



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



Universidad
Nacional
de Quilmes

Romanowski, Andrés

Ritmos circadianos y estrés 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:

Romanowski, A. (2018). *Ritmos circadianos y estrés 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/20.500.11807/805>

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

Ritmos circadianos y estrés en *Caenorhabditis elegans*

TESIS DOCTORAL

Andrés Romanowski

aromanowski@unq.edu.ar

Resumen

En este trabajo se propone: evaluar los ritmos circadianos en el nematodo *C. elegans*, en particular en lo que se refiere a su respuesta a cambios ambientales, evaluar la presencia de ritmos en el sistema de regulación del estado redox y estudiar el mecanismo por el cual el reloj dispersa los ritmos a todo el organismo.

Director: Dr. Diego A. Golombek

Índice

Contenido	Página
Agradecimientos	5
Objetivos	7
I. Introduccion general	8
Ritmos biológicos	9
Organización del sistema circadiano	11
El ambiente rítmico y el estrés	12
Organismos modelo utilizados en cronobiología	13
El reloj de los invertebrados	16
Buscando el reloj interno, componentes moleculares del reloj	17
El modelo de estudio, <i>Caenorhabditis elegans</i>	19
Ecología de <i>C. elegans</i>	20
El sistema nervioso de <i>C. elegans</i>	24
Ritmos circadianos en <i>Caenorhabditis elegans</i>	25
Registros del movimiento y ritmos de actividad locomotora en <i>C. elegans</i>	25
Genes de <i>Caenorhabditis elegans</i> homólogos a genes reloj de insectos	29
Capitulo 1. Ritmos circadianos de respuesta a estrés abiótico	32
Introducción	32
Materiales y métodos	35
Resultados	38
Discusión	45
Capitulo 2. Ritmos circadianos de respuesta a estrés biótico	49
Introducción	49
Materiales y métodos	52
Resultados	56
Discusión	65
Capitulo 3. Estado Rédox y ritmos	72
Introducción	72

Materiales y métodos	79
Resultados	83
Discusión	93
Capítulo 4. Modulación de ritmos de actividad locomotora en <i>C. elegans</i> por factores ambientales	99
Introducción	100
Materiales y métodos	105
Resultados	108
Discusión	124
Conclusión General	127
Anexo. Estudios bioinformáticos	131
Introducción	131
Materiales y métodos	140
Resultados y discusión	142
Bibliografía	156



"No es necesario
decir todo lo
que se piensa, lo
que si es
necesario es pensar
todo lo que
se dice."

Agradecimientos

A todos aquellos que supieron brindarme el apoyo que necesité en este largo viaje que comenzó en el año 2007. Antes que nada quiero agradecerle a mi familia, que siempre estuvo al lado mío, en los momentos fáciles y difíciles. En particular, a mi mamá, Silvia; mi hermano, Pablo; mi hermana, Vero (la Petu); y la abuela (Aba).

A mi novia, Euge, compañera en la ciencia y en la vida, que estuvo a mi lado en la rutina diaria del laboratorio y en nuestra casa.

Debo mencionar también a mi papá Victor y mi abuelo Nicolás.

A mis amigos de toda la vida, Martín, David y Guille, que supieron acompañarme y entender que la tesis a veces hacía complicadas las juntadas y, también por las charlas acerca de la vida, tanto cuando hablamos de cosas sin sentido como de aquellas que importan.

A mis amigos y compañeros de laboratorio. Todos los CRONOS (y ex CRONOS): a Diego, Juli, Viru, Pato, Santi, Lea, Pato O, Pao, Juan, el Flaco, José, Naty, Male, Ivis, Fer, Lu, Mica, Sole y Agus. Y por supuesto a los gusanólogos: Sergio, Lau, Agustín, Euge y mi hermana adoptiva, la pequeña Anas. Con ellos hemos compartido, sufrido, llorado, reído, comido (sí, mucha comida) todos los días de esta presente tesis. Sin ellos el día a día no habría sido llevadero. Ustedes saben que son mucho más que compañeros de laboratorio. Son amigos.

A toda la gente de los pasillos de laboratorios de la UNQ. Especialmente, a los ONCOS, la gente de Ingeniería, Inmuno y el PIIB, con los que hemos compartido fiestas, charlas, risas, partidos de fútbol y más de algún reactivo (jeje). Vale, Georgi, Juan, Fer, Marian, Hernán, Gise, Pablo, Lau O, la Pochi, Romi, Lean, Antonio, Claudio, Marcos, Mariano, Vani, Cris, Sole, Ceci, Mati G, San, Javi, Diego, Beti, Agustín, Sole, Mati L., Facu T, Ale, Marce, Lau y Rosana. También a los más recientes, Sole, Rocío, Andrea, Noe, Facu, Chris y Gonza.

También quiero agradecerles a Bruno, Silvia, Guada y Ale de la Secretaria del Depto., siempre dispuestos a ayudar y a compartir algún que otro mate.

Como olvidarme de todas las personas con las que hemos compartido aulas, dando clases de Química 1, Taller de Química, Fisicoquímica e Introducción a la Biología Celular y Molecular.

Por supuesto quiero agradecerle a la UNQ, por mi formación profesional y más que nada a Diego, por haber puesto su confianza en mí y haberme dado la oportunidad de realizar mi tesina de grado y luego mi tesis doctoral. Por haberme enseñado a “*escribir y leer*” papers y la tesis.

Y, por supuesto, a CONICET, UNQ, AGENCIA, CIC y CEDIQUIFA, por el apoyo económico brindado a lo largo de estos años.

Pero especialmente, quiero agradecerle a mi abuela, “la Berti”, a quien deseo

dedicarle esta tesis.

A todos Uds., gracias!



Objetivos

Objetivos Generales:

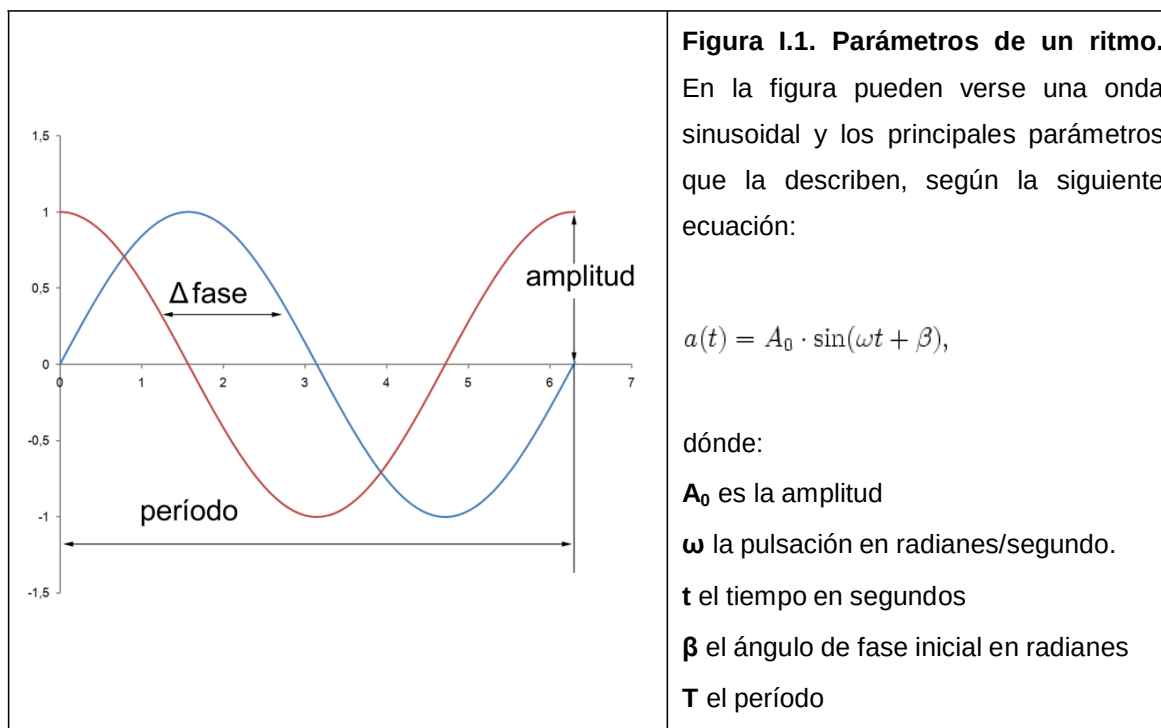
- Evaluar los ritmos circadianos en el nematodo *C. elegans*, en particular en lo que se refiere a su respuesta a cambios ambientales.
- Evaluar la presencia de ritmos en el sistema de regulación del estado redox.
- Estudiar el mecanismo por el cual el reloj dispersa los ritmos a todo el organismo.

Objetivos Particulares:

- Caracterizar la respuesta del nematodo a estrés térmico, osmótico y oxidativo.
- Estudiar la expresión y ritmicidad de genes relacionados con la respuesta a estrés.
- Caracterizar la respuesta de *C. elegans* frente a ensayos de patogenicidad mediada por *P. fluorescens*.
- Estudiar si existen diferencias a lo largo del día en la tolerancia de *C. elegans* frente a la patogenicidad mediada por *P. fluorescens*.
- Estudiar cuales son los metabolitos secundarios responsables de la muerte de *C. elegans*.
- Estudiar si existen diferencias a lo largo del día en la tolerancia de *C. elegans* a los metabolitos secundarios de *P. fluorescens*.
- Estudiar el rol de genes reloj en *C. elegans* en la respuesta a estrés biótico mediante el empleo de líneas mutantes.
- Estudiar el rol de genes de respuesta a estrés en *C. elegans* en la respuesta a estrés biótico mediante el empleo de líneas mutantes.
- Estudiar la actividad enzimática de enzimas relacionadas al estado redox.
- Caracterizar la expresión de genes que codifican para enzimas detoxificantes del estrés oxidativo.
- Caracterizar la expresión de genes relacionados al sistema glutatión.
- Caracterizar la expresión de genes relacionados al sistema tiorredoxina.
- Estudiar el posible rol del péptido PDF (Pigment Dispersing Factor) en la comunicación de los ritmos a todo el organismo.

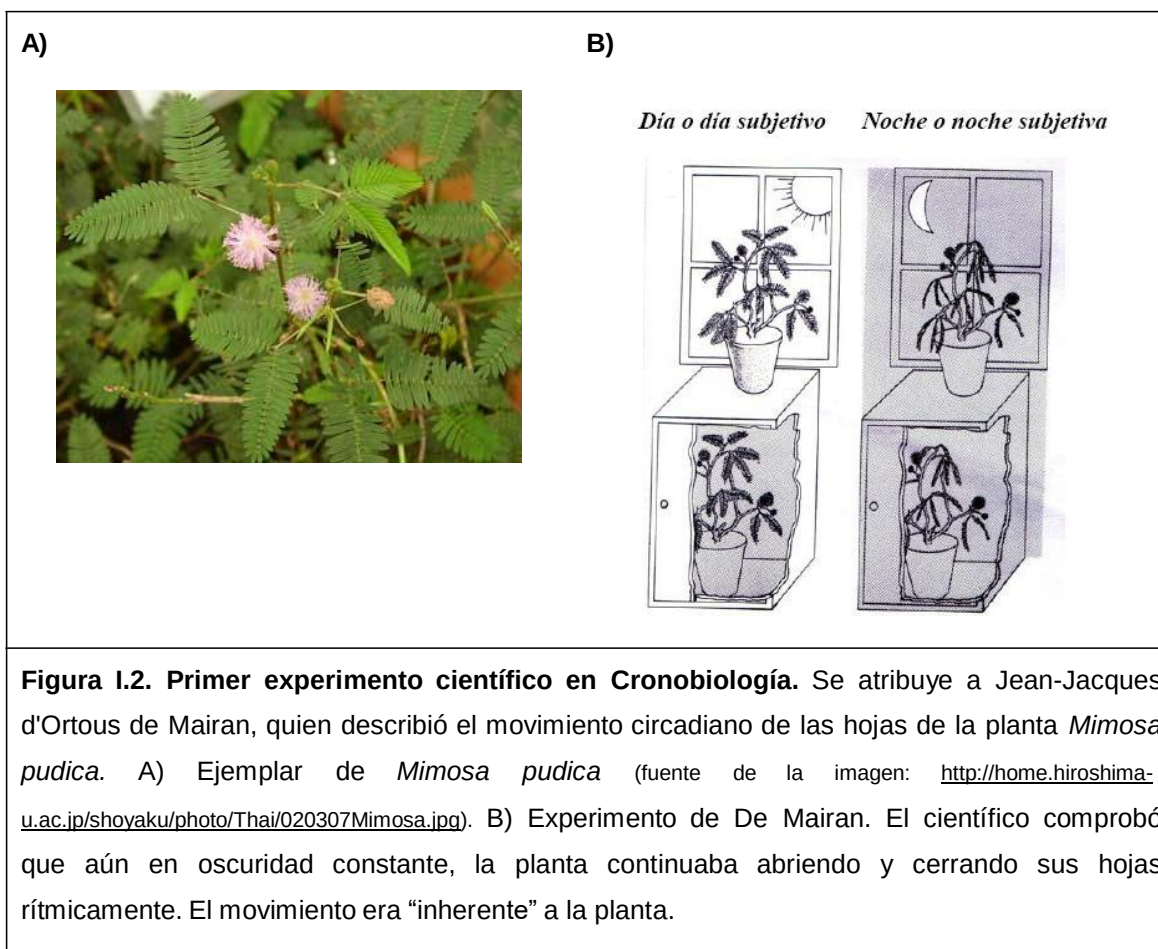
Introducción General

Vivimos en un mundo que gira sobre su eje, dando una revolución completa cada 24 horas. Esto causa cambios en el ambiente que nos rodea, siendo quizás el más evidente la sucesión de los días y las noches. Estos cambios periódicos en diferentes variables ambientales han dejado huella en la evolución de todos los organismos sujetos a ellos, desde las cianobacterias a los seres humanos. Es así que la gran mayoría de los organismos sufren variaciones en sus parámetros fisiológicos a lo largo del día en forma rítmica. Cuando estos ritmos poseen un período cercano a 24 h, estamos ante un ritmo circadiano (del latín *circa* = cerca y *diem* = día, o sea cercano al día). Los ritmos cuyas frecuencias son mayores, son llamados ultradianos (ejemplo: ritmo cardíaco, respiratorio); y, aquellos de menor frecuencia, son llamados infradianos (ejemplo: hibernación, ciclo menstrual). Para caracterizar un ritmo se pueden definir una serie de parámetros: período (T), amplitud (A₀) y fase (β). 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; y la *fase* nos dice en qué momento del ciclo temporal está situada la variable en estudio (Figura I.1) (Golombek 2002; Dunlap, et al. 2004).



Ritmos biológicos

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 cronistas que acompañaba a Alejandro en sus campañas, observó que las hojas del árbol de tamarindo (*Tamarindus indicus*) se elevaban hacia el sol durante el día y se retraían durante la noche. Estas observaciones fueron luego confirmadas en el siglo XVIII por el científico francés Jean-Jacques d'Ortous de Mairan, quien describió el movimiento circadiano de las hojas de la planta *Mimosa pudica* (cuyas hojas se mueven al ser tocadas). De Mairan observó que las hojas de esta planta se mantenían extendidas durante el día y se plegaban durante la noche, lo cual se podía explicar en función de la utilización de la luz del sol como fuente de energía. Pero, además, De Mairan realizó otro experimento: colocó la planta dentro de un gabinete donde no llegaba la luz solar y observó que las hojas de la planta se seguían moviendo (Figura I.2). Así demostró que los ritmos circadianos son capaces de mantenerse aun cuando no existen señales del ambiente (Golombek 2002).



Este primer experimento cronobiológico, 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.

Entre otros notorios experimentos se encuentran algunos como los de De Monceau, que demostró que los movimientos de las hojas de la planta *Mimosa pudica* no se debían a cambios en la temperatura ambiente, o los de De Candolle, que demostró que el movimiento de las hojas bajo condiciones constantes no seguían un período de 24 h, sino de 22-23 h. Incluso Darwin propuso en su libro *“El poder del movimiento en las plantas”* (1880) que los ritmos observados eran una propiedad inherente a las plantas. Este movimiento fue utilizado por un botánico sueco llamado Linneo para confeccionar un reloj floral: Linneo observó que ciertas plantas abrían y cerraban sus flores en diferentes momentos del día y empleó este conocimiento para construir un *“reloj”* con el cual podía saberse la hora, entre las 6 h y las 18 h, de acuerdo a qué flores se encontraban abiertas o cerradas (Golombek 2002) (Figura I.3).

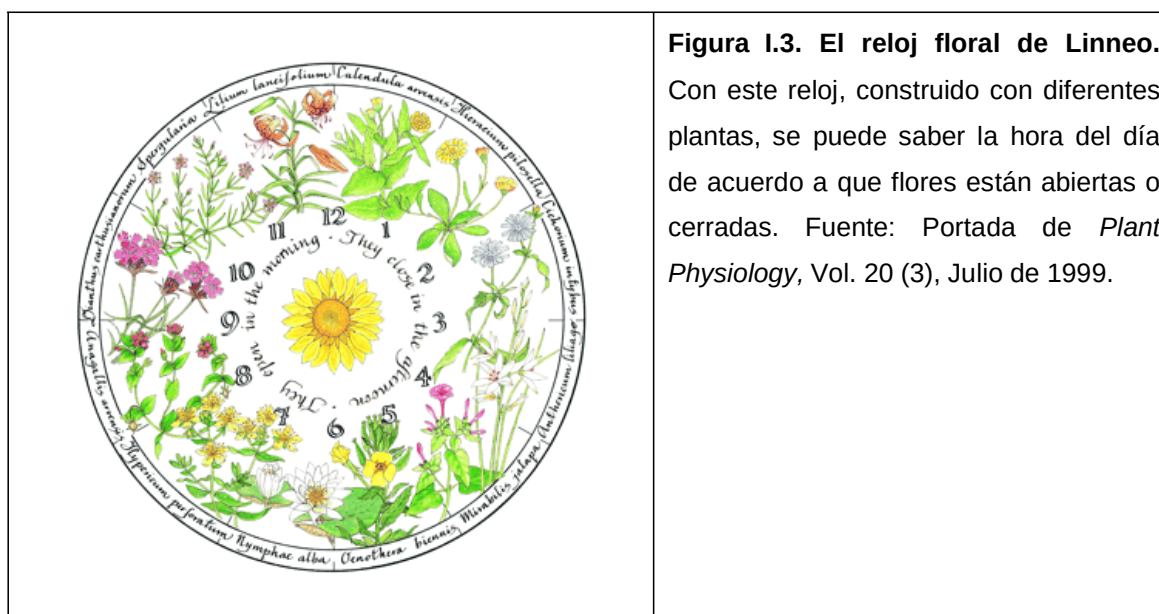


Figura I.3. El reloj floral de Linneo. Con este reloj, construido con diferentes plantas, se puede saber la hora del día de acuerdo a que flores están abiertas o cerradas. Fuente: Portada de *Plant Physiology*, Vol. 20 (3), Julio de 1999.

En el siglo XX, siguieron estudios en abejas realizados por Forel, von Frisch, Beling y Renner (Renner 1960), en los que se demostró que estos insectos poseían una “memoria del tiempo” que los ayudaba a ubicar sus fuentes de alimento todos los días a la misma hora. Incluso se llegó a entrenar abejas para que buscaran alimento a una cierta hora en Alemania, llevarlas a Nueva York y observar si salían a la misma hora. También hubo experimentos con palomas, iniciados por Gustav Kramer, que utilizaban la posición del sol en el cielo para orientarse en sus vuelos (Schmidt-Koenig, et al. 1991).

Esta ciencia se formalizó recién a mediados del siglo XX, con los trabajos de los padres modernos de la Cronobiología: Colin Pittendrigh, que trabajaba principalmente con moscas y pequeños roedores; y Jürgen Aschoff, que investigaba diversas especies de

aves y mamíferos, incluyendo humanos.

Entre los estudios en humanos podemos citar el experimento de William Ogle, quien midió la temperatura corporal en humanos y determinó su ascenso por la mañana antes del despertar y su descenso por la tarde (Golombek 2002).

Luego, en la década de 1960, Jürgen Aschoff y Rütger Wever estudiaron ritmos de temperatura y actividad-reposo en condiciones de aislamiento y descubrieron que el período de estos ritmos era de aproximadamente 25 h (Aschoff 1960, 1967; Aschoff, et al. 1967). Hace poco más de una década el grupo dirigido por Charles Czeisler demostró que el período endógeno es en realidad muy cercano a las 24 h (Czeisler y Brown 1999).

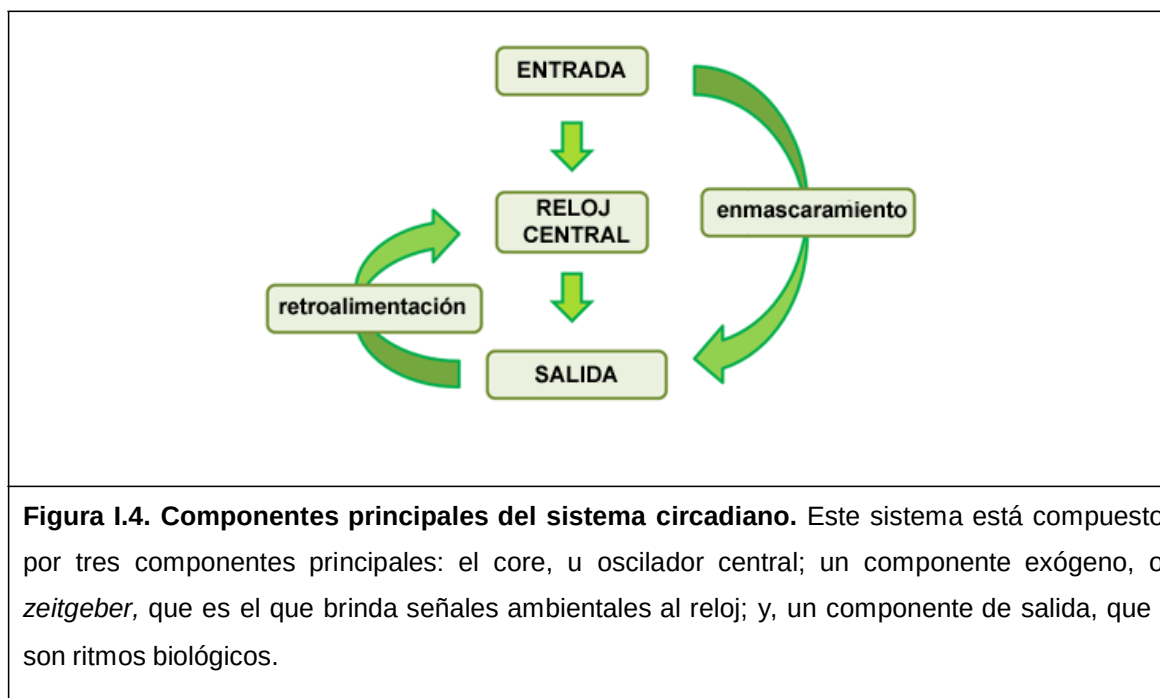
Estos diversos estudios y los que los siguieron comprobaron que los ritmos circadianos dependen de señales externas y pueden ser entrenados (sincronizados) por estímulos como la luz solar (Golombek 2002). Hoy en día se sabe que la mayoría de los organismos estudiados poseen un reloj endógeno que les 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 adecuado. 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.

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 h. Sin embargo, en ausencia de cambios ambientales (o sea en condiciones constantes, también denominadas libre curso o *free running*), la mayoría de las variables fisiológicas siguen siendo rítmicas, lo cual indica la presencia de un reloj endógeno que las controla. De esta manera, el sistema circadiano se podría resumir en los siguientes componentes: un componente exógeno o “*input*” (dador del tiempo, o *zeitgeber*), un reloj biológico o “*core*” y los ritmos biológicos o “*output*” (Moore 1983; Moore y Card 1985; Morin y Allen 2006). (Figura 1.4). Sin embargo, los diversos componentes interactúan entre sí, pudiendo los ritmos retroalimentar la actividad del reloj o los componentes exógenos afectar directamente a los ritmos, pasando por alto al reloj.

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).



Para que un ritmo sea considerado circadiano, debe cumplir 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 (Pittendrigh 1960), siendo el más importante el ciclo de luz: oscuridad.

El ambiente rítmico y el estrés

En la naturaleza existen diferentes ritmos de 24 h. Los medioambientes no son estáticos en este sentido, sino que son completamente dinámicos. Ya sea que estemos hablando de variables inanimadas (agentes abióticos) o de seres vivos (agentes bióticos), siempre encontraremos que existen cambios a lo largo del día. Entre las variables abióticas podemos nombrar todas aquellas que están marcadas por la sucesión de los días y las noches: el ciclo de luz:oscuridad, ciclos de temperatura, de radiación UV, de humedad, ciclos de generación de ROS, ciclos de consumo y generación de oxígeno (Aschoff 1960; Pittendrigh 1960; Roenneberg y Merrow 2002; Dunlap, et al. 2004; Eisensamer y Roenneberg 2004; Hut, et al. 2012). Entre las variables bióticas, podemos nombrar la presencia o ausencia de un organismo patógeno, los ritmos de crecimiento de organismos patógenos o incluso los

ritmos de virulencia de los mismos (Johnson 2007; Carneiro, et al. 2009; Soriano, et al. 2010). Estos cambios afectan a la fisiología de los organismos, causándoles un “estrés”.

Consideramos estrés a todo estímulo nocivo para un organismo. En este sentido, los organismos son capaces de hacer frente a diferentes tipos de estrés, siempre y cuando estos se encuentren dentro de los umbrales fisiológicamente tolerables. Es así que los cambios en las variables del medioambiente son capaces de causar estrés en los organismos. Como estos niveles de agentes estresantes varían a lo largo del día, los organismos que poseen un reloj biológico son capaces de predecir estos cambios y modificar sus mecanismos de defensa de manera acorde. Junto con la actividad locomotora, la tolerancia a estrés suele ser una clásica manera de medir la existencia de ritmos circadianos en distintos organismos (Engelmann 1988; Rensing y Monnerjahn 1996; Hardeland, et al. 2003; Krishnan, et al. 2008; Loudon 2012).

Un caso especial de estrés es el oxidativo. Se presume que hace 2500 millones de años ocurrió un gran evento de oxigenación, con la aparición de los primeros organismos fotosintéticos y los organismos aeróbicos. Estos organismos causaban ciclos en la producción y consumo de oxígeno y en la generación de especies reactivas del oxígeno. Esto causó alteraciones en el balance redox de los organismos y se presume que dio origen a un reloj redox ancestral capaz de predecir y proteger a los organismos de dichos cambios (Edgar, et al. 2012; Loudon 2012).

Organismos modelo utilizados en cronobiología

Se han empleado diferentes organismos modelos para estudiar las ventajas adaptativas de poseer un reloj biológico endógeno, capaz de predecir cambios en la naturaleza. Estos sistemas nos ayudan a descifrar y entender los mecanismos moleculares del reloj circadiano, mediante estudios de biología comparativa.

La planta dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* es un organismo modelo ampliamente utilizado para el estudio de ritmos circadianos. La forma tradicional de estudiar ritmos en plantas ha sido a través del movimiento de las hojas, pero prontamente se extendió el estudio a diferentes comportamientos como germinación, crecimiento, actividad enzimática, movimiento estomatal, actividad fotosintética y apertura de flores. Sin embargo la existencia de técnicas de genética directa y técnicas de biología molecular son las que sellaron su rol en el estudio de ritmos biológicos (McClung 2006).

Las cianobacterias se encuentran entre los organismos que se han convertido en modelo para el estudio de los ritmos circadianos en procariotas. Algunas de sus características son su pequeño tamaño genómico, la facilidad con la que pueden ser manipuladas genéticamente (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).

El hongo filamentoso *Neurospora crassa* es un organismo modelo que ha sido extensamente caracterizado cronobiológicamente. Esto se debe tanto a la posibilidad de poder registrar fácilmente su comportamiento circadiano, como así también a la existencia de técnicas moleculares y genéticas para su estudio (Heintzen y Liu 2007). El método que comúnmente es utilizado para poder estudiar el comportamiento circadiano de *N. crassa* consiste en cultivar a los hongos en un tubo de vidrio, que permite visualizar la producción de conidios (Loros y Dunlap 2001).

Otro caballito de batalla, ampliamente utilizado en estudios cronobiológicos, es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Ashmore y Sehgal 2003). Su genoma totalmente secuenciado y 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. 2002).

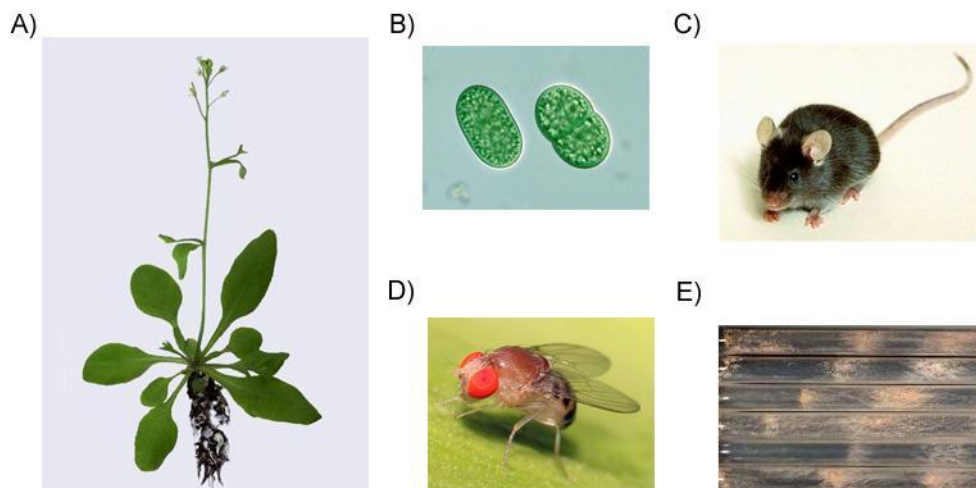


Figura 1.5. Algunos de los organismos modelo empleados en estudios cronobiológicos. A) La planta dicotiledónea, *Arabidopsis thaliana*; B) Las cianobacterias, *Synechococcus elongatus*; C) El ratón, *Mus musculus*; D) La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*; E) El hongo, *Neurospora crassa*.

El ratón común (*Mus musculus*) es uno de los modelos vertebrados más extensamente utilizado en el estudio de los ritmos circadianos. Su genoma completamente secuenciado, su relativamente corto período 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 (Ko y Takahashi 2006).

Si bien no se puede considerar un organismo modelo específico en aves, sí cabe mencionar el hecho de que su estudio indica la particularidad de la presencia de fotorreceptores extraoculares en la glándula pineal y el cerebro. De esta manera muchas células pueden ser sincronizadas de manera directa por un ciclo de luz: oscuridad. Además se sabe que algunas moléculas involucradas en fotorrecepción en mamíferos, parecen estar involucradas en la magnetorrecepción en aves (Cassone, et al. 2009).

Un organismo modelo muy utilizado, inicialmente en el área de las neurociencias, pero ahora empleado como modelo de estudios genéticos, envejecimiento, biología molecular y genética del desarrollo es el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Su corto período de vida, facilidad de cultivo y manteniendo, el mapeo completo de sus conexiones neuronales, su genoma totalmente secuenciado, y la disponibilidad de un sinnúmero de líneas mutantes a través del *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), hacen de este nematodo un modelo ideal de estudio para interacciones entre genes, comportamiento y circuitos neuronales (Brenner

1974; Riddle, et al. 1997; Ruvkun 1997). 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).

El estudio individual y comparativo de todos estos organismos modelo nos permite conocer en detalle la anatomía y fisiología de los relojes circadianos, así como también descifrar y entender los mecanismos moleculares mediante los cuales operan.

El reloj de los invertebrados

En la mayoría de los animales, el reloj biológico central está localizado en el cerebro. Las moscas de la fruta fueron uno de los primeros animales donde se descubrió la ubicación específica del reloj circadiano (Helfrich-Forster, et al. 1998). El reloj biológico de los insectos está anatómicamente y funcionalmente conectado a órganos fotorreceptivos, que le permiten sincronizarse al ciclo luz:oscuridad ambiental; posee diferentes mecanismos de salida que controlan funciones endocrinas, metabólicas y de comportamiento y está compuesto por poblaciones de neuronas con diferente morfología, fisiología y contenido en neurotransmisores (Helfrich-Forster 2004).

En una gran variedad de insectos (escarabajos, cucarachas, grillos y moscas) el reloj circadiano central se localiza en una región específica del cerebro denominada médula 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. 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). En la mosca de la fruta *D. melanogaster* la región del cerebro responsable de los ritmos circadianos también ha sido caracterizada (Figura 1.6). 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 (ND₁ y ND₃). 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).

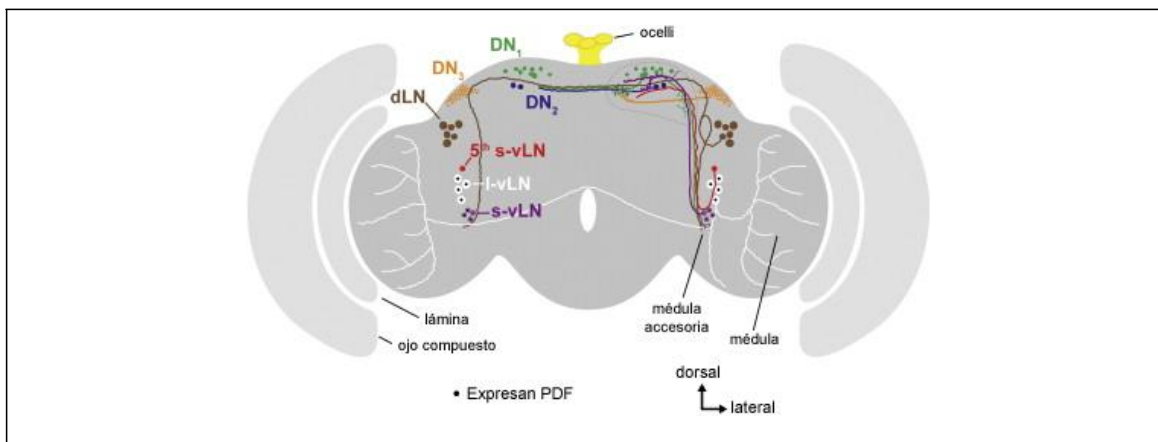


Figura I.6. Localización del reloj circadiano en el cerebro de insectos. El reloj biológico central de una gran variedad de insectos se localiza en una región específica del cerebro denominada medula accesoria (AME), ubicada en la base del lóbulo óptico. En la figura se observa un esquema del cerebro de *Drosophila melanogaster*. Las neuronas que expresan PDF están marcadas con un punto negro en el soma. DN: Neurona dorsal; LN; Neurona lateral; s-vLN: Neurona ventrolateral pequeña; l-vLN: Neurona ventrolateral grande. Adaptado de (Tomchik y Davis 2008)

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 insectos se encuentran conservados en la mayoría de los organismos.

Buscando el reloj interno, componentes moleculares del reloj

El reloj biológico tiene su base molecular en la actividad de factores proteicos que se regulan por lazos de transcripción-traducción retroalimentados (Golombek 2002; Leloup y Goldbeter 2003; Dunlap, et al. 2004). Los principales genes y proteínas involucrados en el reloj han sido identificados en diversos organismos: en mamíferos (Ko y Takahashi 2006), insectos, como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Claridge-Chang, et al. 2001), hongos (Loros y Dunlap 2001), plantas (Millar y Kay 1997) y bacterias (Kondo y Ishiura 2000). Los genes por sí solos no determinan el período del reloj, sino que existen además redes neuronales acopladas como sistemas, que darán finalmente el período del reloj biológico (Golombek 2002; Dunlap, et al. 2004; Herzog y Taghert 2010; Vasalou, et al. 2011).

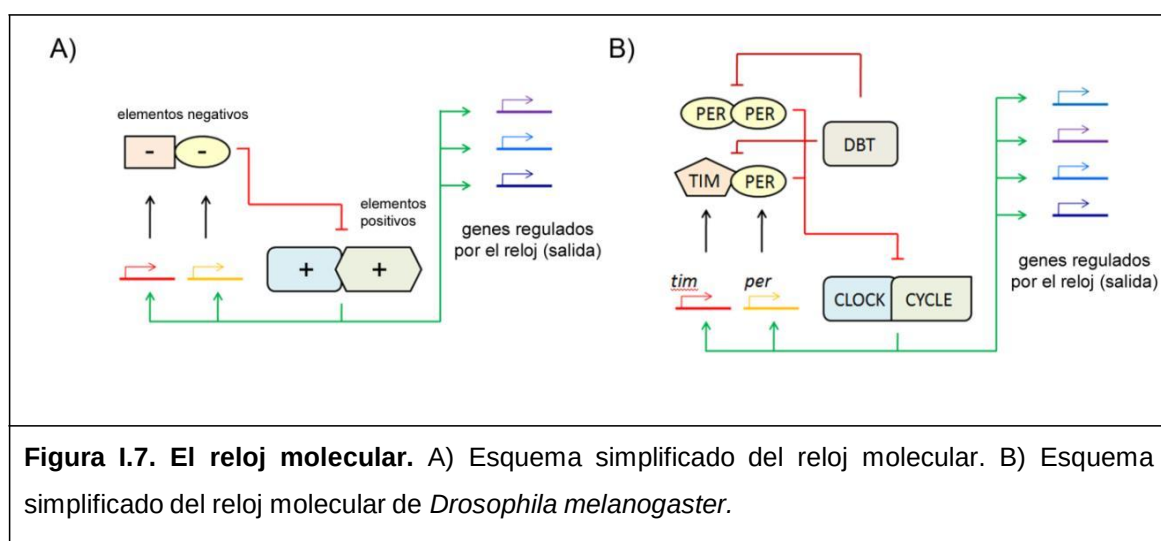
Estos lazos de transcripción-traducción retroalimentados están regulados por moduladores positivos y negativos, que aumentan o reprimen la expresión de su

blanco. 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 I.7A).

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 denominó *Period* (*Per*) (Konopka y Benzer 1971; Bargiello, et al. 1984; Zehring, et al. 1984).

En el caso de *Drosophila* el reloj central está compuesto por los factores positivos Clock (CLK) y Cycle (CYC), y los factores negativos Period (PER) y Timeless (TIM). Durante el día, un heterodímero de Clock y Cycle activa la transcripción de los genes *per* y *tim*. Así, a partir de los productos formados, se crean dímeros diversos como PER-PER y PER-TIM, que entran al núcleo hacia el anochecer. Estos dímeros interfieren con la acción de CLK-CYC y reprimen la síntesis de los genes *per* y *tim*. A medida que el tiempo pasa, estos dímeros se degradan y el heterodímero CLK-CYC vuelve a actuar, estimulando una vez más la síntesis de *per* y *tim* para reiniciar el ciclo.

La proteína DoubleTime (DBT), también regula al reloj marcando a los monómeros de PER para su degradación en el citoplasma. Cuando llega el día, el Criptocromo (CRY) es activado e induce la degradación de la proteína Timeless del dímero Per-Tim. Entonces, DoubleTime se encarga de hacer lo mismo con Per y es así como se logra la degradación de los dímeros Per-Tim una vez que han cumplido su función represora (Claridge-Chang, et al. 2001) (Figura I.7B).

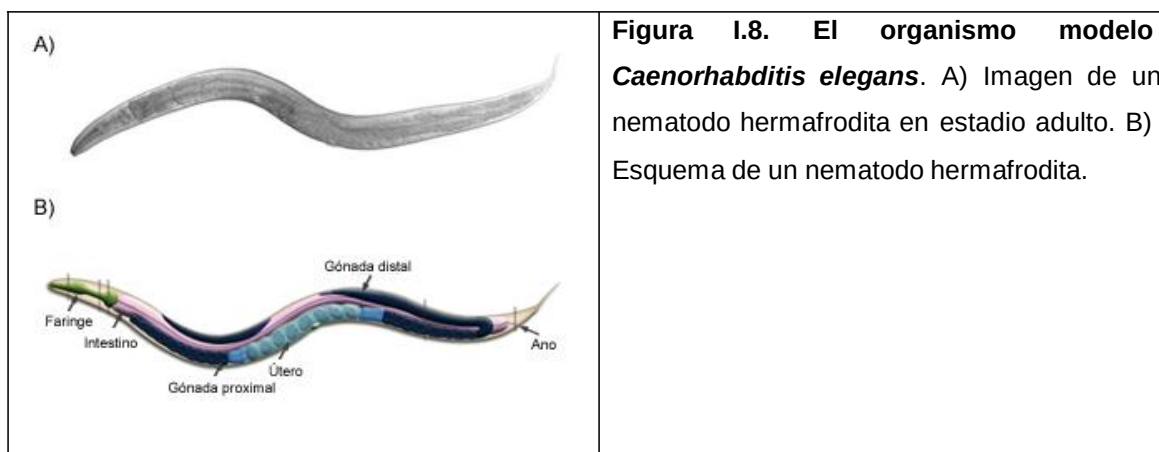


Este mismo circuito es capaz de controlar la expresión rítmica de otros genes (*cgc*, *clock-controlled genes*), en cuyos promotores también se encuentren secuencias activadas por el dímero CLK-CYC.

Si bien existen evidencias de que este oscilador molecular se encuentra conservado a lo largo de la historia evolutiva, no se conoce su accionar particular en modelos de interés para la neurociencia y la biología molecular, como el caso del nematodo *C. elegans*.

El modelo de estudio, *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un nematodo del suelo, ampliamente utilizado en diferentes áreas de investigación, tales como neurociencias, genética, biología molecular, desarrollo y envejecimiento. Entre sus numerosas ventajas podemos nombrar que no ocupa mucho espacio (mide 1mm como adulto), tiene un tiempo de generación corto (alrededor de 4 días a 20°C), es hermafrodita, pone alrededor de 300 huevos a lo largo de su vida, se alimenta de *Escherichia coli*, su genoma y el de especies muy cercanas han sido completamente secuenciados, hay una gran variedad de cepas mutantes disponibles, es fácil realizar ensayos de ARNi y su diagrama de conexiones neuronales ha sido completamente caracterizado (Wood 1988; Riddle 1997; Kiontke K 2006) (Figura I.8). Su uso en las neurociencias data de la década de 1970, cuando fue propuesto como modelo de estudio por el científico Sydney Brenner (Brenner 1974), debido a algunas de las características antes nombradas.



Una de las principales ventajas de *C. elegans* es su corto ciclo de vida. A lo largo de su vida, *C. elegans* atraviesa 4 estadios larvales y un estadio adulto (Figura I.9). Una vez puestos los huevos (estadio de gástrula, alrededor de 30 células), los nematodos eclosionan y se convierten en gusanos adultos en 5,5 días a 15°C, 3,5 días a 20°C y 2,5 días a 25°C. Después de aproximadamente 3-4 semanas muere, mostrando signos de envejecimiento. Cada cambio de estadio larval o *molt* está marcado por un cambio de cutícula (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 nematodos pueden entrar en un estadio larval alternativo denominado *dauer* (o también llamado diapausa). Factores del medio ambiente tales como feromonas, ausencia de comida o altas temperaturas, disparan la formación de un estadio larval intermedio, 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. Una vez que las condiciones ambientales son nuevamente favorables, el nematodo *dauer* puede continuar su desarrollo, pasando al estadio de larva L4 (Figura I.9).

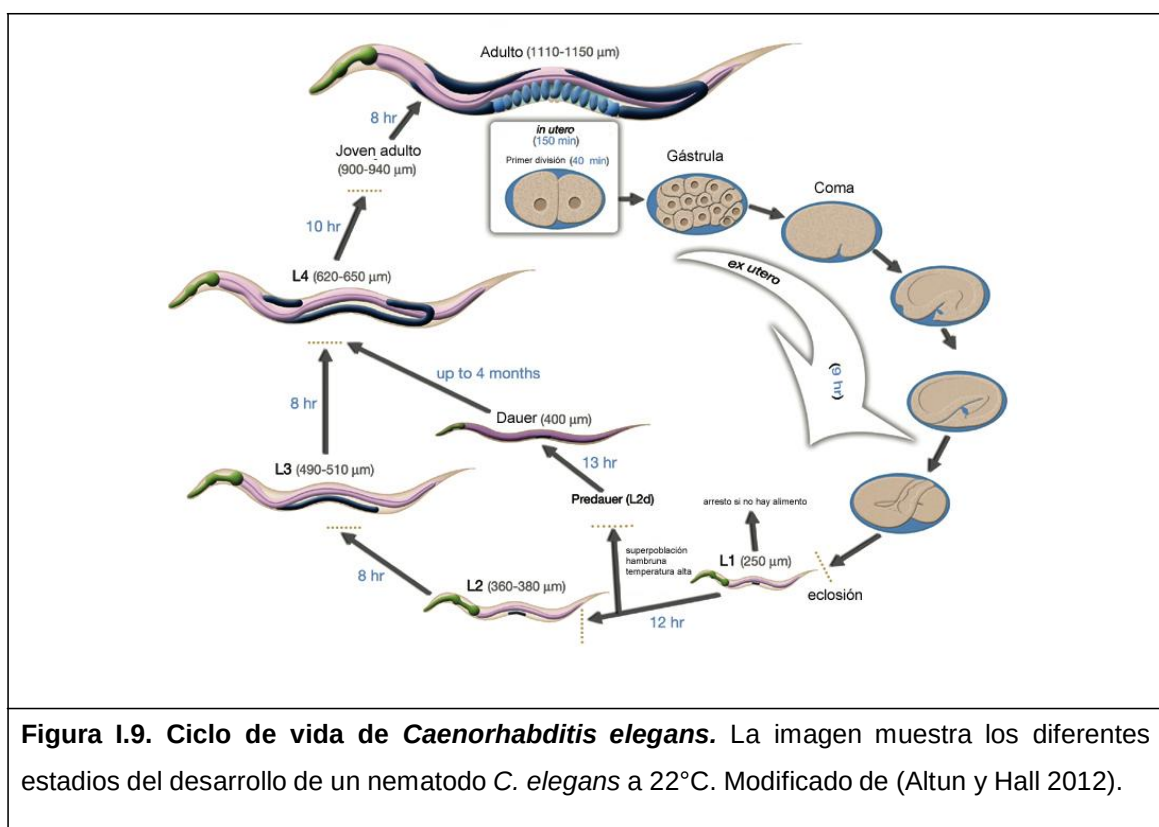


Figura I.9. Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*. La imagen muestra los diferentes estadios del desarrollo de un nematodo *C. elegans* a 22°C. Modificado de (Altun y Hall 2012).

Ecología de *C. elegans*

El género *Caenorhabditis* es morfológicamente similar, pero ecológicamente diverso. Se han descrito 18 especies, de las cuales 6 han sido encontradas solamente 1 vez en la naturaleza. Además, para 13 de estas especies sólo se posee información del lugar de aislamiento (Tabla I.1) (Kiontke y Sudhaus 2006b). Ninguna especie de este género es estrictamente del suelo, en el sentido de que poblaciones en estadio reproductivo sean encontradas solamente allí. Las muestras provenientes del suelo generalmente contienen larvas en estadio *dauer*, las cuales no pasan al estadio reproductivo hasta que se añada

materia orgánica al suelo (Figura I.10). Este recurso es luego consumido rápidamente, dando lugar a explosiones poblacionales. En este sentido, se sabe que el modo reproductivo y el número de espermatozoides de *C. elegans* está optimizado para un crecimiento rápido (Hodgkin y Barnes 1991) y que el pasaje a estadio dauer está controlado por una feromona capaz de sensar sobrepoblación, lo cual sugiere la existencia de poblaciones densas en la naturaleza. Sin embargo, esta alta densidad poblacional es raramente encontrada en poblaciones naturales, las cuales están compuestas por nematodos dauers, con una baja proporción de machos (Barriere y Felix 2005).

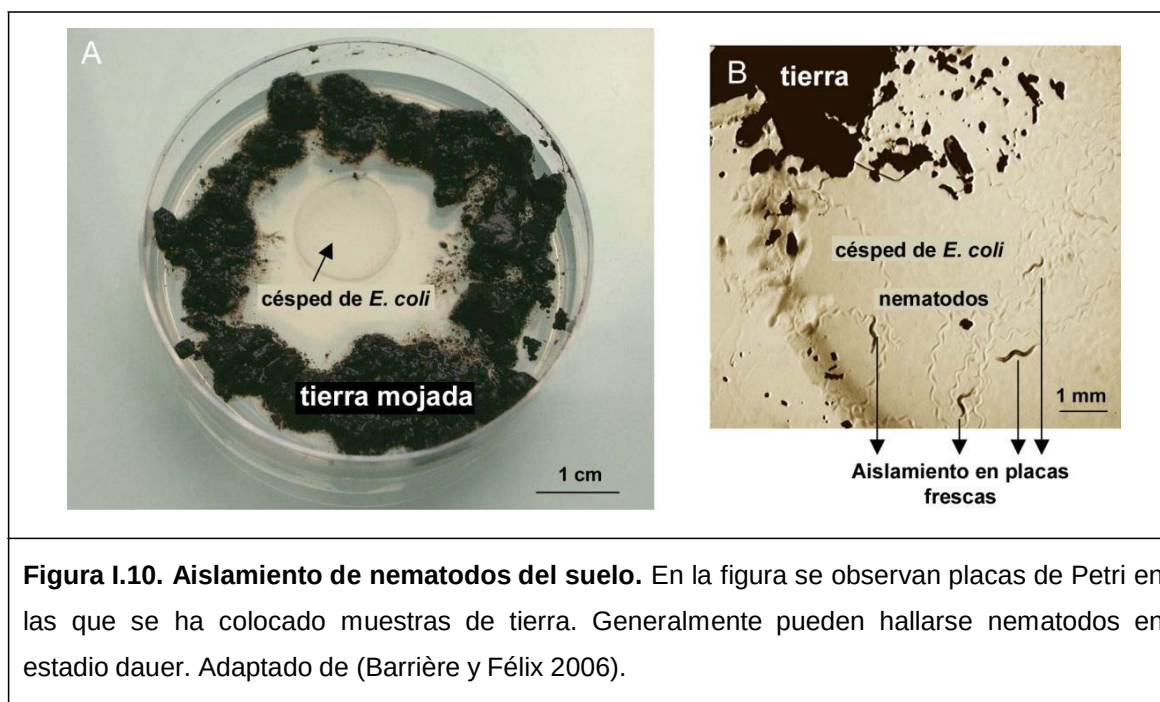
Por otro lado, se conoce poco sobre la dieta natural de *C. elegans*. Aunque crece bien alimentándose de *E. coli*, esta no es su fuente natural de nutrientes. Un estudio aisló 10 especies de bacterias coexistiendo con *C. elegans* a partir de compost de hongos. En cultivos monogénicos, 5 de estas especies (géneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*) fueron capaces de sostener el crecimiento y reproducción de los nematodos por varias generaciones. Especies del género *Bacillus* son capaces de mantener el crecimiento, pero no la reproducción y, mezclas heterogéneas de *Bacillus cereus* y *Pseudomonas sp.* son capaces de sostener el crecimiento y reproducción, pero resultan en menores densidades poblacionales que los cultivos monogénicos. La capacidad reproductiva de *C. elegans* varió con la temperatura y la fuente de comida (Grewal 1991). También se ha observado que *C. elegans* es capaz de alimentarse de amebas y moho mucilaginoso (Kessin, et al. 1996).

<i>Especie</i>	<i>Habitat</i>	<i>Asociaciones</i>	<i>Tipo de asociación</i>	<i>Distribución geográfica</i>	<i>Modo reproductivo</i>
<i>C. briggsae</i>	compost, tierra de jardín, bosques	caracoles	necroménico	América del Norte, Europa, Hawai, India, Taiwan, Japón	hermafrodita
<i>C. sp 5</i>	tierra bajo árboles y en compost para flores	?	?	China	gonocrocístico
<i>C. remanei</i>	compost, bosques	isópodos, caracoles	forético (necroménico facultativo?)	América del Norte, Europa, Japón	gonocrocístico
<i>C. sp 4</i>	compost	?	?	Centroamérica, India	gonocrocístico
<i>C. elegans</i>	compost, tierra de jardín	milpies, isópodos, insectos, caracoles y babosas	forético (necroménico facultativo?)	África, Europa, América, Hawai, Asia y Australia	hermafrodita
<i>C. japonica</i>	cadáveres y nidos de escarabajo asociado	escarabajo <i>Parastrachia japonensis</i>	necroménico facultativo	Japón	gonocrocístico
<i>C. perrieri</i>	abono	?	?	África del Norte	hermafrodita
<i>C. auriculariae</i>	hongos (<i>Auricularia polytricha</i>)	?	?	Japón	gonocrocístico
<i>C. anthobia</i>	inflorescencias de <i>Cyrtandra sp.</i>	?	?	Sumatra	gonocrocístico?
<i>C. avicola</i>	intestino de pájaros	<i>Rhyacornis fuliginosus</i>	parasítico?	Taiwán	gonocrocístico
<i>C. fruticicola</i>	en vegetales y caracoles	caracol <i>Fruticicola sieboldiana</i>	forético?	Japón	gonocrocístico
<i>C. bovis</i>	canal auditivo de cebúes y cabras	moscas y cebúes	forético (o ectoparásito?)	África del Este	gonocrocístico
<i>C. sp 3</i>	galerías construidas por escarabajos en cañas de azúcar	escarabajos de la caña de azúcar y de palmas	forético (necroménico facultativo?)	Estados Unidos, Trinidad	gonocrocístico
<i>C. drosophilae</i>	cactus Saguaro en descomposición	<i>Drosophila nigrospiracula</i>	forético	Estados Unidos	gonocrocístico
<i>C. sp 2</i>	cactus <i>Opuntia</i> en descomposición	<i>Drosophila sp.</i>	forético	Islas Canarias y del mediterráneo, Madeira	gonocrocístico
<i>C. plicata</i>	carroña	escarabajos de la carroña	?	África del Este, Alemania	gonocrocístico
<i>C. sonoreae</i>	cactus Saguaro en descomposición	?	?	Estados Unidos	gonocrocístico
<i>C. sp1</i>	hongos creciendo en árboles	escarabajos <i>Cis nitidus</i>	?	Alemania	gonocrocístico

Tabla I.1. Información ecológica de las especies de *Caenorhabditis* más conocidas. En la tabla se describe el lugar de aislamiento, especies asociadas, distribución geográfica y modo de reproducción de las diferentes especies del género. Adaptado de (Kiontke y Sudhaus 2006b).

Muchas especies del género se han encontrado asociadas a invertebrados. Existen dos tipos de asociaciones, necroménica y forética. El primer tipo de asociación es aquella en la cual los nematodos esperan a que el huésped muera y luego se alimentan de él. En la segunda, el huésped es utilizado simplemente como un medio de transporte (Bovien 1937; Schulte 1989; Sudhaus y Schulte 1989; Richter 1993; Kiontke 1997). En la mayoría de estas asociaciones, los nematodos en estadio dauers exhiben un comportamiento que facilita el contacto con los huéspedes. En este comportamiento, conocido como *waving*, los nematodos dauer se paran sobre la punta de la cola y mueven el cuerpo de un lado a otro. Se ha hallado a *C. elegans* asociado a isópodos, milpiés y otro artrópodos, caracoles y babosas (Kiontke y Sudhaus 2006b).

De acuerdo a su ecología, los nematodos están clasificados en grupos. *C. elegans* es parte del grupo “Elegans”, junto a *C. remanei* y *C. briggsae*. Estas tres especies ocurren en hábitats antropogénicos y es muy probable que co-ocurran; se han encontrado *C. elegans* junto a *C. briggsae* en compost en Francia; *C. briggsae* junto a *C. remanei* en un bosque de Ohio, Estados Unidos; y *C. remanei* junto a *C. elegans* en compost en Berlin, Alemania. Es muy raro encontrar a *C. elegans* fuera de hábitats antropogénicos, aunque recientemente se ha logrado aislarlos de suelo superficial orgánico y asociado a caracoles en un parque estatal de Oregon, Estados Unidos. Su hábitat natural original permanece casi completamente desconocido.



El sistema nervioso de *C. elegans*

El sistema nervioso es el órgano más complejo de *C. elegans*. Aproximadamente un tercio de las células de estos organismos son neuronas (302 de un total de 959 células, en los hermafroditas). Veinte de estas neuronas están situadas dentro de la faringe; el resto de las 282 neuronas están localizadas en el anillo neuronal de la cabeza, el ganglio de la cola, y también a lo largo del cordón ventral, que constituye el principal tracto axónico longitudinal. La mayoría de las neuronas se desarrollan durante la embriogénesis, con la excepción de 80 neuronas (principalmente motoneuronas) que se desarrollan post-embrionalmente. La estructura del sistema nervioso ha sido descrita con un detalle sin precedentes mediante la reconstrucción por medio de microscopías electrónicas (White, et al. 1976). La alta resolución de estas imágenes permitió la identificación de todas las sinapsis (alrededor de 5000 sinapsis químicas, 2000 uniones neuromusculares y casi 500 uniones GAP) y mapear todo el conexionado neuronal (Albertson y Thomson 1976; White, et al. 1976; Sulston y Horvitz 1977; Sulston, et al. 1983; White JG 1986).

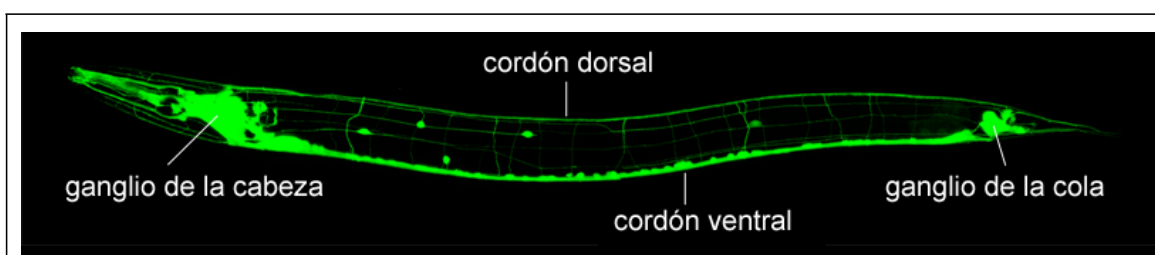


Figura I.11. Sistema nervioso de *C. elegans*. Nematodo transgénico que porta el marcador *unc-119::GFP* con la proteína fluorescente verde. Este marcador se expresa solamente en las neuronas.

(Fuente de la imagen: http://www.sfu.ca/biology/faculty/hutter/hutterlab/research/Ce_nervous_system.html)

La mayoría de las neuronas están localizadas en la cabeza, donde están organizadas en un número de ganglios alrededor de la faringe, formando el “cerebro” del animal. Existen 68 neuronas sensoriales, capaces de detectar varios compuestos químicos solubles y volátiles, estímulos mecánicos, temperatura y, según lo descubierto recientemente, también luz. Estas neuronas sensoriales mandan dendritas a la punta de la nariz, que posee varias estructuras sensoriales. Los axones sensoriales se unen a un gran haz axonal, el anillo neuronal, donde hacen sinapsis con las interneuronas. Algunas de estas interneuronas, a su vez, mandan largos axones a través del cordón ventral que corre a lo largo del animal. Las interneuronas que comandan el circuito motor se conectan a las motoneuronas localizadas en el cordón ventral, y éstas se conectan a las células musculares permitiendo que los

nematodos respondan a las entradas sensoriales cambiando sus patrones de movimiento (Sulston, et al. 1975; Albertson y Thomson 1976; White, et al. 1976; Sulston y Horvitz 1977; Lewis, et al. 1980; Horvitz, et al. 1982; Sulston, et al. 1983; White JG 1986; McIntire, et al. 1993a; McIntire, et al. 1993b; Mori y Ohshima 1995; Nguyen, et al. 1995; Rankin 2002; Hobert 2003; Edwards, et al. 2008; Ward, et al. 2008; Liu, et al. 2010).

Ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans*

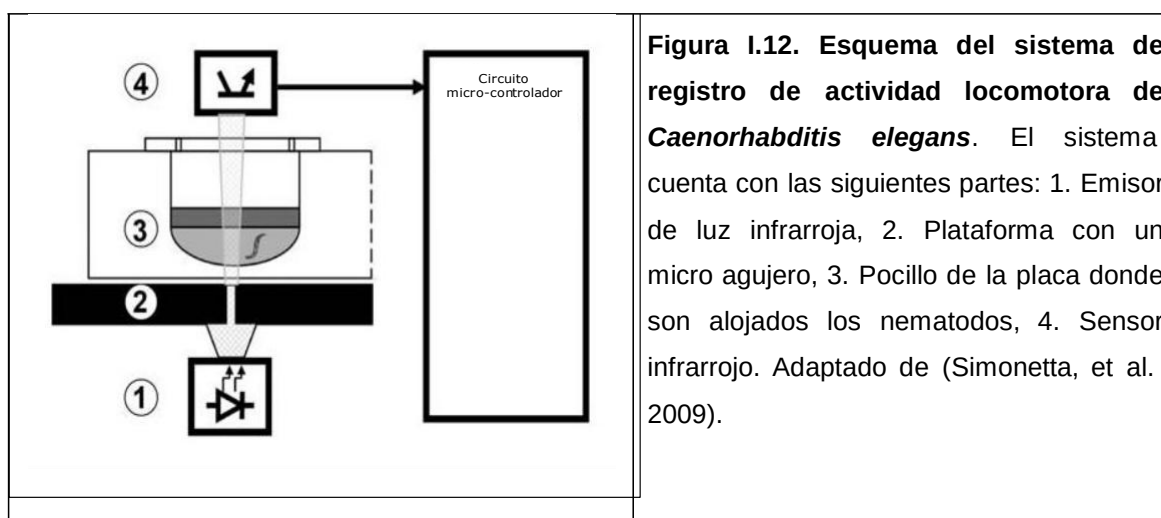
Como ya hemos mencionado, como consecuencia de la rotación de la Tierra, los organismos - desde las cianobacterias hasta los humanos - muestran ritmos circadianos en su fisiología, bioquímica y comportamiento. *C. elegans* es un organismo modelo que es muy utilizado en diversas áreas de investigación, principalmente en genética del desarrollo, pero sólo en años recientes se ha propuesto a este nematodo como modelo en cronobiología. Su corto período 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, en el cual 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, algunos de los cuales serán descritos en los capítulos que siguen (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; Olmedo, et al. 2012).

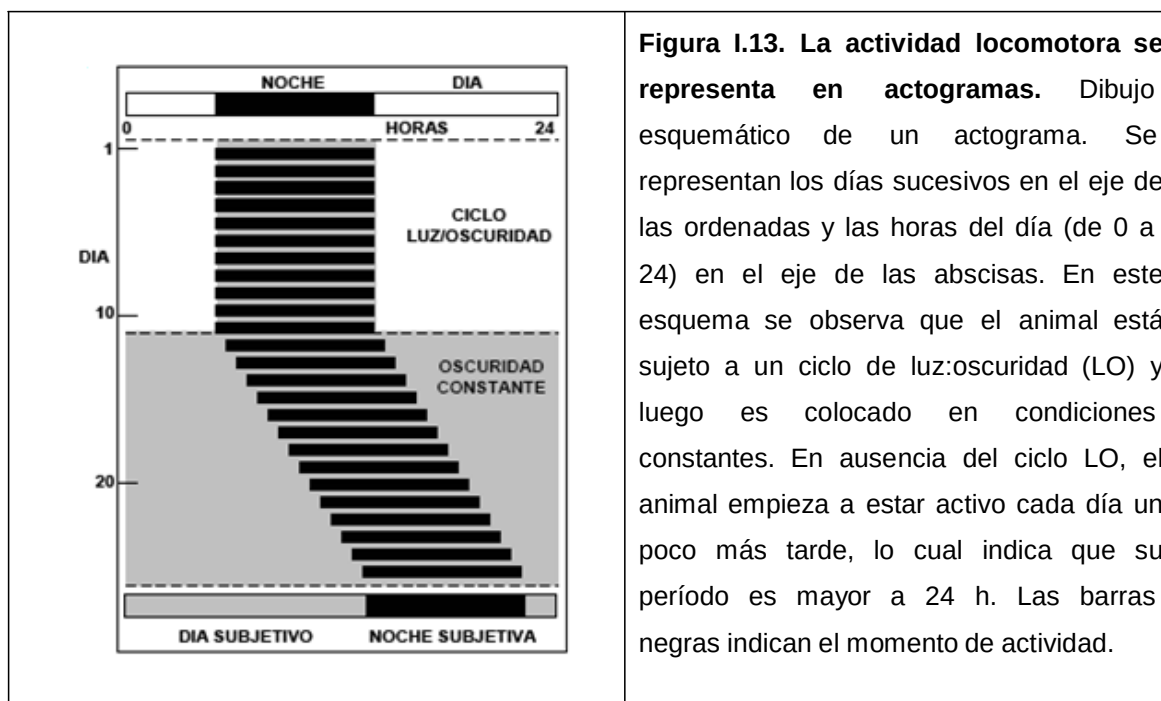
Registro del movimiento y ritmos de actividad locomotora en *C. elegans*

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 en el 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).

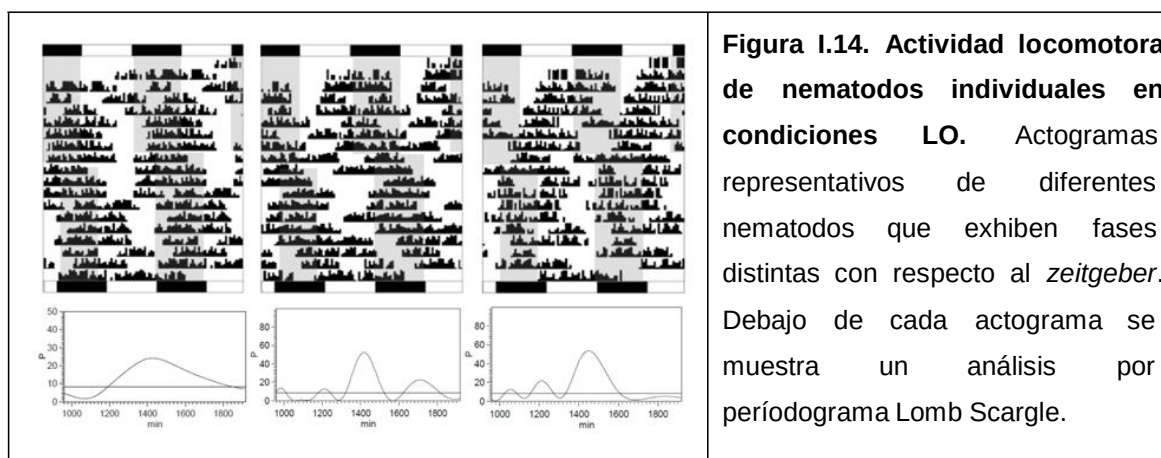
En nuestro laboratorio se desarrolló un sistema capaz de registrar la actividad locomotora de los nematodos en tiempo real y de manera continua (Simonetta y Golombek 2007). El método de registro consiste en cultivar gusanos individuales – o una población de los mismos - en medio líquido, en placas de 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 I.12).



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 I.13). 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 I.13), 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).

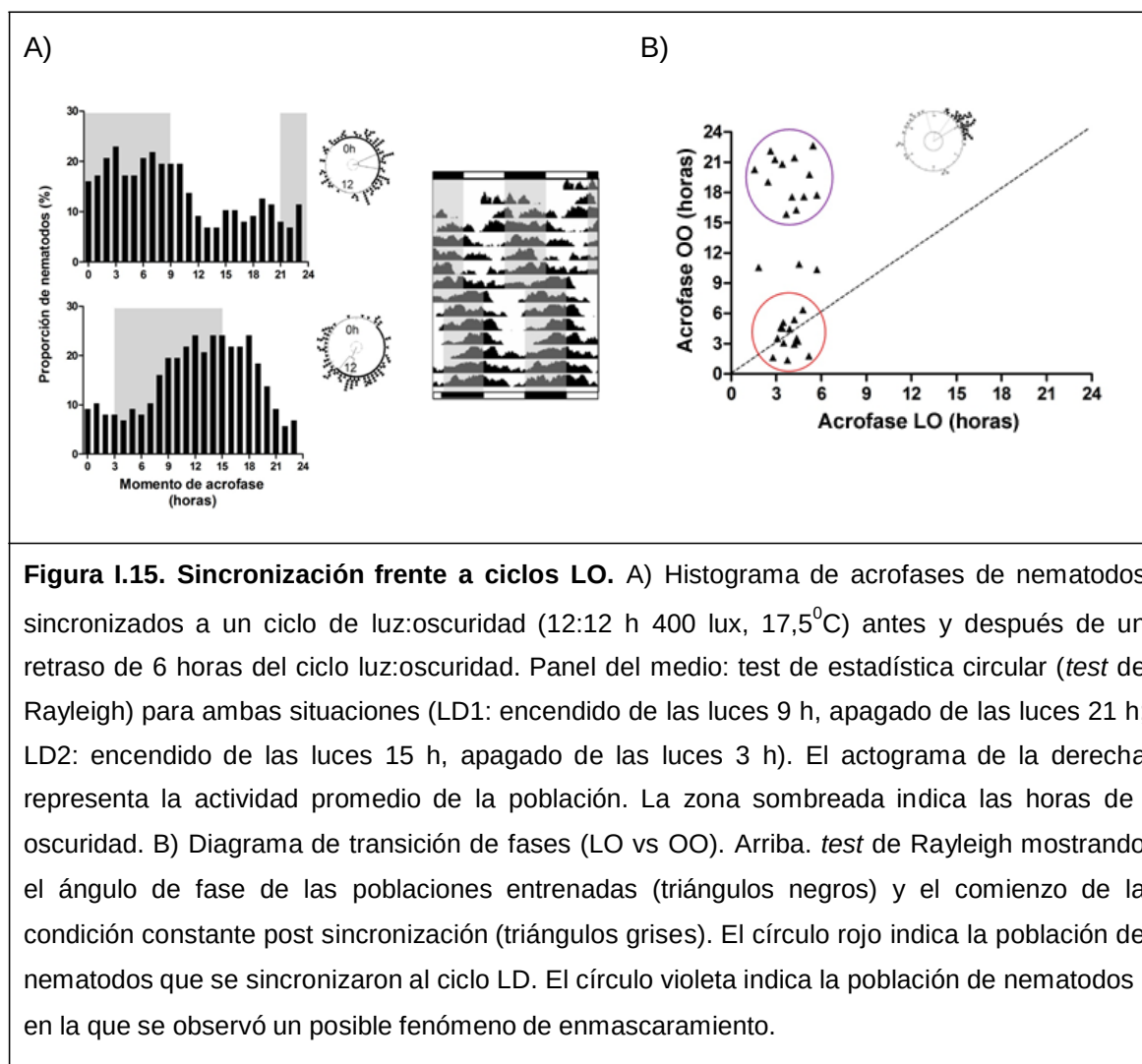


De esta manera, mediante el empleo de este sistema se estudió la actividad locomotora de *Caenorhabditis elegans* en condiciones de luz:oscuridad (LO) y se observó que los nematodos poseen un patrón de actividad de 24 horas cuando son expuestos a un ciclo de luz:oscuridad (luz blanca) de 400 lux. Sin embargo, los análisis mostraban que gusanos individuales entrenaban con diferentes fases con respecto al zeitgeber (Figura I.14).

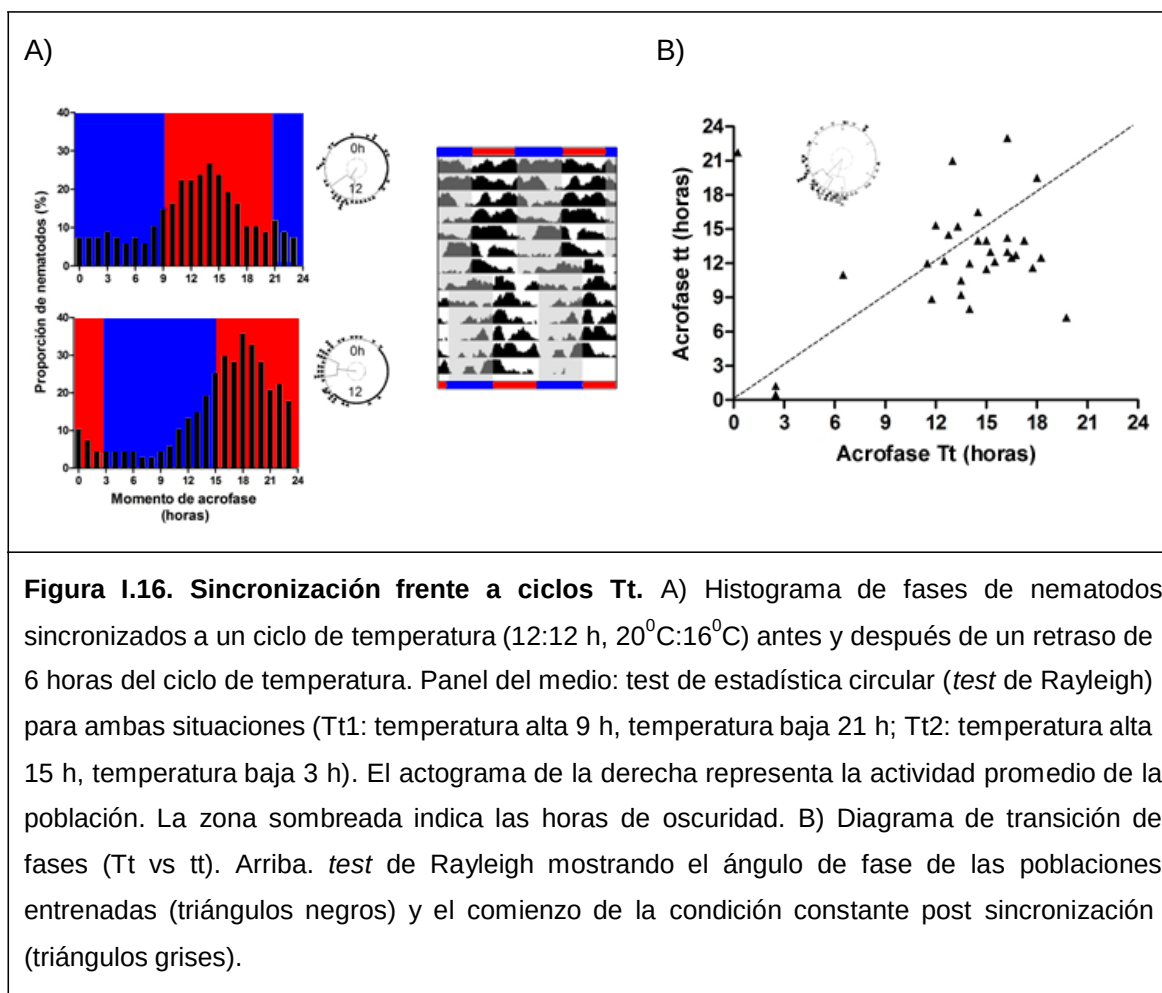


Para solucionar este inconveniente, se registraron ritmos poblacionales y se construyeron histogramas de acrofase. A partir de estos estudios poblacionales, se logró determinar que los nematodos *C. elegans* son capaces de sincronizarse a ciclos de luz:oscuridad (LO) 12 h : 12h (Figura I.15A). Por otro lado, estudios de sincronización mostraron que un 40% de las

poblaciones de nematodos salvajes N2 son rítmicas, pero solo un 9% se sincroniza realmente. Para realizar estos ensayos, luego de que los nematodos estuvieron bajo un ciclo LO se los liberó en condiciones de oscuridad constante (OO). A partir de los actogramas poblacionales, se determinó la acrofase en LO y la acrofase del primer día de OO y se construyeron diagramas de transición de fase. De esta manera, todas las poblaciones situadas sobre la línea a 45° al origen están realmente sincronizadas (Figura I.15B).



De manera similar, se encontró que los nematodos son capaces de sincronizarse a ciclos de temperatura alta: temperatura baja (Tt) 12 h: 12 h (Figura I.16).



Genes de *Caenorhabditis elegans* homólogos a genes reloj de insectos

El mecanismo molecular del reloj de *C. elegans* aún no ha sido dilucidado. Por estudios bioinformáticos se determinó que este nematodo posee genes homólogos a genes reloj de insectos y de mamíferos (Hasegawa, et al. 2005; Temmerman, et al. 2011) (una lista de los genes homólogos a genes reloj de *Drosophila* puede verse en la tabla I.2), pero estos parecen estar involucrados en funciones heterocrónicas (Jeon, et al. 1999; Ambros 2000; Banerjee, et al. 2005).

Un esfuerzo reciente por encontrar el reloj molecular de *C. elegans* no ha aportado resultados conclusivos. En este trabajo se realizó un estudio global a nivel transcriptómico de poblaciones de nematodos mantenidos en condiciones LO y Tt. El análisis de los conjuntos de genes que ciclan en condiciones constantes luego de un ciclo LO o de un ciclo Tt no logró identificar elementos comunes entre ambos conjuntos de datos (van der Linden, et al. 2010). Esto podría querer decirnos que existe la posibilidad de que hayan 2 relojes transcripcionales que coexistiendo en el organismo: uno que regulado por luz y, otro regulado

por la temperatura. Por otro lado el hecho de que se haya utilizado ARN a partir de organismos completos puede estar sesgando los resultados, dando falsos negativos que pueden estar escondiendo la verdadera naturaleza del reloj molecular de estos nematodos.

Nombre del gen	Nombre de la proteína	gen de <i>C. elegans</i>	Porcentaje de homología	valor E	Lazo
per	Period	lin-42	58%	2,00E-14	1er lazo
tim	Timeless	tim-1	52%	5,00E-03	1er lazo
clk	Clock	aha-1	40%	9,00E-10	1er lazo
cyc	Cycle	aha-1	53%	6,00E-52	1er lazo
vri	Vrille	atf-2	85%	2,00E-09	2do lazo
pdp1e	PAR domain protein 1e (isoform J)	ces-2	50%	5,00E-06	2do lazo
	PAR domain protein 1e (isoform D)	ces-2	50%	5,00E-06	
cwo	Clockwork orange	aha-1	50%	6,00E-04	3er lazo
dbt	Doubletime	kin-20	85%	1,00E-141	modulación de per/tim
ck2	Casein Kinase 2 (alpha)	kin-3	83%	1,00E-147	
ck2	Casein Kinase 2 (beta)	kin-10	83%	5,00E-90	modulación de per/tim
sgg	Shaggy	gsk-3	84%	1,00E-145	modulación de per/tim
	PP1-9C (flw)	gsp-1	90%	1,00E-160	
pp1	PP1-13C	gsp-2	94%	1,00E-169	
	PP1-87B	gsp-2	96%	1,00E-171	modulación de per/tim
	PP1-96A	gsp-2	92%	1,00E-192	
pp2a	Protein Phosphatase 2a	pptr-2	84%	0,00E+00	modulación de per/tim
slmb	Supernumerary limbs	lin-23	77%	0,00E+00	modulación de per/tim
cry1	Cryptochrome 1	no hits found	na	na	entrada / degradación de tim
cry2	Cryptochrome 2 (Apis mellifera)	no hits found	na	na	1er lazo?
rh1 (ninaE)	Rhodopsin 1	dop-4	47%	5,00E-21	entrada
rh6	Rhodopsin 6	npr-2	43%	3,00E-14	entrada
rh5	Rhodopsin 5	f41e4.7	47%	6,00E-13	entrada
to	Takeout	c13a2.6	38%	6,60E-01	salida
pdf	Pigment Dispersing Factor	pdf-1	18aa/180	na	salida
		nlp-37	18aa/89	na	
nmo	Nemo	lit-1	79%	1,00E-140	modulación de CLK / PER
slo	Slowpoke	slo-1	72%	0,00E+00	salida
na	narrow abdomen	C27F2 (a y b)	64%	0	salida
lr	Inward rectifier (lr-PB, PC, PD y PE)	M02A10.2 (a y b)	68%	1,00E-101	salida
jet	jetlag (jet-PA y PB)	C02F5.7a	44%	3,00E-13	degradación de TIM
CSN4	COP9 signalosome (con este nombre no aparece es CSNA-PA y PB)	Y55F3AM.15	57%	3,00E-59	degradación de TIM
creb2	cAMP Response Element (crebB-17A)	crh-1	68%	1,00E-12	reloj central
pka	Protein Kinase A (Pka-C1-PA, PB y PC)	ZK909.2h	88%	1,00E-169	salida
ebony	beta-alanyl conjugase synthetase (CG3331-PA)	C41A3.1	41%	2,00E-15	salida
lark	lark (PA, PB, PC, PD y PE)	ZK863.7	66%	3,00E-19	salida
nocte	nocte-PA y PB	no hits found			entrenamiento por temperatura
norpA	phospholipase C (norpA-PA PB, PC, PD y PE)	B0348.4a	65%	1,00E-124	entrenamiento por
Fer2	transcription factor (CG5952-PB)	F48D6.3	73%	3,00E-27	identidad de sLNVs

Tabla I.2. Tabla de genes homólogos a genes involucrados en el reloj de *Drosophila*. En la tabla se indican los genes de *Drosophila*, el nombre de la proteína que codifican, el principal homólogo en *C. elegans* encontrado por el algoritmo BLASTP, el valor E asociado y la función de ese gen en la mosca de la fruta.

La importancia adaptativa de poseer un reloj endógeno radica en que nos permite poder anticiparnos a la naturaleza cíclica del universo. Esta capacidad ha sido estudiada en organismos modelos tales como *Mus musculus*, *Rattus rattus*, *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Synechococcus elongatus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Passer domesticus*, *Gallus gallus*, entre otros. Todos estos sistemas nos permiten conocer la anatomía y el funcionamiento de los relojes circadianos y 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 las neurociencias, la biología del desarrollo, genética, ARNi 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 estudiar los ritmos circadianos de *C. elegans* de tolerancia a diversos tipos de estrés que puede encontrar en su hábitat natural, teniendo en cuenta lo que se conoce

sobre su ecología, así como también cómo es que estos ritmos pueden estar poniéndose en hora a través del ciclo de luz:oscuridad. Las variaciones diarias en el estrés ambiental han forjado la evolución de los organismos y *C. elegans* se presenta como un excelente modelo para estudiar justamente cómo estos cambios han causado adaptaciones en los sistemas de defensa a estrés en el organismo. En este sentido, uno de los objetivos del trabajo es interpretar la ventaja adaptativa que confiere un reloj biológico capaz de predecir estos cambios en las diversas variables cíclicas de su hábitat. La disponibilidad de cepas mutantes a través del Caenorhabditis Genetics Center (CGC), su caracterización genómico y neuronal, su corta longitud de vida y económica manutención, hacen de este nematodo un modelo ideal para estudiar el rol que cumple el sistema circadiano en las interacciones entre un organismo y el medio ambiente en que vive.

Capítulo 1

Ritmos circadianos de respuesta a estrés abiótico

Introducción

Caenorhabditis elegans es un nematodo que habita la capa superior del suelo (Kiontke y Sudhaus 2006a). En este nicho ecológico está sujeto a diferentes cambios diarios en variables ambientales. Estos cambios ambientales están dados principalmente por la sucesión cíclica de los días y las noches, cuyo periodo es el tiempo que tarda nuestro planeta en girar sobre su eje (un periodo de revolución) y es de 24 h. Algunos de estos cambios diarios, en general predecibles, pueden ser nocivos y causar un estrés sobre los nematodos. El concepto de estrés es muchas veces utilizado de manera imprecisa, lo cual puede dar lugar a confusiones. En este trabajo utilizaremos el término estrés para referirnos a cualquier factor externo que pueda afectar negativamente a los nematodos. En particular, en este capítulo vamos a discutir factores ambientales, o abióticos. En la mayoría de los casos (y no sólo en *C. elegans*) el estrés es medido en relación a la supervivencia de un organismo. La habilidad de un organismo para sobrellevar un estrés es llamada *tolerancia al estrés* y también es conocida como *resistencia al estrés*. Ambos términos son empleados en la literatura científica, aunque en este trabajo emplearemos *tolerancia al estrés*.

El estrés ambiental juega un rol importante en la evolución y ecología de todos los organismos. Como los agentes inductores de estrés abiótico varían a lo largo del día, es lógico asumir que los organismos deben ser capaces de predecir estos cambios periódicos para poder sobrevivir. Varias señales ambientales, incluyendo cambios diarios en la temperatura, la intensidad de luz UV o la humedad, podrían guiar o sincronizar las respuestas celulares rítmicas al estrés ambiental. Como la maquinaria de respuesta a estrés está conservada en muchos organismos, es posible encontrar patrones similares de regulación circadiana en diferentes especies. Por ejemplo, las proteínas de respuesta a *shock* térmico (básicamente HSP70 y HSP16) están reguladas por un reloj circadiano en *Synechocystis*, *Neurospora*, *Gonyaulax* y *Drosophila* (Rensing y Monnerjahn 1996; Ceriani, et al. 2002), ya sea a nivel transcripcional o de actividad. Los ritmos en enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa, haloperoxidasa y glutatión peroxidasa, están regulados a nivel de ARNm o de actividad en diversos organismos de varias *taxa*, desde plantas a humanos (Hardeland, et al. 2003).

El hábitat natural de *C. elegans* es el suelo, donde está expuesto a muchos tipos diferentes de agentes estresantes, como estrés abiótico, estrés térmico (ya sea por frío o calor), radiación UV, estrés oxidativo, etc. Si combinamos este hecho con las características descritas en la introducción general, podemos decir que *C. elegans* es un excelente modelo para estudiar interacciones con agentes estresantes ambientales. Esta

declaración se ve reflejada en la amplia variedad de literatura disponible en la tolerancia al estrés mediado por metales pesados (Au, et al. 2009; Chong, et al. 2009; Schwartz, et al. 2010; Tvermoes, et al. 2010; Wang, et al. 2010b; Ye, et al. 2010; Zhang, et al. 2010; Murphy, et al. 2011), estrés osmótico (Lamitina, et al. 2004; Lamitina, et al. 2006; Choe y Strange 2007; Rohlfing, et al. 2010), desecación (Gal, et al. 2005; Erkut, et al. 2011), estrés oxidativo (Gems y Doonan 2009; Van Raamsdonk y Hekimi 2010; Cabreiro, et al. 2011), deficiencia de oxígeno (Powell-Coffman 2010; Hayakawa, et al. 2011; LaRue y Padilla 2011), temperatura (Treinin, et al. 2003; Prahlad, et al. 2008) y luz UV (Murakami y Johnson 1996; Edwards, et al. 2008; Wang, et al. 2010a; Stergiou, et al. 2011) (Figura 1.1.1).



Kippert et al. fueron los primeros en describir una tolerancia rítmica a un estrés ambiental en *C. elegans*. Estudiaron la tolerancia a estrés hiperosmótico de una población de larvas L1 expuestas a una solución 1,3M de NaCl, y descubrieron la existencia de un ritmo que podía ser sincronizado a ciclos de luz:oscuridad (LO) y persistía en condiciones de oscuridad constante. También lograron estimar que el periodo del ritmo era cercano a las 22 horas y que podía ser compensado por temperatura, con un Q₁₀ cercano a 1,06 (Kippert, et al. 2002).

Tomando en cuenta los diferentes tipos de agentes estresantes que *C. elegans* encuentra en su ambiente natural y sabiendo que estos agentes varían diariamente de acuerdo a la sucesión de los días y las noches, en este capítulo se estudiará la existencia de ritmos de tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico en nematodos adultos de *C. elegans*. Para esto se medirá la sobrevida mediante un estímulo mecánico (respuesta a TAP) luego de un desafío con un agente estresante. La respuesta a TAP consiste en la inducción de un movimiento de escape cuando el cultivo de nematodos

es levemente golpeado contra una superficie sólida, y permite evaluar rápida y fácilmente la respuesta de los nematodos. Es ampliamente utilizado en estudios de memoria, *screening* de mutantes locomotores y ensayos de tolerancia a estrés (Chalfie y Sulston 1981; Larsen 1993; Hardaker, et al. 2001; Hart 2006).

Resumiendo, se sabe que *C. elegans* posee ritmos de tolerancia a estrés osmótico por NaCl en estadio larval L1. Sin embargo, no se sabe si estos ritmos se mantienen a lo largo de toda la vida de los nematodos. Además tampoco se tienen indicios de la existencia de ritmos transcripcionales que pudieran llegar a regular estos ritmos. En este capítulo se buscará resolver algunas de estas incógnitas.

Materiales y Métodos

Cultivo de nematodos

En este trabajo se empleó la cepa TJ1060 [spe-9(hc488); fer-15(b26)] del nematodo *Caenorhabditis elegans*, previamente descrita (Fabian y Johnson 1994). Esta cepa acarrea alelos sensibles a temperatura en 2 loci, que resultan en nematodos estériles a 25°C pero permiten su reproducción a 18,5°C. Para algunos experimentos se emplearon las cepas AM1 [osr-1(rm1)] o RB1373 [gpdh-1(ok1558)] (todas las cepas fueron provistas por el *Caenorhabditis* Genetics Center, University of Minnesota, MN, USA).

Los stocks de nematodos fueron mantenidos en medio NGM (0,3% NaCl, 0,25% Peptona, 5 g/ml colesterol, 1 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgSO₄, 1,7% Agar en 25 mmol/l de buffer fosfato pH 6,0) con céspedes bacterianos de *Escherichia coli* OP50 (Brenner 1974) bajo condiciones de luz: oscuridad 12 h : 12 h (LO, intensidad = 400 lux) a 16°C.

Para los ensayos experimentales, una población de nematodos fue sincronizada al mismo estadio de desarrollo utilizando el método de sincronización por cloro (Lewis y Fleming 1995a) y cultivados en un medio líquido compuesto por M9 (42 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 85,5 mM NaCl, 1 mM MgSO₄) + Antibiótico-antimicótico (AB) 1x (Gibco, USA) en erlenmeyers con baffles de 25, a 110 rpm y 18,5°C. Una vez que los huevos eclosionaron, las larvas L1 obtenidas fueron mantenidas en condiciones LO y sin comida por 3 días. Al cuarto día (al momento del encendido de las luces, definido como tiempo *zeitgeber* 0 o ZT0), los nematodos fueron alimentados con medio de supervivencia (10^{10} *E. coli*/ml en medio S completo + AB; adaptado de (Fabian y Johnson 1994)) y mantenidos a una concentración final de 15 nematodos/10 ml. La temperatura se elevó a 25°C para evitar la auto-reproducción. El primer día de estadio adulto, el medio fue renovado a ZT0.

Todos los reactivos químicos fueron comprados a Sigma Chemical Co. (St Louis, MO), a menos que se indique lo contrario.

Ensayo de comportamiento de tolerancia a estrés

Para determinar la respuesta de comportamiento frente a diferentes tipos de estrés abiótico (osmótico, oxidativo y térmico), 20 µl de cultivo líquido fueron mezclados con 30 µl de la solución que contenía el estímulo, o M9 como control, e incubados por 2 h a 25°C. Luego del tratamiento, se observó el número de nematodos que mostraban respuesta a TAP (tal como fue descrito por Larsen et al, 1993; la placa que contiene a los nematodos en medio líquido es golpeada suavemente contra una superficie sólida y se cuenta el número de nematodos que se mueven respondiendo al

estímulo mecánico) en una población, por triplicado. El número total de nematodos y el de animales que respondieron al TAP fue contado visualmente en una lupa estereoscópica. La DL_{50} (concentración para obtener 50% de nematodos que responden al TAP) fue obtenida para una solución de NaCl (200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mM), una solución de H_2O_2 (0, 25, 50, 70 y 90 mM) y estímulos de temperatura (29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 °C).

Para los ensayos circadianos, 20 μ l de cultivo líquido de nematodos (20 a 35 individuos) fueron tratados cada 6 horas con los estímulos estresantes por 2 h a su concentración DL_{50} (o con M9 como control), desde ZT18 del 1er día de adultos, durante 1,5 días. Las muestras fueron tomadas por triplicado y contadas 2 veces. Todos los ensayos fueron realizados a partir de 3 cultivos independientes. Cuando los nematodos fueron cultivados en condiciones OO los ensayos de comportamiento se realizaron bajo luz roja tenue. Todas las muestras fueron analizadas luego de las 2 horas de tratamiento, en cada punto horario.

Para aquellos nematodos de cepas diferentes a la cepa TJ1060, se agregó a los cultivos de nematodos Fluorodeoxiuridina (FuDR) a una concentración final 50 μ M una vez que los nematodos se encontraran en estadio L4, para evitar la auto-reproducción de los animales (Mitchell, et al. 1979).

RT-PCR semicuantitativa

Se realizaron cultivos a gran escala tal como se describió anteriormente y se tomó una muestra de 2000 nematodos cada 6 horas durante 2 días, desde ZT18 del primer día de adulto. Todas las muestras fueron lavadas 2 veces con 15 ml de buffer M9, resuspendidas en 200 μ l de Trizol (Trizol LE, Invitrogen, Carlsbad, CA) y congeladas instantáneamente a -80°C, sumergiéndolas en isopropanol pre-enfriado, hasta la finalización de la toma de muestras. Una vez finalizada la toma de muestras, el RNA fue aislado por el método de trizol, y verificado por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante. 5 μ g de RNA fueron tratados con DNAsa I MAXIscript™ (AMBION, Foster City, CA), mezclados con oligo dT y transcritos en forma reversa (M-MLV RT, Superscript™ RT, Invitrogen, Carlsbad, CA). Las condiciones de linealidad de la PCR semicuatitativa fueron ajustadas por temperatura de hibridización, concentración de Mg^{2+} y condiciones de ciclado, para cada par de primers. Los primers utilizados para las reacciones de amplificación se encuentran listados en la Tabla 1.2.1. El programa de PCR utilizado fue 2 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundo a 92°C, 30 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C, excepto en el caso de *gpdh-1* en el que se realizaron 31 ciclos de PCR. Todos los primers fueron comprados a Invitrogen.

Blanco	Secuencia Primer Directo	Secuencia Primer Reverso	Descripción
hsp-6	GGACAAACCAAGGGACATG	AACGAATGCTCCAACCTGAG	proteína de shock térmico (70kDa)
hsp-16.1	TATTTCCGTCCAGCTCAACG	ATCGCTTCCTTCTTTGGTGC	proteína de shock térmico (16kDa)
gpdh-1	CAAGCTACAAAAGGGAGCCC	GGATTTCACGTTGTAGGCC	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
c11e4.1	ATGGCACTTTGGCAGCTCA	ACGCGCAAAAAGTAGCAACG	glutación peroxidasa
msra	TGAGCCATTGGACAAGTTCTA	TTAAGCATGACAGTTTCTTGGA	metionin-sulfóxido reductasa
act-4	TGAAGATCCTCACTGAGCGC	AGCACTTGCGGTGGACAATC	actina

Tabla 1.1.1. Primers diseñados para este trabajo.

PCR cuantitativa en tiempo real

El sistema ICycler IQ system (Bio-Rad) fue utilizado para realizar las reacciones de PCR en tiempo real. Para cada reacción Icyler, se preparó una mezcla maestra con las siguientes concentracones finales: 12,4µl de agua, 1,2µl de MgCl₂ (3 mM), 0,4µl de primer directo (0,4µM), 0,4µl de primer inverso (0,4µM), 2,0µl de Buffer Platinum TAQ (1X) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,4µl de dNTPs (0,2 mM), 0,2µl Platinum TAQ DNA polimerasa (1 unidad) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 2µl SybrGreen Type I (1X) (Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla “maestra” ICycler (19µl) fue agregada a cada uno de los 96 pocillos de una placa de PCR y 1µl de cDNA fue añadido como molde de la PCR. El programa de PCR fue 2 minutos a 94°C, 45 ciclos de 30 segundos a 92°C, 30 segundos a 60°C (medida única de fluorescencia), 1 minuto a 72°C, extensión final de 5 minutos a 72°C, programa de curva de melting (60–95°C con una tasa de calentamiento de 0,5°C por segundo y medición continua de fluorescencia) y finalmente un paso de enfriamiento a 15°C. Los resultados fueron cuantificados usando el método de la curva estándar. Para esto se construyó una curva estándar de 6 puntos (serie de diluciones seriadas 1/2) para cada gen (Karsai, et al. 2002). Los niveles de cada gen fueron normalizados con los niveles del gen de referencia actina (*act-4*).

Análisis de Datos

La DL₅₀ fue calculada por el método de Spearman-Kärber (LC50 software V1.0, U.S. EPA Release.). Los ensayos de ritmos de tolerancia a estrés abiótico fueron analizados por ANOVA de una vía, seguido por un test de Dunnett de comparación de grupos (grupo control: ZT12 día 2 y CT12 día 2, para LO y OO, respectivamente). Cada patrón de variación diaria fue caracterizado mediante una regresión de forma de onda con Sigma Plot (Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Los perfiles fueron ajustados a una onda senoidal con decaimiento, con la siguiente ecuación: $y = y_0 + a * \exp(-x / d) * \sin(2 * \pi * x / b + c)$, donde y es el punto de datos n , x es el tiempo del punto de datos n , y_0 es el valor basal, a es la amplitud, b es el periodo de la onda, c es la fase, y d es el parámetro de decaimiento de la onda. Las acrofases fueron determinadas mediante el análisis de Cosinor (es decir, mejor ajuste a formas de onda cosenoidales) de los conjuntos de datos. Los resultados de RT-PCR semicuantitativa fueron agrupados en día (ZT0,5 y ZT6) y noche (ZT12,5 y ZT18) y analizados por el test de Student de 2 colas. Los ensayos de tolerancia a estrés osmótico de las cepas mutantes fueron analizados por ANOVA de una vía, seguido por un test de Dunnett de comparaciones grupales (grupo control: ZT0).

Todos los datos fueron expresados como la media aritmética $\pm$ error estándar de n valores.

Resultados

Variación diaria en la tolerancia a estrés osmótico y oxidativo en nematodos adultos

Para evaluar la presencia de patrones rítmicos de tolerancia a estrés en nematodos adultos, se cuantificó la respuesta a TAP a lo largo del día o del ciclo circadiano. Cuando una población de nematodos fue tratada con concentraciones crecientes de NaCl, encontramos una correlación en la respuesta a TAP (Figura 1.3.1A). A partir de esto se eligió la DL₅₀ (350mM) para este ensayo. Al tratar diferentes poblaciones de nematodos adultos con esta concentración de NaCl en diferentes momentos del día, se observó un patrón rítmico de tolerancia a estrés osmótico en condiciones de LO y OO ($n=27$ para LO y $n=9$ para OO; ANOVA, $p<0,05$ en ambos casos), encontrándose un mínimo de tolerancia a ZT0 y CT0 para LO y OO, respectivamente (Figuras 1.3.1B y 1.3.1C). Se observó un pico a ZT12/CT12 (Test de Comparaciones Múltiples de Dunnett, $p<0,05$). Los conjuntos de datos de LO y OO fueron luego ajustados a una onda senoidal con decaimiento (el mejor ajuste para las condiciones circadianas arrojó un periodo de 20,6 h) (Figuras 1.3.1B y 1.3.1C – línea de puntos). Se determinó que las acrofases eran a ZT13,14 (LO) y

CT13,19 (OO), según el análisis de Cosinor ($p < 0,05$).

Cuando el mismo procedimiento se aplicó para estudiar la tolerancia frente al estrés oxidativo causado por H_2O_2 (figura 1.3.1D, $DL_{50}=50mM$), también se encontró un patrón diario en condiciones de LO y OO ($n=27$ para LO y $n=9$ para OO, test de ANOVA, $p < 0,05$ en ambos casos), pero con una fase invertida al compararlo con el encontrado para estrés osmótico (máximo=ZT0 o CT0 OO, Test de Comparaciones Múltiples de Dunnet, $p < 0,05$) (Figuras 1.3.1E y 1.3.1F). Los conjuntos de datos de LO y OO fueron ajustados a una ecuación senoidal con decaimiento y se encontró que el periodo circadiano en OO era de 20,3 h. Se determinó que las acrofases eran ZT23,42 (LD) y CT2,49 (DD), según el análisis de Cosinor ($p < 0,05$).

A pesar de que el ensayo de tolerancia frente a estrés térmico mostró una correlación lineal entre el número de animales en movimiento y los valores crecientes de temperatura (datos no mostrados), no se pudo aplicar el ensayo de TAP porque cuando los nematodos eran transferidos de la temperatura de ensayo ($DL_{50}=32,5^{\circ}C$) a la temperatura de observación ($25^{\circ}C$), la actividad locomotora se vio significativamente afectada y los resultados obtenidos no fueron reproducibles a lo largo de los diferentes ensayos.

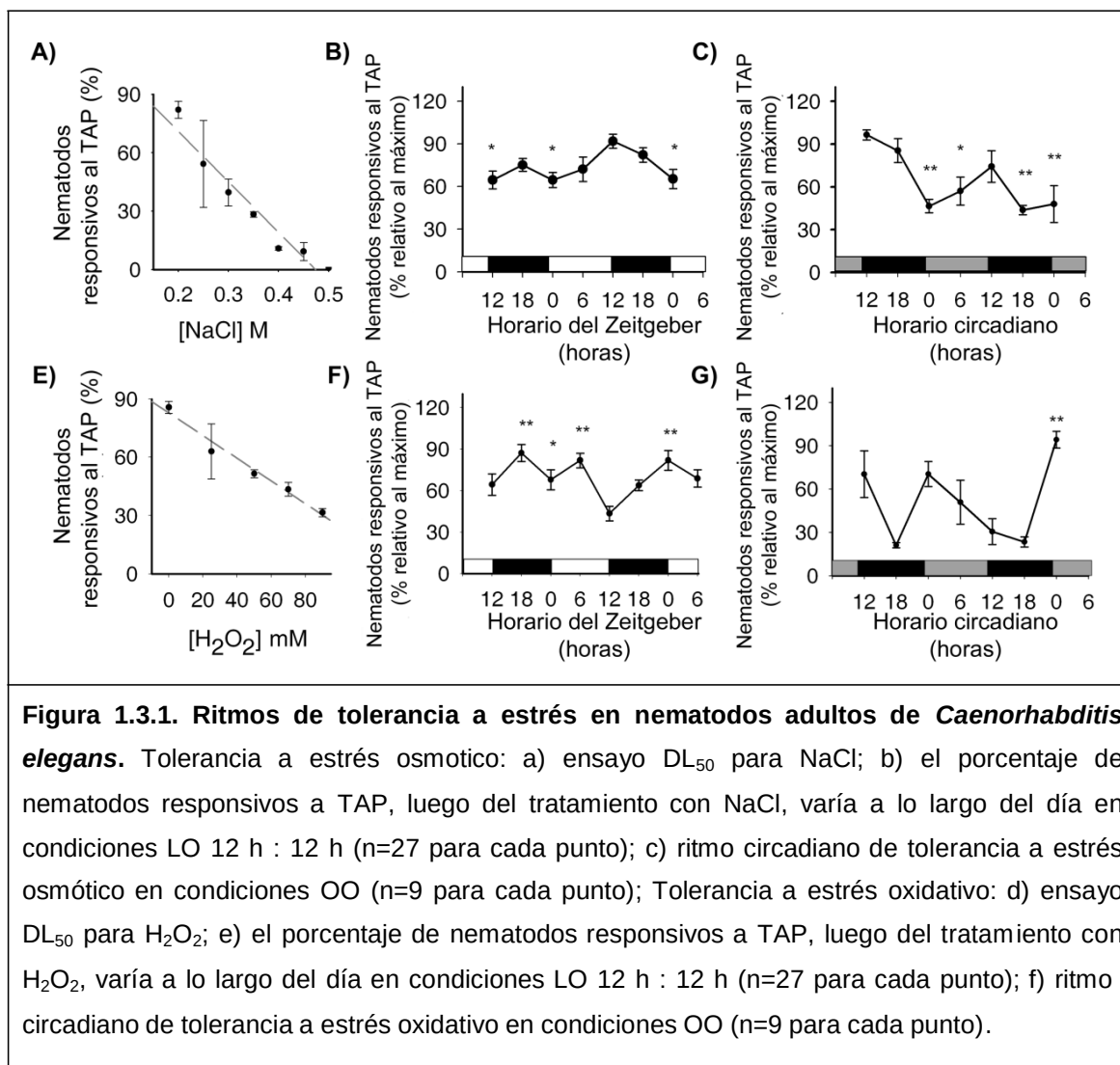
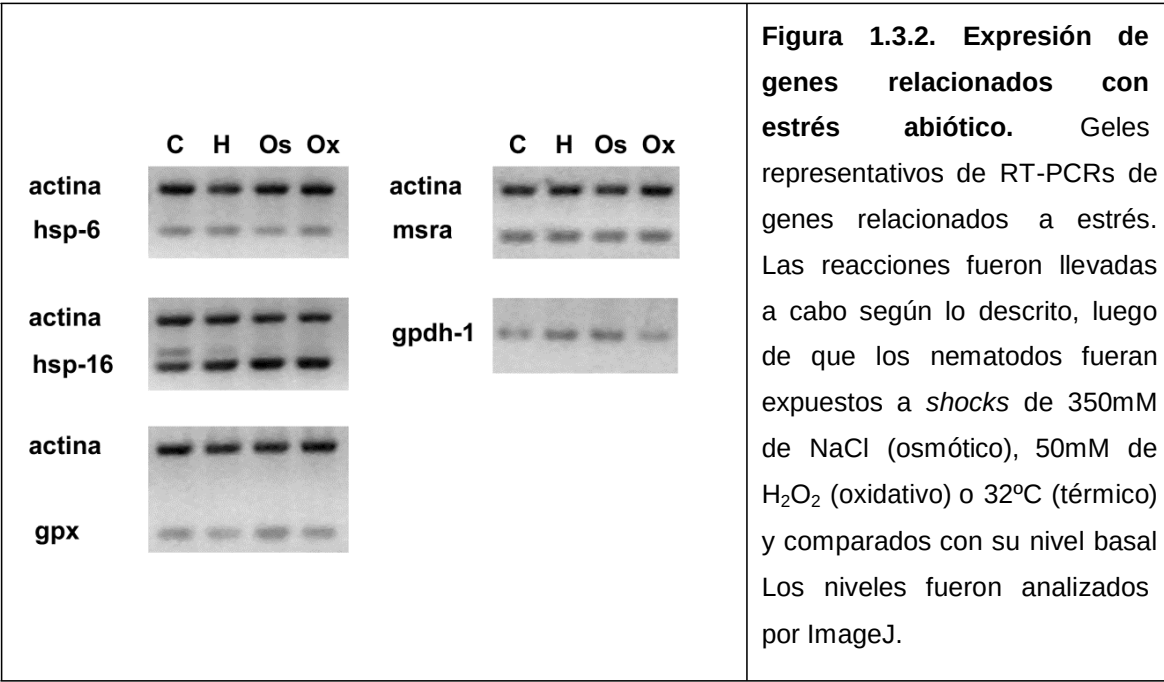


Figura 1.3.1. Ritmos de tolerancia a estrés en nematodos adultos de *Caenorhabditis elegans*. Tolerancia a estrés osmótico: a) ensayo DL₅₀ para NaCl; b) el porcentaje de nematodos responsivos a TAP, luego del tratamiento con NaCl, varía a lo largo del día en condiciones LO 12 h : 12 h (n=27 para cada punto); c) ritmo circadiano de tolerancia a estrés osmótico en condiciones OO (n=9 para cada punto); Tolerancia a estrés oxidativo: d) ensayo DL₅₀ para H₂O₂; e) el porcentaje de nematodos responsivos a TAP, luego del tratamiento con H₂O₂, varía a lo largo del día en condiciones LO 12 h : 12 h (n=27 para cada punto); f) ritmo circadiano de tolerancia a estrés oxidativo en condiciones OO (n=9 para cada punto).

No se encontraron ritmos estadísticamente significativos en la respuesta a TAP cuando las poblaciones de nematodos fueron tratados con buffer M9 (datos no mostrados).

Expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés

Para poder relacionar la tolerancia a estrés con respuestas a nivel de expresión génica, se midió el nivel de expresión de genes relacionados con estrés en *C. elegans* luego de un shock de estrés térmico, oxidativo u osmótico. Como se muestra en la figura 1.3.2 y en la tabla 1.3.1, los estímulos osmótico, oxidativo y térmico fueron suficientes para inducir la transcripción de *hsp6* (proteína de shock térmico de 70kDa), *hsp16* (proteína de shock térmico de 16kDa), *gpx* (glutathion peroxidasa) y *gpdh-1* (glicerol-3-fosfatoo deshidrogenasa). Las inducciones observadas correlacionan bien con la literatura para *hsp6* (Heschl y Baillie 1990), *hsp16* (Link, et al. 1999; Hong, et al. 2004) y *gpdh-1* (Lamitina, et al. 2006).



Como la tolerancia rítmica a un ambiente estresante puede estar genéticamente controlada, se estudiaron los niveles basales de los genes relacionados a estrés previamente caracterizados. Aunque no todos ellos mostraron una clara variación día- noche en su expresión, se encontró que *gpx* (relacionado al estrés oxidativo) y *gpdh-1* (relacionado al estrés osmótico) mostraron una expresión significativamente más alta durante la noche (Figura 1.3.3 y Tabla 1.3.2, Test T de Student, $p < 0,05$). Estos resultados fueron luego confirmados por PCR en tiempo real usando el método de la curva estándar para *gpx* y *gpdh-1* (ZT18/ZT6: *gpx*=1,7X; *gpdh-1*=5,2X; n=3 cada uno con duplicados técnicos).

Gen	Tipo de shock		
	Térmico	Osmótico	Oxidativo
<i>hsp-6</i>	++	-	+
<i>hsp-16</i>	++	+++	++++
<i>gpx</i>	+	+++	+
<i>msra</i>	-	-	-
<i>gpdh-1</i>	+	+	-

Tabla 1.3.1. Cuantificación de las reacciones de RT-PCR de genes relacionados a estrés.

+: ≥30% de aumento en los niveles de ARNm; ++: ≥60% de aumento en los niveles de ARNm; +++: ≥90% de aumento en los niveles de ARNm; ++++: ≥120% de aumento en los niveles de ARNm. En todos los casos los niveles son relativos a los controles (es decir, buffer M9 y sin cambio de temperatura).

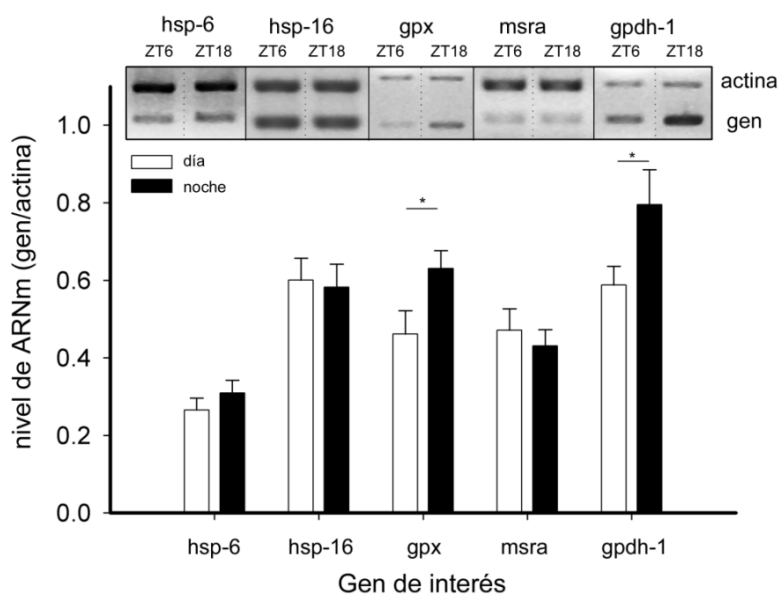


Figura 1.3.3. Variación diaria en la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés.

Las RT-PCRs de genes relacionados a la respuesta a estrés fueron llevadas a cabo según lo descrito y la expresión día-noche fue cuantificada. Los productos de RT-PCR muestran variaciones diarias significativas en la expresión de glutatión peroxidasa (*gpx*) y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (*gpdh-1*), siendo sus niveles más elevados durante la noche. Las diferencias en las intensidades de bandas de diferentes puntos horarios se encuentran mostradas en un gel representativo en el extremo superior de la figura, por encima de cada columna. * $p < 0,05$; test T de Student.

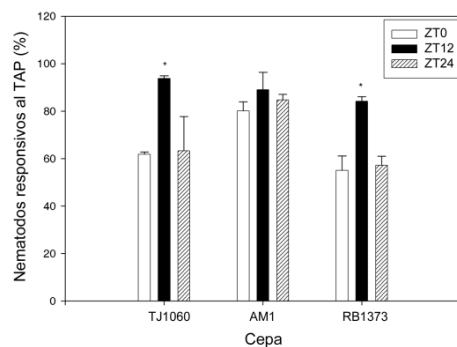
Gen	Horario del <i>Zeitgeber</i>				<i>P</i> (anova)
	ZT0.5	ZT6	ZT12.5	ZT18	
<i>hsp-6</i>	0.24 ± 0.04 (5)	0.28 ± 0.04 (9)	0.33 ± 0.04 (5)	0.30 ± 0.05 (7)	p>0.05
<i>hsp-16</i>	0.58 ± 0.13 (5)	0.61 ± 0.06 (9)	0.61 ± 0.14 (4)	0.56 ± 0.05 (6)	p>0.05
<i>gpx</i>	0.42 ± 0.08 (5)	0.43 ± 0.08 (7)	0.57 ± 0.07 (5)	0.69 ± 0.06 (7)	p<0.05
<i>msra</i>	0.55 ± 0.11 (5)	0.42 ± 0.05 (8)	0.35 ± 0.07 (5)	0.48 ± 0.05 (7)	p>0.05
<i>gpdh-1</i>	0.52 ± 0.06 (5)	0.63 ± 0.07 (8)	0.57 ± 0.04 (4)	0.81 ± 0.06 (7)	p<0.05

Tabla 1.3.2. Cuantificación de la variación diurna en la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés abiótico (RT-PCR) a ZT0,5; ZT6; ZT12.5 y ZT18. El número de muestras de cada punto horario se encuentra entre paréntesis. Todos los valores son relativos a *act-4*.

La tolerancia a estrés osmótico se ve afectada por la vía de *gpdh-1*

Para caracterizar el rol de *gpdh-1* en la variación circadiana en la tolerancia a estrés, se estudió el comportamiento de mutantes de la vía de respuesta a estrés osmótico. Como se muestra en la figura 1.3.4, nematodos mutantes para *osr-1* (un regulador negativo de la vía de respuesta a estrés osmótico) fueron en general menos sensibles al estrés por NaCl (el porcentaje de animales responsivos al TAP a ZT0 y ZT24 fue significativamente más alto para la cepa mutante para *osr-1* (AM1) que para la cepa control (TJ1060) (Test de comparaciones múltiples de Dunnet, p<0,05)) y no mostraron una variación diaria en la respuesta a 350mM NaCl (Test de comparaciones múltiples de Dunnet, p<0,05). Sin embargo, la cepa mutante para *gpdh-1* (RB1373, que posee una delección de 1227bp en el gen *gpdh-1*) no mostró diferencias significativas con la cepa control, mostrando la misma variación diaria que la cepa control. Cuando este experimento se repitió a una concentración más alta de NaCl (correspondiente a la DL₅₀=450mM obtenida para el mutante para *osr-1*), se encontró una variación diaria en la tolerancia a estrés del mutante para *osr-1* y también para la cepa control, como se muestra en la figura 1.3.4 (Test de comparaciones múltiples de Dunnet, p<0,05).

A) Tolerancia a estrés osmótico (350mM NaCl)



B) Tolerancia a estrés osmótico (450mM NaCl)

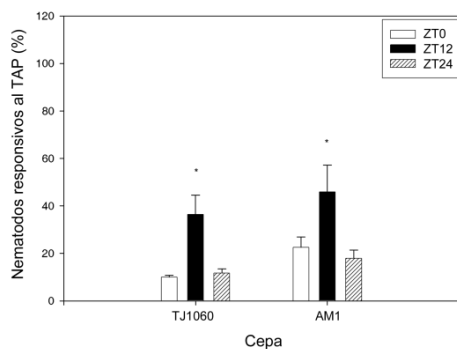


Figura 1.3.4. Variación diaria en la tolerancia a estrés osmótico de cepas mutantes de *C. elegans*.

Diferentes cepas fueron analizadas en los puntos máximo y mínimo de tolerancia y luego comparados con la cepa control. A) la cepa AM1, que es un mutante de un regulador negativo de la respuesta a estrés osmótico (*osr-1*), muestra alta tolerancia frente a 350mM de NaCl en todos los puntos horarios. B) Cuando una concentración más alta, 450mM de NaCl, es utilizada, la cepa AM1 vuelve a mostrar una variación diaria en la tolerancia a estrés osmótico. * $p < 0,05$ comparado con ZT0, ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones de Dunnet.

Discusión

El nematodo *Caenorhabditis elegans* fue originalmente aislado de compost, sustrato de hongos, tierra de jardines y agua, y también asociado a milpiés (diplópodos), isópodos, insectos, caracoles y babosas (Kiontke y Sudhaus 2006a). Como en otros organismos, variaciones diarias en la temperatura, humedad, salinidad y la luz UV pueden haber influido en la aparición y selección de controles biológicos circadianos para no sólo responder a estos cambios sino para poder predecirlos con anticipación (Anokhin 1974; Engelmann 1988; Pittendrigh 1993).

En el año 2002, el laboratorio del Dr. Kippert fue el primero en mostrar evidencias de un reloj circadiano en larvas L1 de *C. elegans* (Kippert, et al. 2002). Las larvas exhibieron una tolerancia rítmica a NaCl 1,3M en condiciones LO y OO y pudieron ser sincronizadas a un fotoperiodo experimental. En el laboratorio replicamos estos resultados en larvas y consideramos útil estudiar este comportamiento en nematodos adultos. Sin embargo, como la presencia de hermafroditas es usualmente considerada un problema en estudios de largo plazo debido a la continua puesta y eclosión de huevos, se utilizaron 2 estrategias diferentes para prevenir la reproducción. Primero, utilizamos la cepa TJ1060, que es infértil a 25°C y, además, en otros ensayos agregamos el FUDR a los cultivos para volver inviables a los huevos (Mitchell, et al. 1979). De esta manera logramos trabajar con cultivos compuestos únicamente por nematodos adultos de todas las cepas estudiadas.

***C. elegans* posee variaciones diarias en la tolerancia a estrés osmótico y oxidativo**

Los resultados obtenidos en los ensayos de tolerancia a estrés osmótico, que muestran un mínimo al comienzo del día, están de acuerdo con los resultados descritos sobre ensayos con larvas ((Kippert, et al. 2002) y nuestros propios resultados no publicados. Sin embargo, encontramos una gran diferencia en el rango de tolerancia (en términos de concentración de NaCl) entre los diferentes estadios del desarrollo: las larvas son capaces de tolerar NaCl 1,3M, mientras que los adultos no sobreviven cuando se enfrentan a concentraciones mayores a 0,5M (en nematodos crecidos en medio enriquecido con peptona con NaCl 21mM) (Solomon, et al. 2004). En la naturaleza, a medida que la temperatura aumenta, la desecación también lo hace; sería de esperar una mayor tolerancia a estrés osmótico durante el día.

A partir de este resultado, se buscó describir con mayor profundidad esta respuesta analizando el comportamiento de la cepa AM1, que corresponde a una sustitución de una única base (a/g – mutante/salvaje) en el gen *osr-1*, y está caracterizada como una cepa con alta resistencia a estrés (Solomon, et al. 2004). Este fenotipo correlaciona muy bien

con nuestros resultados, dado que el ritmo diario en estrés osmótico se ve abolido en mutantes *osr-1(rm1)*. Para poder estudiar si la ritmicidad estaba realmente abolida o si la concentración era insuficiente para que las variaciones aparecieran se construyó una nueva curva DL₅₀ (datos no mostrados) y se repitió el ensayo con NaCl 450mM. A esta concentración, las variaciones diarias seguían observándose en la cepa control (con una marcada disminución del número de animales responsivos al TAP, comparados con la respuesta a 350mM), pero ahora también eran evidentes en la cepa AM1, sugiriendo que la ritmicidad no estaba siendo realmente abolida y que la respuesta estaba siendo enmascarada (en otras palabras, una concentración de NaCl 350mM estaba por debajo del umbral necesario para que los ritmos de tolerancia pudieran observarse).

Además, también estudiamos un mutante de *gpdh-1* que posee una delección de 1227pb. En este caso se esperaba encontrar una disminución de la tolerancia a estrés. Sin embargo, los mutantes no mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa control. Al realizar un estudio bioinformático, observamos que sólo el N-terminal de la proteína se ve afectado y que la proteína mutante posee los motivos que corresponden a la enzima glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa, lo cual nos llevó a pensar que la proteína continuaba siendo funcional. Un trabajo reciente (Lamitina, et al. 2006) demostró que aunque la tasa de acumulación de glicerol mediada por hipertonidad se ve enlentecida en esta cepa mutante, los niveles de glicerol, tanto bajo condiciones normales como de estrés salino, eran similares en los mutantes y en los nematodos salvajes.

Además de analizar la respuesta a estrés osmótico, también se estudió la respuesta frente a un agente inductor del estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno). Las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) pueden ser generadas por exposición a luz UV y/o por el normal funcionamiento de la mitocondria. En este sentido, la generación de ROS puede incrementarse cuando los nematodos están más activos, ya que los animales que viven bajo tierra no están usualmente expuestos a la luz solar, que es la fuente natural de luz UV. En nuestro laboratorio y otros (Saigusa, et al. 2002; Simonetta y Golombek 2007) se ha encontrado que estos nematodos son más activos durante la transición noche-día, mientras que el mínimo de actividad locomotora es observado durante la transición día-noche. Este patrón de actividad correlaciona bien con el patrón rítmico observado para la tolerancia a estrés oxidativo, el cual puede estar relacionado con la producción endógena de ROS en respuesta a la actividad metabólica.

Ambos patrones rítmicos parecen tener un periodo circadiano de menos de 24 h (20,6 h y 20,3 h, patrones osmótico y oxidativo, respectivamente) según se determinó por un ajuste de forma de onda. Sin embargo se debería incrementar la tasa de toma de muestras para obtener una estimación más precisa del periodo circadiano.

Resulta interesante notar que estos dos comportamientos parecen estar en antifase. El análisis de Cosinor indica que la acrofase del ritmo de tolerancia a estrés osmótico se

encuentra cercano a ZT13 (LO) y CT13 (OO), mientras que los máximos para tolerancia a estrés oxidativo se encontraron a ZT24 (LO) y CT2 (OO), lo cual sugiere un mecanismo de control genético diferente para ambas variables. Esta regulación puede estar localizada a nivel de un reloj circadiano aún desconocido, o bien a nivel de sus vías de salida. Esto también implica que los ritmos no están afectados por un ritmo de alimentación intrínseco.

La maquinaria de respuesta a estrés involucra muchos cambios a nivel transcripcional, traduccional y enzimáticos. En este sentido, hemos estudiado los niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés en esta especie y encontramos que los niveles de *gpdh-1* y *gpx* son más altos por la noche. Al comparar esto con los ritmos de comportamiento observados, la variación en la abundancia relativa de ARNm de *gpdh-1* correlaciona con los ritmos de tolerancia a estrés osmótico, mientras que los niveles de ARNm de *gpx* están inversamente relacionados a lo observado en respuesta a un agente oxidante. Más estudios son necesarios para poder entender la relación entre los ritmos transcripcionales y los de comportamiento. Si existen ritmos a nivel de proteína, los niveles de ARNm no necesitan estar en la misma fase que los niveles de los productos que codifican o sus actividades, los cuales van a afectar directamente el comportamiento observado. Lo mismo vale para la actividad de las enzimas codificadas por estos genes, cuyos ritmos no necesariamente van a estar determinados por la tasa de expresión.

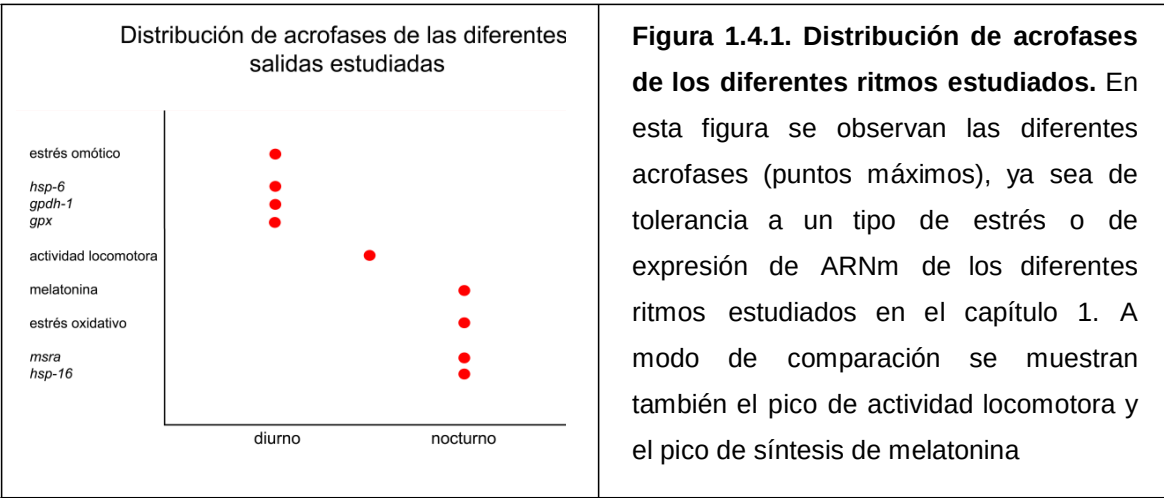
En este trabajo hemos demostrado la existencia de ritmos diarios de tolerancia a estrés abiótico en el nematodo adulto *Caenorhabditis elegans*. Sin embargo, el mecanismo responsable de transducir el tiempo circadiano a respuestas de estrés no se encuentra completamente entendido. Se sabe que la maquinaria celular de respuesta a estrés está regulada a nivel neuronal a través de vías neuroendócrinas (Guarente y Kenyon 2000; Kops, et al. 2002; Lee, et al. 2003; Hwangbo, et al. 2004; Liang, et al. 2006). En *C. elegans* muchos genes, incluyendo a *daf-16* y *tph-1* (implicados en la producción de serotonina), están involucrados en la regulación neuroendócrina de la respuesta a estrés (Baumeister, et al. 2006; Liang, et al. 2006). Aún debe demostrarse que estos u otros genes estén involucrados en el control circadiano de comportamientos de tolerancia a estrés.

Otra pregunta que queda por contestar es cómo son sincronizados los ritmos por luz. Se sabe que *C. elegans* responde a luz visible (540nm) a intensidades tan bajas como 40 lux (Burr 1985) y también a luz UV cercana (Edwards, et al. 2008; Ward, et al. 2008; Garrity 2010; Liu, et al. 2010). Además, se sabe que esta vía de sincronización es relevante para los ritmos circadianos de *C. elegans*, que pueden ser entrenados por ciclos de luz-oscuridad (Kippert, et al. 2002; Saigusa, et al. 2002; Simonetta y Golombek 2007; Simonetta, et al. 2008; Simonetta, et al. 2009; Migliori, et al. 2011a; Migliori, et al. 2011b; Romanowski, et al. 2011) y temperatura (Simonetta, et al. 2009; Olmedo, et al. 2012) a través de mecanismos desconocidos. Los ritmos circadianos se han encontrado en

organismos que viven en condiciones extremas, incluyendo debajo de la tierra y del agua, por lo que el problema de registrar señales cíclicas débiles del medio ambiente es definitivamente relevante para la supervivencia de los organismos.

En resumen, en este capítulo se ha demostrado la existencia de ritmos diarios y circadianos de tolerancia a 2 tipos de estrés abiótico en nematodos adultos de la especie *Caenorhabditis elegans*, que parecen estar relacionados a genes específicos de la vías de respuesta a estrés. Estos ritmos le permiten a los nematodos afrontar los cambios diarios en los niveles de humedad y generación de ROS que se dan debido a la sucesión periódica del día y la noche. En la figura 1.4.1 se puede observar un resumen de los resultados de este capítulo. Allí se visualiza claramente la diferencia temporal en la resistencia a estrés osmótico y oxidativo, que podría representar una ventaja adaptativa y predictiva frente a los cambios ambientales a los que se enfrenta el nematodo cotidianamente.

Asimismo, las variaciones cíclicas que pueden representar estímulos estresantes para *C. elegans* no se limitan a factores abióticos, sino que también pueden enfrentarse a desafíos bióticos, los cuales serán el tema del capítulo siguiente.



Capítulo 2

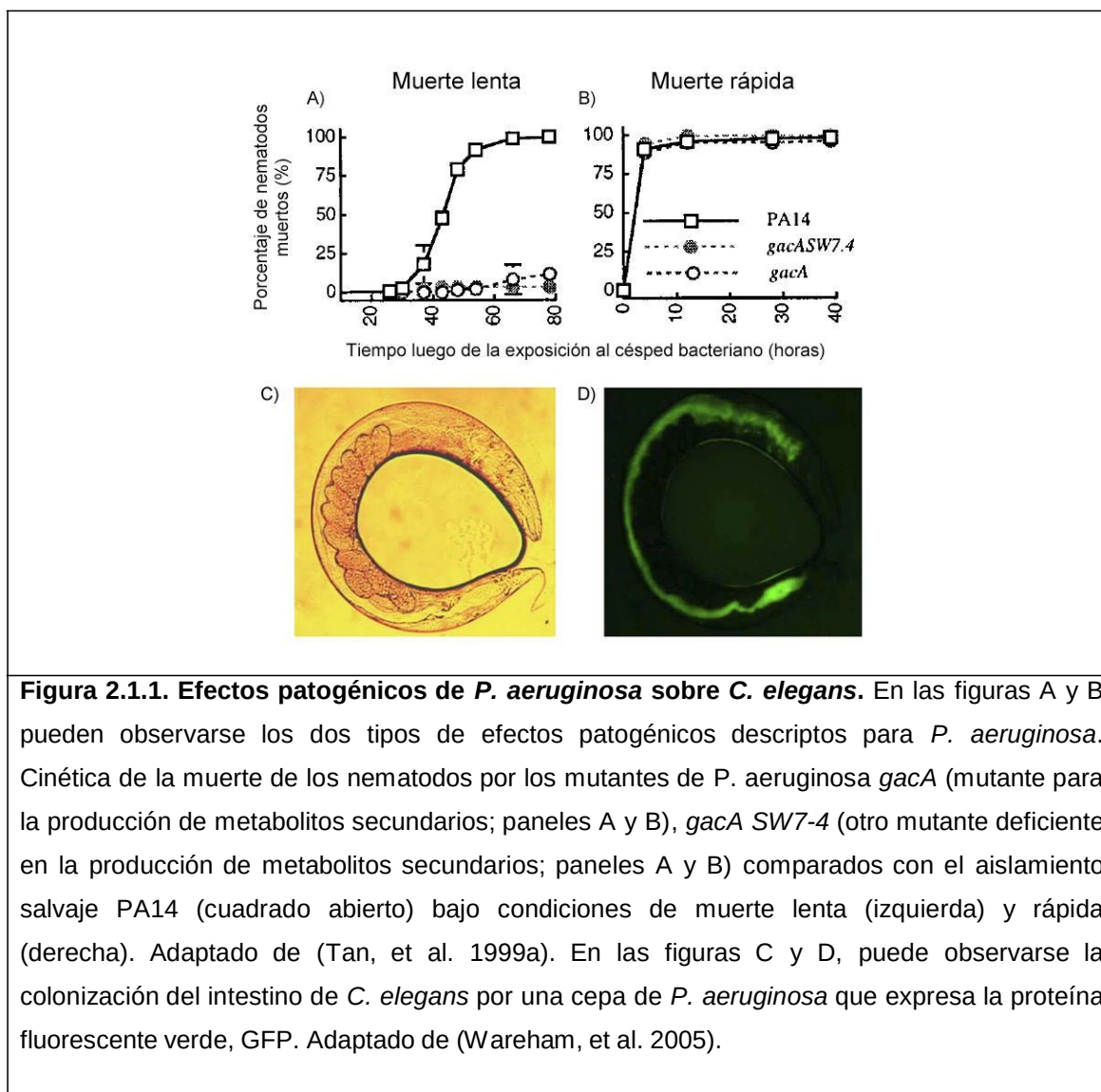
Ritmos circadianos de respuesta a estrés biótico

Introducción

En el capítulo anterior se describieron ritmos circadianos de tolerancia frente a 2 tipos de estrés abiótico: estrés osmótico y estrés oxidativo. Estos ritmos se presentaron en antifase, siendo los nematodos más sensibles al estrés osmótico durante el día y, más sensibles al estrés oxidativo durante la noche, lo que podría indicar una adaptación a un ambiente cíclico en su hábitat natural.

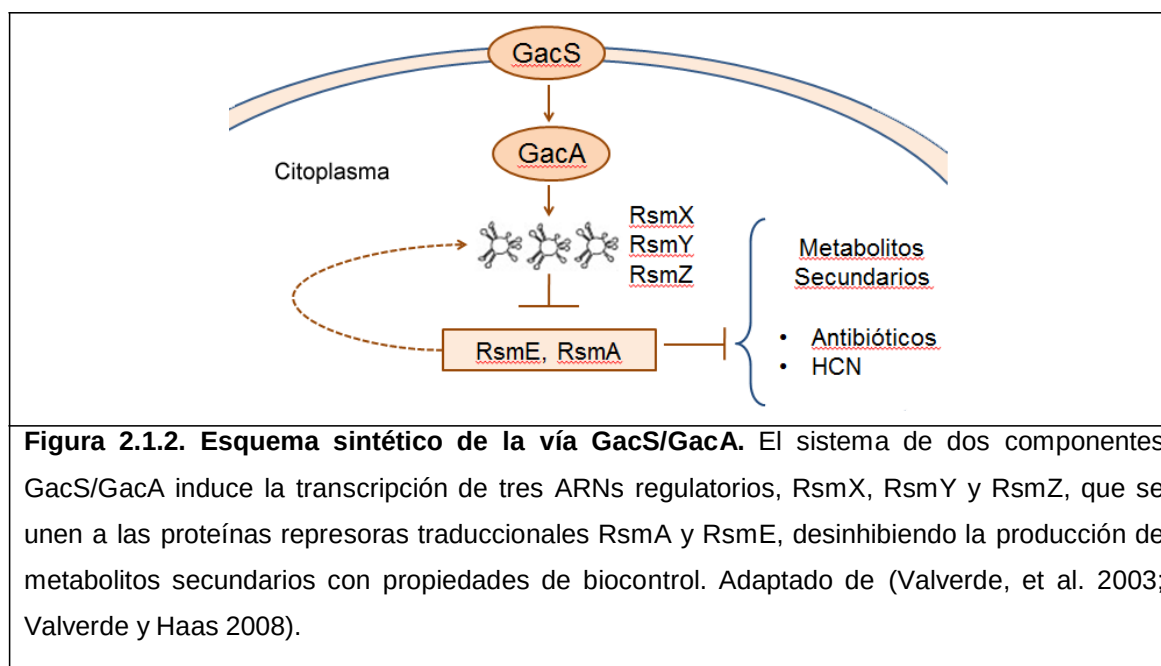
Existen diversos agentes capaces de causar estrés abiótico; sin embargo, en la naturaleza este nematodo no sólo se encuentra con este tipo de agentes estresantes: *Caenorhabditis elegans* habita los suelos y coexiste con una gran variedad de microbios y se alimenta de ellos (Blanc, et al. 2006); sin embargo, a lo largo de su evolución, algunos microbios han desarrollado mecanismos para defenderse de los nematodos. En el caso de *C. elegans*, los efectos patogénicos pueden ser divididos en dos categorías, que no son mutuamente excluyentes. En una, los nematodos se infectan y la presencia de microbios vivos dentro del animal o en su cutícula correlaciona con la muerte o enfermedad. En el otro caso, productos secretados por los microbios son los responsables de los síntomas observados (Darby, et al. 1999; Mahajan-Miklos, et al. 1999; Tan, et al. 1999a; Tan, et al. 1999b; Gallagher y Manoil 2001; Darby 2005).

Las pseudomonas, como *Pseudomonas aeruginosa* o *Pseudomonas fluorescens*, son bacterias gram negativas que, bajo ciertas circunstancias, se vuelven virulentas hacia diversos organismos. Ambas pueden ser encontradas en muestras de suelo y las infecciones o toxinas liberadas por ellas podrían ejercer un estrés biótico sobre *C. elegans*. Varios estudios han empleado a *C. elegans* como un modelo de virulencia simple de infección por *P. aeruginosa* (Darby, et al. 1999; Mahajan-Miklos, et al. 1999; Tan, et al. 1999a; Tan, et al. 1999b; Gallagher y Manoil 2001). Como fue mencionado, este modelo presenta dos tipos de efectos patogénicos sobre los nematodos. En uno de ellos, *P. aeruginosa* lentamente coloniza el intestino del huésped y eventualmente lo mata en cuestión de días (Tan, et al. 1999a) (Figura 2.1.1A). El otro modo descrito involucra la rápida parálisis y muerte de los nematodos en pocas horas (Figura 2.1.1B). Dependiendo del medio de cultivo empleado, este efecto recibe el nombre de “muerte rápida” (Darby, et al. 1999; Tan, et al. 1999a) o “muerte paralizante” (Gallagher y Manoil 2001). Ambos tipos de muerte rápida son mediados por toxinas secretadas por *P. aeruginosa* y las diferencias pueden deberse a variaciones a nivel génico y condiciones de crecimiento de distintas cepas de esta bacteria. El compuesto volátil cianuro de hidrógeno (HCN) ha sido identificado como uno de los principales factores involucrados en la muerte rápida de los nematodos (Gallagher y Manoil 2001).



La cepa CHA0 de *Pseudomonas fluorescens*, aislada de suelo, es capaz de proteger las raíces de diferentes especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas de los efectos deletéreos de varios hongos patogénicos y de matar e inhibir la eclosión de huevos del nematodo del nudo de raíz, *Meloydogine incognita* (Siddiqui, et al. 2005). Estas propiedades de biocontrol dependen de la producción de una serie de compuestos extracelulares que incluyen a los antibióticos diaceitlfluoroglucinol (DAPG), pirrolnitrina y pioluteorina; HCN y la metaloproteasa AprA (Haas y Keel 2003). Resulta interesante hacer notar que la síntesis de estos productos es inducida en condiciones de alta densidad celular por la cascada regulatoria postranscripcional Gac/Rsm, que asegura una secreción coordinada de los metabolitos (Valverde y Haas 2008). Esta cascada está regulada por el sistema de 2 componentes GacS/GacA que induce la transcripción de tres ARNs regulatorios (RsmX, RsmY y RsmZ), y que se unen a las proteínas represoras traduccionales RsmA y RsmE. De esta manera, la represión traduccional de ARNs involucrados en la producción de

metabolitos secundarios es liberada de una manera coordinada (Figura 2.1.2) (Valverde y Haas 2008). Por ende, mutantes *gacS*, *gacA* o *rsmXYZ* no son capaces de secretar antibióticos, HCN o la proteasa AprA y pierden sus capacidades de biocontrol (Laville, et al. 1998; Zuber, et al. 2003; Kay, et al. 2005). Recientemente se ha demostrado que la producción de metabolitos dependiente de Gac/Rsm es necesaria para evitar la depredación por protistas del suelo (Schlimme, et al. 1999; Jousset, et al. 2006) y para mejorar la competitividad de CHA0 en la rizósfera bajo presiones predatorias de protistas y nematodos (Jousset, et al. 2008b; Jousset, et al. 2009; Pedersen, et al. 2009). En el aislamiento biocontrol *Pseudomonas* cepa DSS73, el sistema GacS/Rsm también es fundamental para escapar a la depredación por nematodos *Caenorhabditis elegans* (Bjornlund, et al. 2009). Por ende, cepas biocontrol como CHA0 y DSS73 pueden representar agentes de estrés biótico para predadores del suelo, como son los protozoos bacterívoros y los nematodos, dependiendo del funcionamiento de la cascada Gac/Rsm.



De acuerdo a lo expuesto, se sabe que *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de infectar a *C. elegans* y matarlo en cuestión de días (muerte lenta) u horas (muerte rápida). Por otro lado, también se sabe que este nematodo coexiste en el suelo con *Pseudomonas fluorescens* (Grewal 1991). Esta bacteria es utilizada como un biocontrol de hongos y de, al menos, una especie de nematodos. Por lo tanto, es probable que esta bacteria pueda defenderse del comportamiento depredatorio por parte de *C. elegans*, causando un estrés sobre los nematodos. Existen numerosas evidencias acerca de ritmos en diversas funciones bacterianas (Kondo, et al. 1993; Iwasaki y Kondo 2004; Golden 2007; Johnson 2007; Soriano, et al. 2010; Qian, et al. 2012), lo que da pie a la hipótesis de que los efectos

deletéreos sobre otros organismos podrían también tener características cíclicas. Así, es de esperar que *C. elegans* haya desarrollado mecanismos de defensa predictivos y adaptativos en respuesta al estrés causado por microorganismos. En este capítulo estudiaremos los efectos de la exposición a bacterias *P. fluorescens* y si dichos efectos varían de acuerdo al estado del reloj endógeno de *C. elegans*.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En este trabajo se usaron las cepas de *Escherichia coli* HB101 (contiene el plásmido de movilización pME497), OP50 (utilizada como alimento de *C. elegans*) y DH5 α (contiene el plásmido pME3013 que codifica para el operón *hcn* de *Pseudomonas fluorescens*) (tabla 2.2.1). Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* utilizadas fueron CHA0 (aislamiento salvaje), CHA19 (mutante *GacS*, no produce metabolitos secundarios), CHA77 (carece del operón *hcn*), CHA207 (posee una delección en el operón *hcn*), CHA631 (no produce el antibiótico DAPG), CHA1012 (no produce el antibiótico PLT), CHA1018 (no produce los antibióticos DAPG y PLT), CHA1144 (mutante *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ*, no produce metabolitos secundarios), CHA77+ (cepa CHA77 complementada con el plásmido pME3013), CHA207+ (cepa CHA207 complementada con el plásmido pME3013), ARQ1 (cepa CHA0 que expresa GFP), ARQ2 (cepa CHA19 que expresa GFP). Todas las cepas de *Pseudomonas fluorescens* empleadas poseen el *background* genómico de CHA0 (tabla 2.2.1). También se empleó la cepa salvaje Hex1T de *Pseudomonas aeruginosa* (tabla 2.2.1).

Los medios de cultivo empleados fueron agar de infusión de cerebro y corazón (BHI, *brain heart infusion*), agar nutritivo (NG, *nutrient agar*), cultivo líquido BHI y cultivo líquido LB. En los casos en que debían mantenerse plásmidos en las cepas, se suplementaron los medios con 125mg/ml de tetraciclina (para *P. fluorescens*) o 40mg/ml de tetraciclina (para *E. coli*). Las temperaturas de incubación de rutina fueron 28°C para *P. fluorescens* y 37°C para *E. coli* y *P. aeruginosa*. *P. fluorescens* fue crecida a 35°C para mejorar su capacidad de aceptar ADN heterólogo en los ensayos de “*mating*” triparentales. Para complementar a los mutantes *hcn*, el plásmido pME3013 de *E. coli* DH5 α fue movilizado a las cepas CHA77 y CHA207 en “*matings*” triparentales, usando a la cepa HB101/pME497 de *E. coli* como la cepa movilizadora (Voisard, et al. 1989a). Se utilizó cloranfenicol a una concentración de 20mg/ml para realizar una contra selección de *E. coli* en los ensayos de *mating*. Los conjugantes de *P. fluorescens* aparecieron luego de 48 hs de incubación y fueron chequeados para pureza y recuperación del fenotipo de producción de HCN.

Cepas de nematodos y condiciones de cultivo

La cepa de *Caenorhabditis elegans* empleada en este trabajo fue la TJ1060, un

mutante *spe-9(hc88)*; *fer-15(b26)*II de la cepa N2 (Caenorhabditis Genetics Center).

Esta cepa, que es sensible a temperatura y estéril por encima de los 20°C, se empleó para poder mantener una población adulta homogénea para realizar los diferentes ensayos (Fabian y Johnson 1994). Los stocks de nematodos fueron mantenidos en placas de Petri de 10 cm de diámetro, con medio NGM agar y un césped de *E. coli* OP50, a 16°C en ciclos de luz:oscuridad (LO) 12 hs : 12 hs (Epstein, et al. 2001). Para poder obtener nematodos adultos día 1 para cada ensayo, nematodos fueron transferidos a 4 placas de NGM agar y cultivados durante 4 días a 18,5°C y ciclos LO 12 hs : 12 hs y luego sincronizados por el método de cloro (Lewis y Fleming 1995b) la 5ta mañana. Los huevos obtenidos fueron resuspendidos en 3,5ml de buffer M9 + 35µl de antibiótico antimicótico GIBCO en un erlenmeyer de 50ml e incubados hasta el día siguiente a 18,5°C, 105rpm y condiciones LO 12 hs : 12 hs. La mañana del 6to día se contaron las larvas L1 y aproximadamente 3000 nematodos fueron transferidos a placas individuales de NGM-agar de 10 cm de diámetro con césped de *E. coli* OP50. Estas placas fueron luego cultivadas a 25,3°C en condiciones de LO 12 h : 12 h hasta que los nematodos llegaron al estadio adulto día 1.

Ensayo de muerte rápida paralítica de nematodos

Los ensayos de muerte rápida paralítica fueron llevados a cabo en placas BHI-agar de 6 cm de diámetro, conteniendo 10ml de BHI agar. Cultivos saturados de *P. fluorescens*, crecidos en medio BHI líquido, fueron diluidos 1/50 en BHI y esta dilución fue luego utilizada para esparcir 50µl en cada placa. Luego de que las placas BHI fueran incubadas 24 hs a 28°C, nematodos adultos día 1 fueron colectados con buffer M9 y una alícuota de 50µl (conteniendo 20 a 100 animales adultos) fue sembrada sobre el césped de *P. fluorescens*. La placa fue luego incubada a 25,3°C con la tapa sellada con parafilm ("sellada") o sin la tapa ("abierta"). La muerte rápida por parálisis fue luego evaluada en una lupa estereoscópica cada hora por un total de 4 horas. Los nematodos fueron considerados muertos si no respondían al estímulo de golpear suavemente la placa contra la base de la lupa (Darby, et al. 1999). Luego del ensayo se comprobó que los nematodos que aparecían como totalmente paralizados no respondían a estímulos mecánicos.

Ensayo de muerte lenta de nematodos

Los ensayos de muerte lenta fueron llevados a cabo en placas de Petri de 10 cm de diámetro con 15ml de NG agar y sembradas con 150 µl de una dilución 1/50 en BHI de un cultivo líquido saturado de *P. fluorescens*. Luego de que las placas fueran incubadas por 24 horas a 28°C, nematodos adultos día 1 fueron colectados con buffer M9 y una alícuota de 50 µl (conteniendo 40 a 100 animales) fue sembrada sobre cada placa. Cada placa fue luego incubada a 25,3 °C con la tapa puesta, pero sin sellar con parafilm, y la muerte de los nematodos fue evaluada mediante una lupa estereoscópica (Tan, et al. 1999a; Tan, et al. 1999b; Lujan, et al. 2007). Los nematodos fueron considerados muertos si no respondían al

estímulo de golpear suavemente la placa contra la base de la lupa. Nuevamente se comprobó que luego del ensayo los nematodos que aparecían como totalmente paralizados no respondían a estímulos mecánicos.

Ensayo de muerte por exoproductos volátiles

Los nematodos fueron colocados en una placa de BHI-agar de 3,5 cm de diámetro que contenía un césped de *E. coli* OP50. Esta placa fue colocada, sin tapa, dentro de una placa de BHI-agar de 10 cm de diámetro, que contenía un césped de *P. fluorescens*. De esta manera, sólo los productos volátiles producidos por la cepa de *P. fluorescens* serían capaces de llegar a los nematodos que se encontraban dentro de la placa de 3,5 cm de diámetro. Una vez que los nematodos fueron colocados sobre el césped de *E. coli* OP50, la placa de 10 cm de diámetro fue sellada con parafilm y la muerte rápida por parálisis fue evaluada como se describió más arriba.

Ensayo de muerte mediada por HCN

Los nematodos fueron colocados en una placa de BHI-agar de 3,5 cm de diámetro sin tapa y colocados dentro de una placa vacía de 10 cm de diámetro. Una tapa invertida de 3,5 cm de diámetro, conteniendo alícuotas separadas de 0,18 M de HCl y una masa definida de KCN disuelta en 0,09 M de NaOH, fue también colocada dentro de la placa de 10 cm de diámetro. Luego de sellar la placa de 10 cm de diámetro con Parafilm, se mezclaron las gotas de HCl y KCN/NaOH inclinando la placa, liberando así el gas HCN. La muerte rápida por parálisis fue evaluada como se describió más arriba.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>C. elegans</i>		
TJ1060	mutante de <i>C. elegans</i> (<i>spe-9(hc88)I</i> ; <i>fer-15(b26)II</i>) sensible a la temperatura (estéril por encima de 20C)	(Fabian y Johnson 1994)
<i>E. coli</i>		
DH5α	cepa de laboratorio para clonados. <i>recA1 endA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169</i> (φ80d <i>lacZ</i> M15)	(Sambrook, et al. 2001)
HB101	cepa de laboratorio para cruzamientos. <i>hsdS recA proA2 leu-6 ara-14 galK2 lacY1 xyl-5 mtl-1 rpsL20 thi-1 supE44</i>	(Sambrook, et al. 2001)
OP50	cepa de laboratorio para mantenimiento de <i>C. elegans</i> . Auxótrofo de uracilo	(Brenner 1974)
<i>P. aeruginosa</i>		
Hex1T	salvaje, aislada de suelo contaminado con hidrocarburos	(Pezza, et al. 2002)
<i>P. fluorescens</i>		
ARQ1	miniTn7- <i>gfp1</i> en el sitio <i>attTn7</i> de CHA0; Km ^R	(Jousset, et al. 2006)
ARQ2	miniTn7- <i>gfp1</i> en el sitio <i>attTn7</i> de CHA19; Km ^R	(Jousset, et al. 2006)
CHA0	salvaje, DAPG ⁺ , PLT ⁺ , PRN ⁺ , HCN ⁺ , AprA ⁺	(Voisard, et al. 1994)
CHA19	Δ <i>gacS</i> , DAPG ⁻ , PLT ⁻ , PRN ⁻ , HCN ⁻ , AprA ⁻	(Zuber, et al. 2003)
CHA77	Δ <i>hcnABC</i> , DAPG ⁺ , PLT ⁺ , PRN ⁺ , HCN ⁻ , AprA ⁺	(Laville, et al. 1998)
CHA77+	cepa CHA77 complementada con el plásmido pME3013 (<i>hcnABC</i> ⁺)	Este estudio
CHA207	<i>hcnA</i> ⁻ - <i>lacZ</i> , DAPG ⁺ , PLT ⁺ , PRN ⁺ , HCN ⁻ , AprA ⁺	(Blumer, et al. 1999)
CHA207+	cepa CHA207 complementada con el plásmido pME3013 (<i>hcnABC</i> ⁺)	Este estudio
CHA631	Δ <i>phlA</i> , DAPG ⁻ , PLT ⁺⁺ , PRN ⁺ , HCN ⁺ , AprA ⁺	(Schnider-Keel, et al. 2000)
CHA1012	<i>pltB</i> ::Tn5, Km ^r , DAPG ⁺⁺ , PLT ⁻ , PRN ⁺ , HCN ⁺ , AprA ⁺	(Baehler, et al. 2005)
CHA1018	<i>pltB</i> ::Tn5, Km ^r , Δ <i>phlA</i> , DAPG ⁻ , PLT ⁻ , PRN ⁺ , HCN ⁺ , AprA ⁺	(Baehler, et al. 2005)
CHA1144	Δ <i>rsmX</i> Δ <i>rsmY</i> Δ <i>rsmZ</i> , DAPG ⁻ , PLT ⁻ , PRN ⁻ , HCN ⁻ , AprA ⁻	(Kay, et al. 2005)
Plásmidos		
pME3013	pVK100 con un fragmento genómico HindIII de 8-kb de <i>P. fluorescens</i> CHA0 conteniendo los genes <i>hcnABC</i> para la biosíntesis de HCN; replicón IncP; RK2 Mob; Tc ^R Km ^R	(Voisard, et al. 1989b)
pME497	plásmido de movilización, IncP-1, Tra; RepA ⁺ (Ts); Ap ^R	(Voisard, et al. 1988)

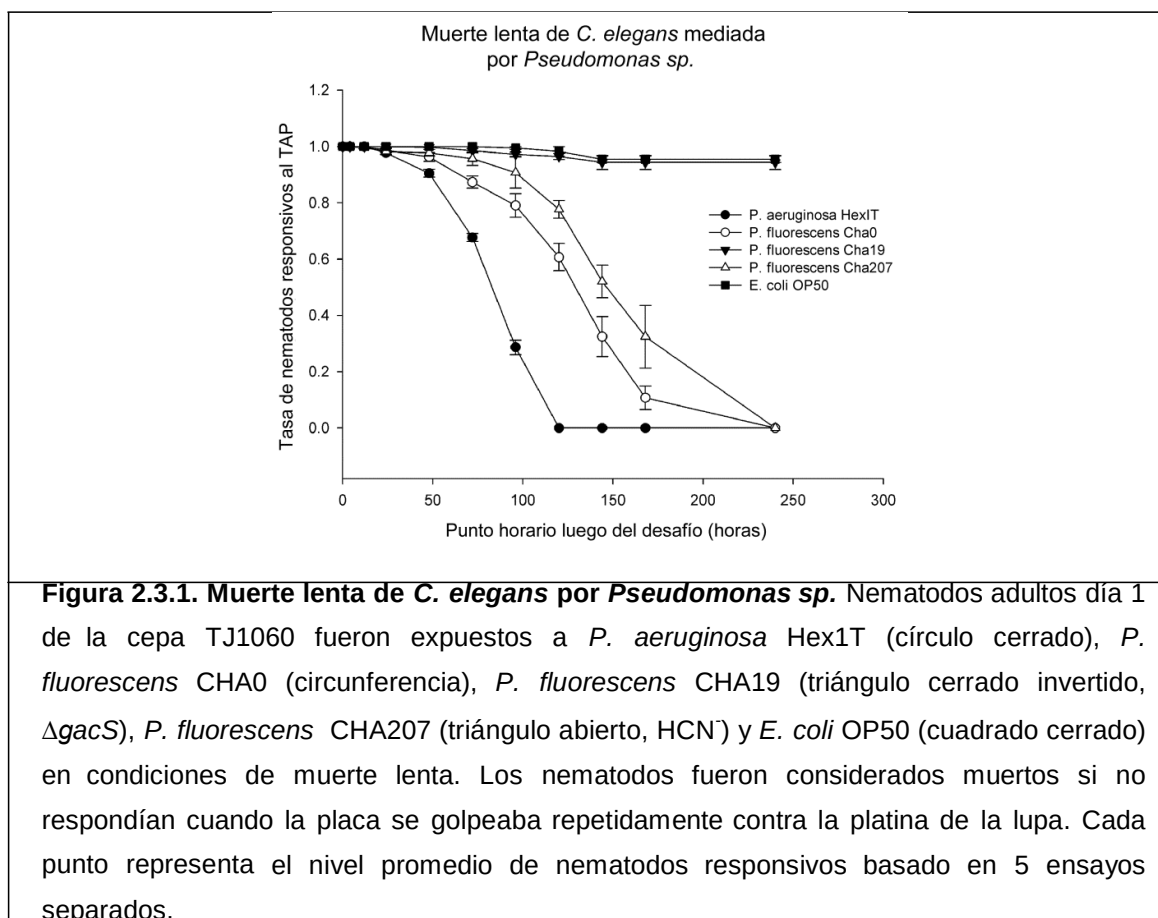
Tabla 2.2.1. Cepas y plásmidos usados en este trabajo

Resultados

Muerte lenta de *C. elegans* por *P. fluorescens*

Se ha demostrado previamente que *P. aeruginosa* exhibe 2 formas de matar nematodos de la especie *C. elegans* (Darby, et al. 1999; Mahajan-Miklos, et al. 1999; Tan, et al. 1999a; Tan, et al. 1999b; Gallagher y Manoil 2001; Darby 2005). Para determinar si *P. fluorescens* también mostraba estos 2 tipos de comportamientos se realizaron ensayos similares a los reportados. En los ensayos de “muerte lenta”, se observó un 50% de letalidad de los nematodos luego de 4 días de incubación para el aislamiento natural *P. aeruginosa* Hex1T. En el caso de *P. fluorescens*, este mismo porcentaje de letalidad se observó a los 6 días para la cepa salvaje CHA0 y, luego de 7 días para la cepa CHA207 (mutante para la producción de HCN). Sin embargo, la cepa CHA19 (un mutante *GacS*) no mató a los nematodos y fue indistinguible de las placas control que contenían bacterias *E. coli* OP50, usadas normalmente como fuente de alimento de los nematodos (Figura 2.3.1). La cepa Hex1T de *P. aeruginosa* fue utilizada como control positivo, ya que se ha reportado que induce “muerte lenta” de *C. elegans* (Lujan, et al. 2007). Con este ensayo hemos encontrado que la cepa *P. fluorescens* CHA0 es capaz de mostrar el comportamiento de “muerte lenta” y que el gen *gacS* es necesario para este tipo de muerte. La imposibilidad de producir HCN gaseoso disminuyó levemente la toxicidad de CHA0 (Figura 2.3.1).

Para evaluar si las bacterias estaban colonizando el intestino de *C. elegans* durante este ensayo, se emplearon las cepas ARQ1 y ARQ2, que son cepas marcadas con GFP, derivadas de CHA0 y CHA19, respectivamente (Tabla 2.2.1). Ambas cepas reprodujeron las curvas de muerte lenta de sus cepas parentales isogénicas (datos no mostrados). Se encontraron bacterias de la cepa ARQ1, pero no de la cepa ARQ2, colonizando el intestino de los nematodos luego de 48 hs de exposición (Figura 2.3.2). Resulta interesante notar que la colonización del intestino por la cepa ARQ2 sólo pudo observarse luego de 168 hs de exposición (Figura 2.3.2D).



Muerte rápida paralítica de *C. elegans*

Otro tipo de muerte exhibida por *P. aeruginosa* es la muerte rápida paralítica (Gallagher y Manoil 2001). Los ensayos con *P. fluorescens* revelaron que tanto *P. aeruginosa* Hex1T como *P. fluorescens* CHA0 matan a *C. elegans*. En este ensayo, la cepa CHA0 resultó mucho más agresiva que la cepa Hex1T (Figura 2.3.3). *P. fluorescens* CHA19 y *E. coli* OP50 no produjeron muerte paralítica de los nematodos (Figura 2.3.3). Nuevamente, la cepa salvaje CHA0 es capaz de matar a *C. elegans* bajo condiciones de muerte rápida, pero el mutante *gacS* resulta inocuo para los nematodos. La cepa CHA1144 de *P. fluorescens*, un mutante que no expresa los tres ARNs pequeños y regulatorios dependientes de GacS/GacA requeridos para la activación de la síntesis de exoproductos, reprodujo el comportamiento del mutante *gacS* CHA19 (datos no mostrados).

En ensayos de colonización sólo se encontraron células de *P. fluorescens* ARQ1 en la faringe de los nematodos (Figura 2.3.5). No se detectó fluorescencia en el intestino en ensayos de muerte rápida (datos no mostrados). Ambas cepas, ARQ1 y ARQ2, reprodujeron las curvas de muerte rápida paralítica de sus cepas parentales isogénicas (datos no mostrados).

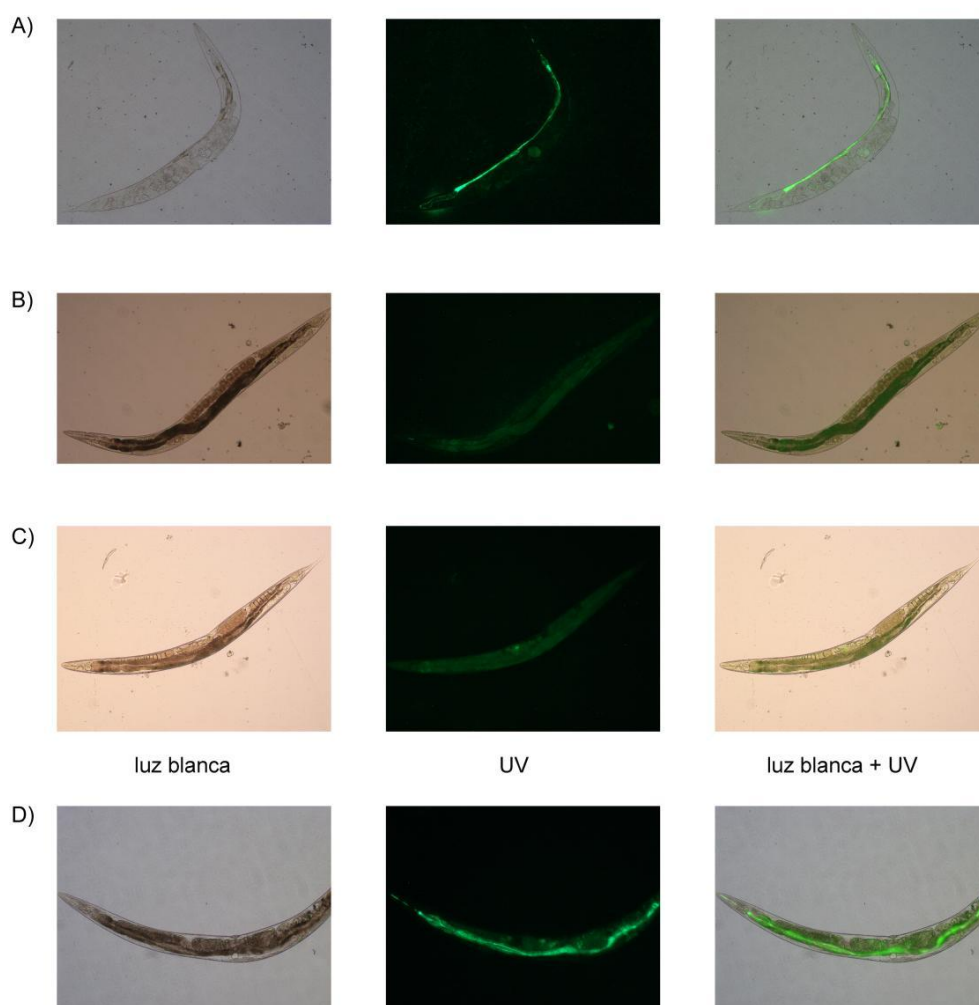
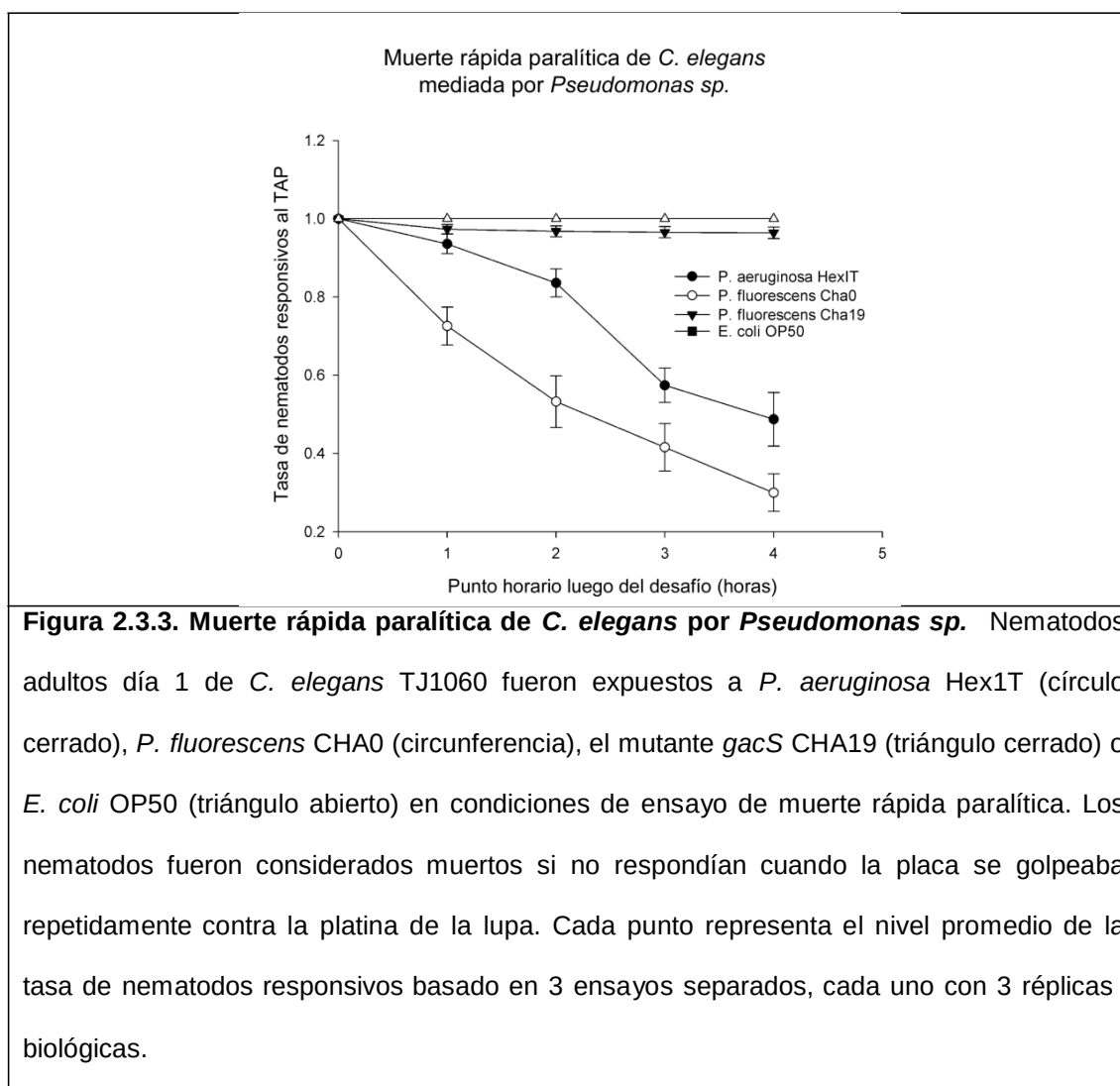


Figura 2.3.2. *P. fluorescens* coloniza el intestino de *C. elegans* bajo condiciones de muerte lenta. Nematodos *C. elegans* TJ1060 adultos día 1 fueron expuestos a (A) *P. fluorescens* ARQ1 (CHA0 marcadas con GFP), (B) *P. fluorescens* ARQ2 (mutante gacS CHA19 marcado con GFP), (C) *E. coli* OP50, luego de 48 h de exposición, o (D) *P. fluorescens* ARQ2 (mutante gacS CHA19 marcado con GFP) luego de 168 h de exposición, en ensayo en condiciones de muerte lenta. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico bajo luz blanca, luz UV y un filtro de 490nm o una combinación de ambas fuentes de luz y un filtro de 490nm. Células de *P. fluorescens* CHA0 fueron detectadas en el intestino de *C. elegans* y en el *corpus* de los nematodos (faringe).

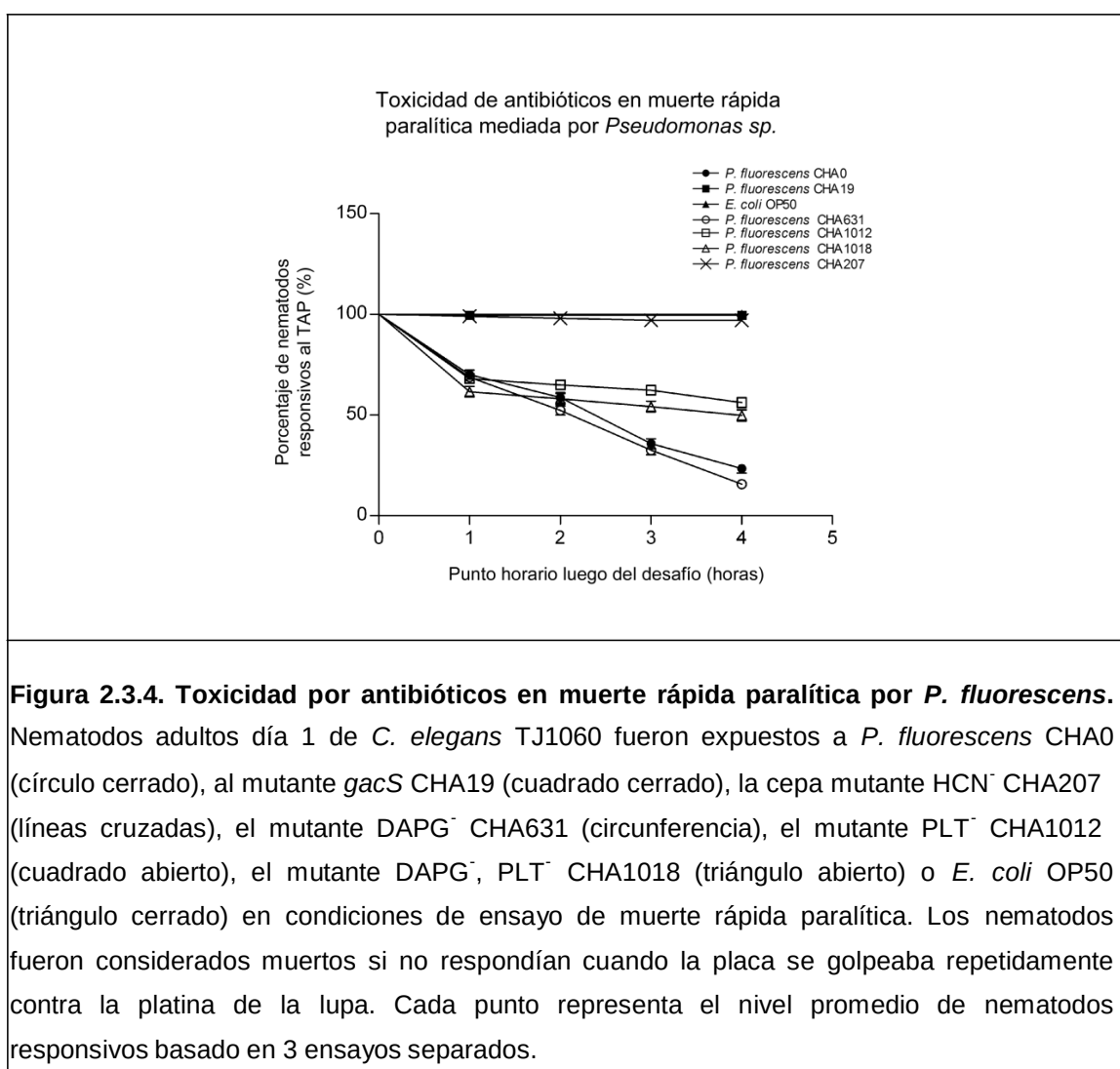


El cianuro es uno de los factores más importantes que afectan la virulencia *P. fluorescens* hacia *C. elegans*.

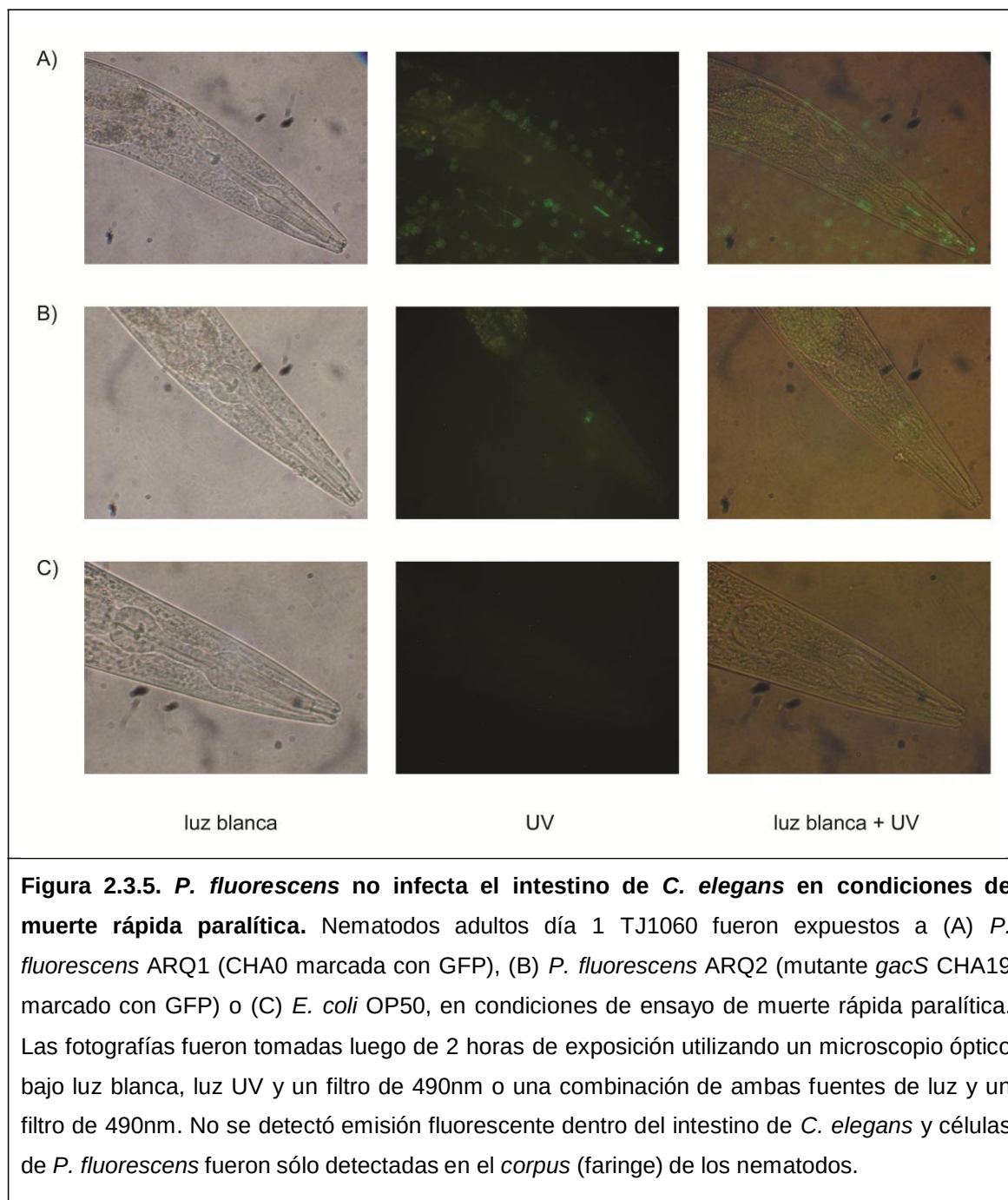
El siguiente objetivo fue identificar los metabolitos producidos por *P. fluorescens* CHA0 responsables de la parálisis observada en *C. elegans*. Para esto, se repitieron los ensayos de muerte rápida usando diferentes mutantes afectados en la producción de metabolitos secundarios (Tabla 2.2.1; Figura 2.3.4). El mutante CHA631, incapaz de producir DAPG, se comportó como la cepa CHA0, indicando la ausencia de toxicidad por DAPG en este ensayo. Los mutantes CHA1012 y CHA1018, deficientes en producción de pyoluteorina, mostraron un efecto levemente menor en los nematodos que aquél mostrado por CHA0 (Figura 2.3.4), sugiriendo una contribución parcial de la pyoluteorina al fenotipo de muerte rápida. Resulta interesante notar que la cepa mutante para la producción de HCN, CHA207, exhibió una habilidad significativamente menor de parálisis de *C. elegans* en condiciones de ensayo de

“muerte rápida paralítica” (Figuras 2.3.4 y 2.3.6). Esta observación fue confirmada con un segundo mutante de producción de HCN (CHA77) isogénico a CHA0 (Figura 2.3.6).

Luego, se modificó el ensayo para estudiar si el HCN volátil era, efectivamente, el compuesto responsable de la parálisis de *C. elegans*. Esto se realizó de dos maneras: primero se repitió el ensayo, pero dejando la placa de Petri abierta y se descubrió que todos los nematodos permanecían activos aún después de 4 horas. Segundo, se modificó el ensayo de muerte separando físicamente la cepa en estudio de los nematodos *C. elegans* de tal forma que el contacto entre ambos ocurriera sólo a través de la fase gaseosa (ver materiales y métodos). De esta manera, se encontró que CHA0 fue capaz de paralizar a los nematodos (sólo el 18% de los individuos se mantuvo activo luego de 4 horas de ensayo), mientras que CHA19, CHA207 y OP50 no pudieron inducir una reducción en la tasa de supervivencia al final del ensayo.



Para confirmar aún más la importancia del HCN en este tipo de muerte, complementamos las dos cepas mutantes de producción de HCN diferentes, CHA77 y CHA207, con un plásmido multicopia que contenía al operón *hcn* de CHA0. Un test colorimétrico (Gewitz, et al. 1976) demostró que ambas cepas complementadas recuperaron la producción de HCN (datos no mostrados). Las cepas complementadas, CHA77+ y CHA207+, exhibieron una actividad inductora de parálisis incluso mayor a aquella inducida por la cepa salvaje (Figura 2.3.6).



La tolerancia de *C. elegans* a la muerte rápida paralítica varía a lo largo del día.

Previamente hemos demostrado que *C. elegans* muestra variaciones diarias en la tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico (Simonetta, et al. 2008). Esto nos llevó a preguntarnos si *C. elegans* también mostraría variaciones en la tolerancia a un estrés biótico como el causado por *P. fluorescens* CHA0 (figura 2.3.3). Para estudiar esto, realizamos ensayos de muerte rápida paralítica en dos momentos distintos del día: a ZT0 (encendido de las luces) y ZT12 (apagado de las luces) (Figura 2.3.7). Tanto en el caso de *P. aeruginosa* Hex1T como en el de *P. fluorescens* CHA0, los nematodos mostraron una tasa más alta de parálisis durante la noche (Log-rank (Mantel-Cox) Test, $p < 0.0001$ and Gehan-Breslow-Wilcoxon Test, $p < 0.0001$) (Figuras 2.3.7A y 2.3.7B). Esto sugiere una susceptibilidad diferencial a ambos agentes causantes de estrés biótico a lo largo del día. *P. fluorescens* CHA19 y *E. coli* OP50 no afectaron la supervivencia de los nematodos a ZT0 y ZT12 (datos no mostrados).

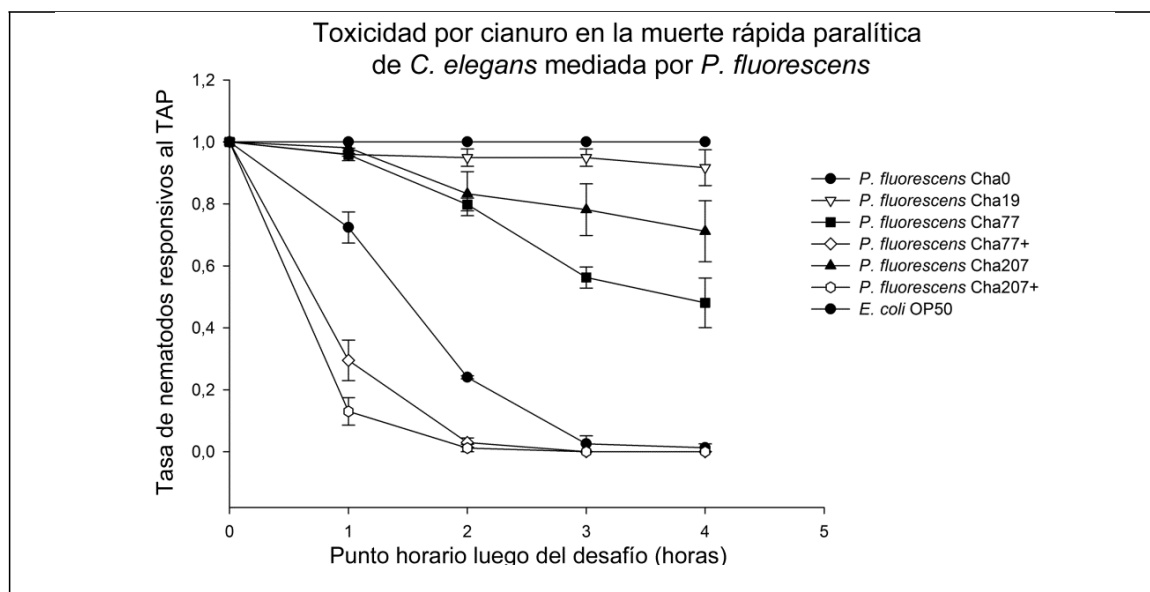


Figura 2.3.6. Toxicidad del cianuro de hidrógeno en la muerte rápida paralítica de *C. elegans* por *P. fluorescens*. Nematodos *C. elegans* adultos día 1 fueron expuestos a *P. fluorescens* CHA0 (círculo cerrado), el mutante *gacS* CHA19 (triángulo abierto), el mutante HCN⁻ CHA77 (círculo cerrado), CHA77+ (rombo abierto), el mutante HCN⁻ CHA207 (triángulo cerrado), CHA207+ (hexágono abierto) o *E. coli* OP50 (círculo cerrado) en condiciones de ensayo de muerte rápida paralítica. CHA77+ y CHA207+ son mutantes deletacionales cromosómicos de *hcn* complementados con un plásmido que contiene el locus *hcn* de CHA0. Los nematodos fueron considerados muertos si no respondían cuando la placa se golpeaba repetidamente contra la platina de la lupa. Cada punto representa el nivel promedio de nematodos responsivos al TAP basado en 3 ensayos separados, cada uno con 3 réplicas biológicas.

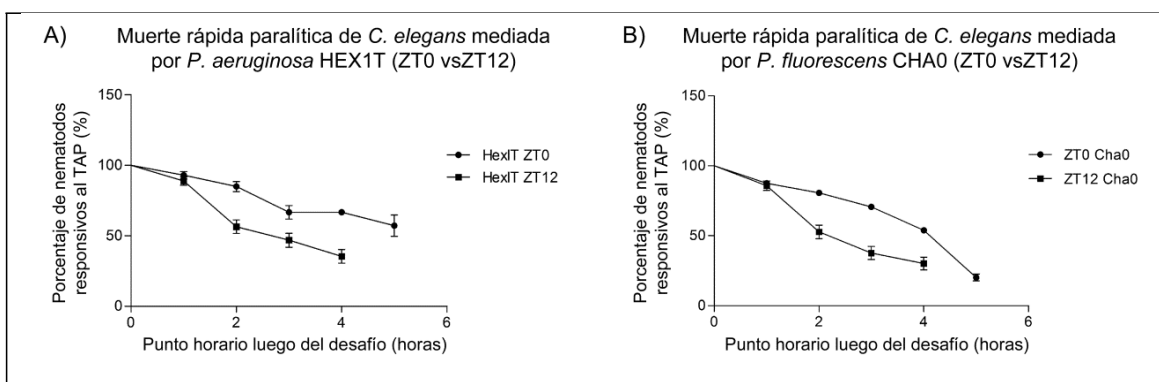


Figura 2.3.7. La tolerancia a muerte rápida parálitica de *C. elegans* varía a lo largo del día.

C. elegans TJ1060 mantenidos en condiciones LO (luz:oscuridad) 12 h : 12 h fueron sometidos a un ensayo de muerte rápida parálitica por *P. aeruginosa* Hex1T (A) o *P. fluorescens* CHA0 (B) a ZT0 (*Zeitgeber Time* 0, encendido de luces) y ZT12 (*Zeitgeber Time* 12, apagado de luces). Los nematodos fueron considerados muertos si no respondían cuando la placa se golpeaba repetidamente contra la platina de la lupa. Cada punto representa el nivel promedio de nematodos responsivos al TAP basado en 3 ensayos separados. *P. fluorescens* CHA19 y *E. coli* OP50 fueron usados como controles (datos no mostrados).

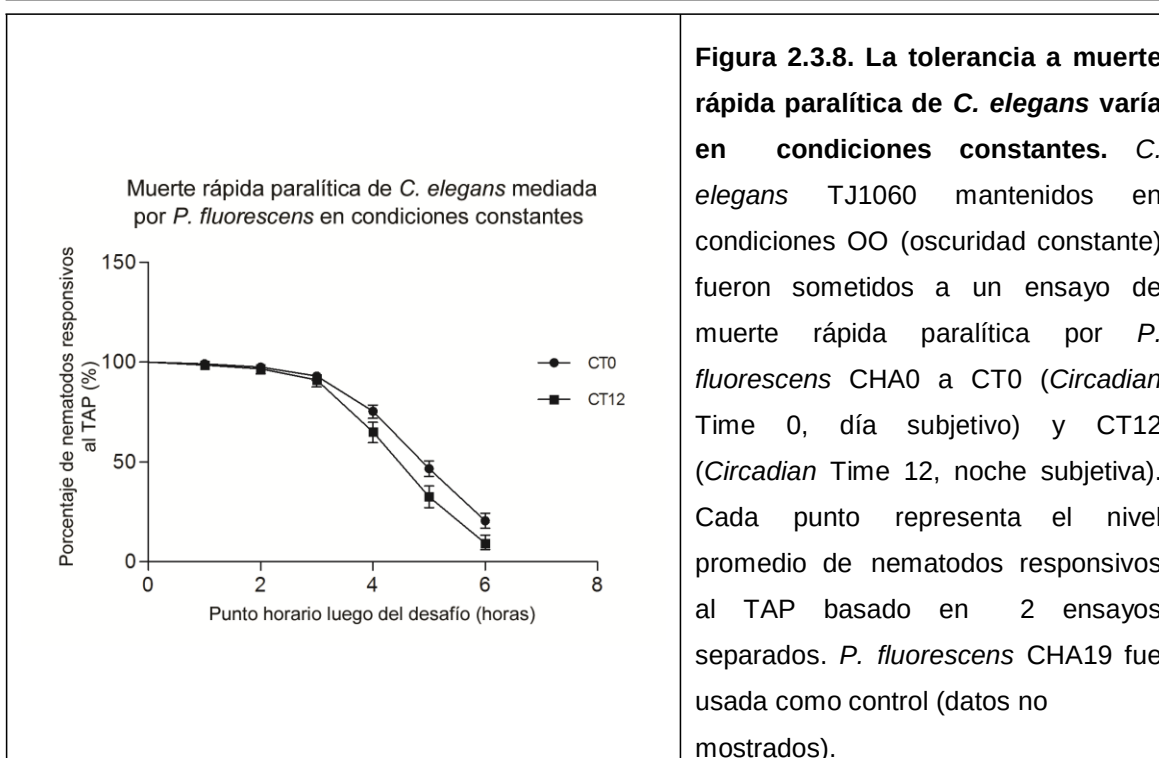


Figura 2.3.8. La tolerancia a muerte rápida parálitica de *C. elegans* varía en condiciones constantes. *C. elegans* TJ1060 mantenidos en condiciones OO (oscuridad constante) fueron sometidos a un ensayo de muerte rápida parálitica por *P. fluorescens* CHA0 a CT0 (*Circadian Time* 0, día subjetivo) y CT12 (*Circadian Time* 12, noche subjetiva). Cada punto representa el nivel promedio de nematodos responsivos al TAP basado en 2 ensayos separados. *P. fluorescens* CHA19 fue usada como control (datos no mostrados).

Este cambio diario en la tasa de parálisis mediada por *P. fluorescens* se mantuvo bajo condiciones constantes (a 25,3 °C), con un pico a CT12 (el momento previo al

apagado de las luces) (Log rank (Mantel-Cox) Test, $p < 0,0001$), sugiriendo que esta susceptibilidad diferencial representa un verdadero ritmo circadiano (Figura 2.3.8).

C. *elegans* muestra variaciones diarias en la tolerancia a cianuro de hidrógeno.

Habiendo encontrado una variación diaria de *C. elegans* en los ensayos de muerte rápida parálitica mediada por ambas especies de *Pseudomonas* (Figuras 2.3.7A y 2.3.7B) y habiendo asimismo identificado al HCN como uno de los factores principales del efecto observado (Figuras 2.3.4 y 2.3.6), estudiamos la tolerancia de *C. elegans* a 2 μ moles de HCN a ZT0 y ZT12. Se encontró que los nematodos soportan mejor la exposición a HCN durante la mañana que durante la noche (Log-rank (Mantel-Cox) Test, $p < 0.0001$) (Figura 2.3.9). Dosis más altas de HCN (6 o 12 μ moles) hacen desaparecer la diferencia diaria en toxicidad (Figura 2.3.10).

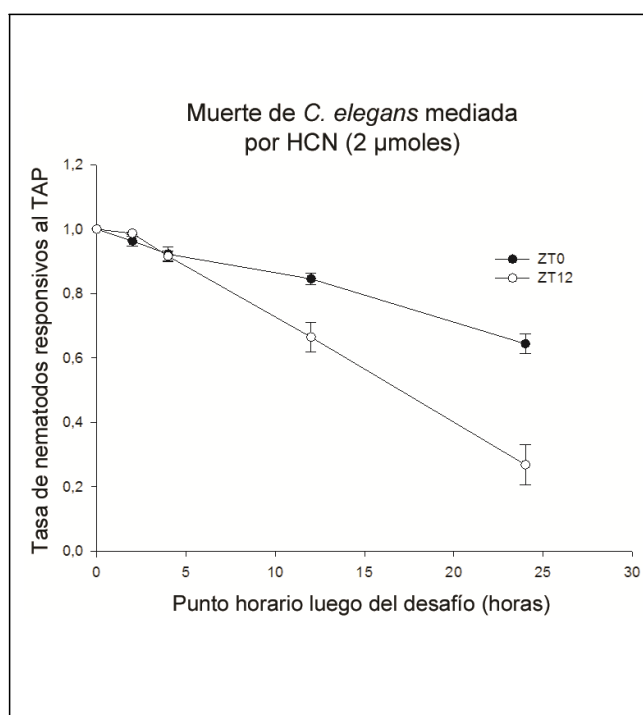
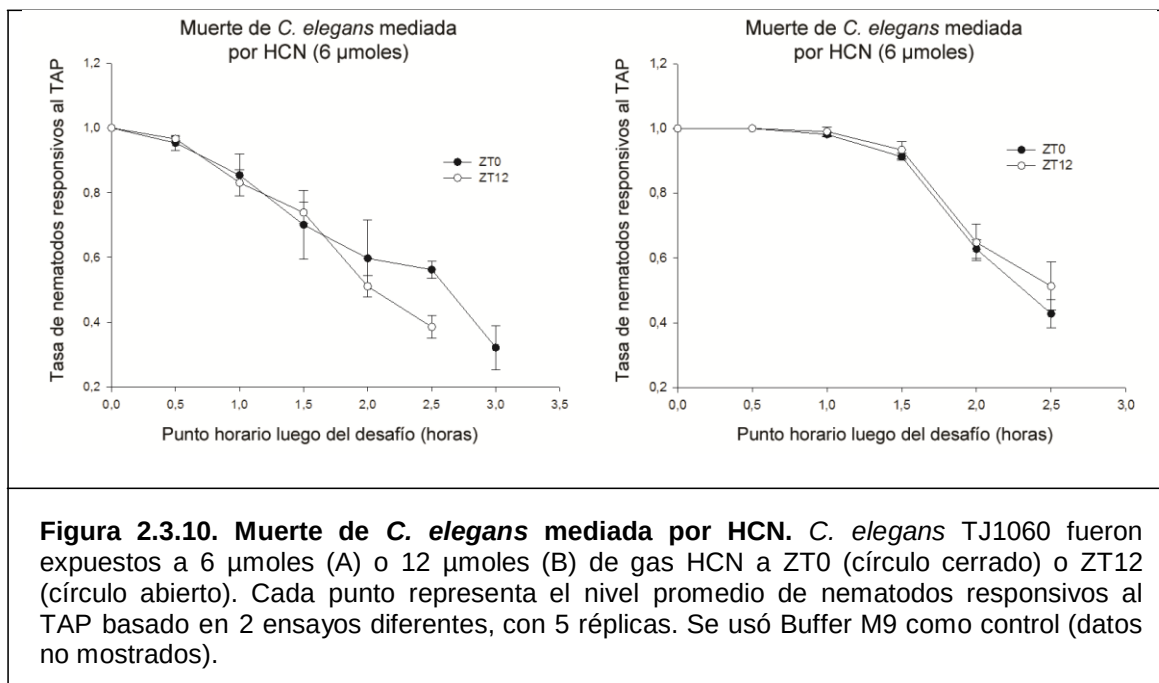


Figura 2.3.9. Variación diaria en la muerte de *C. elegans* mediada por HCN. Nematodos adultos día 1 TJ1060 fueron expuestos a 2 μ moles de gas de cianuro de hidrógeno a ZT0 (círculo cerrado) o ZT12 (círculo abierto). Los nematodos fueron considerados muertos si no respondían cuando la placa se golpeaba repetidamente contra la platina de la lupa. Cada punto representa el nivel promedio de nematodos respondivos al TAP basado en 5 ensayos separados. Se utilizó Buffer M9 como control (datos no mostrados).



Discusión

Muerte de *C. elegans* mediada por *P. fluorescens*

Nuestros resultados muestran que la cepa CHA0 de *P. fluorescens* es capaz de matar eficientemente a nematodos de la especie *C. elegans* con una tasa similar a *P. aeruginosa* Hex1T en condiciones de ensayo de muerte lenta (Figura 2.3.1). Asimismo, se encontraron bacterias marcadas con GFP (cepa *P. fluorescens* CHA0) dentro del *lumen* de los nematodos luego de 48 h de exposición, indicando una colonización bacteriana. Esto también ha sido observado en el caso de *P. aeruginosa* (Tan, et al. 1999a) y parece ser característico de este tipo de muerte. También encontramos que la cepa CHA19, un mutante *gacS* que no produce toxinas, no es capaz de matar a *C. elegans* (Figura 2.3.1). Esto nos dice que los metabolitos secundarios dependientes de GacS son necesarios para la muerte lenta. Sin embargo, CHA207, una cepa mutante deficiente en la producción de HCN, fue capaz de matar a *C. elegans* a prácticamente la misma tasa que la cepa CHA0 (Figura 2.3.1), sugiriendo que el HCN es dispensable para este efecto tóxico causado por la cepa CHA0. Como la colonización intestinal fue severamente afectada en el mutante *gacS*, *P. fluorescens* ARQ2 (CHA19 marcada con GFP, figura 2.3.2), parece ser que la producción de metabolitos secundarios ayuda en la infección del intestino de *C. elegans*.

P. fluorescens CHA0, al igual que *P. aeruginosa* Hex1T, también exhibe la capacidad de inducir “muerte rápida parálitica” de los nematodos (Figura 2.3.3). No se ha determinado aún qué causa que *P. fluorescens* exhiba uno u otro comportamiento.

Sólo podemos hipotetizar que la composición del medio parece ser un factor clave para determinar el tipo de muerte observado. El medio BHI es una fuente más rica en carbono y nitrógeno que el medio NG, por ende la densidad de bacterias alcanzada en el medio BHI es más alta. Esto, a su vez, es crítico para la producción de metabolitos secundarios en *P. fluorescens* CHA0, tales como enzimas extracelulares, antibióticos y HCN, ya que su síntesis se ve favorecida cuando se activa una cascada regulatoria similar al *quorum sensing*, que es manejada por el sistema de dos componentes GacS/GacA (Valverde y Haas 2008). De hecho, la muerte rápida parálítica mostrada por CHA0 es inexistente en un mutante *gacS* (Figura 2.3.3).

Nuestros datos indican que el HCN es el factor principal (o uno de los factores principales) involucrado en la muerte rápida parálítica (Figuras 2.3.4 y 2.3.6). Los mutantes deficientes en la producción de HCN no logran matar a los nematodos de manera tan eficiente como la cepa salvaje y cuando son complementados con el plásmido pME3013 (un plásmido multicopia que contiene al operón *hcn* salvaje) recuperan una letalidad aún más alta que la exhibida por la cepa salvaje. Esto puede explicarse por el hecho de que se ha mostrado que el plásmido usado para complementar a los mutantes incrementa 5 veces la producción de HCN relativa a la cepa salvaje (Voisard, et al. 1989a). Nuestros resultados concuerdan con reportes previos que indican que el HCN es el principal responsable en la muerte rápida parálítica por *P. aeruginosa* (Gallagher y Manoil 2001). Sin embargo, hay una diferencia en el requisito del sistema regulatorio GacS/GacA para la parálisis mediada por HCN entre *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*: mientras que en *P. aeruginosa*, la muerte rápida no se ve afectada por mutaciones *gac* (Tan, et al. 1999a), nosotros observamos un requerimiento estricto de la cascada Gac/Rsm para la muerte rápida parálítica por la cepa CHA0 de *P. fluorescens* (Figura 2.3.3). Esto puede deberse a la regulación diferencial sobre el operón *hcn* por parte del sistema GacS/A. Mientras que en *P. aeruginosa* la mutación *gacA* causa una reducción de 3 veces en la producción de HCN (Kay, et al. 2006), los mutantes *gac* de *P. fluorescens* CHA0 producen 25 veces menos HCN que la cepa salvaje (Valverde, et al. 2003).

Resulta interesante notar que un estudio reciente muestra que *P. fluorescens* CHA0 es capaz de matar termitas subterráneas de la especie *Odontotermes obesus*, inhibiendo a la citocromo c oxidasa (CCO) de la cadena de transporte de electrones. La inhibición de la CCO fue dependiente de la cantidad de HCN producido. En este trabajo también se mostró que la delección del operón *hcn* de la cepa CHA77 redujo fuertemente la letalidad de las termitas (Allada y Chung 2010). Sin embargo, no podemos dejar de lado que el HCN puede no ser el único factor importante para este tipo de muerte de *C. elegans* y que algún tipo de sinergia puede ocurrir con alguno de los otros metabolitos secundarios producidos por *P. fluorescens*. La pyoluteorina también parece estar involucrada en este proceso, ya que dos mutantes negativos de este antibiótico, CHA1012 y CHA1018, mostraron una capacidad ligeramente disminuida para matar a *C. elegans* comparada con

la cepa CHA0 (Figura 2.3.4). Nuestros experimentos apoyan la idea de que *P. fluorescens* mata a *C. elegans* de una manera similar a la reportada para *P. aeruginosa*. Sin embargo, esto no debe ser tomado como una regla general para pseudomónidos. *Pseudomonas* sp. DSS73 no es capaz de matar a *C. elegans* y además ayuda a protegerlo de la muerte por el flagelado *Cercomonas* en experimentos de microcosmos (Bjornlund, et al. 2009).

Las toxinas liberadas por el metabolismo secundario de *P. fluorescens* CHA0 ayudan a prevenir eficientemente la depredación por nematodos. Esto está de acuerdo con experimentos de microcosmos (Jousset, et al. 2009) en el cual los nematodos fueron colocados junto con poblaciones heterogéneas de *P. fluorescens* CHA0 y el mutante *gacS* no tóxico CHA19. *C. elegans* mostró una preferencia por alimentarse con la cepa mutante. Sin embargo, en este escenario CHA19 sobrevive aumentando su *fitness*, ayudándose de los exoproductos de la cepa salvaje coexistente. El alimentarse de la cepa no tóxica refuerza la producción de toxinas a través del incremento de la frecuencia de CHA0 en la población. Esto puede explicar por qué se encuentran frecuentemente en la naturaleza bacterias con genes *gacS/gacA* mutados (Martinez- Granero, et al. 2005; van den Broek, et al. 2005). La producción de toxinas es una buena estrategia no sólo para evitar la depredación, sino también para aumentar la depredación de otras rizobacterias que pueden aparecer más apetecibles, incrementando, por ende, la competitividad (Jousset, et al. 2008a). Una respuesta adaptativa a este fenómeno podría ser la predicción de los momentos del día en que se deban activar los mecanismos de defensa adecuados, de manera de responder de manera cronobiológica.

Variaciones diarias en la muerte rápida paralítica por *P. fluorescens*

Se ha establecido que *C. elegans* responde a las infecciones a través de diferentes vías: la vía DBL-1, la vía DAF-2/DAF-16, la vía de MAP kinasa y la vía de ERK, así como a través del reconocimiento de la infección por la vía de respuesta a estrés (Ewbank 2006). En este trabajo mostramos que el HCN es el principal factor involucrado en la muerte paralítica de *C. elegans*. Como hemos demostrado previamente, en el capítulo 1, que *C. elegans* posee variaciones diarias en la tolerancia a estrés abiótico (Simonetta, et al. 2008), hipotetizamos que quizás también podría haber variaciones diarias en la respuesta a estrés biótico causado por *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*. Efectivamente, este es el caso: encontramos que la tasa de muerte por parálisis es más elevada durante la noche, a ZT12 (horario de apagado de las luces). El significado ecológico de esta variación diurna en la resistencia a estrés aún debe ser establecido. Un trabajo reciente postula que las diferencias en la expresión de funciones metabólicas y de defensa pueden afectar la dinámica de comunidades de nematodos a través de la interacción con su microambiente microbiano (Coolon, et al. 2009). Los autores encontraron que la

exposición a diferentes fuentes bacterianas de alimento induce una expresión génica diferencial en *C. elegans*. En acuerdo con esto, la exposición a *Pseudomonas sp.* altera la expresión de genes relacionados a la inmunidad innata, la defensa y el metabolismo en *C. elegans* (Coolon, et al. 2009). Cambios diarios en la expresión de genes podrían entonces representar una adaptación a cambios diarios en la abundancia de tipos de bacterias y, a su vez, pueden contribuir con la dinámica de poblaciones de los suelos. Asimismo, las vías transduccionales relacionadas con la respuesta a metabolitos bacterianos también podrían sufrir variaciones periódicas.

La toxicidad del cianuro de hidrógeno varía entre el día y la noche

Para poder entender si las variaciones diarias observadas en la muerte rápida paralítica se deben a una respuesta a estrés diferencial frente al HCN, estudiamos la tolerancia de *C. elegans* a diferentes concentraciones de HCN en 2 puntos horarios, ZT0 (encendido de las luces) y ZT12 (apagado de las luces). Encontramos que los nematodos mostraron una mayor susceptibilidad al HCN al anochecer (ZT12), tal como en el ensayo de muerte rápida paralítica. Sin embargo, nuestros datos también muestran que a concentraciones más altas de HCN esta susceptibilidad diferencial desaparece (Figura 2.3.10), indicando que la respuesta varía sólo debajo de un umbral determinado. Efectivamente, los ritmos circadianos en respuesta a un compuesto tóxico sólo son evidentes en un rango limitado de concentraciones. Si la dosis excede ciertos límites, entonces ensayos realizados durante el día y la noche muestran una curva de supervivencia similar. Esto se debe a que la dosis empleada excede ampliamente a la capacidad moduladora del sistema circadiano del organismo, preparado para responder a los niveles de tóxicos usualmente encontrados en la naturaleza.

Conclusiones finales

En este capítulo se muestra que *P. fluorescens* CHA0 muestra al menos dos modos de matar a nematodos de la especie *C. elegans*. Uno de ellos, la muerte lenta, requiere que la vía GacS esté activa, pero no depende de la producción de HCN. La otra, que se asemeja a la muerte rápida paralítica mediada por *P. aeruginosa*, también requiere de la vía GacS y depende fuertemente de la producción de HCN, aunque otros factores pueden también contribuir a la patogenicidad observada.

Se han descrito ritmos circadianos en la respuesta inmune innata en diferentes especies. Un trabajo reciente muestra que cuando la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es infectada por *P. aeruginosa*, las tasas de supervivencia de las moscas salvajes varían en función del horario de infección, encontrándose un pico en la mitad de la noche (Lee y Ederly 2008). La respuesta inmune innata observada en *C. elegans* puede afectar a la vía de respuesta a estrés (Ewbank 2006). Se sabe que la respuesta a HCN

involucra a la proteína EGL-9 que a su vez regula al factor inducido por hipoxia HIF-1 (Epstein, et al. 2001). Además, se ha demostrado con anterioridad que los mutantes de *egl-9* son resistentes a la exposición a *P. aeruginosa* (Darby, et al. 1999) y esto puede deberse a que estos mutantes presentan una resistencia mayor a la hipoxia. Las variaciones diarias observadas en la tasa de muerte rápida paralítica pueden entonces deberse a variaciones diarias en esta vía de respuesta a estrés. Hemos demostrado con anterioridad la existencia de ritmos diarios de tolerancia a estrés osmótico y oxidativo. La tolerancia a estrés osmótico muestra un máximo a ZT12 (apagado de las luces). En la naturaleza, a medida que la temperatura se eleva, aumenta la desecación y se esperaría una mayor tolerancia a estrés osmótico durante el día. La tolerancia a estrés oxidativo es máxima a ZT0 (encendido de las luces). Las especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden ser generadas por la exposición a luz UV y por el funcionamiento de las mitocondrias. En *C. elegans* los niveles de ROS deberían ser elevados cuando los nematodos exhiben altas tasas de actividad. Nosotros y otros hemos demostrado que los nematodos son más activos durante la transición noche/día (Saigusa, et al. 2002; Simonetta y Golombek 2007; Simonetta, et al. 2009) en condiciones de LO, lo cual correlaciona bien con nuestros resultados. Además, se sabe que *C. elegans* tiene la capacidad de sintetizar melatonina, un excelente agente antioxidante que cumple el rol de señalar la noche en diversos organismos, con un pico nocturno (Migliori, et al. 2012), que correlaciona perfectamente con la tolerancia máxima al estrés oxidativo. Estos cambios en la tolerancia a agentes estresantes son orquestados por un reloj central en otros organismos. Este puede también ser el caso en *C. elegans*. Los comportamientos circadianos observados no se deben a enmascaramiento (un efecto debido a una señal ambiental, pero que no es mantenida por un reloj endógeno), ya que hemos demostrado que las diferencias se mantienen aún en condiciones constantes.

Por otro lado, algo que no hemos considerado aún es la posibilidad de que *P. fluorescens* exhiba ritmos circadianos en la producción de metabolitos secundarios. En el año 2010 se describieron ritmos de crecimiento en *Pseudomonas putida* KT2440 bajo ciclos LO 16h: 8h (Soriano, et al. 2010), en línea con algunas antiguas investigaciones que describían ritmos de crecimiento en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Rogers y Greenbank 1930; Halberg, et al. 2003), aunque se desconoce la existencia de otros ritmos en bacterias no fotosintéticas. Igualmente, si este fuera el caso, las condiciones de crecimiento de las bacterias empleadas en este trabajo asegurarían que estas se encuentren desfasadas (circadianamente hablando) a nivel poblacional, dado que en ningún momento fueron crecidas bajo condiciones ambientales que fluctuaran con un patrón de 24 h, excepto en los ensayos de muerte lenta, donde estuvieron sujetas a ciclos LO 12 h: 12 h junto con los nematodos. Además no se realizaron estudios circadianos de desafío por muerte lenta. De esta manera, podemos decir que los ritmos diarios observados en la tasa de parálisis mediada por muerte rápida muy probable

se deban puramente a cambios fisiológicos que ocurrían dentro de los nematodos sincronizados a los ciclos LO. Es más, los ensayos con HCN confirmaron los resultados obtenidos en los ensayos bióticos, reforzando esta hipótesis. Sin embargo, no es posible descartar completamente algún efecto de sincronización mediado por *quorum sensing* u otros tipos de señalización intercelulares (Coggan y Wolfgang 2012; Jimenez, et al. 2012). Es probable entonces, que quizás estos ritmos observados en *C. elegans* hayan coevolucionado con un estrés periódico del ambiente, que en este caso sería mediado por los productos secretados por las bacterias.

En condiciones de LO, la luz sincroniza la respuesta fisiológica de los nematodos, pero aún se desconoce cómo es que esto sucede. En el capítulo anterior hemos descripto ritmos diarios y circadianos frente a estrés osmótico y oxidativo. Además también se sabe que *C. elegans* exhibe ritmos de actividad locomotora y de síntesis de melatonina (ver resumen de acrofases en Figura 2.4.1). Se ha descubierto que *C. elegans* posee una familia novedosa de fotorreceptores (Edwards, et al. 2008; Ward, et al. 2008; Liu, et al. 2010) que podría estar mediando la transducción de las señales lumínicas del medioambiente al reloj endógeno de los nematodos, pero la conexión entre ellos y el sistema circadiano aún no fue dilucidada. Cómo funciona el reloj de *C. elegans* y cuáles son los mecanismos que lo ponen en hora son preguntas que aún restan responder.

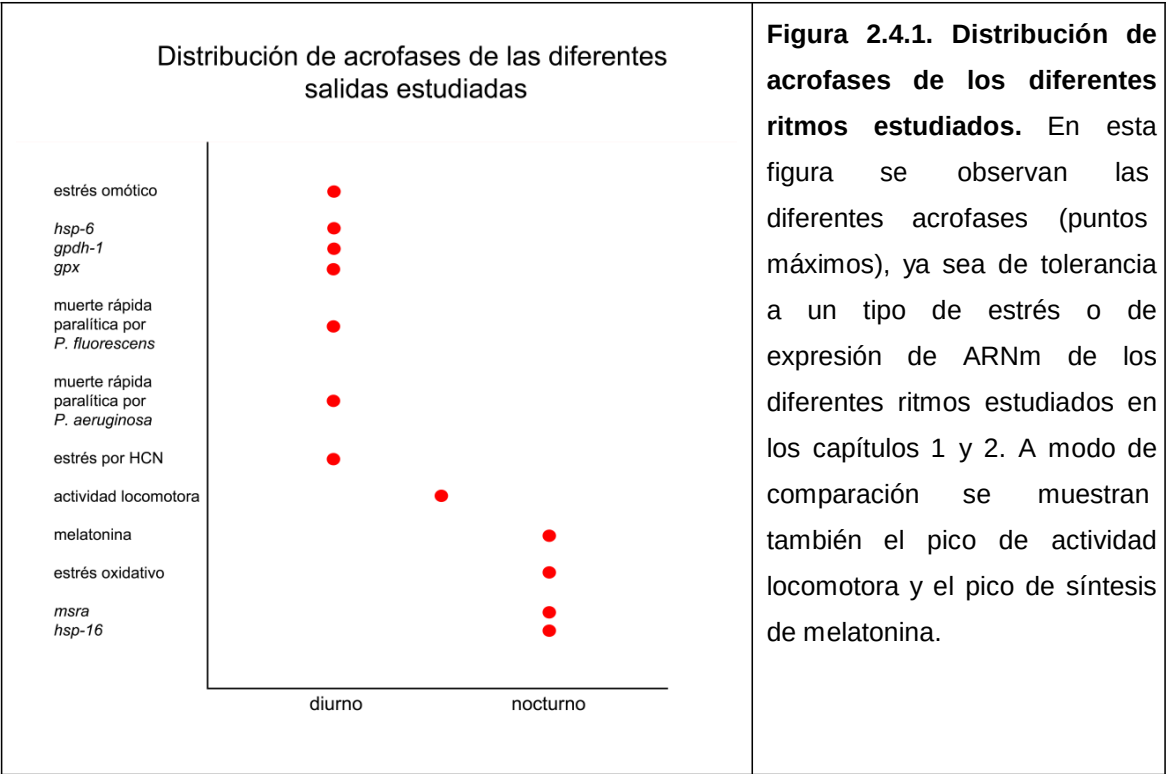


Figura 2.4.1. Distribución de acrofases de los diferentes ritmos estudiados. En esta figura se observan las diferentes acrofases (puntos máximos), ya sea de tolerancia a un tipo de estrés o de expresión de ARNm de los diferentes ritmos estudiados en los capítulos 1 y 2. A modo de comparación se muestran también el pico de actividad locomotora y el pico de síntesis de melatonina.

Capítulo 3

Estado redox y ritmos

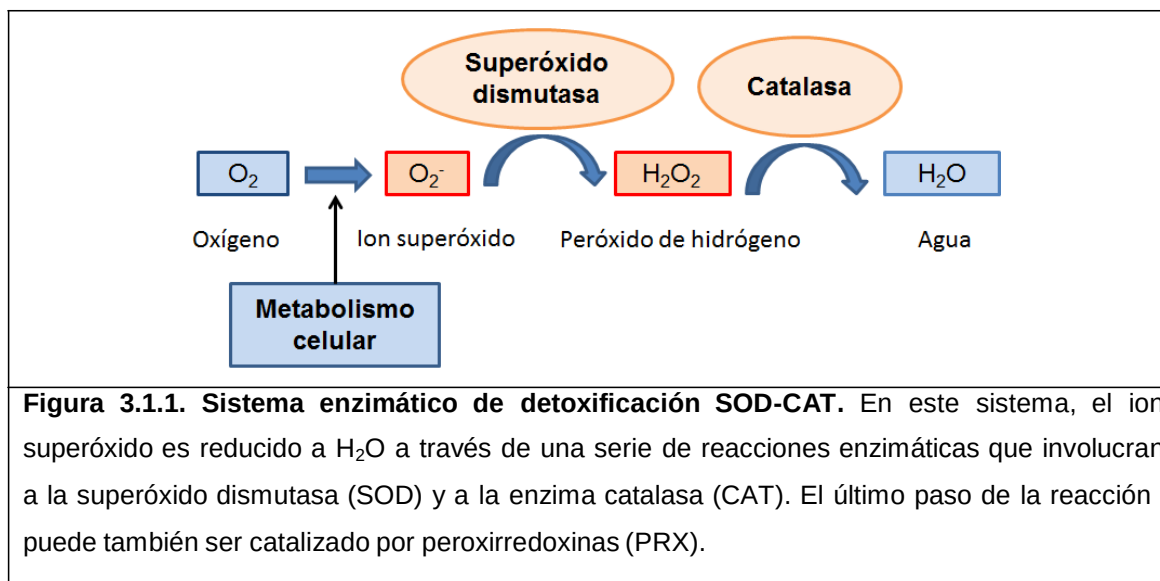
Introducción

En los primeros dos capítulos se demostró que *C. elegans* posee ritmos diarios en la tolerancia frente a diferentes tipos de estrés abiótico y estrés biótico. De estos ensayos hemos visto que este organismo tolera mejor el estrés osmótico durante la noche, y el oxidativo y el mediado por bacterias del género *Pseudomonas*, durante el día. El estrés oxidativo, particularmente, está íntimamente relacionado con el concepto de estado redox, ya que este tipo de estrés puede alterar el balance de oxidorreducción de las células, afectando directamente al metabolismo celular.

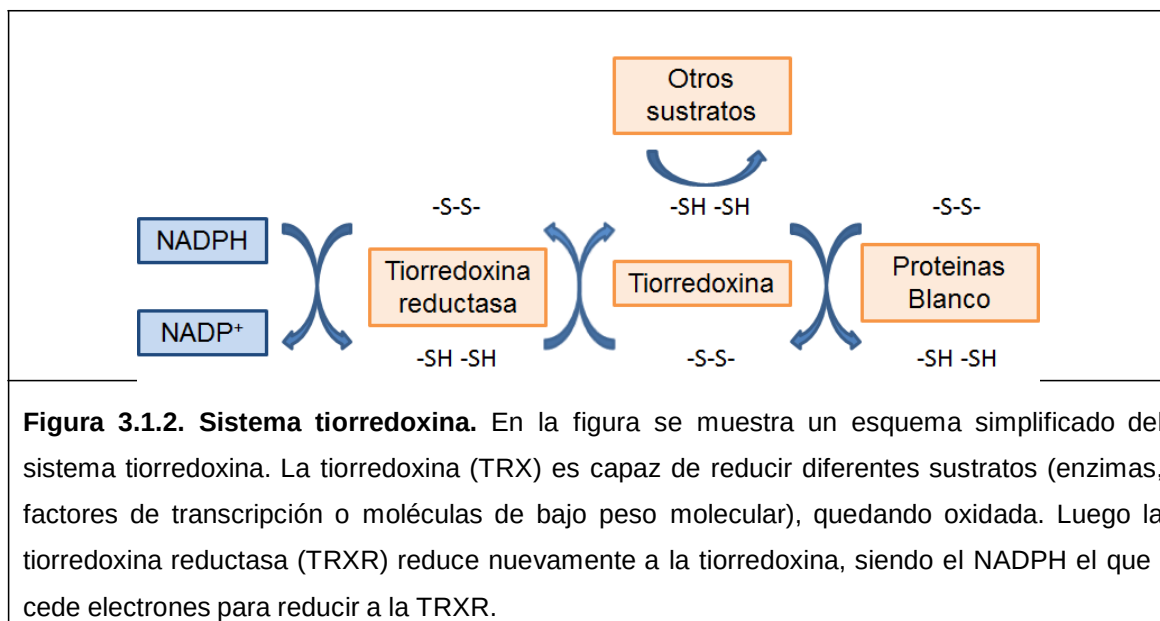
Históricamente, el estado redox fue definido como la tasa entre las formas oxidada y reducida de un par redox específico. Estas formas son interconvertibles entre sí; un ejemplo clásico es la tasa de NAD⁺/NADH (Bücher y Klingenberg 1958; Krebs 1967; Krebs y Gascoyne 1968). Hoy en día, se define al estado redox por el potencial de reducción de media celda (E_{hc} o E^0) y la capacidad reductora del par redox.

Resulta inadecuado usar el término *estado redox* con sistemas que tienen muchos pares redox acoplados, como las células y los tejidos. Por ende, se sugiere el término *ambiente redox* para estos sistemas. El ambiente redox de un set de pares redox acoplados (como los encontrados en una organela, célula o tejido) es la sumatoria de los productos del potencial redox y la capacidad reductora de los pares redox presentes (Schafer y Buettner 2001).

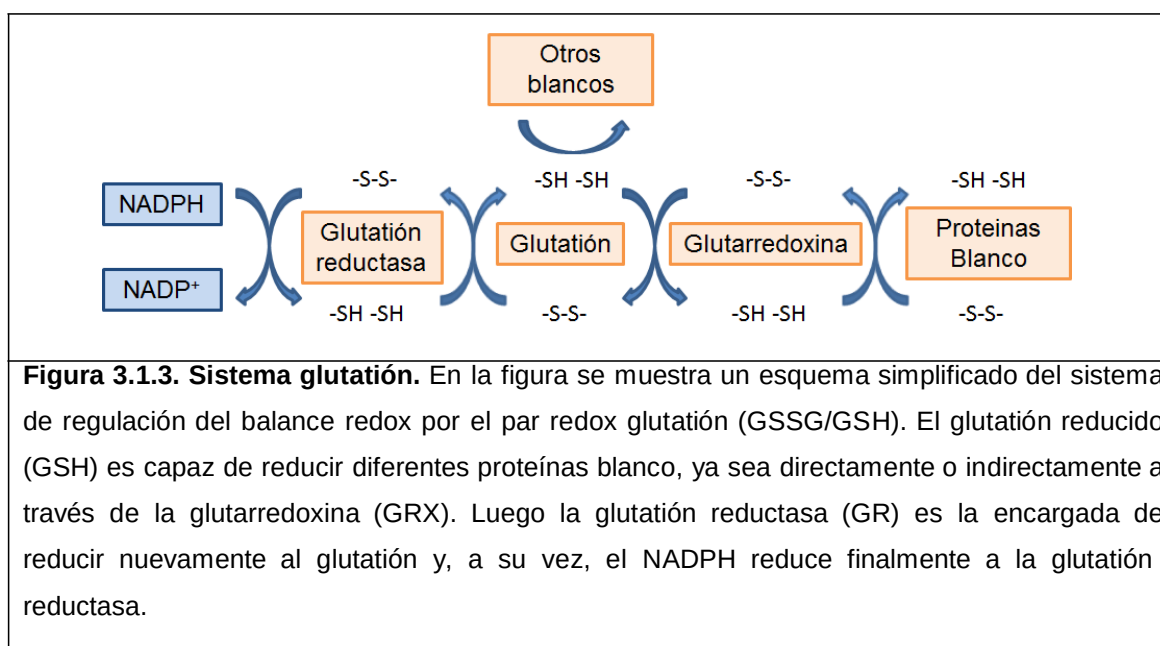
Además de moléculas redox, existen diferentes enzimas y sistemas enzimáticos capaces de alterar el balance del ambiente redox celular (Sies 1997). Uno de estos sistemas está encargado de detoxificar el anión superóxido, el cual es primero transformado en un peróxido por la enzima superóxido dismutasa, y este producto es luego transformado en agua por la enzima catalasa (Figura 3.1.1) y/o diferentes peroxirredoxinas.



Además de estos complejos enzimáticos existen dos grandes sistemas que regulan el balance redox celular: el sistema tiorredoxina y el sistema glutatión. El sistema tiorredoxina se basa principalmente en la proteína tiorredoxina (TRX) y la enzima tiorredoxina reductasa (TRXR). El sitio activo de la tiorredoxina contiene dos cisteínas, como parte de un dominio conservado CXXC que es capaz de ciclar entre una forma activa tiol (estado reducido) y una forma inactiva disulfuro (estado oxidado). Luego de ser oxidada, la tiorredoxina es reducida por la tiorredoxina reductasa, utilizando NADPH como dador de electrones (Figura 3.1.2). La tiorredoxina activa es capaz de reducir diferentes sustratos, entre los que encontramos moléculas de bajo peso molecular (glutatión oxidado, S-nitrosoglutatión o dehidroascorbato), peroxirredoxinas dependientes de tiorredoxina y diversas proteínas blanco (ribonucleótido reductasa, factores de transcripción, plasmorredoxina, entre otros) (Arner y Holmgren 2000; Jortzik y Becker 2012).



El sistema glutatión incluye al glutatión (GSH), la glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasas (GPXs), la glutarredoxina (GRX) y glutatión-S-transferasas (GSTs). En este sistema, el glutatión ocupa un rol similar al de la tiorredoxina siendo su forma activa (estado reducido) capaz de reducir diferentes proteínas blanco (entre las que se encuentran GPX, GRX, GST). Luego la glutatión reductasa es la encargada de reducir al glutatión oxidado (GSSG) nuevamente a su forma activa (GSH) (Figura 3.1.3).



En la figura 3.1.4 podemos ver a estos 3 sistemas actuando en conjunto para detoxificar especies reactivas del oxígeno (ROS o *reactive oxygen species*, en inglés).

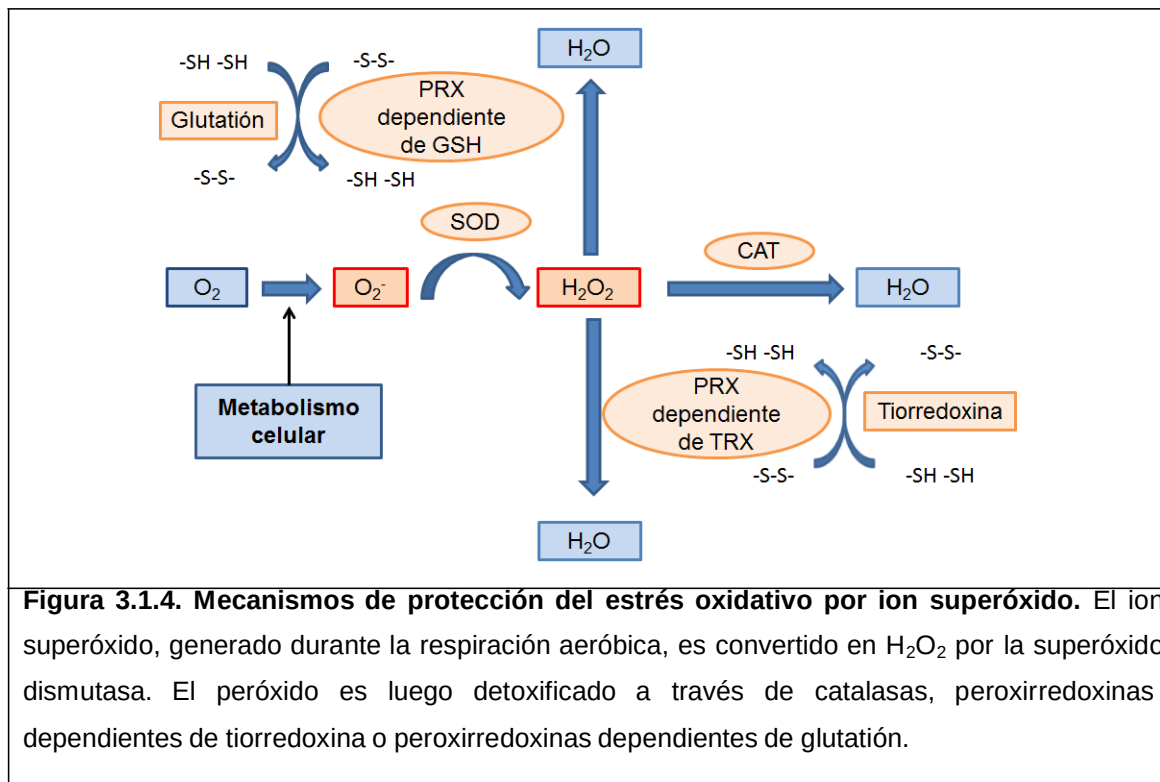


Figura 3.1.4. Mecanismos de protección del estrés oxidativo por ion superóxido. El ion superóxido, generado durante la respiración aeróbica, es convertido en H_2O_2 por la superóxido dismutasa. El peróxido es luego detoxificado a través de catalasas, peroxirredoxinas dependientes de tiorredoxina o peroxirredoxinas dependientes de glutatión.

El ambiente redox tiene un impacto de gran magnitud en la fisiología de los organismos desde el punto de vista de las consecuencias de la generación de ROS. El sistema circadiano le permite a los organismos anticipar cambios en su tasa metabólica. De esta manera, pueden emplear recursos energéticos, enzimas antioxidantes, *scavengers* de radicales libres (moléculas capaces de bloquear o neutralizar la acción de los radicales libres), etc. en el momento adecuado. En este sentido, se ha descrito una comunicación bidireccional entre el estado redox y la maquinaria molecular del reloj circadiano (Vanden Driessche, et al. 2000). Las tasas metabólicas fluctúan de manera circadiana en prácticamente todos los organismos estudiados. Esto se relaciona con la actividad y el nivel de expresión de ARNm de diferentes enzimas clave, así como de la respiración mitocondrial. Por ende, el balance redox debería reflejar cualquier cambio en la tasa metabólica.

Los lazos entre el sistema circadiano y el estado redox resultan evidentes en el contexto de protección antioxidante. En diversos organismos se han demostrado ritmos de enzimas encargadas de detoxificar radicales libres (Hardeland, et al. 2003). También se ha descrito el rol de la melatonina en la regulación de mecanismo de protección. La melatonina resetea el reloj de organismos vertebrados y actúa como un mediador químico para señalar la noche. Esta molécula ha sido detectada en un gran número de taxa, incluyendo bacterias, hongos, invertebrados y vertebrados, y puede incluso proveer protección contra agentes oxidantes en organismos tan diferentes como protozoos, angiospermas y vertebrados.

(Vanden Driessche, et al. 2000).

Recientemente se ha descubierto que existen células capaces de oscilar aún en ausencia de ritmos transcripcionales, pero que presentan oscilaciones redox. Estas células presentaron una oscilación robusta en el estado de oxidación de la enzima PRX (peroxirredoxina) (O'Neill y Reddy 2011; O'Neill, et al. 2011), una proteína importante debido a su rol en la inactivación de especies reactivas del oxígeno, particularmente del H₂O₂. Estos resultados fueron replicados en organismos tan diversos como arqueas, bacterias, algas, plantas, moscas e incluso seres humanos (O'Neill y Reddy 2011; O'Neill, et al. 2011; Edgar, et al. 2012). En ratones, se demostró que el ritmo de oxidación de PRX mostraba picos diferentes en los nucleos supraquiasmáticos y en el hígado, aunque sin embargo estaban en fase con sus respectivos osciladores transcripcionales-traduccionales (Edgar, et al. 2012). Luego se extendieron estos resultados a moscas (*Drosophila*), plantas (*Arabidopsis*), hongos (*Neurospora*), bacterias (*Synechococcus elongatus*) y arqueas (*Halobacterium*), en todos los casos se demostró que los osciladores responsables del reloj circadiano molecular y de las variaciones en oxidación de PRX están acoplados de algún modo. Por ende, un reloj puede ciclar tanto con el sistema transcripcional-traduccional o con el sistema PRX, pero ambos son requeridos para una fisiología normal.

La evolución de ciclos de oxidación de PRX, con periodo cercano a las 24 horas, en todos los dominios de la vida, sugiere que los ritmos celulares pueden utilizar elementos comunes y evolutivamente muy antiguos. Las proteínas PRX, involucradas en la detoxificación de ROS generadas por el metabolismo, pueden haber conferido ventajas adaptativas en el comienzo de la vida aeróbica en la Tierra. Esto ocurrió hace 2500 millones de años con la aparición de los organismos fotosintéticos y la foto- disociación del agua, lo que llevó a un rápido aumento en la concentración de oxígeno atmosférico, en lo que se conoce como el Gran Evento de Oxigenación (GEO). Esto dio lugar a cambios catastróficos en la ecología del planeta, con la pérdida de muchos organismos anaeróbicos, pero que de manera interesante, se presume que coinciden con la aparición del primer reloj transcripcional-traduccional en cianobacterias. Entonces, durante el GEO los ritmos de producción/consumo de oxígeno y generación de ROS estaban manejados por el ciclo solar, dando lugar a un reloj metabólico, que aún hoy persiste en ausencia de un ciclo transcripcional-traduccional típico (Figura 3.1.5) (Edgar, et al. 2012).

Como varias vías de respuesta a estrés se encuentran conservadas en diferentes especies, es posible encontrar patrones similares de regulación circadiana en diferentes organismos. Entre estos diversos organismos, aquí proponemos utilizar a uno de los organismos modelos más poderosos, aprovechado principalmente en estudios de desarrollo y genética, el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Por búsquedas bioinformáticas se encontró que el genoma de *C. elegans* posee 3 genes de catalasas, 5 superóxido dismutasas y 3 peroxirredoxinas; del sistema glutatión posee 8 proteínas con dominios glutatión peroxidasa, 51 glutatión-S-transferasas, 1 glutatión-S-reductasa y 12 proteínas con dominio glutarredoxina; y, del sistema tiorredoxina, posee 2 tiorredoxina reductasas (resultados

propios, Tabla 3.1.1). Además, recientemente se ha comprobado que *C. elegans* posee un gen homólogo a PRX, *prdx-2*, que conserva perfectamente el sitio activo y exhibe ritmos de sobre-oxidación/reducción frente a ritmos de temperatura (Edgar, et al. 2012; Olmedo, et al. 2012), lo cual nos indica la posible presencia de un reloj redox en este organismo.

En nuestro laboratorio hemos descrito ritmos en diversas variables fisiológicas tales como estrés osmótico y oxidativo; consumo de oxígeno, defecación y alimentación; síntesis de melatonina y actividad de AANAT, en condiciones LO (luz:oscuridad) 12 h :12 h. Por otro lado también se ha logrado describir ritmos de actividad locomotora. Tal como se explicó en la introducción general, por medio de un sistema diseñado en el laboratorio (Simonetta y Golombek 2007), se logró medir en tiempo real y de manera continua la actividad locomotora de poblaciones de nematodos *C. elegans* bajo diferentes ciclos ambientales (ciclos LO y de temperatura alta: temperatura baja (Tt)) (Figura I.15 e I.16). Además los nematodos son capaces de resincronizarse luego de un cambio de fase de 6 horas en el ciclo LO (Figura I.15A) y el período de estos ritmos es capaz de compensar cambios en la temperatura (Simonetta, et al. 2009), cumpliendo con los requisitos para ser considerados verdaderos ritmos circadianos (Pittendrigh 1954; Sweeney y Hastings 1960)

En el capítulo 1 observamos que *C. elegans* posee ritmos en la tolerancia al estrés oxidativo. En línea con esto y para poder entender cómo es que *C. elegans* es capaz de afrontar los cambios diarios en la generación de ROS, ya sean metabólicos o ambientales, en este capítulo se estudiarán los diferentes sistemas que posee *C. elegans* para controlar el balance redox interno y, a su vez, la capacidad de afrontar el estrés oxidativo.

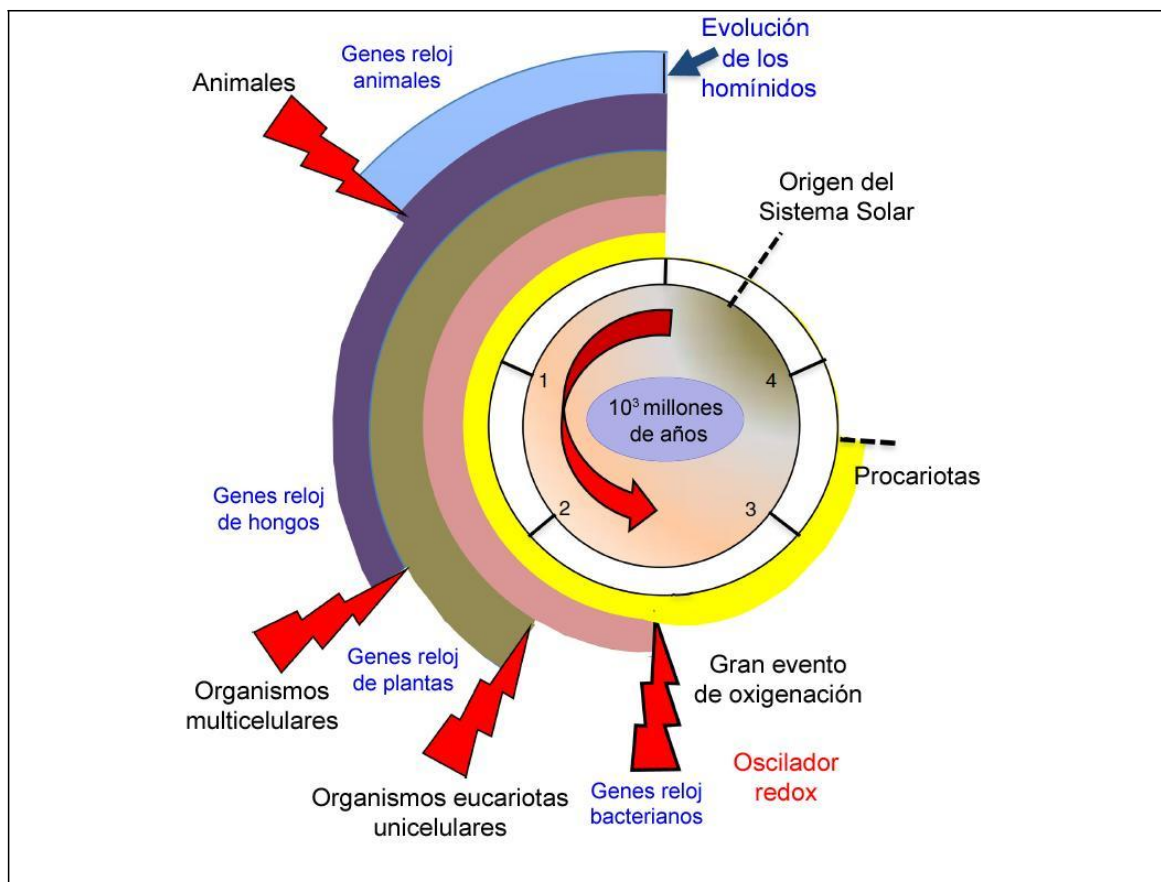


Figura 3.1.5. Evolución del reloj redox. La vida en la tierra comenzó hace aproximadamente 3500 millones de años. El gran evento de oxigenación (2500 millones de años atrás) puede haber llevado a la evolución de oscilaciones circadianas en especies reactivas de oxígeno y en sus mecanismos de detoxificación. Adaptado de (Loudon 2012).

Sistema SOD - CAT - PRX			Sistema glutatión			
CAT	SOD	PRX	GR	GST	GPX	GRX
<i>ctl-1 a 3</i>	<i>sod-1 a 5</i>	<i>prdx-2,3 y 6</i>	<i>gsr-1</i>	<i>gst-1 a 44</i>	<i>c11e4.1</i>	<i>glrx-5, 10, 21 y 22</i>
				<i>gst-1 a 3</i>	<i>c11e4.2</i>	<i>gst-3</i>
				<i>c02d5.4</i>	<i>f26e4.12</i>	<i>d2063.3</i>
				<i>gstk-1 y 2</i>	<i>f55a3.5</i>	<i>f10d7.3</i>
					<i>t09a12.2</i>	<i>f47b8.3</i>
					<i>r05h10.5</i>	<i>f47b8.4</i>
					<i>y94h6a.4</i>	<i>r11a8.5</i>
					<i>r03g5.5</i>	<i>y45f10a.7</i>
						<i>zc334.7</i>
Sistema tiorredoxina						
TRXR						
<i>trxr-1 y 2</i>						

Tabla 3.1.1. Genes de *C. elegans* relacionados a los diferentes sistemas de regulación del balance redox. En la tabla se detallan los genes relacionados a los 3 sistemas de regulación redox descritos en este capítulo, hallados por búsqueda de dominios conservados a través de WormBase (<http://www.wormbase.org>) e InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa; PRX: peroxirredoxina; GR: glutatión reductasa; GST: glutatión-S-transferasa; GPX: glutatión peroxidasa; GRX: glutarredoxina; TRXR: tiorredoxina reductasa.

Materiales y métodos

Cepas de nematodos y condiciones de cultivo

En este trabajo se emplearon las cepas N2 (cepa salvaje); TJ1060, un mutante *spe-9(hc88)I*; *fer-15(b26)II* de la cepa N2, estéril por encima de los 20°C; y GA800, un mutante que posee el array integrado *wuls151 [ctl-1 + ctl-2 + ctl-3; myo-2::gfp]* bajo un *background* genómico N2 (Caenorhabditis Genetics Center).

Para poder mantener una población adulta homogénea se empleó la cepa TJ1060, que es sensible a temperatura y estéril por encima de los 20°C (Fabian y Johnson 1994) y así realizar los diferentes ensayos de actividad enzimática y extracción de ARN. Los stocks de nematodos fueron mantenidos en placas de petri de 10 cm de diámetro, con medio NGM agar y un césped de *E. coli* OP50, a 16°C en ciclos de luz:oscuridad (LO) 12 hs : 12 hs (Epstein, et al. 2001). Para poder obtener *C. elegans* adultos día 1 para cada ensayo, los nematodos fueron transferidos a 4 placas de NGM agar y cultivados durante 4 días a 18,5°C y ciclos LO 12 hs : 12 hs y luego sincronizados por el método de cloro (Lewis y Fleming 1995b) la 5ta mañana. Los huevos obtenidos fueron luego resuspendidos en 3,5ml de buffer M9 + 35µl de antibiótico antimicótico GIBCO en un erlenmeyer de 50ml e incubados hasta el día siguiente a 18,5°C, 105rpm y condiciones LO 12 hs: 12 hs. La mañana del 6to día, las larvas L1 fueron contadas y aproximadamente 8000 nematodos fueron transferidos a placas individuales de NGM-agar de 10 cm de diámetro con césped de *E. coli* OP50. Estas placas fueron luego cultivadas a 25,3°C en condiciones de LO 12 h: 12 h hasta que los nematodos llegaron al estadio adulto día 1.

Cuantificación de actividad catalasa

Se tomaron muestras de 8000 nematodos por punto horario cada 4 horas durante dos días seguidos, por un total de 13 puntos horarios en condiciones de LO 12 h : 12 h (día 1) y OO (oscuridad constante) (días 2 y 3). Brevemente, los nematodos fueron levantados de las placas con 3ml de M9 en tubos tipo Falcon de 15ml, centrifugados y lavados 5 veces con buffer M9. En el último lavado se resuspendió el pellet de nematodos en 1ml de M9 y se pasó a un tubo eppendorf de 1,5ml. Luego se centrífugo a 4000 rpm durante 1 minuto y se resuspendió el pellet en 200µl de buffer M9 + EDTA 1mM + cóctel inhibidor de proteasas Sigma P8340 1X final. Las muestras fueron rápidamente congeladas en alcohol isopropílico preenfriado a -80°C y luego guardadas a -80°C hasta la determinación de actividades enzimáticas.

Se determinó la actividad catalasa por medio del kit Amplex Red Cat Kit Assay (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Básicamente este kit mide la

actividad de la enzima de manera indirecta utilizando un compuesto químico (Amplex Red) que es oxidado, originando un compuesto llamado resorufina que absorbe a una longitud de onda de 560nm, por la peroxidasa. Esta enzima utiliza el H₂O₂ que no fue consumido por la actividad enzimática catalasa de la muestra a determinar.

En el caso de la toma de muestras de nematodos para las determinaciones enzimáticas de catalasa, luego del último lavado con buffer M9 y la resuspensión de los nematodos en 1ml de M9, la muestra se dividió en 2 tubos eppendorf de 1,5ml en partes iguales (4000 nematodos aproximadamente en cada uno) y luego de la centrifugación se resuspendió uno de los pellets con 200µl de buffer M9 + EDTA 1mM + cóctel inhibidor de proteasas Sigma P8340 1X final, como se describió anteriormente, y, el pellet correspondiente al otro tubo fue resuspendido en 200µl de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) para la posterior extracción de ARN total.

Extracción de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real

Una vez finalizada la toma de muestras, el ARN fue aislado por el método de trizol, y verificado por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante. 5 µg de RNA fueron tratados con DNase I MAXIscript™ (AMBION, Foster City, CA), mezclados con oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA) y transcritos en forma reversa (M- MLV RT, Superscript™ II RT, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Las secuencias completas de los genes blanco fueron extraídas de WormBase (Version WS190) y los primers (tabla 3.1.1) fueron diseñados por el software Primer 3

Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y cotejados para especificidad utilizando NCBI BLAST (blastn). Los productos amplificados por los conjuntos de primers fueron evaluados por el software MFOLD (<http://mfold.rutgers.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) para identificar la formación de estructuras secundarias en el sitio de unión de los primers. El análisis de MFOLD fue llevado a cabo usando la configuración estándar y 50 mM Na⁺, 3 mM Mg²⁺ y una temperatura de 60°C (que es la temperatura de hibridación de los primers). Los primers fueron comprados a Invitrogen.

El sistema StepOne (Applied Biosystems) fue utilizado para realizar las reacciones de PCR en tiempo real. Para cada reacción StepOne se preparó una mezcla maestra con las siguientes concentraciones finales: 10 µl de Buffer de PCR SYBR Green PCR Master Mix 2X (Part No. 4309155, Invitrogen, Carlsbad, CA), X µl de primer directo (0,1 – 0,4 µM), X µl de primer inverso (0,1 – 0,4 µM), agua destilada desionizada hasta un volumen final de 19 µl. La mezcla maestra StepOne (19µl) fue agregada a cada uno de los 48 pocillos de una placa de PCR y 1 µl de cDNA fue añadido como molde de la PCR. El programa de

PCR fue 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C (medida única de fluorescencia), seguido de un análisis de curva de melting (60–95°C con una tasa de calentamiento de 0,3°C por segundo y medición continua de fluorescencia). Los resultados fueron cuantificados usando el software LinReg PCR (Ruijter, et al. 2009) para determinar los Ct de cada reacción y luego analizados utilizando el método descrito por Pfaffl (Pfaffl 2001; Hellemans, et al. 2007). Para la puesta a punto de cada set de primers se construyó una curva estándar de 5 puntos (serie de diluciones seriadas 1/4) para cada gen y se determinó la concentración de primers (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 µM) a la cual la eficiencia era mayor (ésta fue luego utilizada en las reacciones subsiguientes). Los niveles de cada gen fueron normalizados con los promedios geométricos de los niveles de los genes de referencia *cdc-42*, *y45f10d.4* y *pmp-3* (Hellemans, et al. 2007; Hoogewijs, et al. 2008).

Blanco	Secuencia Primer Directo	Secuencia Primer Reverso	Descripción
gsr-1	CGGAAAAGACGAGAAAGTCG	TTATTCCGGCTTCACACCTC	glutación reductasa
r03g5.5	ACAGGGTGGAACCTCTTTTCG	GTTTGTGCGACGGACCAAATC	glutación peroxidasa
gst-36	AGGCAATTCGTCTGCTCTTC	CGAGCGATTGCTGTAGTTTG	glutación-S-transferasa
gst-28	CGCTGGAAAATCTCAGGAAG	AATGTCCGCGAAGGTGATAC	glutación-S-transferasa
sod-3	TCGGTTCCTGGATAACTTG	AAGGATCCTGGTTGCACAG	superóxido dismutasa
ctl-1	ACTGAAAACCTACAAGGAGACG	GCGACCGTTGAAAAACGAACG	catalasa
ctl-2	ACTGAAAACCTACAAGGAGACG	GTGTCGGCGGATCCGCTC	catalasa
ctl-3	CACAAAACCCGGACCAATGG	GCGACCGTTGAAAAACGAACG	catalasa
trxr-1	ACGATTGGTGTGAAAGAGC	TCAGGTGTTCCCTCCAAAAC	tiorredoxina reductasa
trxr-2	CGGGAAAGAGCTAAACACG	ATCCACAAACTCGGCATAGG	tiorredoxina reductasa
prdx-2	CAACCGAGATTATCGCCTTC	TGTCAGCGAGAACTGGAATG	peroxirredoxina
y45f10d.4	GTCGCTTCAAATCAGTTCAGC	GTTCTTGTCAGTGATCCGACA	gen de referencia
pmp-3	GTTCCCGTGTTCACTCAT	ACACCGTCGAGAAGCTGTAGA	gen de referencia
cdc-42	CTGCTGGACAGGAAGATTACG	CTCGGACATTCTCGAATGAAG	gen de referencia
ama-1	CCTACGATGTATCGAGGCAAA	CCTCCCTCCGGTGTAATAATG	gen de referencia

Tabla 3.1.1. Primers diseñados para este trabajo.

Ensayos de actividad locomotora

Para la realización de los experimentos de registro de actividad locomotora, poblaciones de gusanos se sincronizaron al mismo estadio de desarrollo utilizando el método de cloro (Lewis y Fleming 1995b). Los huevos obtenidos de la sincronización se cultivaron 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 anti micótico 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 las larvas L1 se transfirieron a placas de *petri* con medio NGM,

previamente sembradas con *E. coli* cepa OP50. Cuando los nematodos llegaron al estadio de larva L4, se transfirieron a placas de 96 pocillos conteniendo medio L15 (Gibco, USA) suplementado con Antibiótico/antimicótico 1,5x (Gibco, USA) + 5- fluorodeoxyuridina (FuDR) 40 μ M + colesterol 5 mg/ml + leche 2%. Las placas fueron cubiertas con cinta adhesiva para evitar la evaporación del medio.

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.

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).

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

Ensayos de sincronización por luz

Nematodos de la cepa N2 y GA800 fueron preparados de acuerdo a lo descripto en el inciso anterior y dispuestos en una placa de 96 pocillos de fondo curvo (poblaciones de 5-7 gusanos por pocillo, 40 μ l de medio), de forma tal que la mitad de los pocillos de la placa contuvieran poblaciones de nematodos de la cepa N2 y, la otra mitad contuviera nematodos de la cepa GA800. Luego, se registró la actividad locomotora de ambas cepas bajo condiciones LO 12 h : 12 h durante siete días y al octavo día se los pasó a condiciones de oscuridad constante, por otros 7 días más. La iluminación consistió en una lámpara fluorescente compacta integrada (Philips Essential PLE15W230). Las condiciones de temperatura fueron constantes (17,5°C).

Análisis de Datos

Los ensayos de actividad catalasa fueron analizados por ANOVA de una vía, seguido por un test de Tukey de comparaciones múltiples. Las acrofases fueron determinadas mediante el análisis de Cosinor (es decir, mejor ajuste a formas de onda cosenoidales) de los conjuntos de datos. Los resultados de RealTime-PCR fueron analizados de la misma forma (ANOVA de una vía, seguida de un test de comparaciones múltiples de Tukey para los sets de datos de LO y OO, por separado) y luego fueron sometidos a un análisis de transformada rápida de Fourier. Se determinó el valor del poder espectral de 24 h para cada transcripto, a partir de los valores normalizados de cada serie temporal (F24). Este valor del poder espectral y la significancia del mismo (p valor del poder), generada por la comparación de un set de datos permutados 1000 veces al azar, fueron obtenidos utilizando un algoritmo escrito en MATLAB, gentilmente cedido por el Dr. Keegan (Keegan, et al. 2007). Se utilizó un único método de ordenamiento de los días, ya que

este análisis no es sensible al orden en el que se encuentran las series temporales (van der Linden, et al. 2010).

Los datos del sistema de registro de actividad locomotora 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 con un alto nivel de ruido (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 población de gusanos fue utilizada para la construcción de los histogramas.

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

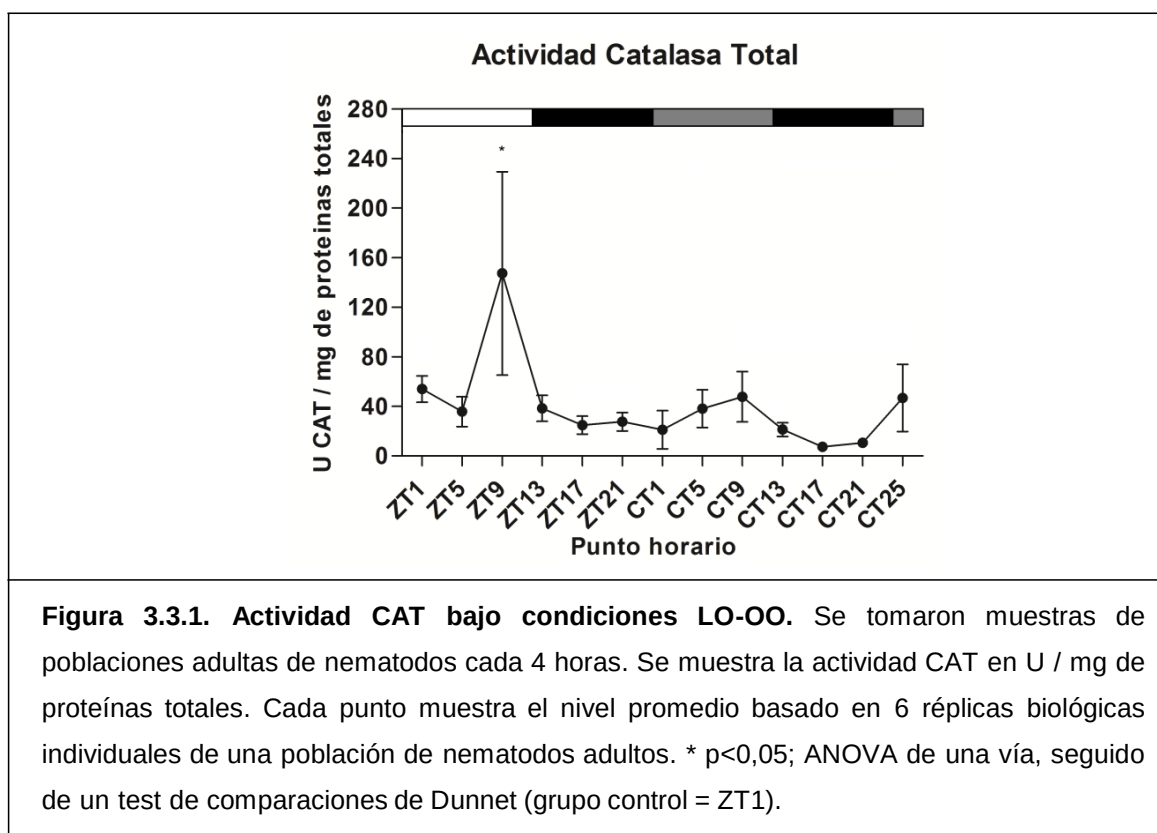
Para comparar la fase de los ritmos sujetos a sincronización por luz versus condiciones constantes, se realizaron diagramas de transición de fase (*phase transition* (PTC) *plots*) (Pittendrigh 1981). Los mismos se construyeron utilizando el valor de acrofase (del análisis por cosinor) para los 3 últimos días de la fase de sincronización vs. el primer día en condiciones constantes post-sincronización. Para verificar si existían diferencias entre el número de poblaciones entrenadas de cada cepa se realizó el análisis de contingencia de Fisher (Graphpad Prism, Graphpad Software Inc.). Este mismo análisis se aplicó para estudiar si existían diferencias en el número de poblaciones sincronizadas de cada cepa.

Todos los datos fueron expresados como el valor medio $\pm$ SEM.

Resultados

Variación circadiana en la actividad catalasa

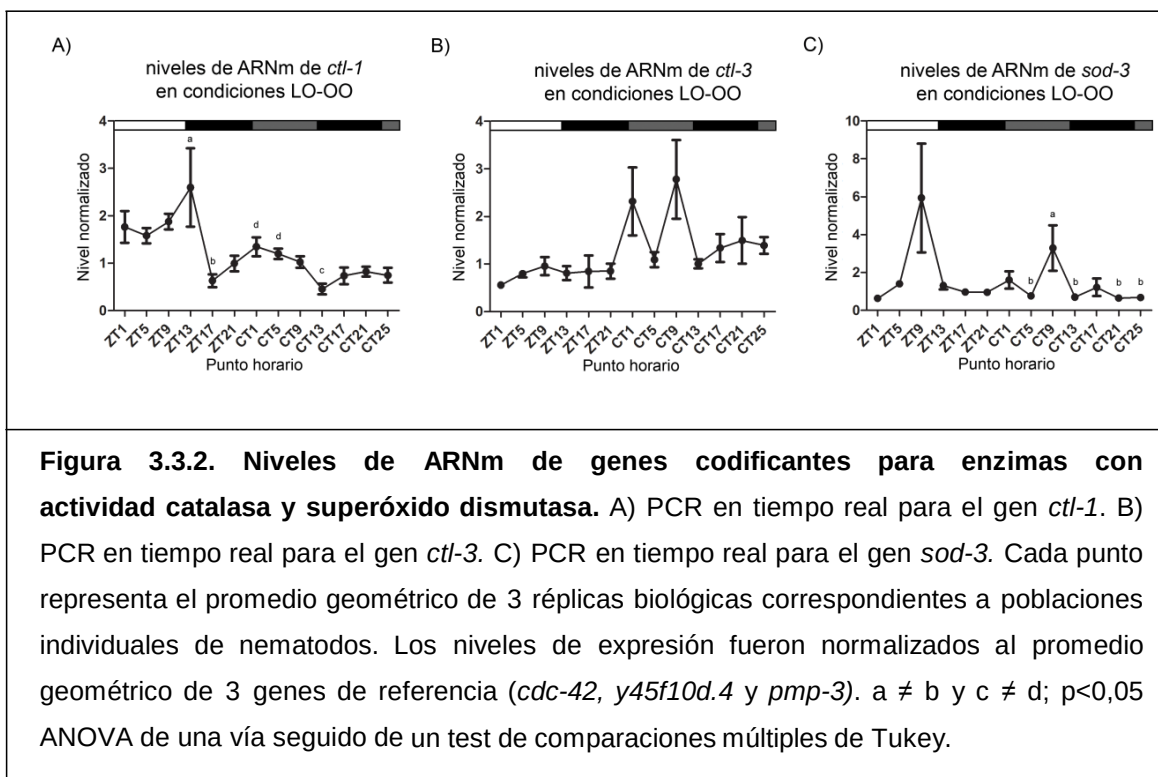
Hemos demostrado previamente la existencia de ritmos de tolerancia a estrés oxidativo (Simonetta, et al. 2008). Como el estrés oxidativo está íntimamente ligado al estado redox intracelular, quisimos determinar si las actividades enzimáticas de enzimas reguladoras del estado redox variaban a lo largo del día. Para esto se tomaron muestras de nematodos adultos TJ1060 durante dos días, en condiciones de luz:oscuridad (LO) (día 1) y oscuridad constante (OO) (día 2). Cuando se midieron los niveles de actividad catalasa de poblaciones adultas se observó un pico de actividad hacia el final de la fase de luz, en ZT9 ($p < 0,05$; ANOVA de una vía, seguido de un test de comparaciones de Dunnet, con ZT1 como grupo control). Al pasar a condiciones constantes se observa una tendencia con un máximo relativo durante el día subjetivo, a CT9, que se repitió al comienzo del tercer día subjetivo, a CT25 (Figura 3.3.1).



Variaciones en los niveles de expresión de genes que codifican enzimas que regulan

el estado redox

Por otro lado, también buscamos determinar la existencia de ritmos a nivel transcripcional de genes relacionados a la regulación redox. Se estudiaron los niveles de expresión de genes codificantes para catalasa, superóxido dismutasa, peroxirredoxina, enzimas del sistema glutatión y del sistema tiorredoxina.



En el caso de las catalasas, se estudiaron los niveles de *ctl-1* y *ctl-3*, dos isoenzimas citosólicas. Al analizar el patrón temporal de expresión de *ctl-1*, podemos observar un pico hacia el principio de la noche (ZT13) en condiciones LO. Sin embargo, el ritmo desaparece cuando los nematodos son sometidos a condiciones constantes (OO) (Figura 3.3.2A, a ≠ b y c ≠ d; p<0,05 ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey). En el caso de *ctl-3* no se observaron cambios en condiciones LO, aunque cuando las condiciones se vuelven constantes se observa un aumento general durante el día subjetivo que 2 presenta picos al comienzo y final del día (CT1 y CT9, respectivamente), aunque estos no son significativos (Figura 3.3.2B, p>0,05 ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey). Por otra parte, los niveles de ARNm de *sod-3*, uno de los genes codificantes para una superóxido dismutasa Fe/Mn mitocondrial (Honda, et al. 2008), parece ser circadiano, con una clara tendencia a un pico a ZT9, que luego se repite en condiciones constantes a CT9, aunque con una amplitud mucho menor.

Este segundo pico es significativamente distinto del resto de los puntos (Figura 3.3.2C, $a \neq b$; $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey).

Luego, se realizó un análisis de Transformada rápida de Fourier (Keegan, et al. 2007), para analizar si los datos se ajustaban a ondas senoidales con periodos circadianos, infradianos o ultradianos. De esta manera, se encontró que los niveles de ARNm de *ctl-1* presentaban un mejor ajuste a una onda coseno de 12h al analizar sólo los niveles en condiciones LO; de 24 h, al analizar los niveles en OO; y de 48 h, al analizar el ensayo completo en condiciones LO-OO. En el caso de *ctl-3*, los ajustes fueron de 12 h (LO), 8h (OO) y 48 h (LO-OO). Resulta interesante notar, que en el caso de *sod-3* los datos se ajustan a una onda de 24 h en condiciones LO y LO-OO, indicando que este gen se expresa de manera circadiana. Sin embargo, en OO se ajustan a un periodo de 8 h, que podría tratarse de un armónico de 24 h (Tabla 3.3.1).

gen / condición	Mejor P		
	Período	p	Potencia
<i>ctl-1</i> LO	12 h	0,0497	0,070552
<i>ctl-1</i> OO	24 h	0,0004	0,079571
<i>ctl-1</i> LO-OO	48 h	0,0802	0,07647
<i>ctl-3</i> LO	12 h	0,0013	0,012537
<i>ctl-3</i> OO	8 h	0,0098	0,13847
<i>ctl-3</i> LO-OO	48 h	0,0844	0,083415
<i>sod-3</i> LO	24 h	0,0002	0,24842
<i>sod-3</i> OO	8 h	0,0002	0,32448
<i>sod-3</i> LO-OO	24 h	0,0563	0,1628

Tabla 3.3.1. Análisis de Transformada rápida de Fourier para CAT y SOD. A través de un algoritmo de MATLAB (Keegan, et al. 2007) se analizó la potencia de Fourier para ajustes de ondas de diferentes periodos (8; 9,6; 12; 16, 24 y 48 h) y se calculó el p valor para la mejor potencia de Fourier que se ajustara a los datos. La tabla muestra el mejor ajuste de onda para cada serie de datos, en condiciones LO, OO o LO-OO.

Al analizar la expresión de genes relacionados con el sistema glutatión, encontramos que el gen que codifica para la glutatión reductasa, *gsr-1*, exhibe ritmos diarios con una clara tendencia a un pico durante el día (ZT5-ZT9), que reaparece en condiciones constantes con un pico significativo levemente adelantado (CT1) (Figura 3.3.3A, $a \neq b$; $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey).

En el caso de *r03g5.5* (glutación peroxidasa) podemos observar una tendencia un pico a ZT9-13, que luego desaparecen bajo condiciones constantes. Se observa sin embargo un pequeño pico a CT1 (Figura 3.3.3B, $a \neq b$; $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey). Por su parte, *gst-36*, que codifica para una glutación-S-transferasa, exhibe una clara tendencia a un máximo durante el día (ZT5) en condiciones LO y 2 picos en condiciones constantes (CT1 y CT9), similar a lo observado para *ctl-3* (Figura 3.3.3C, $a \neq b$, $c \neq d$ y $e \neq f$; $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey).

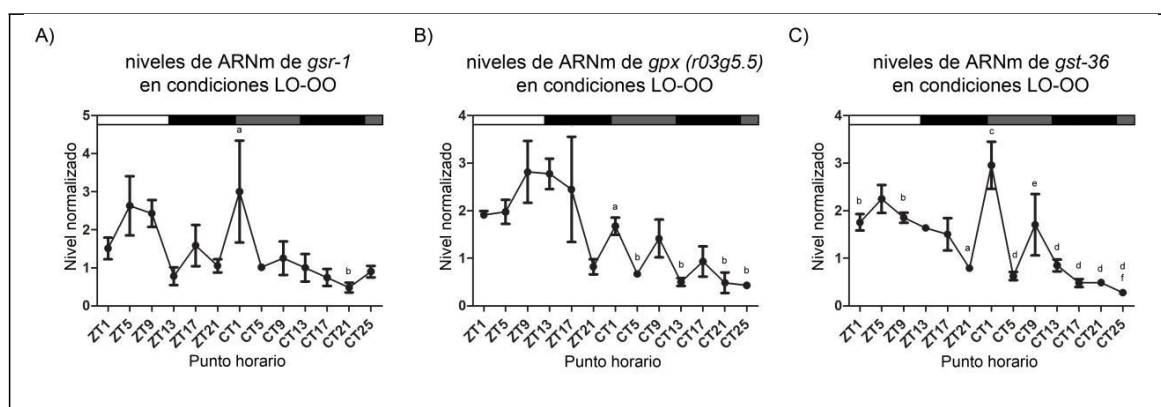


Figura 3.3.3. Niveles de ARNm de genes codificantes para enzimas del sistema glutación.

A) PCR en tiempo real para el gen *gsr-1*. B) PCR en tiempo real para el gen *gst-36*. C) PCR en tiempo real para el gen *r03g5.5* (*gpx*). Cada punto representa el promedio geométrico de 3 réplicas biológicas correspondientes a poblaciones individuales de nematodos. Los niveles de expresión fueron normalizados al promedio geométrico de 3 genes de referencia (*cdc-42*, *y45f10d.4* y *pmp-3*). $a \neq b$, $c \neq d$ y $e \neq f$, $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey.

Al realizar el análisis de Transformada rápida de Fourier, encontramos que *gsr-1* exhibe un patrón de ajuste similar a *sod-3* para los datos en condiciones LO y LO-OO, lo que nos indica es circadiano. Sin embargo los datos de OO se ajustan mejor a un periodo de 12 h (en este caso el p valor para el ajuste a 24 h es levemente mayor, $p = 0,1812$). Por su parte, *gpx* exhibe mejores ajustes a ondas de 24 h (LO), 8 h (OO) y 48 h (LO-OO). Esto nos indica que este gen exhibe solamente ritmos diarios, mientras está entrenado a ciclos LO. Esto mismo sucede para *gst-36*, que presenta ritmos diarios de 24 h para LO (Tabla 3.3.2).

gen / condición	Mejor P		
	Período	p	Potencia
<i>gsr-1</i> LO	24 h	0,0328	0,082537
<i>gsr-1</i> OO	12 h	0,111	0,12756
<i>gsr-1</i> LO-OO	24 h	0,1592	0,073943
<i>gpx</i> LO	24 h	0,0009	0,068548
<i>gpx</i> OO	8 h	0,0009	0,28097
<i>gpx</i> LO-OO	48 h	0,0135	0,1489
<i>gst-36</i> LO	24 h	0,001	0,04806
<i>gst-36</i> OO	8 h	0,0599	0,25327
<i>gst-36</i> LO-OO	8 h	0,1763	0,070926

Tabla 3.3.2. Análisis de Transformada rápida de Fourier para el sistema glutatión. A través de un algoritmo de MATLAB (Keegan, et al. 2007) se analizó la potencia de Fourier para ajustes de ondas de diferentes periodos (8; 9,6; 12; 16, 24 y 48 h) y se calculó el p valor para la mejor potencia de Fourier que se ajustara a los datos. La tabla muestra el mejor ajuste de onda para cada serie de datos, en condiciones LO, OO o LO-OO.

Del sistema tioredoxina se analizó el patrón de expresión de los genes que codifican para la enzima tioredoxina reductasa, encargada de reducir la tioredoxina oxidada. En el caso de *trxr-1*, nuevamente observamos una tendencia que sugiere un ritmo diario bajo condiciones LO (pico a ZT9), con una posterior pérdida de la ritmicidad bajo condiciones de oscuridad constante, aunque estos no son estadísticamente significativos (Figura 3.3.4A, ANOVA de una vía seguida de un test de comparaciones múltiples de Tukey). Por otro lado, *trxr-2* si muestra cambios significativos de expresión, encontrándose un pico a ZT5. Una vez en condiciones constantes parece haber dos nuevos picos, a CT1 y CT21, aunque no son estadísticamente significativos (Figura 3.3.4B, $a \neq b$ y $c \neq d$; $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey).

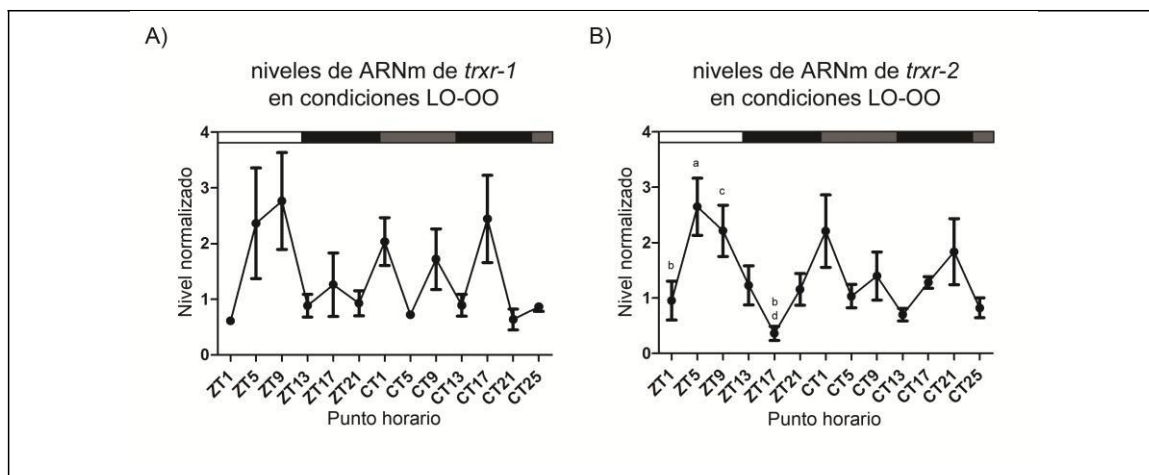


Figura 3.3.4. Niveles de ARNm de genes codificantes para enzimas del sistema tiorredoxina. A) PCR en tiempo real para el gen *txr-1*. B) PCR en tiempo real para el gen *txr-2*. Cada punto representa el promedio geométrico de 3 réplicas biológicas correspondientes a poblaciones individuales de nematodos. Los niveles de expresión fueron normalizados al promedio geométrico de 3 genes de referencia (*cdc-42*, *y45f10d.4* y *pmp-3*). a $\neq$ b y c $\neq$ d, $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey.

gen / condición	Mejor P		
	Período	p	Potencia
<i>txr-1</i> LO	24 h	0,0268	0,13675
<i>txr-1</i> OO	8 h	0,0008	0,3508
<i>txr-1</i> LO-OO	16 h	0,0905	0,090556
<i>txr-2</i> LO	24 h	0,001	0,17789
<i>txr-2</i> OO	24 h	0,0099	0,077267
<i>txr-2</i> LO-OO	16 h	0,2129	0,05173

Tabla 3.3.3. Análisis de Transformada rápida de Fourier para el sistema tiorredoxina. A través de un algoritmo de MATLAB (Keegan, et al. 2007) se analizó la potencia de Fourier para ajustes de ondas de diferentes periodos (8; 9,6; 12; 16, 24 y 48 h) y se calculó el p valor para la mejor potencia de Fourier que se ajustara a los datos. La tabla muestra el mejor ajuste de onda para cada serie de datos, en condiciones LO, OO o LO-OO.

En el caso de *txr-1* observamos que el análisis de Transformada rápida de Fourier nos indica que estamos ante la presencia de ritmos diarios en condiciones LO, mientras que en el caso de *txr-2*, encontramos que los datos se ajusta a un patrón de 24 h en condiciones LO y también en condiciones OO. Sin embargo al analizar todo el set completo de datos, el

ajuste es mejor a una onda de 16 h. Al analizar los valores de potencia de 24 h y 16 h, vemos que la diferencia entre ambos es mínima (0,05103 vs 0,05173) por lo que podría tratarse de un ritmo circadiano con un componente armónico fuerte de 16 h (Tabla 3.3.3).

También analizamos la expresión del gen de la peroxirredoxina 2, propuesto recientemente como un marcador universal de la presencia de ritmos circadianos en un organismo (O'Neill y Reddy 2011; O'Neill, et al. 2011; Edgar, et al. 2012; Loudon 2012). En la figura 3.3.5 se observa que existe un pico significativo en los niveles de ARNm de *prdx-2* a ZT5-9. En condiciones de oscuridad constante se observa un pico significativo a CT1 y una tendencia que sugiere otros 2 picos a CT9 y CT17, que indicarían un periodo menor a 24 h en OO (Figura 3.3.5, $a \neq b$ y $c \neq d$; $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey).

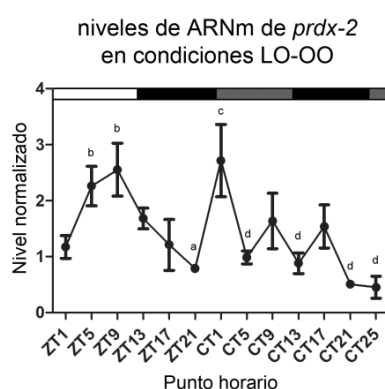


Figura 3.3.5. Niveles de ARNm de *prdx-2*. PCR en tiempo real para el gen *prdx-2*. Cada punto representa el promedio geométrico de 3 réplicas biológicas correspondientes a poblaciones individuales de nematodos. Los niveles de expresión fueron normalizados al promedio geométrico de 3 genes de referencia (*cdc-42*, *y45f10d.4* y *pmp-3*). $a \neq b$ y $c \neq d$, $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey.

El análisis de ajustes a ondas senoidales por transformada rápida de Fourier nos indica que el gen *prdx-2* posee ritmos diarios de transcripción. Es decir que solamente cicla bajo condiciones LO, pero al pasar a condiciones constantes los ritmos se ajustan a una onda con periodo de 8 h. Esto mismo se repite cuando consideramos el set de datos completo (LO-OO) (Tabla 3.3.4).

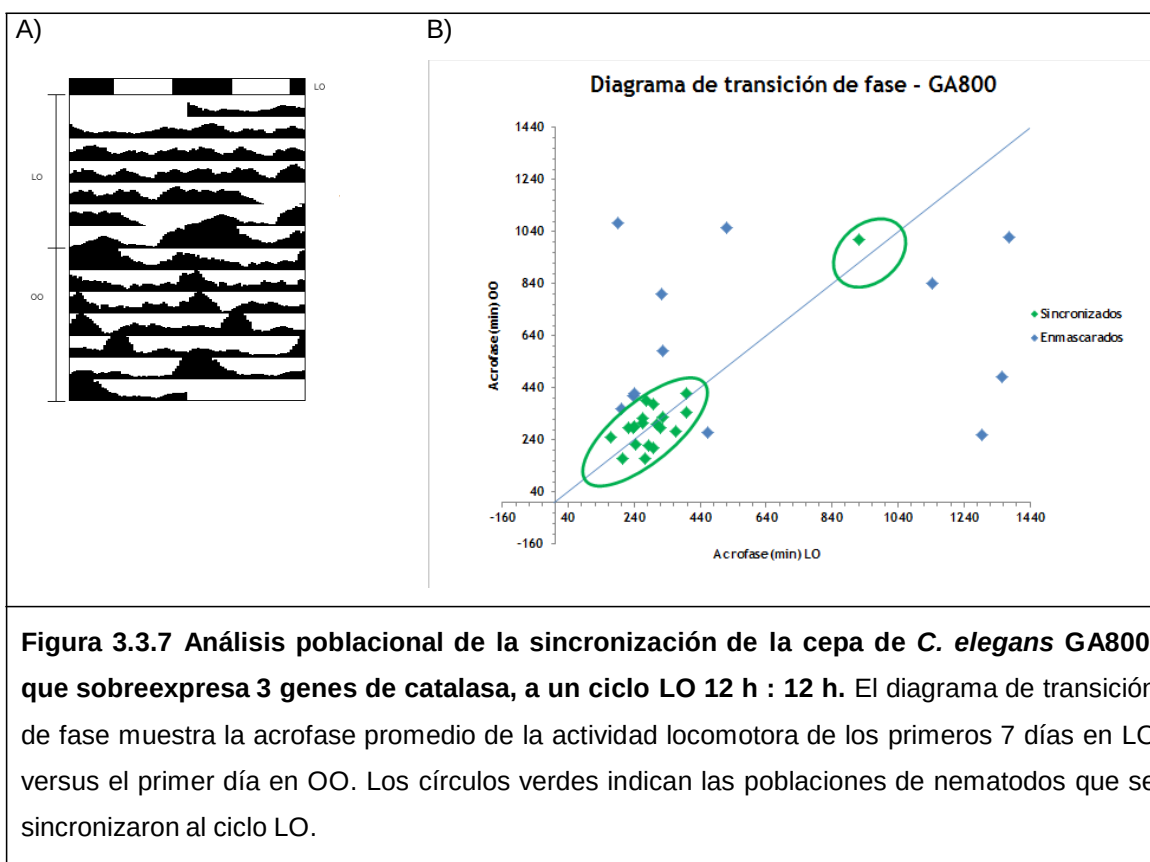
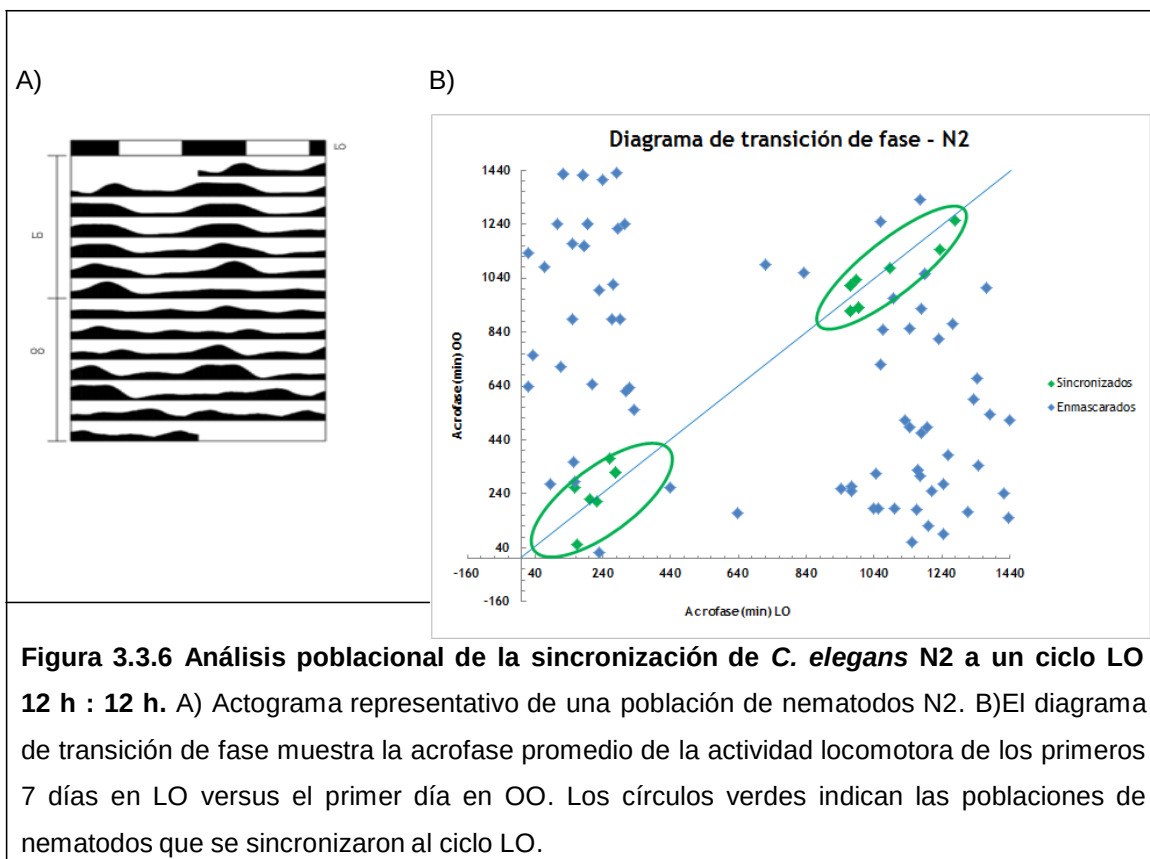
gen / condición	Mejor P		
	Período	p	Potencia
<i>prdx-2</i> LO	24 h	0	0,12483
<i>prdx-2</i> OO	8 h	0,0002	0,28444
<i>prdx-2</i> LO-OO	8 h	0,1361	0,070263

Tabla 3.3.4. Análisis de Transformada rápida de Fourier para el gen *prdx-2*. A través de un algoritmo de MATLAB (Keegan, et al. 2007) se analizó la potencia de Fourier para ajustes de ondas de diferentes periodos (8; 9,6; 12; 16, 24 y 48 h) y se calculó el p valor para la mejor potencia de Fourier que se ajustara a los datos. La tabla muestra el mejor ajuste de onda para cada serie de datos, en condiciones LO, OO o LO-OO.

La sobreexpresión de catalasas aumenta el porcentaje de sincronización a ciclos de luz:oscuridad

Debido a reportes previos que indican que la señal de la luz podía ser transducida a través de señales redox utilizando al H₂O₂ como segundo mensajero (Hirayama, et al. 2007; Forman, et al. 2010), realizamos experimentos de sincronización a ciclos de luz:oscuridad (LO) 12 h : 12 h, comparando la cepa salvaje N2 con una cepa transgénica que sobreexpresa el locus de *C. elegans* con 3 genes que codifican para enzimas con actividad catalasa (*ctl-1*, *ctl-2* y *ctl-3*).

En la figura 3.3.6 podemos observar un análisis de transición de fase de la cepa salvaje N2 (figura 3.3.6). Estos nematodos fueron sujetos a 7 días de un ciclo LO 12 h : 12 h y luego fueron liberados en condiciones constantes. De esta manera podemos estudiar la capacidad de sincronización de los nematodos a este estímulo ambiental mediante una comparación de la fase de la actividad locomotora previa y posterior a la liberación en OO (figura 3.3.6). Si las fases son similares, entonces la población está realmente sincronizada, mientras que si las fases en LO y OO difieren en más de 120 minutos, entonces estamos ante un fenómeno de *masking* o enmascaramiento. Este fenómeno tiene lugar cuando el *zeitgeber* ejerce su efecto directamente sobre la salida analizada, pasando por alto el oscilador endógeno del reloj. El análisis de los resultados nos muestra que si bien el 48% de las poblaciones de nematodos N2 son rítmicas, sólo un 9% está verdaderamente sincronizada al ciclo LO (n=181).



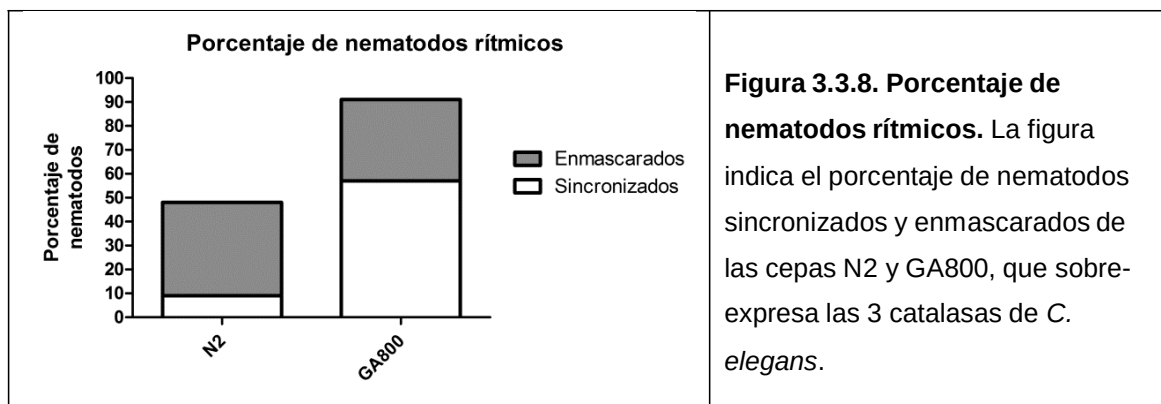


Figura 3.3.8. Porcentaje de nematodos rítmicos. La figura indica el porcentaje de nematodos sincronizados y enmascarados de las cepas N2 y GA800, que sobreexpresa las 3 catalasas de *C. elegans*.

Al repetir este ensayo con la cepa GA800 (figura 3.3.7), una cepa con *background* genómico N2 que sobreexpresa las catalasas *ctl-1*, *ctl-2* y *ctl-3*, observamos que el porcentaje de nematodos rítmicos es del 91%, mientras que el porcentaje de nematodos verdaderamente sincronizados al ciclo LO asciende a un 57,1% (n=35). Comparando estos valores obtenidos con los de la cepa salvaje, observamos que el número de poblaciones rítmicas es significativamente mayor en la cepa GA800 ($p < 0,0001$; Test exacto de Fischer). Asimismo, al comparar el número de poblaciones realmente sincronizadas al ciclo LO, nuevamente encontramos que la cepa GA800 tiene mayor capacidad de sincronización que la cepa N2 ($p = 0,001$; Test exacto de Fischer).

Discusión

Variaciones diarias en la actividad de la enzima catalasa

En este estudio hemos descrito la existencia de variaciones a nivel de actividad enzimática de la enzima catalasa, encontrándose un máximo de actividad durante la fase de luz a ZT9 (figura 3.3.1). El periodo tiende luego a mantenerse en condiciones de libre curso, encontrándose un máximo a CT9 (figura 3.3.1). La presencia de ritmos en la actividad de esta enzima está en línea con los descritos en otros organismos, como ser ratas (Agapito, et al. 1999; Hardeland, et al. 2003), hámsters (Coto-Montes, et al. 2001; Hardeland, et al. 2003), escarabajos del género *Pyrearinus* (Barros y Bechara 2001), la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Hardeland, et al. 2003) o el pez cebra, *Danio rerio* (Hirayama, et al. 2007). Sin embargo, la forma del ritmo parece depender del organismo estudiado en particular, ya que se han descrito ritmos de actividad bimodales (Barros y Bechara 2001; Coto-Montes, et al. 2001) y unimodales (Agapito, et al. 1999; Hardeland, et al. 2003), siendo el ritmo encontrado en *C. elegans* de ésta última forma.

La importancia de encontrar ritmos en la actividad de esta enzima radica en el hecho de que su actividad es la detoxificación del peróxido de hidrógeno, una molécula que ha sido descrita como segundo mensajero en lo que se han llamado cascadas de señalización

redox (Forman, et al. 2010). Variaciones en la actividad enzimática podrían estar ajustando los niveles de respuesta de estas cascadas de señalización. Además, recientemente se ha descrito un rol para el H₂O₂ en el mecanismo de sincronización por luz del reloj biológico del pez cebra, *Danio rerio* (Hirayama, et al. 2007). En este trabajo se muestra que un pulso de H₂O₂ es capaz de inducir la oscilación circadiana de genes reloj en la línea de cultivo celular Z3. Por otro lado, demuestra también que la actividad de la enzima catalasa es dependiente de la luz, con un máximo en la transición día-noche; y, que actúa como un regulador negativo de la señalización por H₂O₂ al reloj (Hirayama, et al. 2007; Uchida, et al. 2010). Por otro lado, también debemos considerar que la actividad catalasa puede estar actuando simplemente según su efecto clásico como detoxificador de ROS. En tal caso, la importancia de encontrar ritmos en su actividad enzimática se traduce en variaciones en la capacidad de tolerar estrés oxidativo proveniente del metabolismo celular o, del medio ambiente donde habitan los nematodos. En este sentido, el hecho de que el máximo de actividad enzimática se encuentre durante el día corelaciona con los resultados de tolerancia a estrés oxidativo obtenidos en el capítulo 1. En estos ensayos se demostró la existencia de ritmos circadianos de tolerancia a H₂O₂, con un máximo al inicio del día (Figuras 1.3.1F y 1.3.1G). Si bien la actividad enzimática CAT tiene su máximo en la mitad del día, esto concuerda bien con el hecho de que la tolerancia a este agente estresante es mayor durante el día que durante la noche.

Variaciones diarias en los niveles de ARNm de enzimas redox

Para determinar si las variaciones observadas en los niveles de actividad dependían de variaciones a nivel transcripcional, se caracterizaron los niveles basales de expresión de los genes que codifican para los diferentes sistemas que regulan el balance redox celular: el sistema SOD-CAT/PRX, el sistema glutatión y el sistema tioredoxina. En el caso de las catalasas (*ctl-1* y *ctl-3*), se observó la presencia de patrones rítmicos de expresión, aunque no de 24 h. *ctl-1* mostró un pico transcripcional significativo a ZT13 en condiciones LO, pero análisis posteriores revelaron que este ritmo se ajusta mejor a una onda de 12 h, que a un patrón de 24 h. Por otro lado, *ctl-3* mostró una expresión prácticamente constante en LO, exhibiendo 2 picos en condiciones OO, que se ajustaron a un patrón de 8 h. El patrón de expresión de *ctl-1* es muy similar al observado para peces zebra entrenados en condiciones LO (Hirayama, et al. 2007), donde el máximo de expresión se encuentra hacia el final del día / comienzo de la noche y luego los ritmos se pierden en condiciones constantes. Si comparamos los datos de expresión con los datos de actividad enzimática, vemos que el pico en actividad antecede al pico de expresión de *ctl-1*. Esto pareciera no ser lógico, pero debemos recordar que la actividad medida es debida a todas las enzimas con actividad catalasa del organismo. Es decir, la relacionada con los 3 genes *ctl* y cualquier otra proteína con actividad catalasa aún no descripta que pudiera tener *C. elegans*.

También se cuantificaron los niveles de expresión de uno de los genes codificantes para una superóxido dismutasa, *sod-3*, y se encontró un patrón rítmico en condiciones de LO. Este patrón de expresión continuó en condiciones de oscuridad constante, indicando que para el organismo es importante una expresión rítmica de esta enzima. Es más los análisis por transformada de Fourier indican que este gen tiene un patrón de transcripción circadiano, ajustándose correctamente a una onda senoidal con periodo de 24 h.

Luego se analizaron los niveles transcripcional de *prdx-2*. En este caso se encontraron ritmos diarios de 24 h, con un pico a ZT9 en condiciones LO. Al pasar a condiciones constantes, observamos que los ritmos de 24 h se pierden. Esto se evidencia en el análisis de Tukey y el posterior análisis por transformada de Fourier, que indica la presencia de ritmos de 8 h.

Además del sistema de detoxificación por catalasa/peroxirredoxina y superóxido dismutasa, existen otros dos grandes sistemas de regulación redox, que son el sistema glutatión y el sistema tiorredoxina. Para determinar si estos genes están regulados por el reloj de *C. elegans*, se caracterizaron los niveles de expresión de genes que codifican enzimas de ambos sistemas. En el caso del sistema glutatión se estudiaron los genes *gsr-1*, *gst-36* y *gpx* (*r03g5.5*), que codifican para las enzimas glutatión-S-reductasa, glutatión-S-transferasa y glutatión peroxidasa, respectivamente. Se descubrió que a pesar de que sólo *gsr-1* está regulado de manera circadiana, dado que es el único que continúa ciclando en condiciones constantes, parece ser que es importante mantener una variación diaria en condiciones LO, dado que los 3 genes estudiados presentan un patrón de expresión con un período de 24 hs en dichas condiciones, de acuerdo al análisis por transformada de Fourier.

En el caso del sistema tiorredoxina, si bien observamos que *trxr-1* se ajusta a un patrón LO de 24 h, el ritmo observado no es significativo. Por otro lado, *trxr-2* posee ritmos diarios que continúan en oscuridad constante y el análisis por transformada rápida de Fourier nos indica que se trata de un transcripto circadiano.

En resumen, los resultados nos indican que de los 9 genes estudiados hay al menos 3 genes (*sod-3*, *gsr-1* y *trxr-2*) con un patrón de expresión circadiano y 4 genes (*gpx*, *gst-36*, *trxr-1* y *prdx-2*) que muestran una regulación directa por el *zeitgeber*, ya que ciclan bajo condiciones LO, pero luego pierden el patrón de 24 h en condiciones constantes. De los otros dos genes, *ctl-1* exhibe una tendencia rítmica con un patrón cercano a las 24 h, aunque sin embargo este no es significativo; y, *ctl-3* parece ser constante en LO y exhibe múltiples picos en OO. Al comparar estos patrones observados con aquellos descritos en una reciente publicación de un estudio a nivel transcriptómico global de la expresión en *C. elegans* mantenidos en diferentes ciclos de luz:oscuridad / temperatura (van der Linden, et al. 2010) encontramos que los patrones observados concuerda para el caso de *gst-36* (cicla sólo en LO), pero no así para el resto de los transcriptos estudiados. Por ejemplo, resulta interesante notar que, aunque en ese mismo trabajo se había reportado que *sod-3* ciclaba solamente bajo ciclos de temperatura, nosotros hemos encontrado ritmos en condiciones LO-OO. Sin

embargo, las diferencias en los patrones de expresión pueden deberse a que se usaron diferentes técnicas para analizar la expresión de dichos transcriptos. En este trabajo se tuvo especial cuidado en la elección de genes de referencia adecuados, ya que la elección de un gen de referencia incorrecto puede traer en consecuencia conclusiones erróneas (Vandesompele, et al. 2002; Hoogewijs, et al. 2008). Esta misma aclaración también es válida para el caso de *prdx-2*, que en una reciente publicación fue descrito como no rítmico (Olmedo, et al. 2012). Sin embargo en esa publicación se trabajó solamente con ciclos de temperatura y no con ciclos de luz:oscuridad; por ende, no podemos comparar los niveles transcripcionales de ARNm con los obtenidos en este trabajo.

Estado redox y ritmos de actividad locomotora

El hecho de encontrar ritmos en la actividad de enzimas detoxificantes de peróxido de hidrógeno y en la expresión de genes relacionados con los diferentes mecanismos que regulan el balance redox intracelular nos indica que estas variaciones son importantes para el organismo. Recientemente se demostró que al afectar el balance redox, en términos de los ritmos de oscilación de PRX, se provocan cambios en la amplitud y fase del reloj transcripcional-traducciona de plantas y bacterias (Edgar, et al. 2012). Además, publicaciones previas demostraron que el balance redox juega un papel en la sincronización de organismos diversos, como los hongos (Yoshida, et al. 2011; Belozerskaya, et al. 2012) y los peces zebra (Hirayama, et al. 2007). Estos trabajos nos daban un indicio de que la señalización redox podía ser parte del mecanismo de sincronización por luz y por esto, decidimos trabajar con una cepa mutante que sobreexpresa catalasas y, posiblemente, tenga afectada la señalización redox. Resulta interesante notar que encontramos que las poblaciones de nematodos mutantes poseían una mayor capacidad de sincronización que los nematodos salvajes (Figuras 3.3.6, 3.3.7 y 3.3.8) aunque no está claro aún cuál es el mecanismo que permite dicho incremento en el porcentaje de nematodos sincronizados. Podemos hipotetizar que se trata de una mejora en la relación señal/ruido del sistema de señalización redox mediado por H₂O₂. Dado que las catalasas son las encargadas de eliminar rápidamente cualquier exceso de peróxido de hidrógeno y, que la Km de las catalasas es levemente menor que la Km de las peroxirredoxinas, que son las encargadas de transducir la señal redox, podemos suponer que las peroxirredoxinas se encuentran en un ambiente relativamente limpio del ruido generado por las especies reactivas del oxígeno provenientes del metabolismo general y, por ende, están en mejores condiciones de transducir cambios en el estado redox. Sin embargo, esto es sólo una hipótesis y se necesitan más experimentos para comprobarlo.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que existen variaciones en diversos sistemas de regulación redox del nematodo *C. elegans*, tanto a nivel de actividad enzimática como a nivel transcripcional, los cuales están de acuerdo con publicaciones previas de

estudios realizados en otros organismos. Además, los ensayos de actividad locomotora presentan indicios de que modificaciones en enzimas involucradas en la detoxificación de agentes redox son capaces de modificar la capacidad de sincronización de los nematodos frente a ciclos de LO. Resulta interesante notar que tanto la actividad CAT como la expresión de genes relacionados a mantener el balance redox, presentan máximos durante el día. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos para los ritmos de tolerancia a estrés oxidativo del capítulo 1 (en la figura 3.4.1, podemos ver un resumen de las fases de los ritmos descriptos en los últimos 3 capítulos a modo comparativo). Además, en la naturaleza, durante la fase de luz se producen más ROS debido al aumento en la intensidad de la radiación UV, lo cual implicaría que los organismos deberían estar preparados para afrontar este aumento predecible en los radicales libres. También debemos destacar que el hecho de que los nematodos posean un homólogo a PRX nos está indicando la presencia de un oscilador redox en *C. elegans*. Nuestros resultados nos muestran que *prdx-2* exhibe ritmos transcripcionales en condiciones LO 12 h: 12 h y previamente, se ha demostrado que existen ritmos de sobreoxidación de PRDX-2 en condiciones constantes, luego de un entrenamiento a un ciclo de temperatura (Olmedo, et al. 2012). Estos resultados concuerdan con la hipótesis de la existencia de un sistema oscilador redox que data de hace 2500 millones de años, luego del gran evento de oxigenación que tuvo lugar en la Tierra. Se presume que este sistema permitió que los organismos se adaptaran a ciclos diarios en la producción/consumo de oxígeno y generación de ROS, dados por el ciclo de luz:oscuridad debido al ciclo diario día:noche.

Es interesante destacar que los ritmos circadianos, generados en muchos organismos por un oscilador central (desconocido actualmente en *C. elegans*) deben comunicarse por distintas vías al resto del cuerpo. Así, las variaciones cíclicas en un tejido o célula determinada pueden acoplarse a otras áreas del organismo. Uno de los responsables posibles de este mecanismo en el nematodo bajo estudio será examinado en el capítulo siguiente.

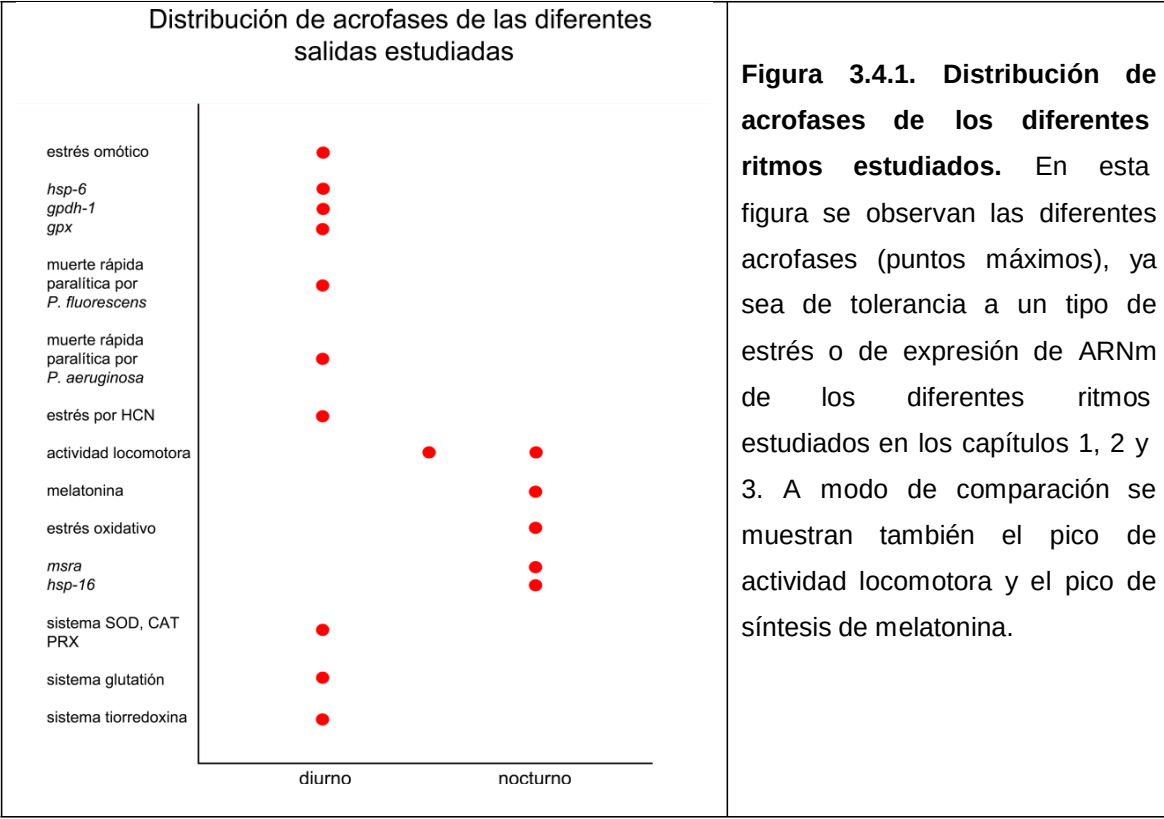


Figura 3.4.1. Distribución de acrofases de los diferentes ritmos estudiados. En esta figura se observan las diferentes acrofases (puntos máximos), ya sea de tolerancia a un tipo de estrés o de expresión de ARNm de los diferentes ritmos estudiados en los capítulos 1, 2 y 3. A modo de comparación se muestran también el pico de actividad locomotora y el pico de síntesis de melatonina.

Capítulo 4

Modulación de ritmos de actividad locomotora en *C. elegans* por factores ambientales



Introducción

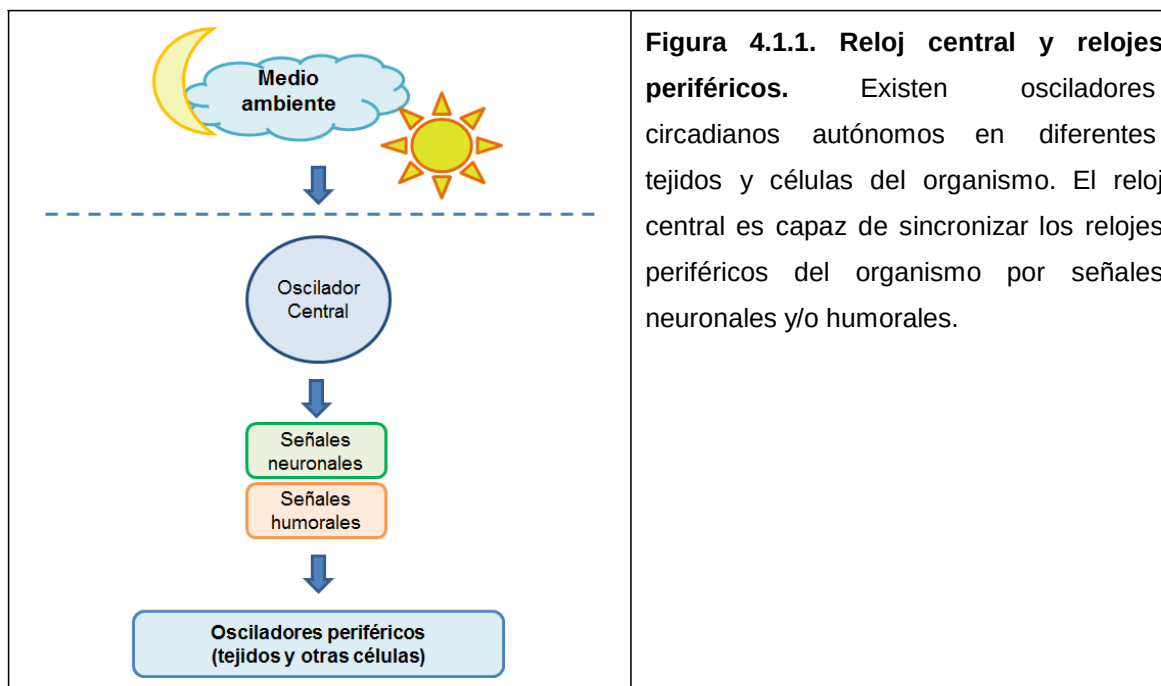
En los capítulos previos se ha demostrado la existencia de ritmos diarios de tolerancia a agentes estresantes abióticos, como el estrés osmótico y el estrés oxidativo; agentes estresantes bióticos, como la interacción con bacterias del género *Pseudomonas*; y también se ha mostrado la existencia de variaciones diarias en componentes que regulan el ambiente redox celular. Todos estos ritmos resultan pasibles de sincronización por un componente exógeno. Esto quiere decir que el oscilador central se “puso en hora” (ajustó su período y fase) de acuerdo al ciclo impuesto por esta señal del medio ambiente y luego, de alguna manera, fue capaz de dispersar estos ritmos al resto del organismo. En la naturaleza existen diferentes ciclos ambientales con un periodo de 24 horas como el ciclo luz/oscuridad, la temperatura, la actividad social, etc., que tienen la capacidad de sincronizar (poner en hora) al reloj biológico. Estas señales ambientales son conocidas como *zeitgebers*, o dadores del tiempo, y la principal señal sincronizadora es el ciclo de luz:oscuridad (Aschoff, et al. 1975). Además, existen ciclos ambientales diferentes de 24 horas, como por ejemplo los ciclos de las mareas (12,4 horas) o el mes lunar (29,53 días). Estos ciclos representan la presión de selección sobre 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, el reloj biológico ajusta su período y fase al *zeitgeber* mediante un proceso denominado *sincronización* (Pittendrigh 1960). La sincronización asegura la conexión entre el reloj biológico y los ciclos ambientales. Como ya fue dicho, en la naturaleza existen diferentes factores que pueden variar en forma rítmica, y como consecuencia actuar como *zeitgebers*; 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 existe sincronización social de los ritmos de actividad locomotora en *D. melanogaster* (Lone y Sharma 2011).

Bajo determinadas condiciones el *zeitgeber* puede no sincronizar al reloj y afectar directamente a las salidas del mismo en un 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. Por otro lado,

en el caso de enmascaramiento, si se elimina el *zeitgeber*, el ritmo en libre curso empieza en una fase que no es predecible por la exposición previa al estímulo periódico (Madrid y Rol de Lama 2006). A través del enmascaramiento, los animales poseen la capacidad de responder directamente a las señales del ambiente. El enmascaramiento complementa al mecanismo de sincronización como mecanismos de control del reloj biológico de manera de ayudar a los animales a especializarse ya sea en un ambiente nocturno o diurno (Aschoff 1988).

Además del reloj biológico central, existen relojes circadianos en diversos tejidos y células y estos osciladores autónomos parecen estar organizados de una manera jerárquica (Reppert y Weaver 2002; Schibler y Sassone-Corsi 2002). Estos relojes situados en tejidos diferentes al del oscilador central son llamados, de manera muy original, *relojes periféricos*. Como en ausencia de un reloj central funcional estos relojes periféricos rápidamente pierden amplitud, se los considera relojes esclavos que regulan los ritmos de cada tejido. Esto indica que el reloj central es capaz de “comunicarle” la hora a cada reloj periférico (Barclay, et al. 2012) (Figura 4.1.1).



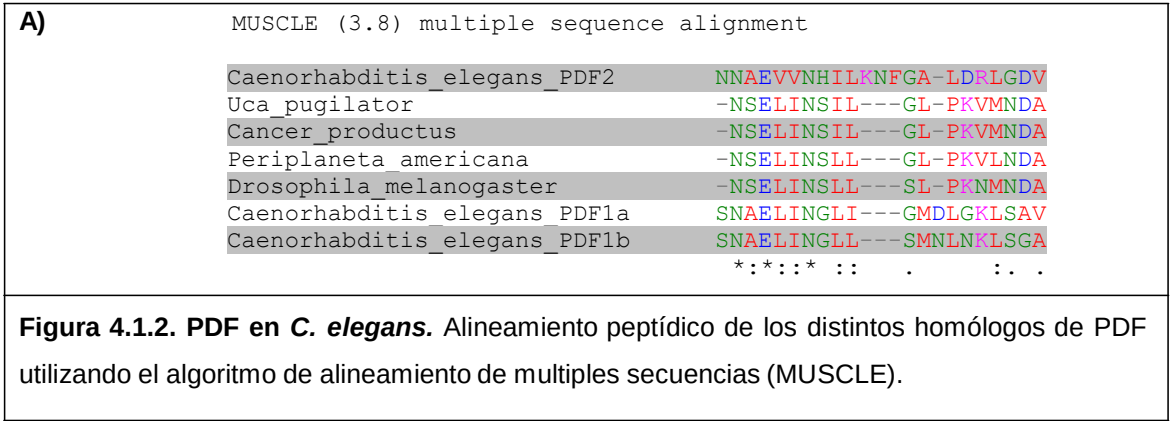
Existen mecanismos humorales y/o neuronales capaces de transmitir información desde el reloj central hacia cada uno de los tejidos. A través de conexiones neuronales, las señales de salida del reloj central son transmitidas a otras áreas del cerebro por ritmos de la actividad eléctrica. En mamíferos este ritmo también está expuesto a la modulación circadiana de ondas de calcio, que contribuyen a las oscilaciones diarias en el potencial de membrana (Pennartz, et al. 2002). Dentro de las señales humorales existen diversos neuropéptidos que cumplen un rol fundamental en la dispersión de los ritmos. En mamíferos, por ejemplo, este rol es cumplido en parte por TGF- α (Snodgrass-Belt, et al. 2005) y PK2 (Cheng, et al. 2002). En *Drosophila melanogaster* - y se presume que en otros insectos también - este rol es cumplido por el neuropéptido PDF (*pigment dispersing factor*). Éste péptido fue descubierto por ser homólogo a una hormona de crustáceos, PDH (del inglés *Pigment Dispersing Hormone*), que fue prácticamente uno de los primeros péptidos en ser identificados y caracterizados en invertebrados. Estas hormonas tienen la capacidad de actuar como neurotransmisores/neuromoduladores, controlando procesos como el cambio de color del integumento, dispersión de pigmentos en los ojos, respuesta de la retina y se sabe también que existe una clara relación entre PDH y la sincronización circadiana para, al menos, dos crustáceos (Sullivan, et al. 2009).

En *Drosophila melanogaster*, PDF es requerido para mantener los ritmos de actividad bajo condiciones constantes (Renn, et al. 1999) mientras que sincroniza la fase y la amplitud de células osciladoras individuales (Peng, et al. 2003; Lin, et al. 2004). Utilizando anticuerpos anti- β PDH (una de las isoformas presentes en crustáceos), PDF pudo ser localizado en neuronas cerebrales (especialmente en áreas relacionadas con el sistema visual) y en el sistema nervioso abdominal (Dirksen, et al. 1987).

Con la generación de un mutante para *pdf* en la mosca de la fruta *D. melanogaster* se logró estudiar en detalle la influencia de este neuropéptido y su participación como componente génico del reloj circadiano de estos organismos. Las moscas salvajes de *D. melanogaster* tienen una actividad rítmica bimodal con picos en la mañana y en la transición tarde-noche. Las moscas mutantes para *pdf* mantienen su ritmicidad en condiciones LD, aunque pierden su anticipación por la mañana y muestran un adelanto de 2 horas en su máximo de actividad en la transición tarde-noche. Luego de tres días en condiciones de oscuridad constante, los mutantes *pdf* pierden su ritmicidad; lo que refleja la pérdida gradual de la sincronización por PDF (Renn, et al. 1999).

Estudios posteriores demostraron la existencia de un receptor de PDF denominado PDFR, una proteína de la familia de las GPCR's clase B (tipo secretina), las cuales usan proteínas G α_s para acoplar a la adenilato ciclasa y regular los niveles de AMP cíclico (Mertens, et al. 2005). Mutantes de *pdfr* fenocopian a los mutantes nulos de *pdf*, es decir, muestran un comportamiento rítmico aberrante (Mertens, et al. 2005). Entonces, podemos

inferir que si hay expresión de *pdfr* en las neuronas reloj, *pdf* debe cumplir algún rol autocrino sobre las mismas (Im y Taghert 2010). Su modo de acción puede ser vía difusión o a través de conexiones neuronales indirectas (Mertens, et al. 2005).



El genoma de *C. elegans* contiene dos genes *pdf*, *pdf-1* y *pdf-2*, que codifican tres péptidos: PDF-1a, PDF-1b y PDF-2 (Figura 4.1.2). Los tres péptidos pueden activar las tres isoformas de receptor de PDF, PDFR, codificados por un único gen *pdfr-1*. Estos péptidos están constituidos por 20 ó 22 aminoácidos. De forma similar a como se genera PDH en los crustáceos, en los nematodos PDF se origina a partir de una molécula precursora que consiste en un péptido señal, un conector y PDF maduro flanqueado por sitios de clivaje dibásicos (Figura 4.1.3).

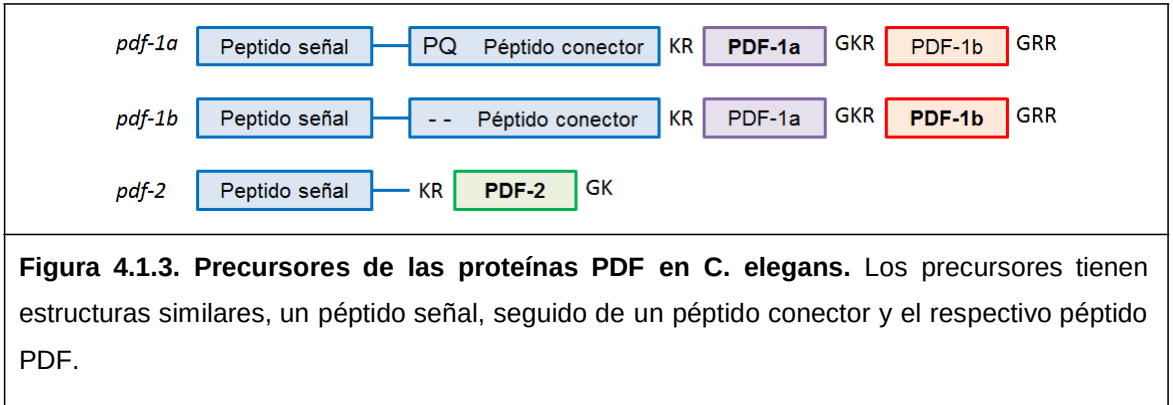


Figura 4.1.3. Precursores de las proteínas PDF en *C. elegans*. Los precursores tienen estructuras similares, un péptido señal, seguido de un péptido conector y el respectivo péptido PDF.

Mediante el uso de reporteros GFP, se estudió la expresión espacial de PDF en *C. elegans* y se observó que el precursor de PDF-1 (que codifica tanto al péptido PDF-1a como a PDF-1b) se expresa en las interneuronas, neuronas sensoriales y neuronas motoras. Además algunos tejidos no-neuronales también expresan estos péptidos, como la glándula rectal y células de la válvula rectal intestinal. La expresión de *pdf-2* se observó en las mismas localizaciones que *pdf-1*, e inclusive en ciertas células de la cavidad bucal de los

nematodos. Todas las neuronas que expresan PDF en *C. elegans* juegan un papel en el sentido e integración de estímulos ambientales, como presencia de oxígeno u actividad locomotora (Janssen, et al. 2009). Para este último caso, mutantes de PDF-1a y PDF-1b muestran comportamiento locomotor alterado, lo que se manifiesta en una marcada disminución de su velocidad de movimiento. Por otro lado, mutantes de PDF-2 no mostraron diferencias con el fenotipo de locomoción salvaje (WT, del inglés *wild type*). Asimismo, dobles mutantes *pdf-1/pdf-2* mostraron un fenotipo de locomoción similar al salvaje. Esto no ocurrió para mutantes del receptor *pdf-1*, los cuales presentaron una velocidad de locomoción reducida (Tabla 4.1.1).

Gen	Velocidad de locomoción	Tabla 4.1.1. Fenotipos de velocidad de locomoción en <i>C. elegans</i>. En la tabla se indican los fenotipos de locomoción de las diferentes cepas mutantes de genes <i>pdf</i> . (↓) velocidad reducida (wt) fenotipo de locomoción salvaje (<i>wild type</i>).
<i>pdf-1</i>	↓	
<i>pdf-2</i>	wt	
<i>pdf-1/pdf-2</i>	wt	
<i>pdf-1</i>	↓	

Ritmos de actividad locomotora en *Caenorhabditis elegans*.

Ya mencionamos que *Caenorhabditis elegans* es un nematodo que vive en el suelo y carece de órganos especializados sensibles a la luz. A pesar de ello, existen datos recientes que indican que son capaces de responder a estímulos fóticos. Trabajos de Ward y colaboradores (Ward, et al. 2008) demostraron que un estímulo lumínico genera una respuesta fototáctica negativa en los nematodos. Un grupo de neuronas sensoriales ciliadas fueron identificadas como posibles células receptoras capaces de mediar la fototaxis en estos animales. 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 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 (Liu, et al. 2010).

Como se explicó anteriormente en la introducción general, utilizando el sistema de registro de actividad locomotora desarrollado en nuestro laboratorio, se demostró que *C. elegans* es capaz de sincronizarse a ciclos de 24 horas de luz: oscuridad (LO) y de temperatura alta : temperatura baja (Tt) (Figura I.15 e I.16). Además los nematodos son capaces de resincronizarse luego de un cambio de fase de 6 horas en el ciclo LO (Figura I.15A) y el período de estos ritmos es capaz de compensar cambios en la temperatura (Simonetta, et al. 2009), cumpliendo con los requisitos para ser considerados verdaderos ritmos circadianos (Pittendrigh 1954; Sweeney y Hastings 1960). Uno de las principales ventajas de este sistema es que nos permite evaluar una salida clásica del reloj circadiano en forma continua y casi en tiempo real (Simonetta y Golombek 2007).

En los capítulos previos se describieron diferentes ritmos de tolerancia a agentes estresantes que *C. elegans* puede encontrar a lo largo de su vida diaria en la naturaleza. Asimismo, también se demostró la existencia de ritmos en diferentes sistemas relacionados a la regulación del ambiente redox celular, que protegen a los nematodos de los efectos nocivos del estrés oxidativo. Todos estos ritmos están controlados en última instancia por un reloj endógeno central, cuya maquinaria molecular y ubicación orgánica son aún desconocidas. Dilucidar cómo es que estos ritmos están controlados por este reloj central, nos permitiría entender mejor cómo es que este organismo afronta los cambios que ocurren diariamente en su hábitat.

Experimentos de nuestro laboratorio (Simonetta, et al. 2008; Simonetta, et al. 2009; Migliori, et al. 2011b; Romanowski, et al. 2011; Migliori, et al. 2012) y otros (Kippert, et al. 2002; Saigusa, et al. 2002; van der Linden, et al. 2010) indican que *C. elegans* es capaz de sincronizarse a ritmos de luz:oscuridad. Por otro lado, no se conoce aún cómo es que el reloj es capaz de dispersar o transducir los ritmos a todo el organismo. Teniendo en cuenta lo que se conoce acerca de la regulación de los relojes periféricos en otros organismos, es lógico pensar que un mecanismo similar puede estar actuando en *Caenorhabditis elegans*, ya sea a través de señales neuronales o humores. En este aspecto, PDF resulta un candidato excelente de estudio. Este neuropéptido, que actúa como una salida del reloj en insectos, dispersando los ritmos a todo el organismo, tiene 2 ortólogos en *C. elegans* y podría estar cumpliendo este mismo rol. Valiéndonos del sistema de registro de actividad locomotora y de diferentes cepas mutantes de los genes *pdf* y su receptor, en este capítulo intentaremos responder esta pregunta.

Materiales y métodos

Métodos generales y cepas utilizadas

Se utilizaron animales de la especie *Caenorhabditis elegans*, cepas N2 (*wild type*), LSC27 (*pdf-1(tm1996)*), con una delección de 588pb que afecta al primer exón; LSC40 (*pdf-2(tm4393)*), con una delección de 401pb que afecta al primer exón; LSC39 (*pdf-1(lst34)*),

con una delección de 855pb que afecta a las 3 variantes de splicing del receptor PDFR; *pdf-1* rescue (LSC27 + *IstIs1[pdf-1 + elt-2::GFP]*), un rescate con múltiples copias genómicas de *pdf-1*; y el doble mutante LSC27 x LSC40 (*pdf-1(tm1996); pdf-2(tm4393)*). La cepa N2 fue provista por el *Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota, MN, USA*. Las cepas mutantes, rescates y mutantes dobles para genes relacionados a PDF fueron gentilmente cedidas por la Dra. Ellen Meelkop (Universidad de Leuven, Bélgica).

Los nematodos se mantuvieron en placas de petri con medio NGM (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; en ciclos de luz:oscuridad (LO) 12 h : 12 h, 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 ensayos de actividad locomotora se sincronizaron poblaciones de nematodos al mismo estadio de desarrollo utilizando el método de cloro (Lewis y Fleming 1995b). Los huevos obtenidos de la sincronización se cultivaron 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 anti micótico 1x (Gibco, USA) en un erlenmeyer de 50 ml, en agitación (110 rpm) y a 18,5°C, bajo un ciclo LO 12 h: 12 h. 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 estadio 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).

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 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.

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 5-10 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 5-10 gusanos fueron analizados mediante Cosinor, y la acrofase promedio fue utilizada para dicho análisis. El umbral de significancia establecido fue de $p = 0,05$.

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* "landA Excel macro suite" (Steve Kay, Scripps Institute)).

Para comparar la fase de los ritmos sujetos a sincronización (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 para los últimos 3 días de la fase de sincronización vs. el primer día en condiciones constantes post-sincronización.

Para los experimentos de condiciones constantes (OO), los datos filtrados fueron graficados (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 *El 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 $\pm$ SEM.

Experimentos de sincronización por luz

Para los experimentos de sincronización por luz, los nematodos (contenidos en las placas de 96 pocillos) fueron expuestos a un ciclo LO 12 h : 12 h 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.

Resultados

Caracterización del rol de PDF en la sincronización por luz

Para entender el rol de PDF en la sincronización por luz de los ritmos de actividad locomotora de *Caenorhabditis elegans*, se estudió la capacidad de sincronización de diferentes cepas con mutaciones en genes relacionados a PDF. En particular, se trabajó con cepas mutantes para *pdf-1* (variante *tm1996*; mutante delecional, con una deleción de 588pb que afecta a PDF1a y PDF1b), *pdf-2* (variante *tm4393*; mutante delecional, con una deleción de 401pb), un mutante doble (*pdf-1*; *pdf-2*) y el mutante del único receptor de PDF de *C. elegans* conocido hasta el momento, *pdfr-1* (variante *lst34*; mutante delecional, con una deleción de 855pb que afecta a las tres variantes de splicing del receptor (Meelkop, et al. 2012)). Para poder tener una mayor resolución en la toma de datos se decidió realizar ensayos de actividad locomotora, ya que dicha salida puede ser estudiada en forma continua. De esta manera cambios sutiles en la fase, período o acrofase del ritmo pueden ser detectados eficazmente, mientras que si se emplean tomas de muestras discretas podríamos perdernos parte de la información. Se realizaron estudios poblacionales, ya que en estudios previos al analizar gusanos individuales se observó gran variabilidad en los patrones

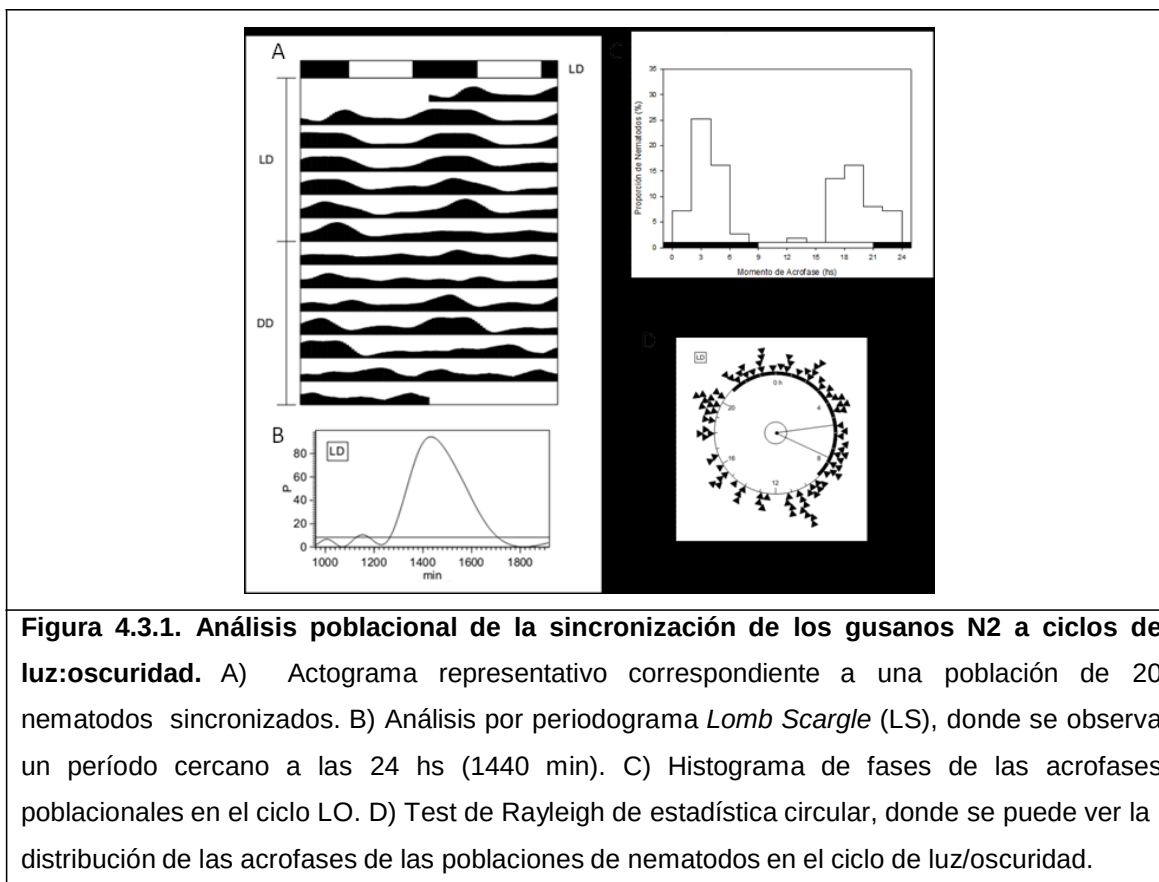
obtenidos (Simonetta y Golombek 2007; Simonetta, et al. 2009).

Se registró la actividad locomotora de nematodos adultos bajo ciclos de luz:oscuridad (LO) 12 h : 12 h durante 7 días y, luego se los dejó en condiciones de libre curso (*free running*), en oscuridad constante (OO), durante 7 días más.

Cepa N2

Los registros de actividad locomotora muestran que poblaciones de la cepa salvaje de *C. elegans* N2, son capaces de sincronizar a un ciclo LO con periodo de 24 horas (actograma representativo, figuras 4.3.1A; y periodograma, Figura 4.3.1B). A partir de los registros de poblaciones individuales, se realizaron análisis de Cosinor para cada uno de los registros y se construyó un histograma de acrofases (Figura 4.3.1C). Con estos datos se realizó un test de estadística circular de Rayleigh y se determinó que la acrofase promedio para la cepa salvaje se encontraba hacia el final de la noche (Figura 4.3.1D). Esta cepa exhibió un periodo poblacional promedio en LO de 23,6h y, de 23,7h en OO.

Por su parte, el test poblacional por histogramas de fase muestra que la actividad locomotora de poblaciones de nematodos N2 presenta una distribución de acrofases bimodal con una población que exhibe una acrofase durante la noche y, otra que la exhibe hacia el final del día. Podría tratarse también de dos subpoblaciones con picos diferentes (Figura 4.3.1C). En el actograma representativo se puede visualizar que la población fue capaz de sincronizarse a ciclos de luz/oscuridad. Además, en la figura puede verse que la actividad de la población parece ser parcialmente inhibida por la luz, ya que ésta decrece durante el transcurso del día. De esta manera, la sincronización al ciclo LO observada podría deberse en parte a un efecto de enmascaramiento de la actividad locomotora, y no a una sincronización del reloj circadiano en sí mismo.



Para poder determinar si la actividad locomotora de los nematodos N2 está efectivamente bajo control circadiano, se realizaron estudios para determinar si los nematodos estaban realmente sincronizados. Luego de que los nematodos estuvieron expuestos a un ciclo LO durante 7 días se los colocó en condiciones de oscuridad constante (OO) para así determinar si existía o no enmascaramiento. Se determinaron las acrofases previas al pasaje a condiciones constante y las acrofases del primer día en OO y se construyeron diagramas de transición de fase (*phase transition (PTC) plots*). En estos diagramas, las poblaciones sincronizadas se sitúan sobre la recta a 45° desde el origen. Todas aquellas poblaciones que se desvían de la recta están enmascaradas. Como criterio de desvío se definió que la diferencia entre la fase en OO y la fase en LO debía ser menor o igual a 120 minutos. En la Figura 4.3.2 se puede observar que no todas las poblaciones de nematodos están realmente sincronizadas ya que solo el 9% de las poblaciones se agruparon cerca de la línea de 45°, particularmente alrededor de las coordenadas (ZT4, CT4) y (ZT18, CT18), 240 y 1080 minutos, respectivamente. Este resultado confirma también las dos poblaciones encontradas en cuanto a su acrofase de actividad locomotora en condiciones de LO.

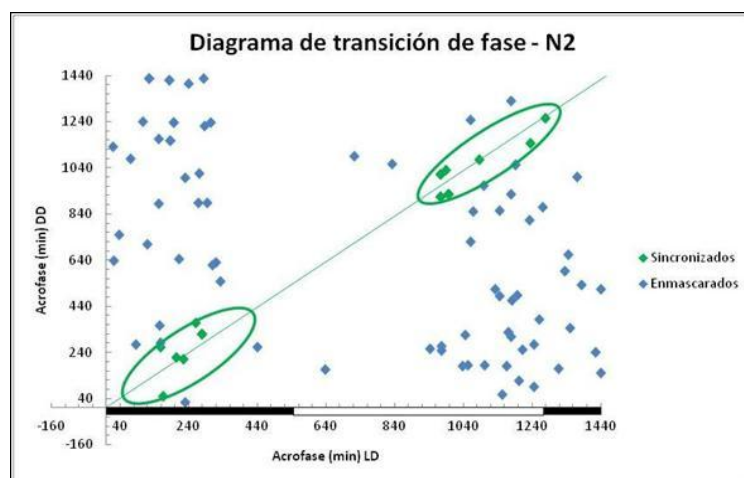


Figura 4.3.2. Análisis poblacional de la sincronización de *C. elegans* N2 en la transición LO/OO. Diagrama de transición de fase mostrando la acrofase (análisis de *Cosinor*) de la actividad locomotora del primer día en OO (ordenada) en función de la acrofase promedio de los primeros 7 días en LO (abscisa). Los rombos verdes indican las poblaciones sincronizadas al ciclo LO, mientras que los rombos azules indican las poblaciones enmascaradas. Para mayor claridad, las poblaciones sincronizadas están encerradas en elipses verdes.

Estos resultados sugieren que la luz es capaz de sincronizar los ritmos de actividad locomotora en un porcentaje relativamente reducido de poblaciones de *C. elegans*. Sin embargo, en el resto de los animales analizados se observó un posible enmascaramiento, ya que al eliminar el *zeitgeber* el ritmo en libre curso poseía una fase diferente a la determinada por el ciclo LO, cuyas acrofases promedio se agrupaban alrededor de ZT4 (240 minutos) y ZT18 (1080 minutos). Este comportamiento puede deberse a que bajo determinadas condiciones el *zeitgeber* no sincroniza el 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.

Una vez analizadas las poblaciones de nematodos salvajes N2, se prosiguió con el análisis de las cepas mutantes de PDF.

Cepa LSC27 (mutante pdf-1)

Los actogramas de las poblaciones *pdf-1* sujetas a condiciones LO 12 h: 12 h no muestran patrones robustos de actividad con periodo cercano a 24 horas (Figura 4.3.3). Si bien la acrofase promedio para estos mutantes es nocturna, el test de Rayleigh no es significativo (Figura 4.3.3D) y, analizando el histograma de acrofases, se observa una distribución dispersa a lo largo de todo el día, mostrando una leve tendencia a presentar una mayor actividad durante el día (Figura 4.3.3C). Esta cepa exhibió un periodo poblacional promedio en LO de 23,5h y, de 23,4h en OO.

En el actograma representativo puede visualizarse que la población no se sincronizó totalmente a los ciclos de luz:oscuridad y se vuelve rápidamente arrítmica en condiciones de curso libre (Figura 4.3.3A), a diferencia de lo observado con la cepa N2. Además el análisis del diagrama de transición de fase (Figura 4.3.4) muestra que, prácticamente, esta cepa no fue capaz de sincronizarse al ciclo LO. Sólo una pequeña proporción de las poblaciones (5% del total analizado) se agrupó cerca de la línea de 45° al origen, alrededor de las coordenadas (ZT3, CT3), o 180 minutos. En este gráfico también podemos observar una bimodalidad en las acrofases de LO, representada por un grupo de poblaciones con su frase centrada en ZT3, efectivamente sincronizadas, y otras centradas en ZT15, claramente enmascaradas.

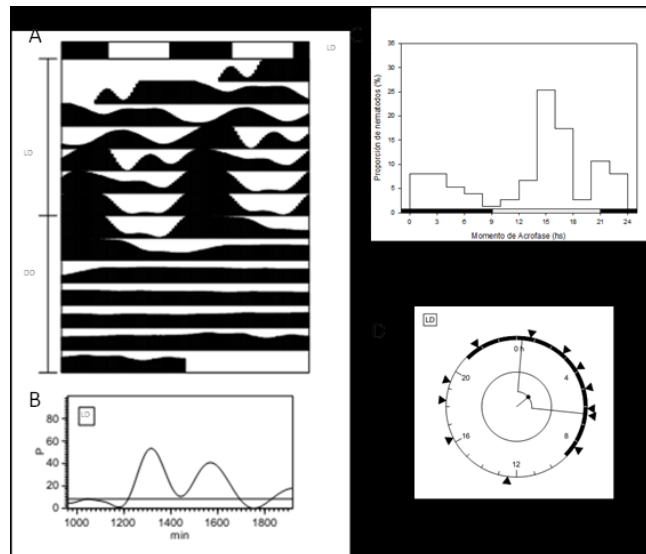


Figura 4.3.3: Análisis poblacional de la sincronización de los nematodos LSC27 (mutantes *pdf-1*) a ciclos de luz:oscuridad. A) Actograma representativo correspondiente a una población de 20 nematodos sincronizados. B) Análisis por periodograma *Lomb Scargle* (LS), donde se observa un período cercano a las 24 hs (1440 min). C) Histograma de fases de las acrofases poblacionales en el ciclo LO. D) Test de Rayleigh de estadística circular, donde se puede ver la distribución de las acrofases de las poblaciones de nematodos en el ciclo de luz/oscuridad.

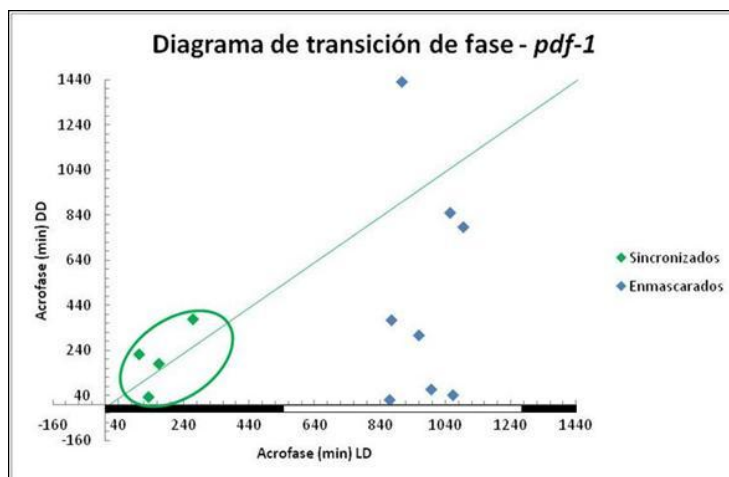


Figura 4.3.4. Análisis poblacional de la sincronización de *C. elegans pdf-1* en la transición LO:OO. Diagrama de transición de fase mostrando la acrofase (análisis de *Cosinor*) de la actividad locomotora del primer día en OO (ordenada) en función de la acrofase promedio de los primeros 7 días en LO (abscisa). Los rombos verdes indican las poblaciones sincronizadas al ciclo LO, mientras que los rombos azules indican las poblaciones enmascaradas. Para mayor claridad, las poblaciones sincronizadas están encerradas en elipses verdes.

Estos resultados nos indican que la mutación en el gen *pdf-1* afecta notablemente los ritmos de actividad locomotora de los nematodos, presentando estos animales una movilidad reducida, con pérdida de patrones definidos de actividad locomotora y de la ritmicidad. Esto último se evidencia en los periodogramas, ya que no es posible observar un único período significativo (periodograma representativo, Figura 4.3.3B) y además, la distribución de las acrofases aparentaría ser al azar, tal como se observa en el historgrama de acrofases (Figura 4.3.3C).

Cepa rescate de pdf-1

Para validar los resultados obtenidos con la cepa mutante para el gen *pdf-1*, se repitieron los experimentos de sincronización con una cepa que rescataba la mutación de la cepa LSC27, *pdf-1 rescue*, la cual fue generada por la Dra. Liliane Schoofs y la Dra. Ellen Meelkop (*Laboratory of Functional Genomics and Proteomics, Zoological Institute, K.U. Leuven, Naamsestraat 59, B-3000 Leuven, Bélgica*). Esta cepa es un integrante espontáneo de una línea generada por microinyección del gen completo de *pdf-1* (incluyendo su promotor) junto a un marcador de selección (*elt-2::GFP*).

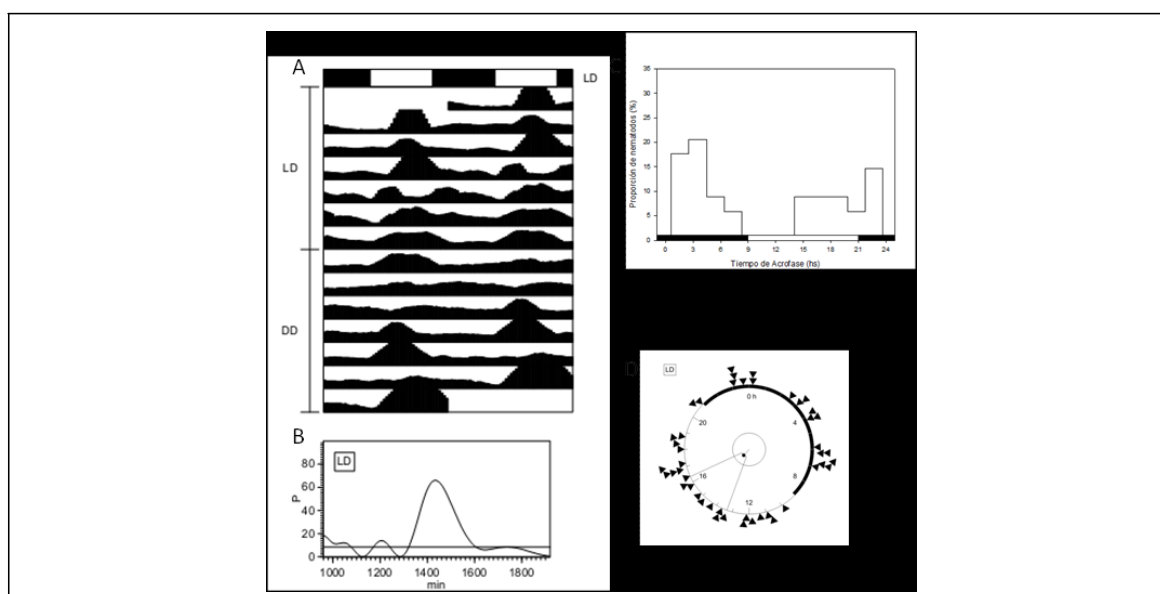


Figura 4.3.5. Análisis poblacional de la sincronización de los gusanos mutantes *pdf-1 Rescue* a ciclos de luz:oscuridad. A) Actograma representativo correspondiente a una población de 20 nematodos sincronizados. B) Análisis por periodograma *Lomb Scargle* (LS), donde se observa un período cercano a las 24 hs (1440 min). C) Histograma de fases de las acrofases poblacionales en el ciclo LO. D) Test de Rayleigh de estadística circular, donde se puede ver la distribución de las acrofases de las poblaciones de nematodos en el ciclo de luz/oscuridad.

Los análisis poblacionales muestran que la cepa rescate es capaz de sincronizarse al ciclo LO con un patrón de actividad de 24 horas, de manera similar a la cepa salvaje N2, con una acrofase en la transición día-noche (Figura 4.3.5). Esta cepa exhibió un periodo poblacional promedio en LO y OO de 23,6h.

El histograma de acrofases (Figura 4.3.5C) muestra una distribución de fases muy similar a la de la cepa N2 (Figura 4.3.1C), con un comportamiento básicamente bimodal, presentando un máximo durante la noche y otro durante el final del día y el principio de la noche. A pesar de esto, el test de estadística circular de Rayleigh (Figura 4.3.5D) no es significativo. En el actograma representativo (Figura 4.3.5A) puede visualizarse que la población como un todo es capaz de sincronizarse a ciclos de luz/oscuridad. Ésta población en particular presentó una acrofase centrada hacia el final del día (ZT19) en condiciones LO.

Luego, se construyó un diagrama de transición de fase (Figura 4.3.6) para determinar la proporción de poblaciones realmente sincronizadas. Nuevamente, observamos un patrón similar a la cepa salvaje N2 (Figura 4.3.2). En este caso aproximadamente el 17% del total de las poblaciones analizadas se distribuyó cerca de la línea de 45° al origen alrededor de las coordenadas (ZT4, CT4) y (ZT19, CT19), 240 minutos y 1140 minutos, respectivamente.

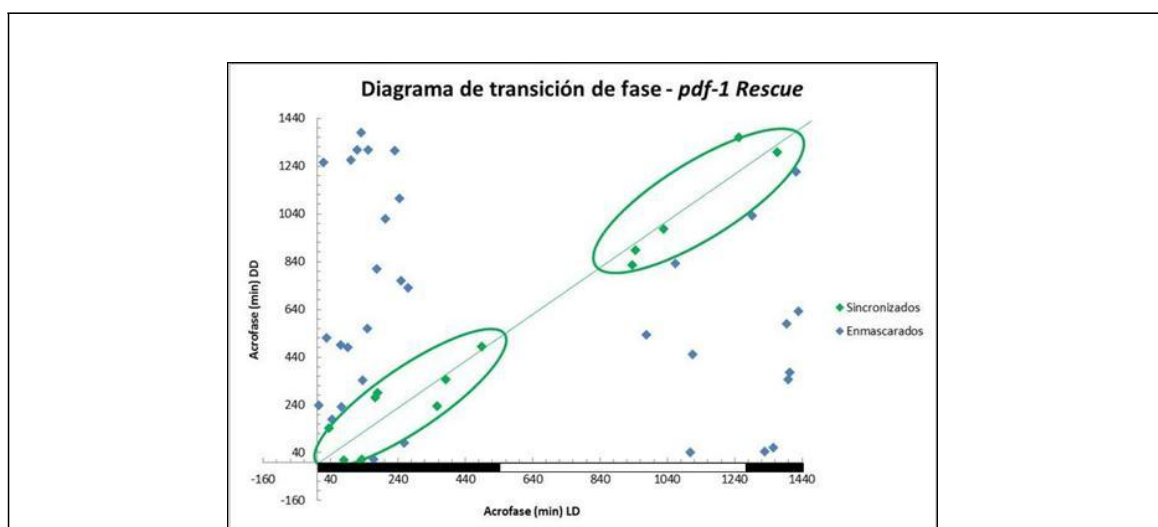


Figura 4.3.6. Análisis poblacional de la sincronización de *C. elegans pdf-1 Rescue* en la transición LO:OO. Diagrama de transición de fase mostrando la acrofase (análisis de *Cosinor*) de la actividad locomotora del primer día en OO (ordenada) en función de la acrofase promedio de los primeros 7 días en LO (abscisa). Los rombos verdes indican las poblaciones sincronizadas al ciclo LO, mientras que los rombos azules indican las poblaciones enmascaradas. Para mayor claridad, las poblaciones sincronizadas están encerradas en elipses verdes.

Estos resultados indican que la cepa pdf-1 rescue es efectivamente capaz de rescatar los defectos encontrados para la cepa LSC27 (mutantes pdf-1), recuperando los patrones de actividad presentados por la cepa salvaje N2. Esto indica que el gen pdf-1 está involucrado en el mecanismo de generación de ritmos de actividad locomotora.

Cepa LSC40 (mutante pdf-2)

Los ensayos con la cepa LSC40 no mostraron un ritmo de actividad locomotora demasiado alterado, pudiendo evidenciarse cierta ritmicidad con un patrón de actividad locomotora cercano a las 24 horas, en condiciones LO 12 h : 12 h (Figura 4.3.7). Esta cepa exhibió un periodo poblacional promedio en LO y OO de 23,2h.

El histograma de acrofases mostró una distribución con un sesgo hacia el final del día y durante la noche (Figura 4.3.7C), pero el análisis de estadística circular no indica una acrofase promedio significativa ($p > 0,05$; Test de Rayleigh, figura 4.3.7D).

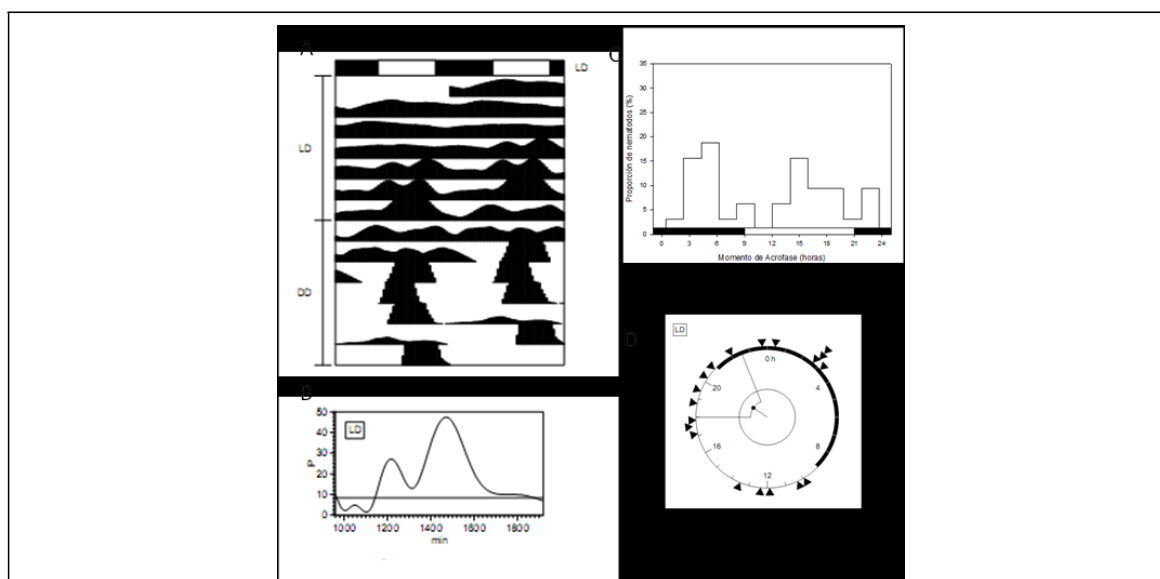


Figura 4.3.7. Análisis poblacional de la sincronización de los gusanos mutantes *pdf-2* a ciclos de luz:oscuridad. A) Actograma representativo correspondiente a una población de 20 nematodos sincronizados. B) Análisis por periodograma *Lomb Scargle* (LS), donde se observa un período cercano a las 24 hs (1440 min). C) Histograma de fases de las acrofases poblacionales en el ciclo LO. D) Test de Rayleigh de estadística circular, donde se puede ver la distribución de las acrofases de las poblaciones de nematodos en el ciclo de luz/oscuridad.

Luego de 7 días en ciclos LO, los nematodos fueron colocados en condiciones constantes (OO), para poder determinar si la actividad locomotora de los mismos está bajo control circadiano. A partir de los datos de acrofases promedio en LO y del primer día de OO, obtenidos por análisis de Cosinor, se observó que las poblaciones de nematodos LSC40 se sincronizaron parcialmente al ciclo luz:oscuridad. Sólo un 2% de las poblaciones exhibieron fases que se agruparon cerca de la línea de 45° al origen, alrededor de las coordenadas (ZT19, CT19), o 1140 minutos. Esto nos indica que las poblaciones de nematodos estaban en su mayoría enmascaradas (sólo una población de nematodos realmente se encuentra realmente sincronizada), debido a que al eliminar el *zeitgeber* el ritmo en libre curso exhibió una fase diferente a la determinada por el ciclo LO (Figura 4.3.8).

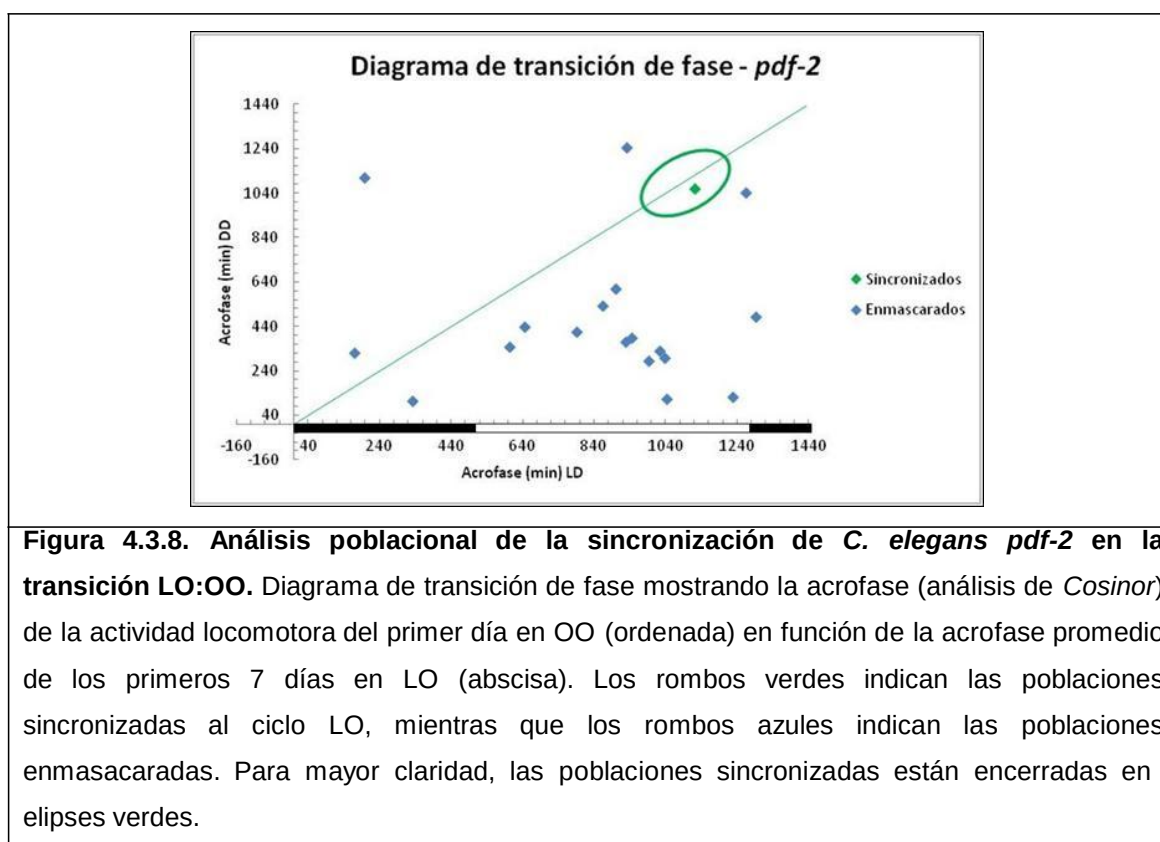


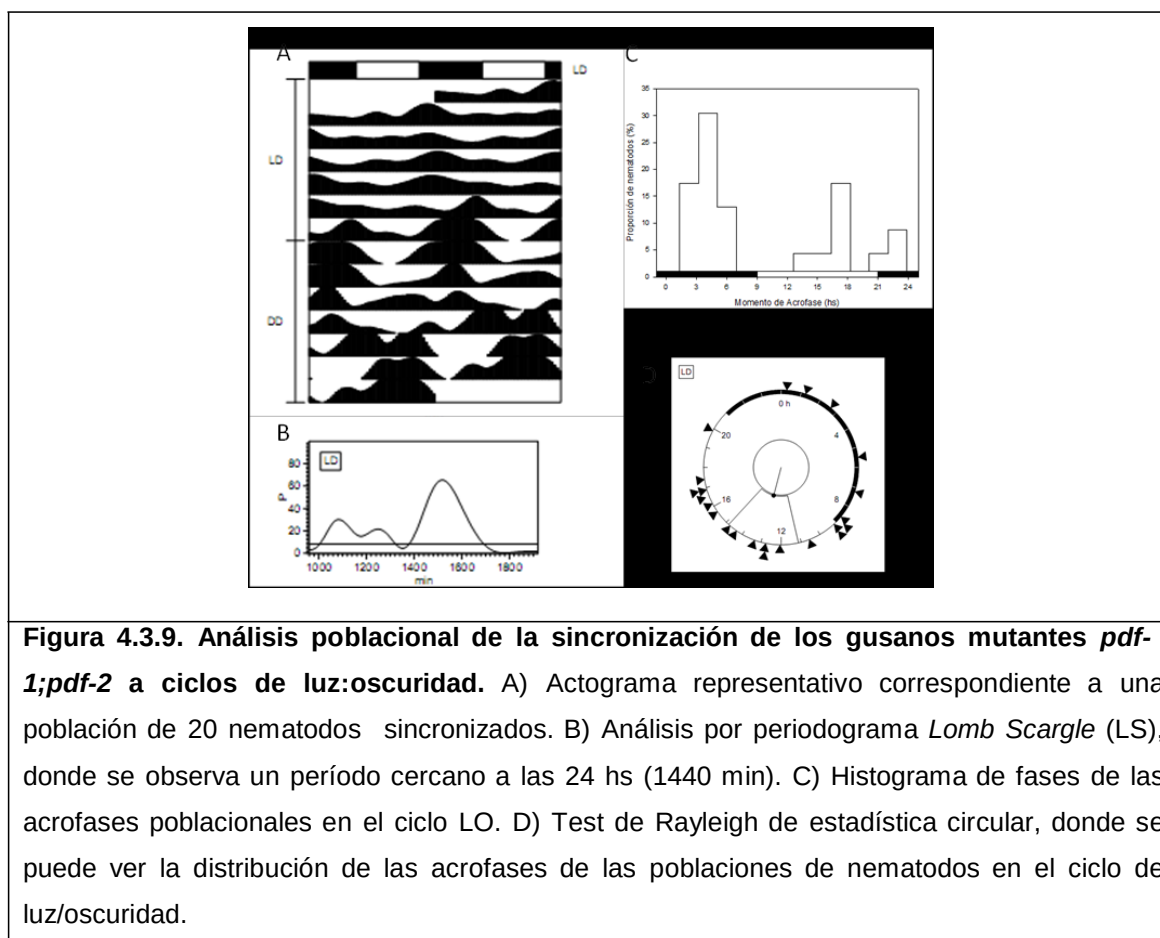
Figura 4.3.8. Análisis poblacional de la sincronización de *C. elegans pdf-2* en la transición LO:OO. Diagrama de transición de fase mostrando la acrofase (análisis de *Cosinor*) de la actividad locomotora del primer día en OO (ordenada) en función de la acrofase promedio de los primeros 7 días en LO (abscisa). Los rombos verdes indican las poblaciones sincronizadas al ciclo LO, mientras que los rombos azules indican las poblaciones enmascaradas. Para mayor claridad, las poblaciones sincronizadas están encerradas en elipses verdes.

La delección parcial que afecta al mutante *pdf-2* mostró un efecto sutil sobre la actividad locomotora de los nematodos bajo condiciones LO, diferente al exhibido por la cepa LSC27. Las poblaciones de estos mutantes presentan patrones de actividad que pueden ser observados en los actogramas, pero su actividad no se encuentra consolidada, lo cual se comprueba al observar que los periodogramas no muestran periodos significativos (periodograma representativo, figura 4.3.7B). Este tipo de comportamiento puede

considerarse un “rítmo débil” (*weakly rhythmic*). Este término fue acuñado para catalogar a moscas *Drosophila melanogaster* que exhibían inicios (*onsets*) y finales (*offsets*) de actividad fácilmente reconocibles en los actogramas, pero con una actividad poco consolidada, resultando en periodogramas que describen periodos no significativos o apenas significativos (Yang y Sehgal 2001).

Cepa doble mutante (pdf-1;pdf-2)

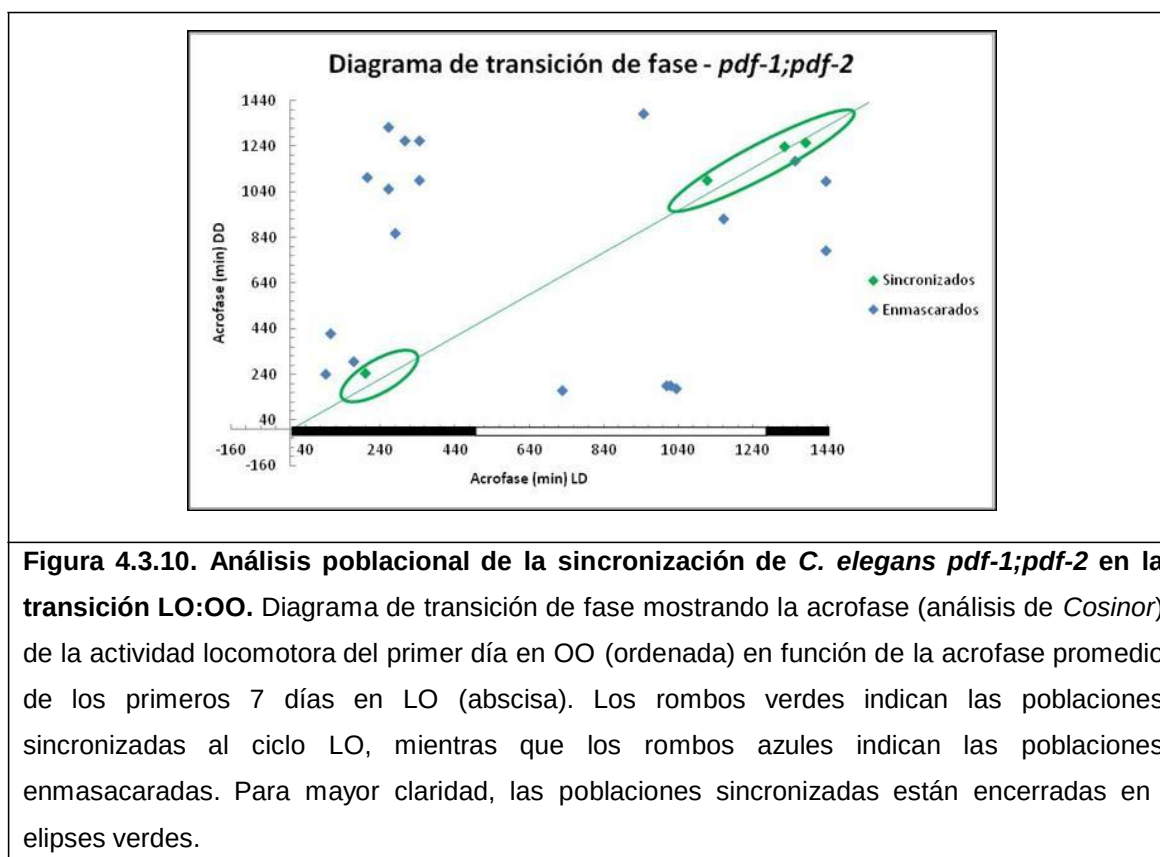
Para comprobar si los efectos observados en las cepas mutantes LSC27 y LSC40 podían sumarse, se trabajó con el doble mutante *pdf-1; pdf-2*. En este caso, las poblaciones sujetas a ciclos LO 12 h : 12 h exhibieron patrones de actividad de 24 horas con una acrofase preponderantemente nocturna (Figura 4.3.9), aunque no tan evidentes como los de la cepa salvaje (Figura 4.3.1). Esta cepa exhibió un periodo poblacional promedio en LO de 23,2h y, de 22,7h en OO.



El análisis del histograma de acrofases muestra una distribución de fases a lo largo del ciclo, con una tendencia de mayor actividad hacia la noche (Figura 4.3.9C). Sin embargo, esta tendencia no es significativa, tal como lo demuestra el test de estadística circular de Rayleigh (Figura 4.3.9D)

En el actograma (Figura 4.3.9A) puede visualizarse que la población se sincroniza a los ciclos de luz/oscuridad, aunque no de una forma tan robusta como la observada para la cepa N2 (Figura 4.3.1A), indicando un patrón de actividad no consolidado, que concuerda con la ausencia de un único periodo significativo observada en los periodogramas (periodograma representativo, Figura 4.3.9B).

Por otro lado, resulta interesante notar que el análisis de sincronización revela que un 9% del total de las poblaciones está realmente sincronizada, una proporción similar a la encontrada con la cepa salvaje N2. Tal como se puede observar en la figura 4.3.10, estas poblaciones sincronizadas se agruparon cerca de la línea de 45° al origen alrededor de (ZT4, CT4) y (ZT21, CT21), 240 y 1260 minutos, respectivamente.

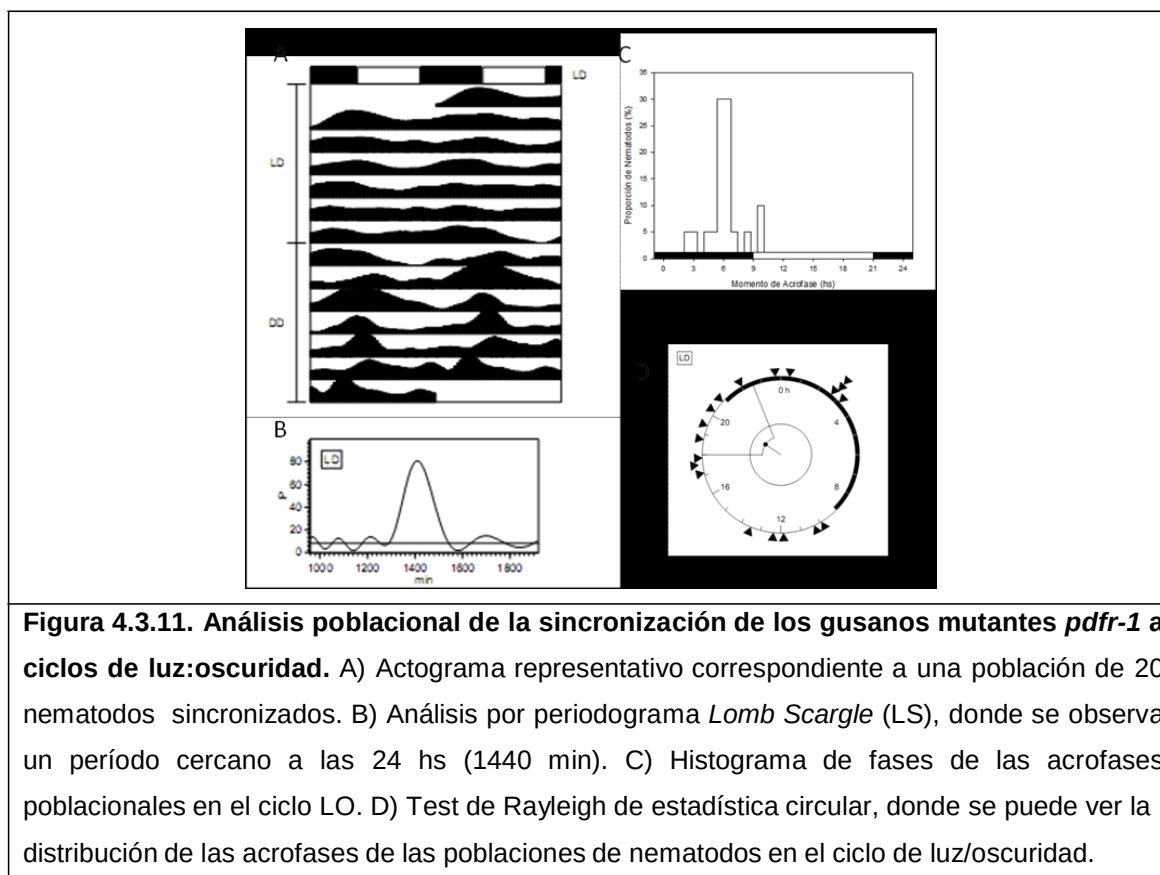


Los resultados para estos mutantes dobles nos muestran que, contrariamente a lo esperado, estas poblaciones no poseen alteraciones graves en los ritmos de actividad

locomotora, sino que exhiben lo que podría definirse con un ritmo débil. Esto resulta sorprendente ya que tomando en cuenta los efectos exhibidos por los mutantes *pdf-1*, que muestran ritmos de actividad locomotora notoriamente afectados, los resultados aquí obtenidos sugieren un efecto compensatorio en los dobles mutantes *pdf-1;pdf-2*.

Cepa LSC39 (mutante *pdfr-1*)

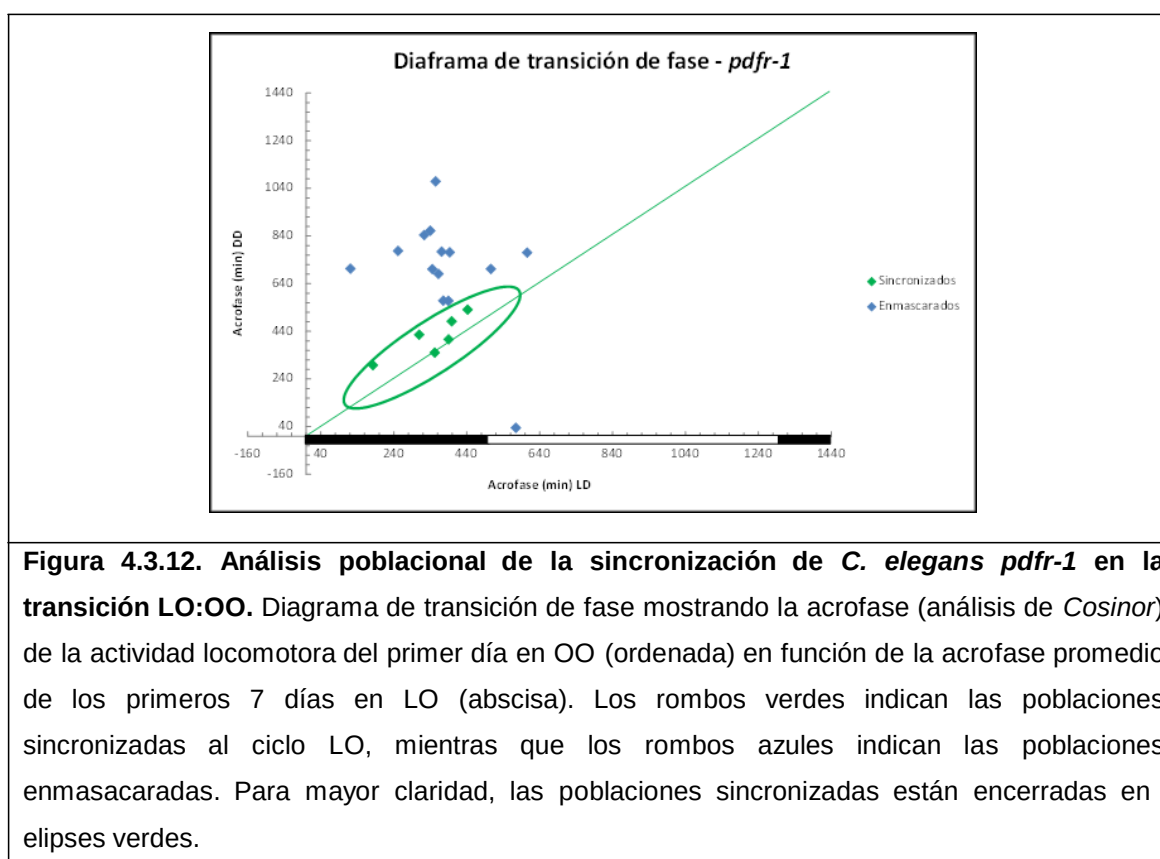
Habiendo observado los efectos causados por mutaciones en los dos genes que codifican para péptidos PDF en *C. elegans*, se estudiaron los efectos causados por una mutación en el gen codificante para el receptor, *pdfr-1*. En condiciones LO 12 h :12 h, se observó un patrón de actividad de 24 horas, con una acrofase hacia el final del periodo de oscuridad (Figura 4.3.11). Esta cepa exhibió un periodo poblacional promedio en LO de 23,4h y, de 22,9h en OO.



El análisis del histograma de acrofases reveló que el máximo de actividad se centró en el final de la noche (Figura 4.3.11C), exhibiendo un comportamiento completamente unimodal. Esta pérdida de uno de los componentes (o una de las subpoblaciones) del esquema

bimodal de distribución de acrofases, puede ser comparada con la pérdida del pico matutino de actividad (componente M) que ocurre en los mutantes nulos *pdf* y del receptor de PDF *Drosophila melanogaster* (Renn, et al. 1999; Hyun, et al. 2005; Lear, et al. 2005). En el actograma representativo (Figura 4.3.11A) se observa que la población de nematodos fue capaz de sincronizarse al esquema de luz:oscuridad, de una manera similar a la cepa salvaje (Figura 4.3.1A). Los periodogramas nos muestran que esta cepa exhibió un ritmo con un periodo cercano a las 24 horas (periodograma representativo, figura 4.3.11B).

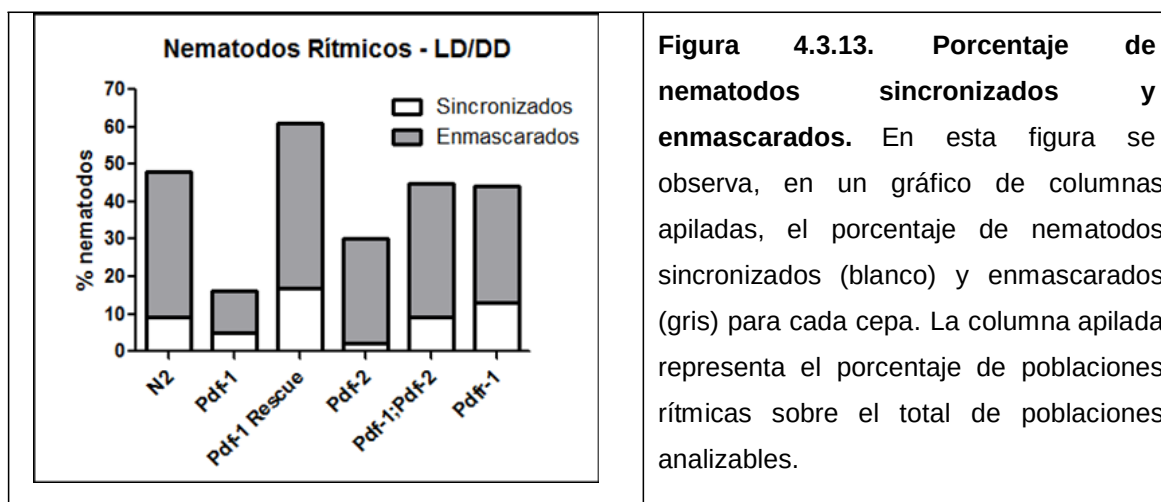
Los análisis de sincronización revelaron una capacidad de sincronización cercana a la de la cepa N2, con un 13% de las poblaciones agrupándose alrededor de la línea de 45° al origen, cerca de las coordenadas (ZT6, CT6), o 360 minutos. El resto de las poblaciones también exhibieron una acrofase LO cercana a ZT6, aunque sin embargo, al ser liberadas en condiciones de libre curso la acrofase fue diferente, lo cual indica que estaban enmascaradas (Figura 4.3.12).



Estos resultados sugieren que la mutación en el gen *pdf-1* no estaría afectando los ritmos de actividad locomotora para estos nematodos, pero sí la distribución de acrofases a nivel poblacional, ya que sólo retiene el componente nocturno y desaparece el componente

de la transición día-noche (comparar figuras 4.3.2 y 4.3.12).

Un resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de sincronización puede observarse en la figura 4.3.13. En cada ensayo se consideró como el 100% de las poblaciones a todas aquellas que pasaron el test de normalidad (*poblaciones analizables*). En base a este número de poblaciones se calculó el porcentaje de nematodos rítmicos (aquellos que se ajustaron al periodo impuesto por el *zeitgeber*) y de nematodos realmente sincronizados (aquellos que continuaban con la misma fase con que venían de LO, al ser liberados en condiciones constantes). De esta forma se encontró que las cepas mutantes *pdf-1* y *pdf-2* poseen un porcentaje de poblaciones rítmicas menor que la cepa N2 ($p < 0,0001$ y $p = 0,0140$, respectivamente; Test exacto de Fischer). Esto nos indica que su capacidad de entrenarse al ciclo LO 12 h : 12 h es significativamente menor al de la cepa salvaje. Por otro lado, las cepas del doble mutante *pdf-1*; *pdf-2* y *pdf-1* no mostraron diferencias significativas en su capacidad de entrenamiento con respecto a la cepa salvaje ($p = 0,6249$ y $p = 0,8688$, respectivamente; Test exacto de Fischer). En línea con lo observado en los ensayos, se encontró que la cepa *pdf-1 rescue* recupera su capacidad de entrenamiento e incluso supera levemente a la cepa salvaje ($p = 0,0421$; Test exacto de Fischer). A su vez, cómo era esperable, la cepa *pdf-1* tiene una menor capacidad de entrenamiento que el rescate ($p < 0,0001$; Test exacto de Fischer). Al analizar la capacidad de sincronización observamos que ninguna de las cepas es diferente significativamente de la cepa salvaje ($p > 0,05$; Test exacto de Fischer). Sin embargo, si se encuentra una diferencia significativa en la capacidad de sincronización de la cepa *pdf-1* comparada con su rescate ($p = 0,0368$; Test exacto de Fischer) (Tabla 4.3.1).



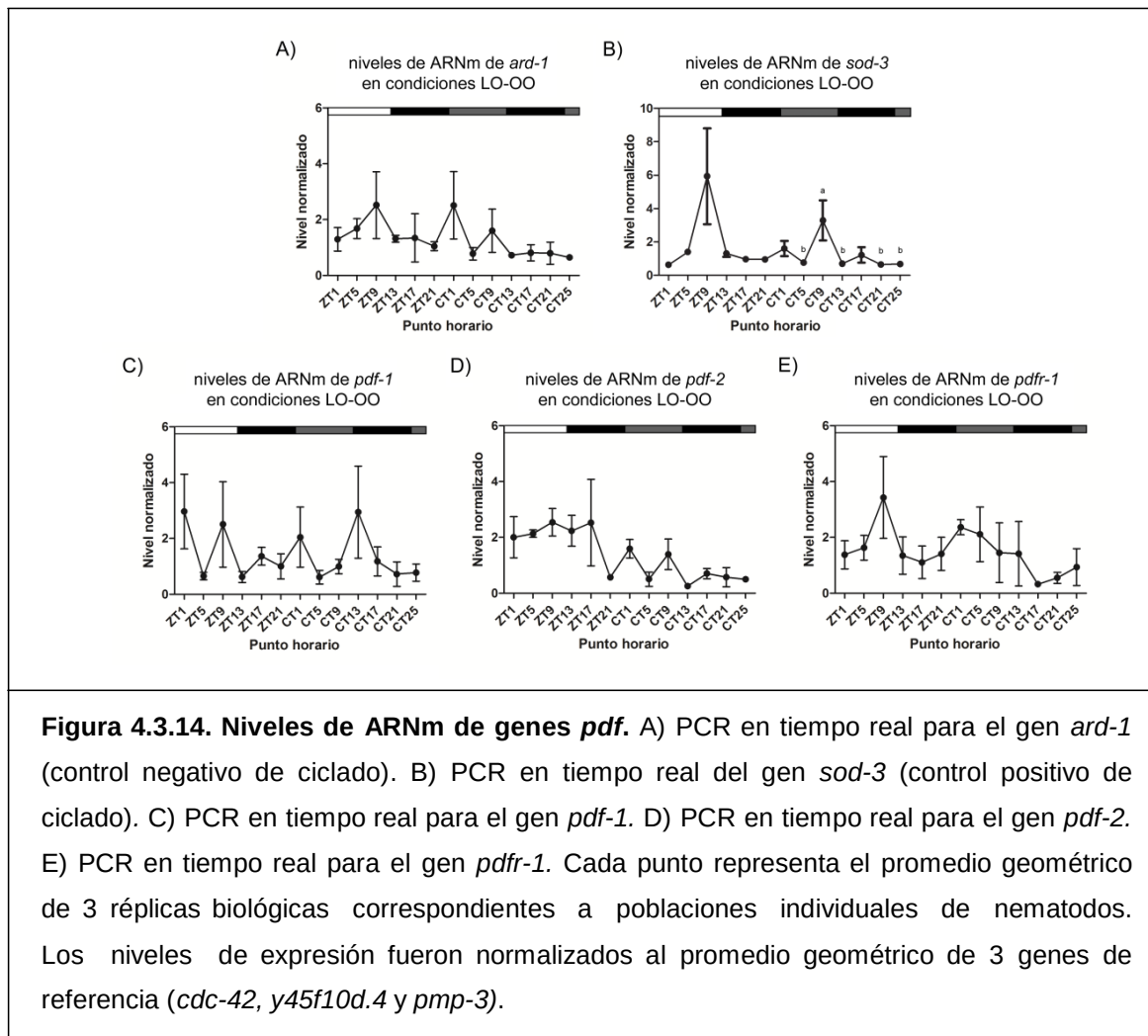
Cepa	Total de poblaciones analizables (100%)	Entrenados	Sincronizados	Período LO	Período OO
N2	200	47%	09%	23,6 h	23,7 h
<i>pdf-1</i>	75	16% * †	05% †	23,5 h	23,4 h
<i>pdf-1 rescue</i>	75	61% *	17%	23,6 h	23,6 h
<i>pdf-2</i>	65	29% *	02%	23,2 h	23,2 h
<i>pdf-1; pdf-2</i>	45	51%	09%	23,2 h	22,7 h
<i>pdfr-1</i>	45	44%	13%	23,4 h	22,9 h

Tabla 4.3.1. Poblaciones de nematodos entrenados y sincronizados a ciclos LO. En la tabla se observa el porcentaje de nematodos entrenados y sincronizados, y el periodo en LO y OO de cada una de las cepas analizadas. * $p < 0,05$ – Test exacto de Fischer de cada cepa comparada con la cepa N2; † $p < 0,05$ – Test exacto de Fischer de *pdf-1* comparado con *pdf-1 rescue*.

Análisis de la expresión de genes *pdf*

Una vez realizados los ensayos de comportamiento, se procedió a estudiar el patrón de expresión de los genes codificantes para los péptidos PDF y el receptor PDFR de *C. elegans*. Para esto se tomaron muestras de poblaciones de nematodos adultos (crecidos en ciclos LO y temperatura constante) cada 4 horas en 13 puntos horarios (1 día en LO seguido de 1 día en OO) de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos, se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de primer cadena y se realizaron estudios de PCR en tiempo real. El gen *sod-3*, fue utilizado como control positivo de ritmicidad, de acuerdo a lo estudiado en el capítulo 3.

Los niveles de ARNm de los genes *pdf* prácticamente no varían durante ciclos de luz:oscuridad seguidos por un período de *free running* en oscuridad constante (Figura 4.3.14). Los niveles de expresión de cada transcripto fueron analizados por ANOVA de una vía, seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey. En el caso de *ard-1*, un gen house keeping que no cicla (van der Linden, et al. 2010) utilizado como control, y de *pdfr-1*, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los puntos ($p > 0,05$; Test de comparaciones múltiples de Tukey; Figuras 4.3.14D y 4.3.14A). Además, el análisis por cosinor revela que los datos no se ajustan a una onda coseno con periodo de 24hs ($p > 0,05$). En el caso de *pdf-1* y *pdf-2* se encontraron variaciones significativas entre algunos puntos ($p > 0,05$; Test de comparaciones múltiples de Tukey; Figuras 4.3.14B y 4.3.14C). Sin embargo, dichas variaciones no se ajustan a un cosinor con un periodo de 24hs ($p > 0,05$), con lo cual podemos decir que estos genes no se expresan con un periodo 24 horas bajo ciclos de luz/oscuridad, lo que está en línea con lo descrito hasta ahora en *D. melanogaster* (Park y Hall 1998).



Discusión

Para tratar de entender parte del mecanismo por el cual se transducen y comunican dentro del organismo los ritmos que hemos estudiado en los 3 capítulos anteriores, en el presente capítulo se caracterizó la capacidad de sincronización a ciclos de luz:oscuridad 12 h : 12 h de diversas líneas mutantes para la producción del neuropéptido PDF. Este péptido está involucrado en la dispersión de ritmos en *Drosophila melanogaster* (Renn, et al. 1999; Hardin 2005; Peschel y Helfrich-Forster 2011) y la presencia de 2 genes homólogos en *C. elegans* nos llevó a preguntarnos si PDF también estaría involucrado en la generación de ritmos en este organismo. Para esto se eligió estudiar como salida a los ritmos de actividad locomotora debido a que podemos obtener una lectura continua de la actividad (Simonetta y Golombek 2007); esto nos brinda más información que un esquema discreto de tomas de muestras. Como los ritmos de actividad locomotora de *C. elegans*

muestran una gran variabilidad interindividuo, probablemente porque dicho parámetro no constituye una vía de salida robusta del reloj biológico en este organismo, los registros se llevaron a cabo con poblaciones de animales constituidas por 5-7 nematodos.

Los resultados encontrados para la cepa salvaje, N2 (Bristol) están de acuerdo con lo reportado hasta el momento (Simonetta, et al. 2009). Se observa un histograma de acrofases con una distribución que indica que la mayoría de las poblaciones tienen su máximo de actividad principalmente en 2 momentos del día, ya sea en la transición día-noche o en la mitad de la noche (Figura 4.3.1), lo cual también se ve reflejado en el análisis poblacional de la sincronización (Figura 4.3.2), que compara la fase de LO con la fase del primer día de OO. Este estudio nos permite identificar qué proporción de la población rítmica está realmente sincronizada y cuál no (efecto “*masking*” o enmascaramiento).

Los estudios realizados con la cepa mutante para *pdf-1* indican que al perder este péptido se alteran los histogramas de acrofases y las relaciones de fase LO-OO encontradas para N2. En este caso, hay una distribución de acrofases a lo largo de todo el ciclo, lo cual se evidencia claramente en el histograma de acrofases y el test de estadística circular de Rayleigh (Figura 4.3.3). Por otro lado, al rescatar la mutación en *pdf-1*, se observa un retorno a los parámetros encontrados en la cepa salvaje (Figura 4.3.5 y 4.3.6). La cepa rescate exhibe incluso un porcentaje significativamente mayor a la cepa salvaje en términos de poblaciones rítmicas (Tabla 4.3.1), lo cual puede ser producto de que las líneas generadas por la técnica de microinyección de DNA suelen tener múltiples copias del transgen de interés. Esto causa que la expresión del transgén sea diferente del de la cepa salvaje (Evans 2006). En el caso de las poblaciones mutantes para *pdf-2*, se observan alteraciones en la distribución de acrofases (Figura 4.3.7), aunque estas son menos marcadas que las observadas en los mutantes *pdf-1*. Resulta muy interesante notar que al estudiar el doble mutante *pdf-1; pdf-2*, los patrones resultantes son muy similares a la cepa salvaje, aunque menos marcadas (Figuras 4.3.9 y 4.3.10). Esto está en línea con lo reportado para los comportamientos de *velocidad de locomoción* y *número de reversiones* (Meelkop, et al. 2012). En este trabajo se demostró que las cepas mutantes de *pdf-1* y *pdf-1* poseían menor velocidad de locomoción que la cepa salvaje, pero que tanto el mutante *pdf-2*, como el doble mutante *pdf-1;pdf-2*, mostraban una velocidad similar a N2. Por su parte, *pdf-2* mostraba menos reversiones que N2 mientras que *pdf-1* y *pdf-1* exhibían más reversiones. Nuevamente el doble mutante *pdf-1;pdf-2* poseía un número de reversiones similar a la cepa salvaje. Estos resultados sugieren un rol antagónico para los péptidos PDF-1 y PDF-2 de acuerdo con lo propuesto en la literatura (Janssen, et al. 2008; Meelkop, et al. 2012).

Los mutantes para el receptor de PDF, *pdf-1*, exhiben actogramas similares a la cepa salvaje, aunque al examinar el histograma de acrofases se observa un pico durante la

mitad de la noche, desapareciendo las poblaciones que poseían un máximo de actividad en la transición día-noche (Figuras 4.3.11 y 4.3.12). Existe un paralelismo notorio con lo que ocurre en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ya que mutantes del receptor de PDF también son afectados de manera similar, aunque en términos individuales y no poblacionales. En condiciones normales de laboratorio, la mosca de la fruta presenta 2 componentes muy marcados en su actividad locomotora: un componente matutino ("M", del inglés *morning*) y un componente al atardecer ("E", del inglés *evening*). Sin embargo, mutantes de receptor o mutantes nulos de PDF pierden completamente el componente M de actividad, pasando a tener una actividad unimodal en lugar de bimodal (Renn, et al. 1999; Hyun, et al. 2005; Lear, et al. 2005). Poblacionalmente hablando, los nematodos mutantes para el receptor de PDF pierden uno de sus componentes en el histograma de acrofases, reteniendo el componente nocturno. Esto resulta evidente al comparar las figuras 4.3.2 (diagrama de transición de fase de la cepa salvaje N2) y 4.3.12 (diagrama de transición de fase de la cepa mutante *pdf-1*).

Al comparar el porcentaje de nematodos rítmicos (Figura 4.3.13) podemos observar que tanto la cepa mutante para *pdf-1* como la cepa mutante para *pdf-2* presentan una disminución en la habilidad de "ver" el ciclo de luz:oscuridad. Resulta interesante que al rescatar la mutación *pdf-1*, los valores vuelven a ser similares al de la cepa control. Las cepas mutantes para *pdf-1* y la doble mutante *pdf-1; pdf-2* no se diferencian de la cepa salvaje. Si dentro de las poblaciones rítmicas consideramos la proporción de nematodos realmente sincronizados y la proporción de nematodos que sufren de enmascaramiento, nuevamente observamos que en los mutantes de *pdf-1* y *pdf-2* disminuye la capacidad de sincronización al ciclo impuesto y la mayoría de los nematodos rítmicos *pdf-2* están sufriendo enmascaramiento. Esto indica que probablemente estos nematodos tengan algún problema para transducir correctamente la señal de la luz, ya sea a la entrada o a la salida del sistema circadiano.

Se sabe que en *D. melanogaster* PDF es requerido para mantener los ritmos de actividad bajo condiciones constantes (Renn, et al. 1999) mientras que sincroniza la fase y la amplitud de células osciladoras individuales (Peng, et al. 2003; Lin, et al. 2004; Peschel y Helfrich-Forster 2011). *D. melanogaster* tiene una actividad rítmica bimodal con picos en la mañana y en la transición tarde-noche. Las moscas mutantes para *pdf* mantienen su ritmicidad en condiciones LD, aunque pierden su anticipación por la mañana y muestran un adelanto de 2 horas en su máximo de actividad en la transición tarde-noche. Luego de tres días en condiciones de oscuridad constante, los mutantes de *pdf* pierden su ritmicidad; lo que refleja la pérdida gradual de la sincronización por PDF (Renn, et al. 1999; Peschel y Helfrich-Forster 2011). Esto mismo parece suceder con los mutantes *pdf-1*, tal como se observa en el actograma representativo de la figura 4.3.3A. Los mutantes de *C. elegans* para *pdf-1* rápidamente pierden la ritmicidad en condiciones

de oscuridad constante. Además, en el caso de *C. elegans*, PDF parece estar involucrado en la capacidad de entrenamiento del reloj frente a ciclos de luz:oscuridad, no afectando significativamente el porcentaje de nematodos realmente sincronizados.

Utilizando 3 genes de referencia que no ciclan (van der Linden, et al. 2010) se determinó que tanto *pdf-1*, *pdf-2* y el receptor *pdf-1* no ciclan en *C. elegans*, bajos ciclos LO 12 h: 12 h. Esto revela otro paralelismo con lo evidenciado en *D. melanogaster* (Park y Hall 1998). Varios estudios mostraron un ciclo diario en la inmunorreactividad de PDF, pero solo dentro de las terminales de axones que se proyectan desde las neuronas ventrolaterales pequeñas (s-LNvs) (Park, et al. 2000; Wu, et al. 2008). *Gryllus bimaculatus* y *D. melanogaster* muestran un ritmo diario en la liberación de PDF (Park, et al. 2000; Abdelsalam, et al. 2008; Wu, et al. 2008), mientras que otros insectos como *Apis mellifera* no lo hacen (Bloch, et al. 2003). Todavía debe ser determinado si este es también el caso en *C. elegans*.

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten concluir que el rol de PDF en el mecanismo de generación de ritmos circadianos se encuentra conservada a lo largo de la evolución, desde crustáceos hasta insectos incluyendo, también, a *C. elegans*. En este nematodo, PDF-1 está involucrado en la generación de ritmos y en la sincronización frente a ciclos de luz:oscuridad, perdiéndose los ritmos rápidamente en condiciones de oscuridad constante. Por otro lado, el receptor PDFR también juega un rol importante, al menos en cuanto a la distribución de acrofases a nivel poblacional, ya que mutantes que afectan las 3 variantes de este receptor no poseen el componente de acrofases de la transición día-noche, pero sí el componente nocturno. En este sentido el sistema PDF de *C. elegans* tiene varias similitudes con sistema descrito en *Drosophila melanogaster* y cumple un rol esencial en la adaptación de *C. elegans* al medio ambiente que lo rodea, permitiendo que este organismo sea capaz de predecir adecuadamente los cambios diarios que se suceden en la naturaleza, no sólo en términos de los agentes estresantes que pudiera encontrar sino de todas las variables ambientales en general.

Conclusión general

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 (Dunlap, et al. 2004; Edgar, et al. 2012). 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 está 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 (Engelmann 1988; Pittendrigh 1993; Dunlap, et al. 2004).

La importancia adaptativa de poseer un reloj biológico ha sido estudiada en diferentes organismos modelos, tales como *Drosophila melanogaster*, *Neurospora crassa* y *Mus musculus* (Dunlap, et al. 2004; Hardin 2011; Lakin-Thomas, et al. 2011; Pegoraro y Tauber 2011; Ripperger, et al. 2011). 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 ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans* en términos eco-fisiológicos, buscando encontrar variaciones en la tolerancia a los diferentes tipos de estrés, abióticos y bióticos, que este nematodo puede encontrar en el medioambiente que habita, así como también empezar a entender cómo es que estos ritmos son generados en estos animales y entrenados por el ciclo luz:oscuridad dictado por la sucesión de los días y las noches.

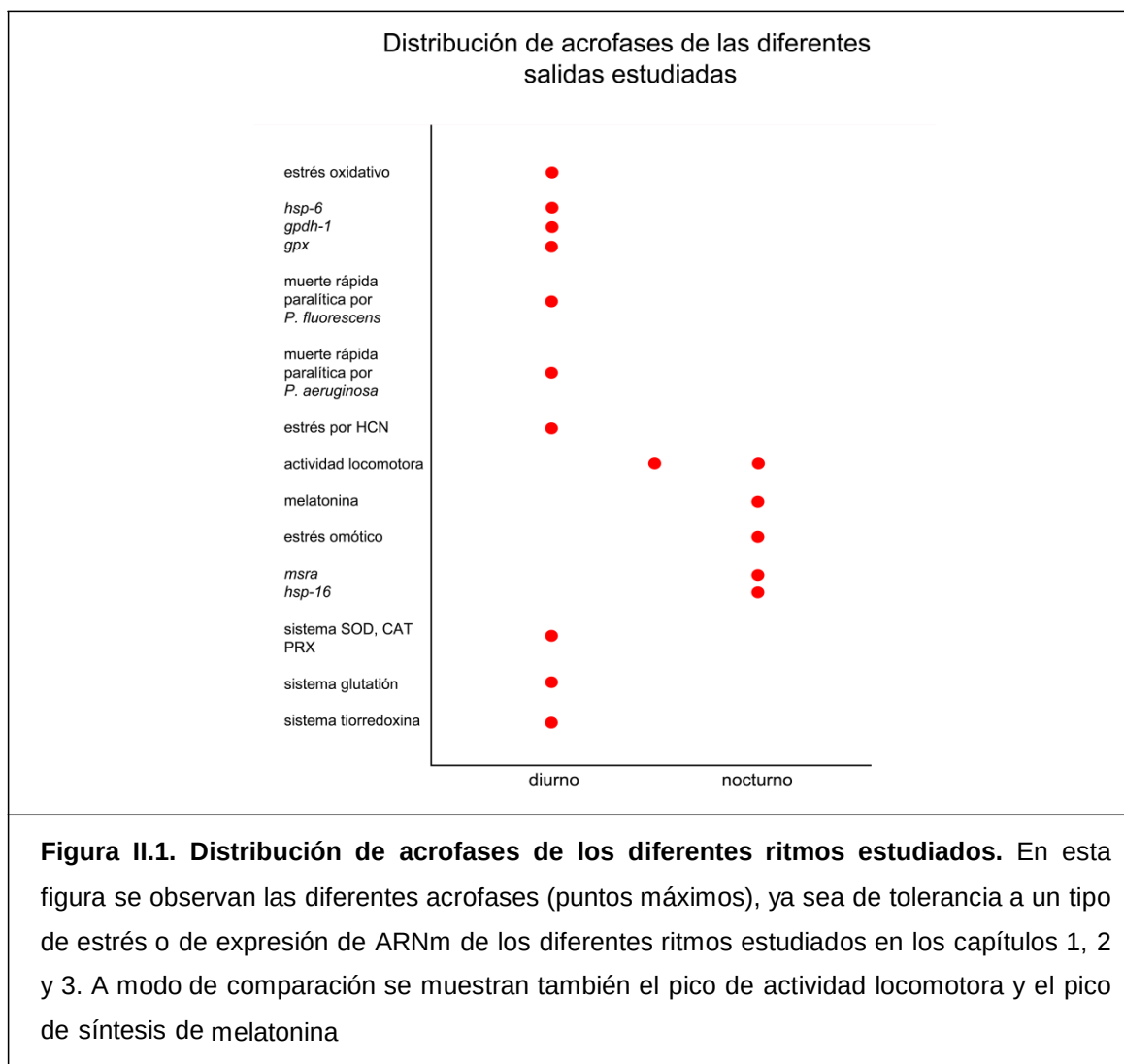
El Capítulo 1 del presente trabajo de tesis tuvo como objetivo general hacer una caracterización inicial de los ritmos circadianos de tolerancia a variables abióticas del medio ambiente en nuestro modelo de estudio, para verificar la existencia de los mismos en algún comportamiento clásico. Como se mencionó 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. No es lo mismo, energéticamente hablando, para un organismo gastar recursos en estar siempre con un sistema de defensa exacerbado que sólo emplearlo en los momentos necesarios. Con bases en esta premisa, en el Capítulo 1 se midieron las tolerancias a diversos tipos de estrés abiótico en *C. elegans* a través del día. Los resultados presentados muestran la presencia de ritmos diarios y circadianos en la tolerancia a estrés oxidativo y estrés osmótico. La tolerancia al estrés oxidativo es máxima durante el día, tal como uno esperaría debido a la generación de especies reactivas del oxígeno por la luz UV. Por otro lado, la tolerancia al estrés osmótico es mayor durante la noche. Esto puede deberse a que la luz solar que incide sobre la tierra, lentamente va elevando su temperatura¹ y, a su vez, disminuyendo la humedad. Menor humedad se traduce en mayor concentración de osmolitos, lo cual puede explicar por qué los nematodos necesitarían protegerse durante la noche de la desecación / estrés osmótico. Resulta interesante notar que estos 2 ritmos están en antifase. Esto sugiere la existencia de mecanismos de regulación diferentes. En este sentido, se han aportado datos sobre la existencia de genes relacionados con la respuesta a estrés 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 y cuáles son los mecanismos empleados por el reloj para modificar su expresión de acuerdo al momento del día en los que sean necesarios, ya sea regulándolos a nivel transcripcional, traduccional o postraduccional.

Luego, el capítulo 2 continúa explorando la respuesta frente a otros tipos de estrés a los que pueden estar sometidos los nematodos en sus condiciones de vida libre, estrés de tipo biológico. En este caso, se estudiaron y caracterizaron las interacciones de *C. elegans* con *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*, una bacteria que suele hallarse cohabitando con *C. elegans* en su ambiente natural. Se observaron respuestas de muerte lenta (varios días) y muerte rápida (4 h) y se descubrió que la tolerancia frente a la muerte rápida mediada por *Pseudomonas* variaba según el momento del día, siendo mayor durante la noche (ZT12). Además, se encontró que el principal agente causal de la muerte rápida parálitica era el HCN, un metabolito secundario producido por *P. fluorescens*. Resulta interesante notar que la tolerancia a este agente abiótico también mostró una tasa de muerte mayor a la noche (ZT12) que durante el día (ZT0). Siendo el sistema inmune de *C. elegans* muy primitivo (carece de sistema inmune adaptativo), se ha postulado que la respuesta a estrés biótico en *C. elegans* parece estar mediada en realidad por una respuesta a los diferentes tipos de estrés abiótico que son generados por la interacción con diferentes patógenos (Darby 2005; Ewbank 2006). No es posible descartar que estas bacterias posean ritmos de crecimiento o de producción de metabolitos secundarios, aunque en las condiciones de los ensayos de este trabajo no necesariamente expresarían ritmos coherentes a nivel poblacional o colonial (dado que los ritmos individuales podrían estar desfasados entre sí). Sin embargo, además de la sincronización al medio ambiente, debemos tomar en cuenta que estas bacterias pueden poseer una sincronización social debida a *quorum sensing* (disparada, por ejemplo, por densidad poblacional) u otros mecanismos de señalización (Coggan y Wolfgang 2012; Jimenez, et al. 2012). Si bien es más intuitivo pensar en la aparición de ritmos por coevolución con un estrés abiótico del ambiente, es posible que la exposición periódica a la producción rítmica de exoproductos por parte de las bacterias del suelo haya mediado la aparición de los ritmos de tolerancia a estrés biótico.

En el Capítulo 3 de este trabajo de tesis se realizó una completa descripción de los niveles de expresión de genes relacionados a la regulación redox intracelular y también sobre la actividad de la enzima catalasa en diferentes momentos del día en condiciones LO-OO. Se presume que la aparición de organismos fotosintéticos, medio la aparición de un primitivo reloj redox que le otorgaba a los organismos aeróbicos la capacidad de predecir los cambios diarios en la producción / consumo de oxígeno, como así también en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Loudon 2012).

Estas ROS son los principales causantes del estrés oxidativo y son capaces de alterar el estado redox (Hardeland, et al. 2003). En este sentido, se esperaba que *C. elegans*, así como muchos otros organismos estudiados (Hardeland, et al. 2003; Krishnan, et al. 2008; Yoshida, et al. 2011; Belozerskaya, et al. 2012; Edgar, et al. 2012), poseyeran mecanismos de protección adecuados para evitar cambios drásticos en su balance redox. Los estudios de actividad catalasa mostraron que la actividad es máxima durante el día, lo cual está línea con lo observado para la tolerancia a estrés oxidativo en el capítulo 1 y con el hecho de que la generación de ROS por UV es mayor durante la fase lumínica. Además, en términos de expresión de genes de cada uno de los 3 sistemas de protección descritos, se encontró que básicamente había tres patrones distintivos de expresión. El primero mostraba un patrón manejado por los ciclos de LO donde los ritmos desaparecen al pasar a condiciones constantes, como es el caso de *gpx*, *gst-36*, *trxr-1* y *prdx-2*. El segundo patrón se caracteriza por no ser significativamente rítmicos, como el exhibido por *ctl-1* y *ctl-3* (pese a que en ambos casos se observó una clara tendencia enmascarada por la amplia variabilidad encontrada en los datos). Por otro lado, *sod-3*, *gsr-1* y *trxr-2* ciclan en LO y continúan ciclando aún en condiciones OO, siendo verdaderos transcritos circadianos. Estos resultados se condicen con la necesidad de poder regular mejor el balance redox durante el día, debido a la mayor generación de ROS. Teniendo en cuenta que existe una interrelación entre ritmos y estado redox en otras especies, los resultados obtenidos estarían indicando que el balance estado redox intracelular, como así también la señalización redox mediada por H₂O₂ podría estar moduladas circadianamente. Se sabe que en los peces cebra, *Danio rerio*, el peróxido de hidrógeno funciona como un segundo mensajero transduciendo la señal de la luz (Hirayama, et al. 2007). Es probable que, quizás este sea el caso también en *C. elegans*.



En la figura II.1 podemos encontrar un resumen de las acrofases de los ritmos de tolerancia a estrés oxidativo, estrés osmótico, tolerancia a muerte rápida paralítica mediada por *Pseudomonas* y de cada sistema de regulación del balance redox. Este gráfico nos informa que la mayoría de los sistemas de protección contra el estrés oxidativo y de mantenimiento del balance redox poseen un máximo durante el día.

Esto puede deberse al aumento de ROS debidos a la luz UV ambiental, pero también a la acumulación de ROS debidas al metabolismo. Trabajos previos del laboratorio han demostrado que los nematodos tienen un pico de consumo de oxígeno en medio de la noche, que correlaciona con los máximos de actividad locomotora (Migliori, et al. 2011b). El mayor consumo de oxígeno se traduce en una acumulación de radicales libres, que luego deben ser detoxificados a lo largo del día. Por otro lado, la tolerancia al estrés osmótico es máxima al anochecer, cuando la humedad del ambiente es menor debido al aumento gradual de la temperatura a lo largo del día. La síntesis de melatonina también tiene su máximo en la mitad de la noche (Migliori, et al. 2011a), justo luego de las

acrofases de actividad locomotora de ambas subpoblaciones. Pensando en su rol dual, como molécula señalizadora de la noche y como *scavenger* de radicales libres es lógico que este pico de síntesis sea nocturno, ya que estaría indicando la noche por su momento de acrofase y además estaría ayudando a detoxificar los ROS provenientes del metabolismo, antecediendo a la línea de defensa montada por los sistemas GSH, TRX y SOD-CAT/PRX que tienen su máximo durante el día.

Para que todos estos ritmos estén concertados en *C. elegans* debe existir alguna o algunas moléculas capaces de mediar en la sincronización a señales del medio ambiente y a la dispersión de los ritmos al resto del organismo. 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 también mediante la producción rítmica de señales humorales; en otros grupos, como insectos, uno de los actores principales en este sentido es el péptido PDF, cuyas concentraciones fisiológicas varían en la mayoría de las especies de artrópodos estudiados hasta el momento. En el Capítulo 4 del presente trabajo se mostró que la deficiencia en la producción de los péptidos PDF1 y PDF2 afecta la sincronización de los nematodos *C. elegans* frente a ciclos de luz:oscuridad 12 h : 12 h. Tanto la disrupción de *pdf-1* como de *pdf-2* disminuye significativamente la proporción de nematodos rítmicos. Sin embargo, un doble mutante se asemeja a la cepa salvaje, indicando, en concordancia con estudios previos (Janssen, et al. 2009; Janssen, et al. 2010; Meelkop, et al. 2012) en que ambos péptidos parecen tener un rol antagónico. Además, una mutación en el receptor *pdfR-1* causa la pérdida de la bimodalidad en la distribución de acrofases poblacionales, reteniendo el componente nocturno. Esto guarda cierta similitud con lo que ocurre con poblaciones mutantes del receptor de PDF en *Drosophila melanogaster*. Estos animales, que naturalmente exhiben una actividad locomotora bimodal, con un pico en la mañana (componente M) y un pico nocturno (pico E), pierden completamente el componente matutino de actividad (Renn, et al. 1999; Hyun, et al. 2005; Lear, et al. 2005). En el caso de *C. elegans* no se pierde un componente de actividad de un individuo, sino una subpoblación entera (Figuras 4.3.11 y 4.3.12) en la distribución de fases de la población general. Resta por analizar en detalle las características de estas dos subpoblaciones, que podrían responder a la variabilidad fenotípica natural que hemos hallado en la cronobiología de *C. elegans*.

Si PDF efectivamente posee un rol similar al que cumple en insectos, entonces en *C. elegans* PDF posiblemente: (1) funcione como una señal de salida del reloj circadiano; (2) coordine y sincronice las oscilaciones de las neuronas reloj, cuando señales ambientales (como el ciclo LO) estén ausentes, funcionando como un *zeitgeber* interno; (3) sincronice las fases de las neuronas reloj y los picos de actividad al momento justo del día, bajo condiciones LO; y/o (4) funcione como una señal fótica del reloj.

En resumen, este trabajo de tesis presenta una caracterización de los ritmos circadianos en *C. elegans* en la tolerancia frente a estrés biótico y abiótico, que pueden ser correlacionados con el nicho ecológico de los nematodos, como así también de los mecanismos que regulan el balance redox interno. Estos mecanismos les confieren a los nematodos una clara ventaja adaptativa en términos de poder afrontar cambios en variables ambientales. Por otro lado, también se encontró un rol para el neuropéptido PDF en la sincronización a los ciclos de luz:oscuridad y en la comunicación de los ritmos al resto del organismo (Figura II.2). Estos estudios nos ayudan a entender un poco mejor cómo es que los relojes circadianos nos permiten adaptarnos al medioambiente que nos rodea. El empleo de diversos organismos modelo y la comparación de las soluciones de cada organismo para poder realizar estas predicciones nos permiten tener una visión amplia de la evolución del reloj circadiano.

En el año 1984 Sidney Brenner tuvo la visión de proponer a *C. elegans* como un organismo modelo para las neurociencias, sentando así las bases de lo que luego se transformaría en una fuente inagotable de nuevos conocimientos. *C. elegans* es, sin duda alguna, un modelo que presenta gran versatilidad, una facilidad de cultivo casi incomparable con otros organismos de laboratorio, posee un genoma totalmente secuenciado, y sobre todo, un sistema nervioso sumamente simple que pudo ser completamente mapeado, al punto de llegar a conocer exactamente la posición y las conexiones de cada neurona individualmente. No existe ningún otro organismo vivo del cual tengamos tanta información de su sistema nervioso y un acceso a tantas herramientas genéticas que permitan manipular muchas de sus variables fisiológicas con tanta facilidad. Sin embargo, en cronobiología ya existían desde hace tiempo dos organismos modelo sumamente establecidos y robustos para responder la mayoría de las preguntas que surgían, *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus*. Por ello, la introducción de este nematodo como organismo para esta rama de las neurociencias tuvo en sus inicios dos grandes barreras a superar, en primer lugar la propia aceptación que conlleva a la instalación de un sistema nuevo, que nadie conocía cómo estudiar y, en segundo lugar, el desconocimiento total de cualquier base cronobiológica o indicio de algún reloj. De hecho, los primeros científicos en estudiarlos tuvieron que enfrentarse a diversas dificultades técnicas y muchos fallaron en encontrar algún indicio de ritmos circadianos en *C. elegans*. Fue recién hace unos 10 años que aparecieron las primeras investigaciones que demostraban fehacientemente la existencia de variables fisiológicas que parecían ajustarse a períodos cercanos a las 24 horas. Desde ese momento *C. elegans* se viene afianzando de a poco como un nuevo organismo modelo para cronobiología, y numerosas publicaciones apoyan esta idea.

Sin embargo, no podemos dejar de remarcar que el hecho de ser un organismo simple no necesariamente debe significar que debamos subestimarlos y creer que podemos

extrapolar todo lo que sabemos de otros modelos ya establecidos para comprender su propio reloj. Por el contrario, la historia misma nos muestra lo importante que es tratar de comprender a cada organismo desde su ambiente natural y su forma de vida, y sin duda debemos seguir aprendiendo a emplear herramientas alternativas y modelos de sincronización que se ajusten más a su nicho ecológico (y, en este caso en particular, a la naturaleza del suelo) para poder explotarlo al máximo y sacar provecho de las ventajas que nos ofrece.

Esta tesis resume en cierta medida el esfuerzo de recolectar durante mucho tiempo gran cantidad de resultados comportamentales y de variables fisiológicas que nos permiten asegurar que *C. elegans* tiene un reloj circadiano. Al mismo tiempo, nuestros resultados pueden sentar las bases de nuevos estudios a nivel molecular y neuronal que permitan vincular la gran cantidad de datos comportamentales con vías de señalización, genes y circuitos neuronales que, eventualmente, lleven a elucidar los mecanismos básicos que expliquen el funcionamiento del reloj de este nematodo.

En definitiva, se propone a *C. elegans* como organismo modelo, no para reemplazar a modelos ya existentes sino para enriquecer el estudio de la cronobiología en otros organismos y para comprender de una manera paralela (y desde la visión de un organismo que proviene de un ambiente muy disímil a lo ya conocido) cómo funcionan los relojes biológicos, cómo han ido evolucionando y por qué no, cómo podemos entender nuestro reloj humano desde un enfoque "ascendente", en el que los sistemas rudimentarios nos ayuden a entender y pensar sistemas más complejos. Asimismo, se propone a *C. elegans* como organismo modelo, para aprender a pensar en la cronobiología de una manera más inclusiva, como una ciencia que intenta comprender cómo el reloj ayuda a cada organismo - en su ambiente particular y con su nivel de complejidad - a adaptarse al medio que lo rodea, para defenderse ante situaciones adversas y eventuales competidores y a adaptarse a cambios en su entorno que puedan afectar sus variables fisiológicas. La figura II.2 resume el modelo del sistema cronobiológico de este nematodo en el marco de esta tesis doctoral, un modelo que puede extrapolarse a otros organismos teniendo en cuenta sus características particulares. Independientemente del nicho del cual provengan, todos los organismos comparten un componente circadiano por el simple hecho de haber evolucionado bajo presiones de selección en este mismo planeta, que gira sobre su eje con un período cercano a las 24 horas. Un reloj dentro de otro reloj.

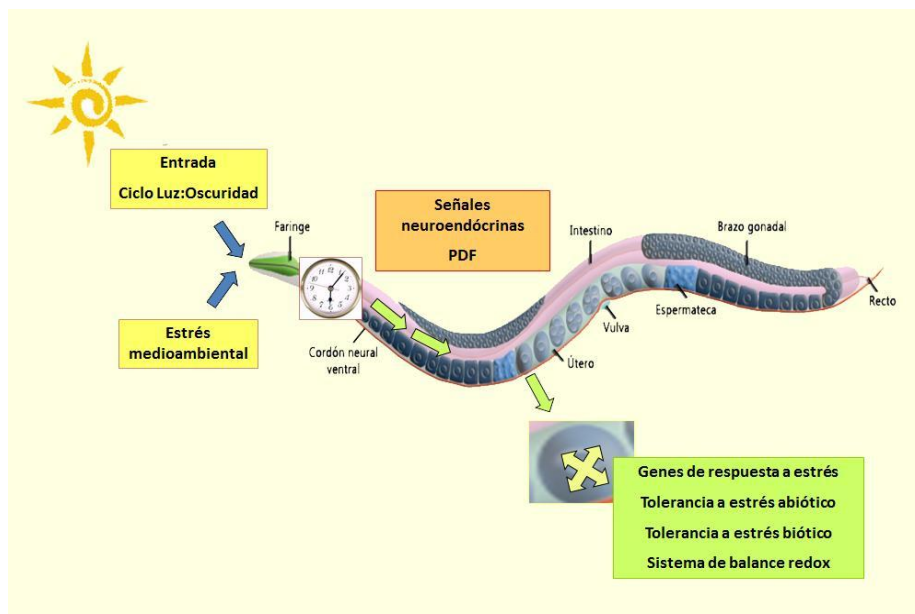


Figura II.2. Esquema del sistema circadiano de *C. elegans*. En su hábitat este nematodo debe ser capaz de predecir cambios en el ambiente que pueden ser nocivos para él. Para esto debe ser capaz de tomar información del ambiente para poder poner en hora su reloj interno y luego, este reloj debe poder transmitir órdenes temporales al resto del organismo.

ANEXO

Estudios bioinformáticos

Introducción

A lo largo de los 4 capítulos de esta tesis se describieron comportamientos de *C. elegans* que le permiten adaptarse a los cambios en variables abióticas y bióticas de un medio ambiente cíclico y, también se estudio el rol del péptido PDF en la sincronización a ciclos LO y dispersión de los ritmos al resto del organismo. Sin embargo, poco y nada se sabe acerca de cuál es el mecanismo molecular del reloj central que gobierna los comportamientos circadianos de este organismo modelo. Los primeros estudios de los mecanismos moleculares de cómo los organismos podrían anticipar cambios periódicos en el medio ambiente fueron realizados en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Hardin et al. (1990) propusieron un mecanismo de retroalimentación entre ARNm y proteínas, basándose en la observación de que la oscilación en los niveles de ARNm y proteínas del gen *period* eran necesarios para mantener la ritmicidad y, además, se influenciaban el uno al otro (Hardin, et al. 1990). Sin embargo, no se sabía si este era un efecto directo de las proteínas sobre el ARNm o uno indirecto a través de otros comportamientos o señales bioquímicas. Esto, fue luego contestado con estudios en el hongo *Neurospora crassa*, en los que se demostró que la proteína FREQUENCY (FRQ) regulaba su propia transcripción, a través de un lazo de retroalimentación negativa (Aronson, et al. 1994). Hoy en día, este principio de un lazo transcripcional-traducciona de retroalimentación es considerado el bloque universal de los relojes circadianos y ha sido identificado en todos los organismos modelo estudiados hasta la fecha (Brown, et al. 2012).

En mamíferos, los principales componentes del reloj son CLOCK, BMAL, PER y CRY. Durante el día, un heterodímero de CLOCK:BMAL activa la transcripción de los genes *per* y *cry*. Una vez traducidos, se forman los dímeros PER:PER y PER:CRY, que se traslocan al núcleo al anochecer. Estos dímeros interfieren con la acción de CLOCK:BMAL y reprimen la transcripción de los genes *per* y *cry*. A su vez, cuando el dímero PER-CRY es degradado, CLOCK:BMAL puede nuevamente inducir la transcripción de PER y CRY cerrando el lazo. Diversos eventos postranscripcionales ajustan finamente la maquinaria circadiana molecular. Por ejemplo, CK1ε también regula al reloj cumpliendo tres roles: 1) marcando a los monómeros de PER para su degradación; 2) ayudando a traslocar a los dímeros PER:PER y PER:CRY al núcleo; y 3) está involucrado en la degradación de esos dímeros una vez que han cumplido su rol represor (Ko y Takahashi 2006) (Figura A.1.1D).

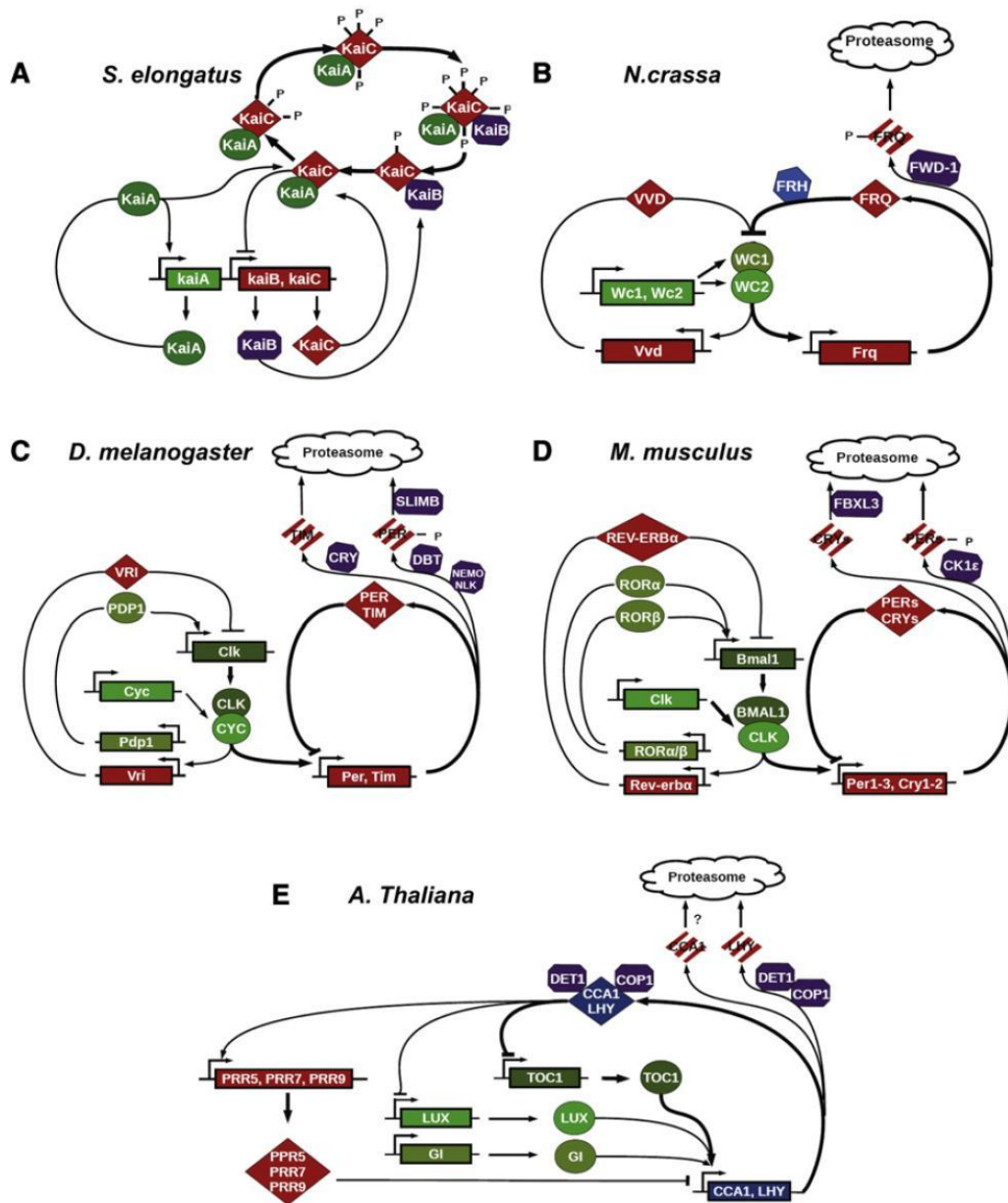


Figura A.1.1. Reloj molecular de diversos organismos. A) *Synechococcus elongatus*; B) *Neurospora crassa*; C) *Drosophila melanogaster*; D) *Mus musculus*; E) *Arabidopsis thaliana*. En todos los casos se observa un lazo principal reforzado por lazos paralelos. Podemos observar a los activadores en verde y a los represores en rojo. En las cianobacterias, el lazo principal es un mecanismo de retroalimentación postraduccional basado en ciclos de fosforilación. En el caso de los 4 eucariotas, el mecanismo principal es un lazo de retroalimentación transcripcional traduccional (adaptado de Brown et al, 2012)

En el caso de *Drosophila*, el proceso es muy similar, pero con leves diferencias. El

dímero que activa la transcripción de *per* es CLOCK:CYCLE. En lugar de activar a CRY, activa a TIMELESS (TIM) y, luego los dímeros TIM:PER se acumulan en el citoplasma para luego entrar al núcleo e interferir con la acción de CLOCK:CYCLE y, por ende, con la transcripción de *per* y *tim*.

El homólogo de CK1ε en las moscas, DOUBLETIME, es el encargado de marcar a los monómeros de PER en el citoplasma. Cuando llega la mañana, CRY es activado e induce la degradación de TIMELESS en los dímeros PER:TIM, mientras que DBT induce la degradación de PER (Claridge-Chang, et al. 2001) (Figura A.1.1C).

En *Neurospora crassa*, la transcripción del gen *frq* es inducida por el complejo WHITE COLLAR (WC), compuesto por las proteínas WC1 y WC2. Luego, la proteína FRQ interactúa con una RNA helicasa, FRH, y este complejo reprime la transcripción de FRQ. El fotorreceptor VIVID actúa de manera similar a la proteína CRY de *Drosophila* para promover la degradación de la proteína CLOCK y modular la transcripción, pero esta vez interactúa con el elemento negativo FRQ:FRH y con el elemento positivo, el complejo WC. Aunque las proteínas del reloj de *Neurospora* no están directamente conservadas en *Drosophila* y mamíferos, comparten homología con ciertos dominios, como el dominio PAS (Per-Arnt-Sim) encontrado en PER, CLOCK, WC1-2 y VIVID. Lo importante es que, más allá de que cambien los actores, el lazo de retroalimentación transcripcional-traducciona central es muy similar (Baker, et al. 2012) (Figura A.1.1B). Un lazo similar también puede ser encontrado en plantas, donde el elemento positivo TOC1 es reprimido por los elementos negativos LHY y CCA1 (McWatters y Devlin 2011) (Figura A.1.1E). De hecho, el mismo tipo de mecanismo se encuentra incluso conservado en la cianobacteria *Synechococcus aureus*, en la cual la proteína KAI-A activa la transcripción del operón *KaiBC*, y el producto KAI-C lo reprime (Figura A.1.1A) (Ishiura, et al. 1998).

El mecanismo del reloj de *C. elegans* aún no ha sido dilucidado. Sin embargo, un análisis a nivel de genoma completo de transcriptos en nematodos *Caenorhabditis elegans* N2 entrenados a ciclos de LO y Tt ha mostrado recientemente que varios genes son expresados de manera circadiana en *C. elegans*. Los conjuntos de datos describen que 1817 transcriptos son manejados por Tt; 775 son manejados por LO; 286 son entrenados a ciclos Tt; y 406 son entrenados a ciclos LO. La comparación de estos datos mostró que 107 transcriptos son comunes a los conjuntos de genes manejados y que sólo 2 son comunes en los conjuntos de genes entrenados (*wdr-5.3*, un homólogo del miembro WDR5 del complejo de histona metiltransferasa que se asocia a PER1 de mamíferos; y *y102a5c.6*, un pseudogen). Este resultado es muy importante porque si *C. elegans* tuviera un único reloj que pudiera ser entrenado tanto por luz como por temperatura, los componentes de este reloj deberían aparecer en este tipo de análisis. Esto puede interpretarse de dos maneras diferentes. Una es que *C. elegans* podría tener 2 relojes distintos, y; la otra es que puede haber ocurrido enmascaramiento debido a tejidos que no ciclan, lo cual significa que los

ARNm del reloj pueden haber sido pasados por alto. Sin embargo, otro resultado importante es que, en las condiciones en que se realizó el estudio, los ARNm de homólogos a genes reloj no parecen ciclar. Esto podría indicarnos que el mecanismo de *C. elegans* puede ser uno completamente nuevo. Los autores también proponen un rol para TAX-2, un canal CNG involucrado en la transducción de señales de temperatura y luz. En el trabajo se mostró que una cepa mutante de *tax-2* (cepa PR671) mostraba ritmos transcripcionales severamente afectados. Esto fue estudiado utilizando un reportero GFP capaz de ser entrenado a ritmos de temperatura (*nlp36p::gfp*) y tres transcritos sincronizables por luz, elegidos al azar. Esto indica que *tax-2* es necesario para transducir estos *Zeitgebers* al reloj. Resulta interesante notar que los mutantes de *lite-1* (gen que codifica para el fotorreceptor LITE-1), requerido para respuestas a luz de alta frecuencia, no mostraron problemas de sincronización a la luz (van der Linden, et al. 2010).

Los estudios bioinformáticos realizados hasta el momento sobre *C. elegans* con el fin de encontrar homólogos a genes del reloj de otras especies no han sido muy exhaustivos y se basaban básicamente en búsquedas por alineamientos de proteínas utilizando el algoritmo BLASTP, a partir de secuencias de mamíferos e insectos (Hasegawa, et al. 2005; Temmerman, et al. 2011). Hoy en día existen herramientas de búsqueda de similitud de secuencias proteicas basadas en métodos probabilísticos, que son más poderosos que el BLASTP. Desde la introducción del conjunto de programas BLAST en la década de 1990, se han hecho importantes avances teóricos en la metodología de búsqueda de homología, así como modelos ocultos de Markov, que permiten búsquedas con tecnología de inferencia probabilística a una velocidad similar al BLAST (Johnson, et al. 2010; Eddy 2011; Finn, et al. 2011). De esta manera, uno puede realizar alineamientos proteicos a partir de proteínas con una función conocida de diferentes organismos (Ej.: la proteína PERIOD de distintos insectos) y generar un modelo oculto de Markov. A partir de este modelo uno puede realizar búsquedas de homología en proteomas enteros utilizando el algoritmo *hmmsearch* incluido en el conjunto de aplicaciones HMMER (Ebersberger, et al. 2009; Finn, et al. 2011). Por otro lado, desde hace un tiempo se vienen liberando genomas y proteomas completos de diferentes nematodos del género *Caenorhabditis* (incluyendo a los de *C. elegans*) y otros de los géneros *Ascaris*, *Brugia*, *Bursaphelenchus*, *Haemonchus*, *Heterorhabditis*, *Meloydogine*, *Pristionchus*, *Strongyloides* y *Trychinella* (WormBase 2012). La combinación de las herramientas del conjunto HMMER y la disponibilidad de estos proteomas completos nos permiten realizar búsquedas exhaustivas de la homología a genes reloj, core y accesorios, de las especies modelo conocidas en los proteomas de 19 especies de nematodos.

Valiéndonos de modelos ocultos de Markov (HMM) generados a partir de alineamientos de los productos proteicos de genes reloj de los organismos modelo antes mencionados, se pueden determinar proteínas homólogas encontradas en organismos del mismo *phylum* que los organismos modelos. Estos modelos HMM nos dan idea de la información importante

(dominios) que determinan que estas proteínas funcionen como componentes de los relojes moleculares. Con ellos pueden buscarse aquellas proteínas de *Caenorhabditis elegans* y otros nematodos que se ajustan a cada modelo HMM generado. De esta manera, se pueden determinar cuáles son los componentes en común del *phylum Nematoda* que podrían llegar a conformar un reloj biológico basado en lazo de transcripción-traducción, con un alto grado de confianza.

Este tipo de enfoque conlleva un alto valor predictivo para la realización de experimentos que eventualmente validen la necesidad de determinados genes para el funcionamiento del reloj circadiano en *C. elegans*.

Materiales y métodos

Bases de datos de ADN y proteínas

Actualmente, 19 genomas completos de nematodos están depositados en WormBase (versión WS230, Tabla A.2.1). Estos incluyen a *Caenorhabditis elegans*, otras 8 especies del género *Caenorhabditis*, y otras 10 especies de los géneros *Ascaris*, *Brugia*, *Bursaphelenchus*, *Heterorhabditis*, *Haemonchus*, *Meloidogyne*, *Pristionchus*, *Strongyloides* y *Trichinella*. Los proteomas de todos los nematodos fueron extraídos de los archivos correspondientes de WormBase (<ftp://www.wormbase.org/pub>). De esta manera, se establecieron 2 bases de datos diferentes: la *base de datos de genomas individuales* (IGD), que guarda las secuencias nucleotídicas de los 19 nematodos; y, la *base de datos de proteomas individuales* (IPD), con 19 bases de datos proteómicas individuales conteniendo el proteoma anotado de cada nematodo.

Construcción de modelos ocultos de Markov (Multi HaMStR)

Para poder establecer situaciones de ortología remota, se consideraron las proteínas involucradas en los relojes de los 5 organismos modelos mejor caracterizados y más empleados en cronobiología: *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Synechococcus elongatus*, *Neurospora crassa* y *Arabidopsis thaliana*. De esta manera, se buscaron genes homólogos a cada una de las proteínas centrales de los relojes de estos organismos utilizando el servicio BlastP de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), restringiendo la búsqueda a organismos del mismo *phylum* y excluyendo resultados no anotados. Estos juegos de proteínas fueron alineados utilizando el software PSI-Coffee empleando los parámetros *t_coffee_msa* y *slow_pair* para los pasos múltiples y pairwise, respectivamente (Kemena y Notredame 2009; Di Tommaso, et al. 2011). Luego, se generaron modelos escondidos de Markov (perfiles HMM) específicos usando el programa local HMMER3 para cada set de secuencias (Finn, et al. 2011). Estos perfiles fueron luego utilizados para encontrar ortólogos en cada uno de los representantes del *phylum Nematoda* utilizando el software HaMStR v8.0

(Ebersberger, et al. 2009), con los parámetros *-rbh* y *-representative parameters* (valor de corte: $1e^{-10}$ para *hmmsearch* v3.0).

Especie	Taxón NCBI	Genoma	Set génico	Ensamblaje	Comentarios
<i>Caenorhabditis briggsae</i> cepa AF16	6238	108419768 bp	curado	WashU	Agregado en WS132
<i>Caenorhabditis species 9</i> cepa JU1422	870437	204396809 bp	externo	WashU Supercóntigos: 7636 N50: 196652	Agregado en WS226
<i>Caenorhabditis remanei</i> cepa PB4641	31234	145500347 bp	curado	WashU Cobertura: 9.2x Supercóntigos: 3670 N50: 461060	Agregado en WS185
<i>Caenorhabditis species 11</i> cepa JU1373	886184	79321433 bp	externo	WashU Cobertura: 19.1x Supercóntigos: 665 N50: 20921866	Agregado en WS226
<i>Caenorhabditis brenneri</i> cepa PB2801	135651	190421492 bp	curado	WashU Cobertura: 9.5x Supercóntigos: 3305 N50: 368319	Agregado en WS196
<i>Caenorhabditis elegans</i> cepa Bristol N2	6239	100272276 bp	curado	WashU/Sanger Cobertura: 6x	Agregado en WS1
<i>Caenorhabditis species 7</i> cepa JU1286	870436		ninguno	WashU	Agregado en WS226.
<i>Caenorhabditis japonica</i> cepa DF5080	281687	166565019 bp	curado	WashU Cobertura: 22x Supercóntigos: 18817 N50: 94149	Agregado en WS195
<i>Caenorhabditis angaria</i> cepa PS1010	860376 (96668)	79761545 bp	externo	CalTech Supercóntigos: 33559 N50: 9453	Agregado en WS218
<i>Haemonchus contortus</i>	6289	297975349 bp	predicho	Sanger Supercóntigos: 59707 N50: 13338	Agregado en WS208.
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> cepa M31e	37862	77007652 bp	externo	WashU Cobertura: 26.1x Supercóntigos: 1263 N50: 312328	Agregado en WS229
<i>Pristionchus pacificus</i> cepa PS312	54126	172773083 bp	externo	WashU/MPI Cobertura: 8.92x Supercóntigos: 18083 N50: 1244534	Agregado en WS194
<i>Meloidogyne incognita</i> cepa Morelos	6306	82095019 bp	ninguno	INRA Supercóntigos: 9538 N50: 83000	Agregado en WS205
<i>Meloidogyne hapla</i> cepa VW9	6305	53017507 bp	externo	NCSU hapla.org Supercóntigos: 3452	Agregado en WS204
<i>Strongyloides ratti</i> natural isolate	34506	52638471 bp	predicho	Sanger Cobertura: 70x Supercóntigos: 2184 N50: 359029	Agregado en WS226
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> cepa Ka4C1	6326	74561461 bp	predicho	Sanger Cobertura: 13x Supercóntigos: 5527 N50: 1158000	Agregado en WS229
<i>Ascaris suum</i> aislamiento natural	6253	272782664 bp	externo	Laboratorio Gasser Supercóntigos: 29831 N50: 407899	Agregado en WS229
<i>Brugia malayi</i> TRS	6279	95814443 bp	externo / predicho	TIGR -> WashU/Sanger Supercóntigos: 27210 N50: 37841	Agregado en WS185
<i>Trichinella spiralis</i> cepa ISS 195	6334	56779425 bp	externo	WashU Supercóntigos: 6863 N50: 3383625	Agregado en WS225

Tabla A.2.1. Genomas completos depositados en WormBase WS230 utilizados en este trabajo. Se emplearon los genomas y proteomas completos de 19 especies de nematodos depositadas en WormBase. Información actualizada a Diciembre, 2012 (WormBase 2012).

Caracterización de la secuencia de posibles genes reloj

Aquellas proteínas identificadas por el uso de los algoritmos anteriormente descritos fueron analizadas y comparadas con sus ortólogos. Los dominios fueron confirmados por InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). Los pesos moleculares fueron calculados utilizando el software *Composition/Molecular Weight Calculation* (http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/comp_mw.shtml) (Wu, et al. 2003). Los puntos isoeléctricos fueron determinados por medio del servidor *Protein Isoelectric Point calculator* server utilizando los valores pK de EMBOSS (<http://www.ebioinfogen.com/biotools/protein-isoelectric-point-calculator.htm>). Las predicciones de péptidos señal y hélices transmembrana fueron llevadas a cabo utilizando *SignalP 4.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen, et al. 2011) y *TMHMM-2.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (Krogh, et al. 2001), respectivamente. Los ortólogos correspondientes a prototipos de reloj aceptados fueron analizados para determinar la presencia de motivos proteicos *ab initio* usando la técnica de maximización de expectativa implementada por el conjunto de aplicaciones MEME con parámetros estándar (Bailey y Elkan 1994; Bailey, et al. 2009). Los motivos presentes en todas las secuencias estudiadas (p -valor combinado $< 1e^{-5}$) fueron aceptados. La disposición de los motivos y los logos de secuencia correspondientes fueron provistos por el servidor web MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>).

Análisis filogenéticos

Se construyó un árbol filogenético de los nematodos estudiados utilizando las secuencias SSU, según se describió anteriormente (Sudhaus y Fitch 2001; Kiontke y Fitch 2005). Por otro lado, los juegos de proteínas ortólogas fueron alineados utilizando el software PSI-Coffee empleando los parámetros *t_coffee_msa* y *slow_pair* para los pasos múltiples y *pairwise*, respectivamente (Notredame, et al. 2000). Los árboles filogenéticos fueron contruidos usando el software local MEGA usando el método *neighbor-joining* y el modelo de *Poisson* para sustituciones de aminoácidos (Saitou y Nei 1987; Kumar, et al. 2004). El porcentaje de árboles réplica en los cuales los *taxa* se agruparon juntos en el test de *bootstrap* (1000 réplicas) es mostrado al lado de cada rama. La distancia neta entre *taxa* fue determinada calculando el número de sustituciones de aminoácidos por sitio de la estimación del promedio neto entre grupos de secuencias. Los análisis fueron llevados a cao utilizando el modelo de corrección de *Poisson*.

Resultados y discusión

Inicialmente se realizó una búsqueda de homología de las proteínas centrales del reloj de plantas (*Arabidopsis thaliana*), cianobacterias (*Synechococcus elongatus*), hongos (*Neurospora crassa*), insectos (*Drosophila melanogaster*) y mamíferos (*Mus musculus*). Esta

búsqueda acotada permitió determinar cuáles de las proteínas centrales del reloj estaban mejor representadas en el genoma de *C. elegans*.

Homología con los relojes centrales de plantas y cianobacterias

A partir de las tablas podemos observar que, tal como era esperable, *C. elegans* no presenta homología a ninguno de los genes centrales del reloj de plantas ni de cianobacterias (Tabla A.3.1).

Homología con el reloj central de hongos

La búsqueda de homología a genes centrales del reloj de hongos arrojó resultados inesperados y se encontraron candidatos en el proteoma de los nematodos que presentaban una homología apreciable a cada uno de los componentes del reloj fúngico (Tabla A.3.1).

La proteína FRH, una RNA helicasa que interactúa con FRQ, presentó un homólogo prácticamente perfecto ($E = 0$), la proteína ceMTR-4 de *C. elegans*. Poseen casi el mismo tamaño en residuos aminoacídicos (1006aa y 1026aa, respectivamente). Ambas proteínas poseen los mismos dominios, con la excepción de un dominio de unión a calcio (Prosite PS00018, dominio de unión a calcio *EF-Hand 1*). Sin embargo, esta proteína parece estar involucrada en la poliadenilación de ARNm destinados a la degradación o *trimming* exosomal y es un sustrato de la vía RTK-RAS-ERK (Arur, et al. 2009; Jia, et al. 2011). Por su parte, FRQ también mostró una homología con la proteína ceMTR-4, aunque la búsqueda de dominios a través de InterProScan revela un dominio único y muy conservado en FRQ que no está presente en ceMTR-4.

La proteína FWD-1, que es la encargada de marcar para degradación a FRQ, presentó mayor homología ($E = 1,2 \times 10^{-80}$) con ceLIN-23 (K10B2.1). Estas proteínas probablemente tengan un rol similar, ya que son proteínas de caja F con dominios de repeticiones WD40. En *C. elegans*, ceLIN-23 es componente de un complejo ubiquitin ligasa SCF (Skp1, Cullina, Caja-F) que funciona en la degradación de proteínas mediada por ubiquitina. Además ceLIN-23 funciona regulando negativamente las divisiones celulares posembrionarias en todos los tipos de tejidos. También regula el crecimiento de las neuritas en algunas neuronas y la abundancia del receptor de glutamato ceGLR-1 (Kipreos, et al. 2000; Fay, et al. 2002; Mehta, et al. 2004; Dreier, et al. 2005).

Organismo	Proteína	Función en el reloj	Homólogo en <i>C. elegans</i>	valor E
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CCA1	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	COP1	moduladora de LHY/CCA1	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	DET1	moduladora de LHY/CCA1	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	GI	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	LHY	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	LUX	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	PRR5	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	PRR7	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	PRR9	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	TOC1	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
<i>Synechococcus elongatus</i>	KAI-A	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	KAI-B	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
	KAI-C	reloj central	<i>no posee</i>	<i>no posee</i>
<i>Neurospora crassa</i>	FRH	reloj central	W08D2.7	0
	FRQ	reloj central	W08D2.7	0
	FWD-1	moduladora de FRQ	K10B2.1	1,20E-80
	VVD	reloj central	F16B3.1	1,30E-06
	WC-1	reloj central	F16B3.1	1,10E-05
	WC-2	reloj central	F38A6.3d	3,90E-09

Tabla A.3.1. Proteínas homólogas a los genes reloj de plantas, cianobacterias y hongos.

Estas proteínas fueron encontradas por búsquedas con tecnología de inferencia probabilística a partir de modelos de Markov generados por alineamientos múltiples para cada proteína de los relojes centrales de plantas (*A. thaliana*), cianobacterias (*S. elongatus*) y hongos (*N. crassa*).

La proteína VVD, otro de los elementos negativos del reloj de *N. crassa*, presenta homología ($E=1,3 \times 10^{-10}$) con ceEGL-2 (F16B3.1). VIVID es una proteína de 186aa con dominio PAS, que define un lazo del reloj que reprime la entrada de luz y regula la puesta en hora del reloj. ceEGL-2, es un canal de potasio de 956aa cuya actividad es requerida para la puesta de huevos, activación muscular, defecación, mecanosensado y quimiosensado (Trent, et al. 1983; Weinshenker, et al. 1999; Wes y Bargmann 2001; LeBoeuf, et al. 2011).

Al analizar la homología de los elementos positivos del complejo WC, WC1 y WC2, se encontró que WC1 también presenta homología ($E=1,1 \times 10^{-5}$) sobre una pequeña región de ceEGL-2, probablemente porque también comparte un dominio PAS con esta proteína. WC2 presenta homología con ceHIF-1d ($E=3,9 \times 10^{-10}$). En *C. elegans*, esta proteína está involucrada en el sensado de los niveles de oxígeno y es necesaria para que los nematodos sean capaces de sobrevivir en ambientes de hipoxia (1% de oxígeno) (Jiang, et al. 2001). Estas proteínas muy probablemente no cumplan la misma función, dado que WC2 posee otros dominios que están ausentes en ceHIF-1, como los dominios GATA, un dominio de dedos de zinc de unión a ADN.

Proteínas centrales del reloj de insectos

Las búsquedas realizadas a partir de alineamientos de proteínas de insectos (Claridge-Chang, et al. 2001; Yuan, et al. 2007; Tomioka y Matsumoto 2010) nos indican que el proteoma de *C. elegans* incluye proteínas con gran homología a las proteínas del reloj central de insectos (Tabla A.3.2).

Las proteínas Period (PER) y Timeless (TIM) constituyen el 1er lazo de retroalimentación negativa del reloj de *Drosophila melanogaster* y otros insectos. Ambas presentan homología con proteínas de *C. elegans*. PER posee gran homología ($E=2,1 \times 10^{-30}$) con ceLIN-42b (F47F6.1b). Ambas poseen dominios PAS (PFAM PF00989) y un dominio reconocido como *PERIOD CIRCADIAN PROTEIN* (PANTHER PTHR11269), aunque su tamaño es muy distinto, PER posee 1218aa y ceLIN-42b posee 597aa. Por su parte, TIM posee homología ($E=3,2 \times 10^{-18}$) con ceTIM-1 (Y75B8A.22). Ambas proteínas son casi de la misma longitud, con 1398aa y 1353aa, respectivamente; y poseen los mismos dominios según el análisis realizado por InterProScan. Se ha reportado que estas proteínas cumplen funciones heterocrónicas en *C. elegans* (Jeon, et al. 1999; Chan, et al. 2003).

Los elementos positivos, Clock (CLK) y Cycle (CYC), presentan homología con la proteína ceAHA-1A (C25A1.11A), $E=1,70 \times 10^{-21}$ y $E=4,1 \times 10^{-75}$, respectivamente. Esta es la única proteína de *C. elegans* que posee los mismos dominios que CLK y CYC. El análisis por InterProScan nos dice que estas proteínas contienen 2 dominios PAS (SMART SM00091), un dominio bHLH (PFAM PF00010), dominios de translocación nuclear (PROSITE PR00785) y un dominio *CIRCADIAN PROTEIN CLOCK/ARNT/BMAL/PAS* (PANTHER PTHR23042), entre otros. Por longitud, la más similar de las 2 proteínas es CYC, que posee 413aa, mientras que CLK tiene 1023aa. ceAHA-1A, por su parte, posee 453aa. La literatura indica que esta proteína es capaz de heterodimerizarse con otras proteínas con dominios PAS de *C. elegans* (ceAHR-1, ceHIF-1, ceCKY-1) y probablemente sea capaz de formar homodímeros también, para luego estimular la transcripción de genes blanco (Powell-Coffman, et al. 1998; Ooe, et al. 2007). Esto mismo sucede con los heterodímeros CLK-CYC en moscas, que activan la transcripción de los factores negativos y otros genes controlados por el reloj (Claridge-Chang, et al. 2001).

La proteína Criptocromo (CRY), involucrada en el sensado de luz azul y degradación de TIM no posee homólogos en *C. elegans*. Lo mismo sucede en el caso de CRY2, que es un potente represor de la transcripción mediada por CLK-CYC, pero es insensible a la luz (Yuan, et al. 2007). Resulta interesante notar que *C. elegans* posee un fotorreceptor totalmente novedoso y desconocido en otras especies. Algunos años atrás se determinó que *C. elegans* poseía un mecanismo de fototaxis negativa hacia longitudes de onda cortas, como la luz UV y la luz azul. Esta respuesta está mediada por el fotorreceptor LITE-1, un receptor asociado a proteína G con homología a los receptores gustatorios de *Drosophila melanogaster*. Esta proteína recibe la información de la luz y activa una guanilato ciclase, que

sintetiza cGMP. Una vez que los niveles de cGMP se elevan, activan unos canales CNG, que terminan por depolarizar a la neurona fotorreceptora (Edwards, et al. 2008; Ward, et al. 2008; Liu, et al. 2010).

Organismo	Proteína	Función en el reloj	Homólogo en <i>C. elegans</i>	valor E
<i>Drosophila melanogaster</i>	PER	reloj central	LIN-42b	2,10E-30
	TIM	reloj central	TIM-1	3,20E-18
	CLK	reloj central	AHA-1a	1,70E-21
	CYC	reloj central	AHA-1a	4,10E-75
	CRY	reloj central	no posee	no posee

Tabla A.3.2. Proteínas homólogas a los genes del reloj central de insectos. Estas proteínas fueron encontradas por búsquedas con tecnología de inferencia probabilística a partir de modelos de Markov generados por alineamientos múltiples para cada proteína del reloj central de insectos (*D. melanogaster*).

Proteínas accesorias del reloj de insectos

Como se encontraron proteínas homólogas a los productos de los genes reloj de insectos, se decidió profundizar la búsqueda e incluir a las proteínas accesorias al reloj de *Drosophila melanogaster* (Sandrelli, et al. 2008; Tomioka y Matsumoto 2010).

Primero se buscaron las proteínas que forman lazos de retroalimentación distintos al principal. Estas proteínas son Vriille, Par Domain Protein 1E y Clockwork Orange.

Vriille (VRI) pertenece al 2do lazo negativo del reloj, inhibiendo la transcripción de CLK. Esta proteína presenta homología ($E=1,7 \times 10^{-17}$) con ceATF-2 (K08F2.2). El análisis por InterProScan revela que ambas proteínas poseen dominio bZIP (PFAM PF07716). Se sabe que ceATF-2 es un factor de transcripción que regula negativamente a los genes de autofagia ceBEC-1 y ceLGG-1 (Erdelyi, et al. 2011), pero se desconoce si regula de alguna manera a ceAHA-1.

Par Domain Protein 1e (PDP1e), está involucrada en el 2do lazo positivo del reloj de moscas y cumple un rol antagónico a VRI, promoviendo la expresión de CLK. La proteína ceCES-2 es la más similar ($E=2 \times 10^{-6}$) a esta proteína de moscas. Ambas poseen dominios bZIP (PFAM PF07716), aunque sus tamaños son muy diferentes. Mientras que PDP1e tiene una longitud de 647aa, ceCES-2 posee 211 residuos aminoacídicos. Se sabe que ceCES-2 regula la apoptosis y es capaz de dimerizarse con ceATF-2 (Wang, et al. 2006; Hatzold y Conradt 2008).

Clockwork Orange (CWO) es parte de un tercer lazo del reloj y actúa como un represor transcripcional de los genes blancos de CLK, cumpliendo un rol importante en la amplitud del reloj de *Drosophila*. No posee homólogos en *C. elegans*.

Luego se estudiaron las proteínas moduladoras del reloj: CREB, DoubleTime (DBT), Casein quinasa 2 (CK2), Shaggy (SGG), las proteínofosfatasa 1 y 2 (PP1 y PP2), Supernumerary Limbs (SLMB), Rhodopsina (Rh), Nemo (NMO), Noche y la fosfolipasa C (NORPA). Los homólogos y la función de estas proteínas pueden verse en la Tabla A.3.3.

Finalmente, se estudiaron las proteínas de salida del reloj de insectos, que incluyen a Takeout (to), Pigment Dispersing Factor (PDF), Slowpoke (SLO), Narrow Abdomen (NA), Inward Rectifier (IR), Jetlag (Jet), COP9 signalosome (CSN4), Protein quinasa A (PKA), Beta Alanil Conjugasa Sintasa (EBONY), Lark (LRK), Factor de transcripción FER2 (FER2). Los homólogos y la función de estas proteínas pueden verse en la Tabla A.3.3.

Organismo	Proteína	Función en el reloj	Homólogo en <i>C. elegans</i>	valor E
<i>Drosophila melanogaster</i>	VRI	2do lazo	ATF-2	1,70E-17
	PDP1E	2do lazo	CES-2	2,00E-06
	CWO	3er lazo	no posee	no posee
	CREB	moduladora	Y41C4A.4d	8,10E-43
	DBT	moduladora	C03C10.1	5,30E-190
	CK2A	moduladora	B0205.7	3,50E-209
	CK2B	moduladora	T01G9.6b	1,50E-121
	SGG	moduladora	Y18D10A.5	3,30E-189
	PP1	PP1b	F29F11.6a	1,30E-216
		PP1-13C	F56C9.1	1,30E-218
	PP2	PP2a_MTS	Y75B8A.30	3,90E-177
		PP2a_TWS	F26E4.1	4,00E-213
		PP2a_WBT_A	W08G11.4	4,30E-256
		PP2a_WBT_B	C13G3.3c	9,50E-279
	PRMT-5	moduladora	C34E10.5	3,70E-144
	SLMB	moduladora	K10B2.1	1,90E-232
	RH1	moduladora	C52B11.3	8,60E-34
	RH5	moduladora	C52B11.3	4,00E-30
	RH6	moduladora	C52B11.3	8,40E-30
	NMO	moduladora	W06F12.1e	1,50E-182
	NOCTE	moduladora	no posee	no posee
	NORPA	moduladora	B0348.4a	0
	TO	salida	no posee	no posee
	PDF	salida	T07E3.6b	3,00E-02
	PDFR	salida	C13B9.4a	1,80E-127
	SLO	salida	Y51A2D.19a	0
	NA	salida	C11D2.6a	0
	IR	salida	M02A10.2a	8,50E-159
	JET	salida	C02F5.7a	8,80E-128
	CSN4	salida	Y55F3AM.15	7,80E-85
	PKA	salida	ZK909.2h	1,60E-217
	EBONY	salida	Y66D12A.14	1,40E-60
	LRK	salida	F18H3.3b	1,80E-36
	FER2	salida	B0304.1b	1,90E-12

Tabla A.3.3. Proteínas homólogas a los genes accesorios del reloj central de insectos.

Estas proteínas fueron encontradas por búsquedas con tecnología de inferencia probabilística a partir de modelos de Markov generados por alineamientos múltiples para cada proteína accesoria del reloj central de insectos (*D. melanogaster*). En rojo se indican aquellas proteínas que fueron halladas como homólogas, pero que no poseen todos los dominios del HMM utilizado como punto de partida.

Proteínas centrales del reloj de mamíferos

Las búsquedas realizadas a partir de alineamientos de proteínas de mamíferos (Takahashi y Lowrey 2011) nos indican que el proteoma de *C. elegans* incluye proteínas con gran homología a las proteínas del reloj central de mamíferos (Tabla A.3.4).

Los elementos positivos del reloj de mamíferos son las proteínas Clock (CLK) y BMAL. BMAL es el homólogo a dmCYC y hay dos variantes, BMAL1 y BMAL2. Además de CLK hay otra proteína llamada NPAS2 que es capaz de heterodimerizarse con BMAL y activar la transcripción de genes blanco. La proteína de *C. elegans* con homología a CLK, BMAL1, BMAL2 y NPAS2 es ceAHA-1a, con valores E de $1,5 \times 10^{-17}$, $1,8 \times 10^{-65}$, $5,4 \times 10^{-63}$ y $6,8 \times 10^{-19}$, respectivamente. Estos resultados son similares a lo encontrado en el caso del reloj de insectos donde la proteína homóloga a CLK y CYC era también ceAHA-1a.

Los elementos negativos del reloj son Period (PER) y Criptocromo (CRY). En este caso existen 3 proteínas PER: PER1, PER2 y PER3. De manera similar a insectos, el homólogo a PER2 y PER3 es ceLIN-42B, con una homología con valor E de $2,9 \times 10^{-21}$ y $5,5 \times 10^{-20}$, respectivamente. PER1, por otro lado, presenta mayor homología ($E=7,5 \times 10^{-17}$) con ceLIN-42C. No existen proteínas homólogas a CRY en el genoma de *C. elegans*.

Si bien estos valores de homología son elevados, los encontrados para insectos eran mayores (comparar las tablas A.3.2 y A.3.4).

Organismo	Proteína		Función en el reloj	Homólogo en <i>C. elegans</i>	valor E
<i>Mus musculus</i>	PER	PER1	reloj central	LIN-42c	7,50E-17
		PER2	reloj central	LIN-42b	2,90E-21
		PER3	reloj central	LIN-42b	5,50E-20
	BMAL	BMAL1	reloj central	AHA-1a	1,80E-65
		BMAL2	reloj central	AHA-1a	5,40E-63
	CLK		reloj central	AHA-1a	1,50E-17
	NPAS2		reloj central	AHA-1a	6,80E-19
	CRY	CRY1	reloj central	no posee	no posee
		CRY2	reloj central	no posee	no posee

Tabla A.3.4. Proteínas homólogas a los genes del reloj central de mamíferos. Estas proteínas fueron encontradas por búsquedas con tecnología de inferencia probabilística a partir de modelos de Markov generados por alineamientos múltiples para cada proteína del reloj central de mamíferos (*M. musculus*).

Proteínas accesorias del reloj de mamíferos

A pesar de que las proteínas centrales del reloj de insectos poseen mayor significancia en su homología que las proteínas de mamíferos, también se realizaron búsquedas de las proteínas accesorias del reloj de mamíferos (Takahashi y Lowrey 2011).

Las proteínas que conforman los elementos positivos del 2do lazo son ROR-A, ROR-B. Actúan fomentando la transcripción de BMAL. El homólogo a ROR-A es ceNHR-23b (C01H6.5b), con $E=1,4 \times 10^{-70}$; y el homólogo a ROR-B es ceNHR-23a (C01H6.5a), con $E=4,5 \times 10^{-73}$. En los nematodos, esta proteína actúa como un receptor hormonal nuclear que es requerido para los cambios larvales (*molts*) (Kostrouchova, et al. 2001).

REB-ERV alpha (NR1D1 y NR1D2) actúa como el elemento negativo del 2do lazo, inhibiendo la transcripción de BMAL. El homólogo a NR1D1 y NR1D2 es ceNHR-85a (W05B5.3a), con un valor E de $8,1 \times 10^{-47}$ y $8,7 \times 10^{-55}$, respectivamente. Esta proteína es un receptor hormonal nuclear requerido para la puesta de huevos y la formación de larvas dauer resistentes al SDS (Gissendanner, et al. 2004).

DBP (proteína de unión a cajas D) forma parte de un segundo lazo accesorio, actuando vía elementos caja D en los genes blanco (Ueda, et al. 2005). El homólogo a DBP es ceCES-2 (ZK909.4), con $E=1,5 \times 10^{-18}$, al igual que para la proteína PDP-1e de insectos.

Luego se estudiaron las proteínas moduladoras del reloj: CASEIN QUINASA 1A, CASEIN QUINASA 1D, CASEIN KINASA 1E, DEC1, DEC2, FBXL3, NOCTURNINA (CCRN4L), PPARGC1A. Los homólogos y la función de estas proteínas pueden verse en la Tabla A.3.5

Finalmente se estudiaron las proteínas de entrada/salida del reloj: los receptores de melatonina MEL1A y MEL1B, MELANOPSINA (OPN4), PROKINETICINA (PKC2), VIP y el receptor de VIP (VPAC2). Los homólogos y la función de estas proteínas pueden verse en la Tabla A.3.5. Cabe mencionar que estudios recientes de nuestro laboratorio han descrito la presencia de ritmos en la síntesis de melatonina y en la actividad de la enzima ASMT, la cual es la enzima limitante del proceso (Migliori, et al. 2011a). Sin embargo, aún son desconocidos los receptores para esta señal humoral. En este trabajo se han identificado algunas proteínas candidato, entre las cuales F41E7.3 es la que presenta un mayor grado de homología con los receptores de mamíferos. Esta proteína es un receptor de neuropéptidos huérfano, por lo que resultaría muy interesante corroborar experimentalmente su función.

Organismo	Proteína		Función en el reloj	Homólogo en <i>C. elegans</i>	valor E
<i>Mus musculus</i>	ROR	ROR-A	2do lazo	NHR-23b	1,40E-70
		ROR-B	2do lazo	NHR-23a	4,50E-73
	REB-ERVα	NR1D1	2do lazo	NHR-85a	8,10E-47
		NR1D2	2do lazo	NHR-85a	8,70E-55
	DBP		3er lazo	CES-2	1,50E-18
	CSNK	CSNK1a	moduladora	C03C10.1	4,30E-204
		CSNK1d	moduladora	F46F2.2b	1,40E-172
		CSNK1e	moduladora	F46F2.2b	5,00E-172
	CCRN4L		moduladora	ZC518.3c	3,50E-21
	DEC1		moduladora	Y54G2A.1	4,20E-05
	DEC2		moduladora	Y54G2A.1	1,50E-05
	FBXL-3		moduladora	C02F5.7a	5,20E-04
	PPARGC1α		moduladora	F18H3.3b	6,10E-08
	receptor MEL	MEL1A	salida	F41E7.3	1,00E-26
		MEL1B	salida	F41E7.3	1,10E-31
	OPN4		entrada	T11B7.4e	5,20E-61
	PKC2		salida	no posee	no posee
	VIP		salida	no posee	no posee
	VPAC2		salida	C18B12.2	1,60E-37

Tabla A.3.5. Proteínas homólogas a los genes accesorios del reloj central de mamíferos.

Estas proteínas fueron encontradas por búsquedas con tecnología de inferencia probabilística a partir de modelos de Markov generados por alineamientos múltiples para cada proteína accesoria al reloj central de mamíferos (*M. musculus*). En rojo se indican aquellas proteínas que fueron halladas como homólogas, pero que no poseen todos los dominios del HMM utilizado como punto de partida.

Perspectivas

Estos resultados parecen indicar que *C. elegans* posee las proteínas necesarias como para poder formar un reloj similar al de insectos, con la excepción de la proteína dmCRY, responsable de degradar a dmTIM bajo la presencia de luz azul (Tomioka y Matsumoto 2010). En el caso del reloj de mamíferos, mmCRY forma parte del reloj central en sí (Ko y Takahashi 2006). En ambos casos el posible reloj de *C. elegans* prescindiría de los criptocromos.

Por otro lado, tomando en cuenta las proteínas accesorias, se observa que *C. elegans* posee homólogos para formar el 2do lazo completo de insectos y la mayoría de las proteínas moduladoras y de salida, con la excepción de los rhodopsinas, dmNOCTE, dmTO y dmEBONY. Tampoco posee homólogos a dmCWO, involucrado en un 3er lazo del reloj.

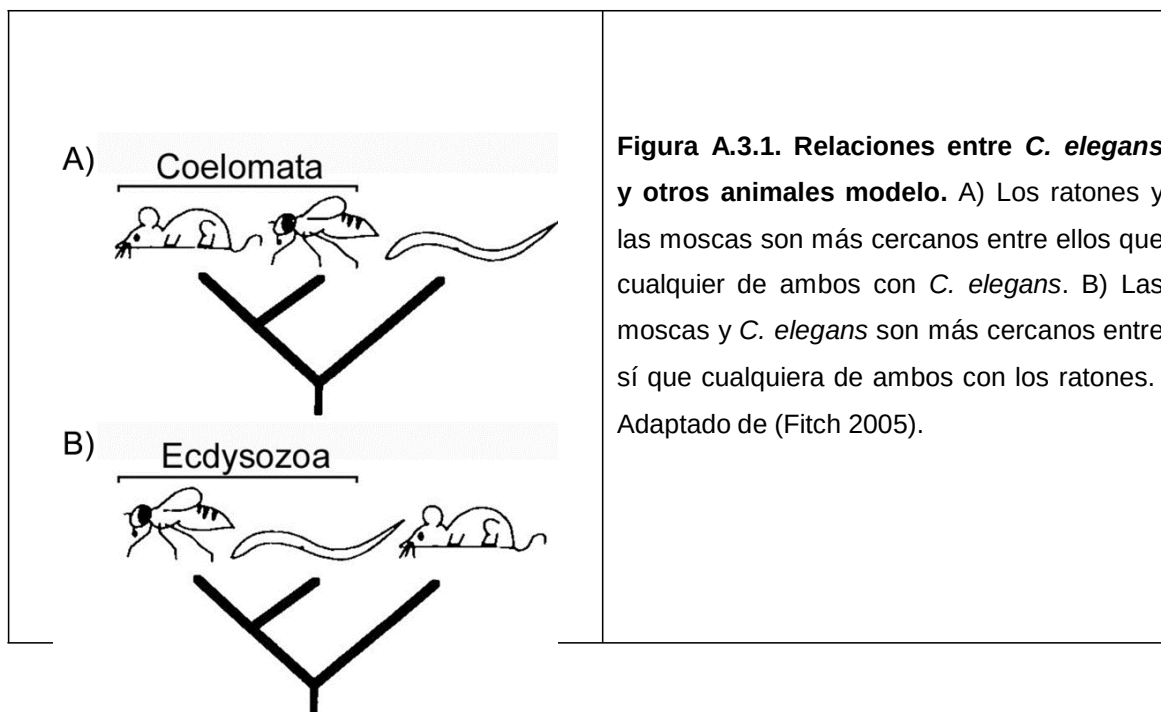
También encontramos homólogos para el 2do y 3er lazo del reloj de mamíferos y varias de las proteínas accesorias de este reloj. Resulta interesante notar que no se encuentran homólogos a VIP, un neuropéptido involucrado en la sincronización de las neuronas reloj de mamíferos, pero sí de su receptor VPAC2. En el caso de insectos, el neuropéptido más similar en función a VIP es PDF. *C. elegans* presenta homólogos a PDF y

a su receptor (Janssen, et al. 2009; Meelkop, et al. 2012) y, como hemos visto en el capítulo 4 de esta tesis, este neuropéptido está involucrado en la sincronización a ciclos LO y generación de ritmos en los nematodos.

En las tablas de insectos y mamíferos encontramos muchas proteínas accesorias con niveles de homología muy significativos. Esto se debe a que muchas de ellas son canales iónicos, fosfatasas o quinasas, y estas proteínas se encuentran muy conservadas en la evolución, por lo que no resultan sorprendentes los valores E obtenidos. Por otro lado, proteínas más específicas del reloj, como es el caso de PRMT-5 (*PROTEIN ARGININE METHYL TRANSFERASE5*), resultan más interesantes. Esta proteína modula el *splicing* alternativo de genes reloj de *D. melanogaster* y *A. thaliana*. Mutantes nulos de la enzima presentan ritmos severamente afectados en ambas especies (Sanchez, et al. 2010; Petrillo, et al. 2011). Por ende, esta sería una proteína candidato a analizar experimentalmente en *C. elegans*.

Las evidencias bioinformáticas parecen apuntar a que *C. elegans* posee un reloj que, al menos en cuanto a sus elementos moleculares homólogos, posee cierta similitud tanto con el oscilador de los insectos como con el de mamíferos. Se debe resaltar, sin embargo que los homólogos a los componentes centrales del reloj, es decir a *period*, *clock*, *tim* y *bmal/cycle* poseen funciones heterocrónicas y de cohesión cromosomal en los nematodos (Jeon, et al. 1999; Chan, et al. 2003; Hasegawa, et al. 2005) y su función en el reloj no es del todo clara. Además, un estudio global a nivel transcriptómico de nematodos entrenados a ciclos LO y a ciclos Tt no encontró que los ARNm de estos genes ciclaran (van der Linden, et al. 2010). Su función, debe entonces ser determinada experimentalmente.

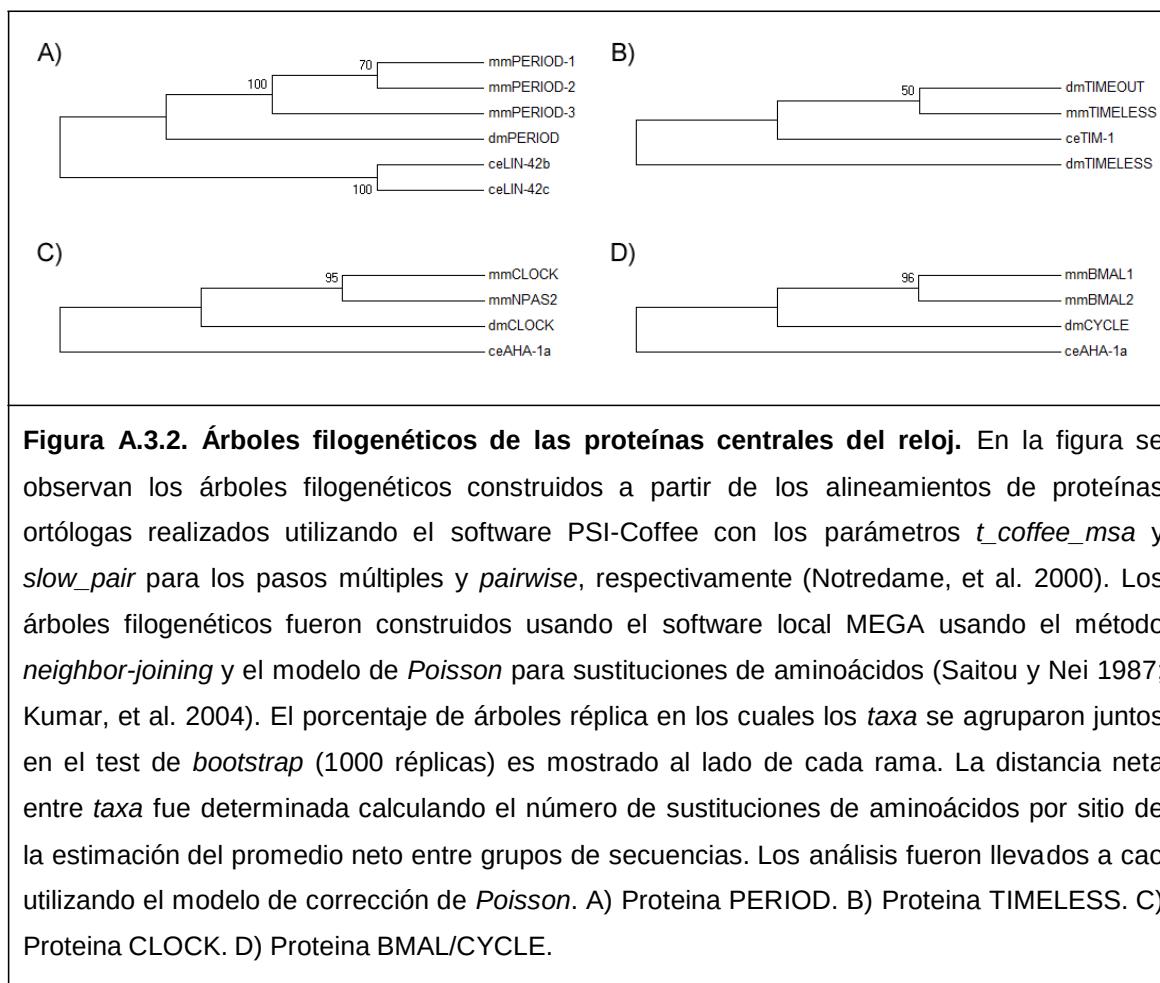
Los estudios realizados en este trabajo podrían ayudar a discernir cuál de las hipótesis sobre la relación de los nematodos con los insectos y mamíferos es más correcta. Hoy en día existen básicamente 2 hipótesis. La hipótesis de los “*celomados*” indica que los nematodos son más cercanos a los insectos que a los mamíferos y, la hipótesis de los “*ecdysozoa*” indica justamente lo contrario (Figura A.3.1).

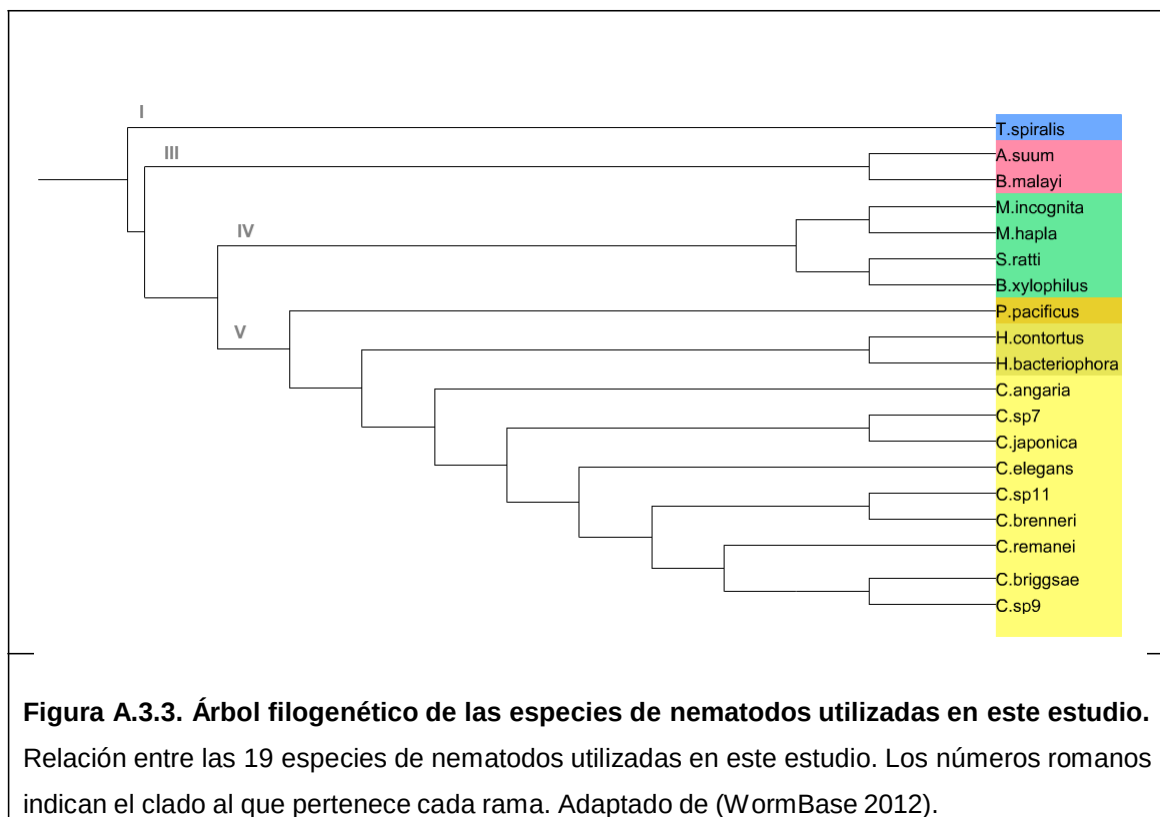


Existen evidencias que apoyan ambas hipótesis. Por ejemplo, basándose en la secuencia del ARN 18S se encuentra que los nematodos están relacionados a los artrópodos en un clado de animales que realizan mudas, llamado *ecdyssozoa* (Figura A.3.1B). Esta hipótesis depende de la exclusión de todos los nematodos con la excepción de *Trichinella spiralis*. Sin embargo al incluir al resto de los nematodos, estos se agruparon en un clado consistente con la hipótesis de celomados (Figura A.3.1A) (Aguinaldo, et al. 1997). Los árboles contruidos a partir de la secuencia de la ARN polimerasa 2 también se ajustan a esta hipótesis (Sidow y Thomas 1994). A partir de los resultados obtenidos en *C. elegans* se construyeron árboles filogenéticos considerando a las proteínas reloj de mamíferos, insectos y su principal homólogo en los nematodos (Figura A.3.2). Estos árboles parecen estar de acuerdo con la hipótesis de los celomados, es decir que la mosca de la fruta y los ratones están más cerca el uno del otro que cualquiera de los dos de *C. elegans*. Además los resultados para la proteína TIMELESS indican que la proteína ceTIM-1 es más cercana a la proteína dmTIMEOUT y a mmTIMELESS, que a dmTIMELESS. En mamíferos, es esencial para el desarrollo embrionario y está asociada al metabolismo del ADN. Además se sabe que se asocia a la peroxirredoxina 2 durante puntos de control del ciclo celular (Gotter, et al. 2007). En *Drosophila* TIMEOUT está involucrada en el metabolismo del ADN, la integridad cromosomal y, también en la fotorrecepción circadiana (Gotter 2006; Benna, et al. 2010; McFarlane, et al. 2010).

Estudios de las homologías de los genes reloj en otras especies de nematodo pueden ayudar a resolver esta larga disputa y favorecer que la balanza se incline hacia alguno de los

dos lados. En este sentido, a pesar de que en este anexo sólo se muestran aquellos homólogos que exhiben los valores más altos de significancia, existen otros candidatos a considerar. Además, este mismo procedimiento se llevó a cabo con otros 18 proteomas de nematodos disponibles en la base de datos WS230 de WormBase (Figura A.3.3).





Las tablas completas, con los resultados de homología obtenidos a partir de la búsqueda de modelos de Markov generados con las proteínas reloj de los 5 organismos modelos empleados, en cada una de las 19 especies de nematodos está disponible en http://cronos.unq.edu.ar/tesis/andres_romanowski/.

El análisis de estos homólogos, según sus dominios, su PM, su pl, presencia de péptidos señal y hélices transmembrana, la determinación de nuevos motivos a través de MEME, y la construcción de árboles filogenéticos comparativos de las proteínas centrales del reloj de insectos y moscas que incluyan a los homólogos encontrados en las 19 especies estudiadas ayudará a entender mejor la relación entre el posible reloj circadiano de los nematodos y el reloj de insectos y mamíferos.

Notas

¹ Datos preliminares indican que en compost, sustrato natural de *C. elegans*, la temperatura varía entre 1 y 2 grados a lo largo del ciclo diurno.

Fin



Bibliografía

- Abdelsalam, S., H. Uemura, Y. Umezaki, A. S. Saifullah, M. Shimohigashi y K. Tomioka. 2008. Characterization of PDF-immunoreactive neurons in the optic lobe and cerebral lobe of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J Insect Physiol* **54**:1205-1212.
- Agapito, M. T., I. Redondo, R. Plaza, S. Lopez-Burillo, J. M. Recio y M. I. Pablos. 1999. Relationships between melatonin, glutathione peroxidase, glutathione reductase, and catalase. Endogenous rhythms on cerebral cortex in *Gallus domesticus*. *Adv Exp Med Biol* **460**:377-381.
- Aguinaldo, A. M., J. M. Turbeville, L. S. Linford, M. C. Rivera, J. R. Garey, R. A. Raff y J. A. Lake. 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* **387**:489-493.
- Albertson, D. G. y J. N. Thomson. 1976. The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**:299-325.
- Altun, Z. F. y D. H. Hall. 2012. Handbook of *C. elegans* Anatomy. en WormAtlas, <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>.
- Allada, R. y B. Y. Chung. 2010. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol* **72**:605-624.
- Ambros, V. 2000. Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* **10**:428-433.
- Anokhin, P. K. 1974. Biological roots of the conditioned reflex and its role in adaptive behavior. Pergamon Press, Oxford.
- Arner, E. S. y A. Holmgren. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**:6102-6109.
- Aronson, B. D., K. A. Johnson, J. J. Loros y J. C. Dunlap. 1994. Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science* **263**:1578-1584.
- Arur, S., M. Ohmachi, S. Nayak, M. Hayes, A. Miranda, A. Hay, A. Golden y T. Schedl. 2009. Multiple ERK substrates execute single biological processes in *Caenorhabditis elegans* germ-line development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:4776-4781.
- Aschoff, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **25**:11-28.
- Aschoff, J. 1967. Human circadian rhythms in activity, body temperature and other functions. *Life Sci Space Res* **5**:159-173.
- 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., U. Gerecke y R. Wever. 1967. Desynchronization of human circadian rhythms. *Jpn J Physiol* **17**:450-457.
- 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.

Au, C., A. Benedetto, J. Anderson, A. Labrousse, K. Erikson, J. J. Ewbank y M. Aschner. 2009. SMF-1, SMF-2 and SMF-3 DMT1 orthologues regulate and are regulated differentially by manganese levels in *C. elegans*. *PLoS One* **4**:e7792.

Baehler, E., M. Bottiglieri, M. Pechy-Tarr, M. Maurhofer y C. Keel. 2005. Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Appl Microbiol* **99**:24-38.

Bailey, T. L., M. Boden, F. A. Buske, M. Frith, C. E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W. W. Li y W. S. Noble. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* **37**:W202-208.

Bailey, T. L. y C. Elkan. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**:28-36.

Baker, C. L., J. J. Loros y J. C. Dunlap. 2012. The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Rev* **36**:95-110.

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.

Barclay, J. L., A. H. Tsang y H. Oster. 2012. Interaction of central and peripheral clocks in physiological regulation. *Prog Brain Res* **199**:163-181.

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.

Barrière, A. y M.-A. Félix. 2006. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. *en* T. C. e. R. Community, editor. *Wormbook*, <http://www.wormbook.org>.

Barriere, A. y M. A. Felix. 2005. High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. *Curr Biol* **15**:1176-1184.

Barros, M. P. y E. J. Bechara. 2001. Daily variations of antioxidant enzyme and luciferase activities in the luminescent click-beetle *Pyrearinus termitilluminans*: cooperation against oxygen toxicity. *Insect Biochem Mol Biol* **31**:393-400.

Baumeister, R., E. Schaffitzel y M. Hertweck. 2006. Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *J Endocrinol* **190**:191-202.

Belozerskaya, T. A., N. N. Gessler, E. P. Isakova y Y. I. Deryabina. 2012. *Neurospora crassa* Light Signal Transduction Is Affected by ROS. *J Signal Transduct* **2012**:791963.

Benna, C., S. Bonaccorsi, C. Wulbeck, C. Helfrich-Forster, M. Gatti, C. P. Kyriacou, R. Costa y F. Sandrelli. 2010. *Drosophila* timeless2 is required for chromosome stability and circadian photoreception. *Curr Biol* **20**:346-352.

Bjornlund, L., R. Ronn, M. Pechy-Tarr, M. Maurhofer, C. Keel y O. Nybroe. 2009. Functional GacS in *Pseudomonas* DSS73 prevents digestion by *Caenorhabditis elegans* and protects the nematode from killer flagellates. *ISME J* **3**:770-779.

Blanc, C., M. Sy., D. Djigal., A. Brauman., P. Normand. y C. Villenave. 2006. Nutrition on bacteria by bacterial-feeding nematodes and consequences on the structure of soil bacterial community. *Eur J Soil Biol* **42**:S70-S76.

Bloch, G., S. M. Solomon, G. E. Robinson y S. E. Fahrbach. 2003. Patterns of PERIOD and pigment-dispersing hormone immunoreactivity in the brain of the European honeybee (*Apis*

- mellifera): age- and time-related plasticity. *J Comp Neurol* **464**:269-284.
- Blumer, C., S. Heeb, G. Pessi y D. Haas. 1999. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14073-14078.
- Bovien, P. 1937. Some types of association between nematodes and insects. *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorik Forening* **101**:1-114.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**:71-94.
- Brown, S. A., E. Kowalska y R. Dallmann. 2012. (Re)inventing the circadian feedback loop. *Dev Cell* **22**:477-487.
- Bücher, T. y M. Klingenberg. 1958. Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. *Angewandte Chemie* **70**:552-570.
- Burr, A. H. 1985. The photomovement of *Caenorhabditis elegans*, a nematode which lacks ocelli. Proof that the response is to light not radiant heating. *Photochem Photobiol* **41**:577-582.
- Cabreiro, F., D. Ackerman, R. Doonan, C. Araiz, P. Back, D. Papp, B. P. Braeckman y D. Gems. 2011. Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage. *Free Radic Biol Med* **51**:1575-1582.
- Carneiro, R. L., M. E. V. dos Santos, A. B. Furlanetto Pacheco y S. M. Feliciano de Oliveira e Azevedo. 2009. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton Research* **31**:481-488.
- 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.
- Cassone, V. M., J. K. Paulose, M. G. Whitfield-Rucker y J. L. Peters. 2009. Time's arrow flies like a bird: two paradoxes for avian circadian biology. *Gen Comp Endocrinol* **163**:109-116.
- Ceriani, M. F., J. B. Hogenesch, M. Yanovsky, S. Panda, M. Straume y S. A. Kay. 2002. Genome- wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *J Neurosci* **22**:9305-9319.
- 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.
- Coggan, K. A. y M. C. Wolfgang. 2012. Global regulatory pathways and cross-talk control *pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr Issues Mol Biol* **14**:47-70.
- Coolon, J. D., K. L. Jones, T. C. Todd, B. C. Carr y M. A. Herman. 2009. *Caenorhabditis elegans* genomic response to soil bacteria predicts environment-specific genetic effects on life history traits. *PLoS Genet* **5**:e1000503.
- Coto-Montes, A., J. A. Boga, C. Tomas-Zapico, M. J. Rodriguez-Colunga, J. Martinez-

Fraga, D. Tolivia-Cadreacha, G. Menendez, R. Hardeland y D. Tolivia. 2001. Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* **30**:785-792.

Czeisler, C. A. y E. N. Brown. 1999. Commentary: models of the effect of light on the human circadian system: current state of the art. *J Biol Rhythms* **14**:538-543.

Chalfie, M. y J. Sulston. 1981. Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **82**:358-370.

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.

Cheng, M. Y., C. M. Bullock, C. Li, A. G. Lee, J. C. Bermak, J. Belluzzi, D. R. Weaver, F. M. Leslie y Q. Y. Zhou. 2002. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* **417**:405-410.

Choe, K. P. y K. Strange. 2007. Molecular and genetic characterization of osmosensing and signal transduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *FEBS J* **274**:5782-5789.

Chong, R., C. Ke-zhou y Y. Zeng-liang. 2009. Induction of germline apoptosis by cobalt and relevant signal transduction pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol Mech Methods* **19**:541-546.

Darby, C. 2005. Interactions with microbial pathogens. *WormBook*:1-15.

Darby, C., C. L. Cosma, J. H. Thomas y C. Manoil. 1999. Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:15202-15207.

Di Tommaso, P., S. Moretti, I. Xenarios, M. Orobittg, A. Montanyola, J. M. Chang, J. F. Taly y C. Notredame. 2011. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res* **39**:W13-17.

Dirksen, H., C. A. Zahnow, G. Gaus, R. Keller, K. R. Rao y J. P. Reiehm. 1987. The Ultrastructure of Nerve-Endings Containing Pigment-Dispersing Hormone (PDH) in Crustacean Sinus Glands - Identification by Antiserum Against A Synthetic PDH. *Cell Tissue Res* **250**:576-578.

Dreier, L., M. Burbea y J. M. Kaplan. 2005. LIN-23-mediated degradation of beta-catenin regulates the abundance of GLR-1 glutamate receptors in the ventral nerve cord of *C. elegans*. *Neuron* **46**:51-64.

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

Dunlap, J. C., J. J. Loros y P. J. DeCoursey. 2004. *Chronobiology: biological timekeeping*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Ebersberger, I., S. Strauss y A. von Haeseler. 2009. HaMStR: profile hidden markov model based search for orthologs in ESTs. *BMC Evol Biol* **9**:157.

Eddy, S. R. 2011. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol* **7**:e1002195.

Edgar, R. S., E. W. Green, Y. Zhao, G. van Ooijen, M. Olmedo, X. Qin, Y. Xu, M. Pan, U. K. Valekunja, K. A. Feeney, E. S. Maywood, M. H. Hastings, N. S. Baliga, M. Merrow, A.

- J. Millar, C. H. Johnson, C. P. Kyriacou, J. S. O'Neill y A. B. Reddy. 2012. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* **485**:459-464.
- Edwards, S. L., N. K. Charlie, M. C. Milfort, B. S. Brown, C. N. Gravin, J. E. Knecht y K. G. Miller. 2008. A novel molecular solution for ultraviolet light detection in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* **6**:e198.
- Eisensamer, B. y T. Roenneberg. 2004. Extracellular pH is under circadian control in *Gonyaulax polyedra* and forms a metabolic feedback loop. *Chronobiol Int* **21**:27-41.
- Elhai, J. y C. P. Wolk. 1988. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**:747-754.
- Engelmann, W. 1988. Evolution and selective advantage of circadian rhythms. *Acta Physiol Pol* **39**:345-356.
- Epstein, A. C., J. M. Gleadle, L. A. McNeill, K. S. Hewitson, J. O'Rourke, D. R. Mole, M. Mukherji, E. Metzen, M. I. Wilson, A. Dhanda, Y. M. Tian, N. Masson, D. L. Hamilton, P. Jaakkola, R. Barstead, J. Hodgkin, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, C. J. Schofield y P. J. Ratcliffe. 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**:43-54.
- Erdelyi, P., E. Borsos, K. Takacs-Vellai, T. Kovacs, A. L. Kovacs, T. Sigmond, B. Hargitai, L. Pasztor, T. Sengupta, M. Dengg, I. Pecs, J. Toth, H. Nilsen, B. G. Vertessy y T. Vellai. 2011. Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* **124**:1510-1518.
- Erkut, C., S. Penkov, H. Khesbak, D. Vorkel, J. M. Verbavatz, K. Fahmy y T. V. Kurzchalia. 2011. Trehalose Renders the Dauer Larva of *Caenorhabditis elegans* Resistant to Extreme Desiccation. *Curr Biol* **21**:1331-1336.
- Evans, C. T. 2006. Transformation and microinjection. *en* WormBook, editor. WormBook. The *C. elegans* Research Community, <http://www.wormbook.org>. Ewbank, J. J. 2006. Signaling in the immune response. WormBook:1-12.
- Fabian, T. J. y T. E. Johnson. 1994. Production of age-synchronous mass cultures of *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol* **49**:B145-156.
- Fay, D. S., S. Keenan y M. Han. 2002. *fzr-1* and *lin-35/Rb* function redundantly to control cell proliferation in *C. elegans* as revealed by a nonbiased synthetic screen. *Genes Dev* **16**:503-517.
- Finn, R. D., J. Clements y S. R. Eddy. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* **39**:W29-37.
- Fitch, D. H. A. 2005. Introduction to nematode evolution and ecology. *en* T. C. e. R. Community, editor. WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Forman, H. J., M. Maiorino y F. Ursini. 2010. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* **49**:835-842.
- Gal, T. Z., I. Glazer y H. Koltai. 2005. Stressed worms: responding to the post-genomics era. *Mol Biochem Parasitol* **143**:1-5.
- Gallagher, L. A. y C. Manoil. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol* **183**:6207-6214.

- Garritty, P. A. 2010. Neuroscience: Feel the light. *Nature* **468**:900-901.
- Gems, D. y R. Doonan. 2009. Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: is the oxidative damage theory of aging wrong? *Cell Cycle* **8**:1681-1687.
- Gewitz, H. S., E. K. Pistorius¹, H. Voss y B. Vennesland. 1976. Cyanide formation in preparations from *Chlorella* and New Zealand spinach leaves: Effect of added amino acids. *Planta* **131**:149-153.
- Gissendanner, C. R., K. Crossgrove, K. A. Kraus, C. V. Maina y A. E. Sluder. 2004. Expression and function of conserved nuclear receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **266**:399-416.
- 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. 2007. Integrating the circadian oscillator into the life of the cyanobacterial cell. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**:331-338.
- 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 cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J Bacteriol* **158**:36-42.
- Golombek, D. A. 2002. *Cronobiologia Humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. Universidad Nacional de Quilmes.
- Gotter, A. L. 2006. A Timeless debate: resolving TIM's noncircadian roles with possible clock function. *Neuroreport* **17**:1229-1233.
- Gotter, A. L., C. Suppa y B. S. Emanuel. 2007. Mammalian TIMELESS and Tipin are evolutionarily conserved replication fork-associated factors. *J Mol Biol* **366**:36-52.
- Grewal, P. S. 1991. Influence of Bacteria and Temperature On the Reproduction of *Caenorhabditis Elegans* (Nematoda: Rhabditidae) Infesting Mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Nematologica* **37**:72-82.
- Guarente, L. y C. Kenyon. 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* **408**:255-262.
- Haas, D. y C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol* **41**:117-153.
- Halberg, F., G. Cornelissen, G. Katinas, E. V. Syutkina, R. B. Sothorn, R. Zaslavskaya, Y. Watanabe, O. Schwartzkopff, K. Otsuka, R. Tarquini, P. Frederico y J. Siggelova. 2003. Transdisciplinary unifying implications of circadian findings in the 1950s. *J Circadian Rhythms* **1**:2.
- Hall, J. C. y M. Rosbash. 1987. Genetic and molecular analysis of biological rhythms. *J Biol Rhythms* **2**:153-178.

- Hardaker, L. A., E. Singer, R. Kerr, G. Zhou y W. R. Schafer. 2001. Serotonin modulates locomotory behavior and coordinates egg-laying and movement in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol* 49:303-313.
- Hardeland, R., A. Coto-Montes y B. Poeggeler. 2003. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int* 20:921-962.
- Hardin, P. E. 2005. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. *Curr Biol* 15:R714-722.
- Hardin, P. E. 2011. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Adv Genet* 74:141-173.
- Hardin, P. E., J. C. Hall y M. Rosbash. 1990. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343:536-540.
- Hart, A. C. 2006. Behavior. *WormBook*.
- Hasegawa, K., T. Saigusa y Y. Tamai. 2005. *Caenorhabditis elegans* opens up new insights into circadian clock mechanisms. *Chronobiol Int* 22:1-19.
- Hatzold, J. y B. Conradt. 2008. Control of apoptosis by asymmetric cell division. *PLoS Biol* 6:e84.
- Hayakawa, T., K. Kato, R. Hayakawa, N. Hisamoto, K. Matsumoto, K. Takeda y H. Ichijo. 2011. Regulation of anoxic death in *Caenorhabditis elegans* by mammalian apoptosis signal-regulating kinase (ASK) family proteins. *Genetics* 187:785-792.
- 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.
- Hellemans, J., G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman y J. Vandesompele. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8:R19.
- Herzog, E. D. y P. H. Taghert. 2010. Circadian Neural Networks. en U. Albrecht, editor. The circadian clock. Springer Science + Business Media.
- Heschl, M. F. y D. L. Baillie. 1990. The HSP70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol B* 96:633-637.
- Hirayama, J., S. Cho y P. Sassone-Corsi. 2007. Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15747-15752.
- Hobert, O. 2003. Behavioral plasticity in *C. elegans*: paradigms, circuits, genes. *J Neurobiol* 54:203-223.
- Hodgkin, J. y T. M. Barnes. 1991. More is not better: brood size and population growth in a self-fertilizing nematode. *Proc Biol Sci* 246:19-24.

- Honda, Y., M. Tanaka y S. Honda. 2008. Modulation of longevity and diapause by redox regulation mechanisms under the insulin-like signaling control in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* **43**:520-529.
- Hong, M., J. Y. Kwon, J. Shim y J. Lee. 2004. Differential hypoxia response of hsp-16 genes in the nematode. *J Mol Biol* **344**:369-381.
- Hoogewijs, D., K. Houthoofd, F. Matthijssens, J. Vandesompele y J. R. Vanfleteren. 2008. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Mol Biol* **9**:9.
- 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.
- Hut, R. A., N. Kronfeld-Schor, V. van der Vinne y H. De la Iglesia. 2012. In search of a temporal niche: environmental factors. *Prog Brain Res* **199**:281-304.
- Hwangbo, D. S., B. Gershman, M. P. Tu, M. Palmer y M. Tatar. 2004. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* **429**:562-566.
- Hyun, S., Y. Lee, S. T. Hong, S. Bang, D. Paik, J. Kang, J. Shin, J. Lee, K. Jeon, S. Hwang, E. Bae y J. Kim. 2005. *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron* **48**:267-278.
- Im, S. H. y P. H. Taghert. 2010. PDF receptor expression reveals direct interactions between circadian oscillators in *Drosophila*. *J Comp Neurol* **518**:1925-1945.
- 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.
- Iwasaki, H. y T. Kondo. 2004. Circadian timing mechanism in the prokaryotic clock system of cyanobacteria. *J Biol Rhythms* **19**:436-444.
- Janssen, T., S. J. Husson, M. Lindemans, I. Mertens, S. Rademakers, K. Ver Donck, J. 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.
- Janssen, T., M. Lindemans, E. Meelkop, L. Temmerman y L. Schoofs. 2010. Coevolution of neuropeptidergic signaling systems: from worm to man. *Ann N Y Acad Sci* **1200**:1-14.
- 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.
- Jia, H., X. Wang, F. Liu, U. P. Guenther, S. Srinivasan, J. T. Anderson y E. Jankowsky. 2011. The RNA helicase Mtr4p modulates polyadenylation in the TRAMP complex. *Cell* **145**:890-901.

Jiang, H., R. Guo y J. A. Powell-Coffman. 2001. The *Caenorhabditis elegans* hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7916-7921.

Jimenez, P. N., G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool y W. J. Quax. 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:46-65.

Johnson, C. H. 2007. Bacterial circadian programs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72:395-404.

Johnson, L. S., S. R. Eddy y E. Portugaly. 2010. Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. *BMC Bioinformatics* 11:431.

Jortzik, E. y K. Becker. 2012. Thioredoxin and glutathione systems in *Plasmodium falciparum*. *Int J Med Microbiol* 302:187-194.

Jousset, A., E. Lara, L. G. Wall y C. Valverde. 2006. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol* 72:7083-7090.

Jousset, A., L. Rochat, M. Pechy-Tarr, C. Keel, S. Scheu y M. Bonkowski. 2009. Predators promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters. *ISME J* 3:666-674.

Jousset, A., S. Scheu y M. Bonkowski. 2008a. Secondary metabolite production facilitates establishment of rhizobacteria by reducing both protozoan predation and the competitive effects of indigenous bacteria. *Functional Ecology* 22:714-719.

Jousset, A., S. Scheu y M. Bonkowski. 2008b. Secondary metabolite production facilitates establishment of rhizobacteria by reducing both protozoan predation and the competitive effects of indigenous bacteria. *Funct Ecol*:714-719.

Karsai, A., S. Muller, S. Platz y M. T. Hauser. 2002. Evaluation of a homemade SYBR green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques* 32:790-792, 794-796.

Kay, E., C. Dubuis y D. Haas. 2005. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17136-17141.

Kay, E., B. Humair, V. Denervaud, K. Riedel, S. Spahr, L. Eberl, C. Valverde y D. Haas. 2006. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:6026-6033.

Keegan, K. P., S. Pradhan, J. P. Wang y R. Allada. 2007. Meta-analysis of *Drosophila* circadian microarray studies identifies a novel set of rhythmically expressed genes. *PLoS Comput Biol* 3:e208.

Kemena, C. y C. Notredame. 2009. Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the high-throughput era. *Bioinformatics* 25:2455-2465.

Kessin, R. H., G. G. Gundersen, V. Zaydfudim y M. Grimson. 1996. How cellular slime molds evade nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4857-4861.

Kiontke, K. 1997. Description of *Rhabditis* (*Caenorhabditis*) *drosophilae* n. sp. and *R.* (*C.*) *sonorae* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) from saguaro cactus rot in Arizona. *Fundam. appl. Nematol.* 20:302-315.

Kiontke, K. y D. H. Fitch. 2005. The phylogenetic relationships of *Caenorhabditis* and other rhabditids. *WormBook*:1-11.

Kiontke, K. y W. Sudhaus. 2006a. Ecology of *Caenorhabditis* species. *WormBook*:1-14.

Kiontke, K. y W. Sudhaus. 2006b. Ecology of *Caenorhabditis* species. en T. C. e. R. Community, editor. *Wormbook*, <http://www.wormbook.org>.

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.

Kipreos, E. T., S. P. Gohel y E. M. Hedgecock. 2000. The *C. elegans* F-box/WD-repeat protein LIN-23 functions to limit cell division during development. *Development* 127:5071-5082.

Ko, C. H. y J. S. Takahashi. 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2:R271-277.

Kondo, T. y M. Ishiura. 2000. The circadian clock of cyanobacteria. *Bioessays* 22:10-15.

Kondo, T., C. A. Strayer, R. D. Kulkarni, W. Taylor, M. Ishiura, S. S. Golden y C. H. Johnson. 1993.

Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5672-5676.

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

Kops, G. J., T. B. Dansen, P. E. Polderman, I. Saarloos, K. W. Wirtz, P. J. Coffey, T. T. Huang, J. L.

Bos, R. H. Medema y B. M. Burgering. 2002. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419:316-321.

Kostrouchova, M., M. Krause, Z. Kostrouch y J. E. Rall. 2001. Nuclear hormone receptor CHR3 is a critical regulator of all four larval molts of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7360-7365.

Krebs, H. A. 1967. The redox state of nicotinamide adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Adv Enzyme Regul* 5:409-434.

Krebs, H. A. y T. Gascoyne. 1968. The redox state of the nicotinamide-adenine dinucleotides in rat liver homogenates. *Biochem J* 108:513-520.

Krishnan, N., A. J. Davis y J. M. Giebultowicz. 2008. Circadian regulation of response to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 374:299-303.

Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne y E. L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567-580.

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

Lakin-Thomas, P. L., D. Bell-Pedersen y S. Brody. 2011. The genetics of circadian rhythms in *Neurospora*. *Adv Genet* 74:55-103.

Lamitina, S. T., R. Morrison, G. W. Moeckel y K. Strange. 2004. Adaptation of the nematode *Caenorhabditis elegans* to extreme osmotic stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C785-791.

Lamitina, T., C. G. Huang y K. Strange. 2006. Genome-wide RNAi screening identifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12173-12178.

Larsen, P. L. 1993. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8905-8909.

LaRue, B. L. y P. A. Padilla. 2011. Environmental and genetic preconditioning for long-term anoxia responses requires AMPK in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 6:e16790.

Laville, J., C. Blumer, C. Von Schroetter, V. Gaia, G. Defago, C. Keel y D. Haas. 1998.

Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* 180:3187-3196.

Lear, B. C., C. E. Merrill, J. M. Lin, A. Schroeder, L. Zhang y R. Allada. 2005. A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron* 48:221-227.

LeBoeuf, B., X. Guo y L. R. Garcia. 2011. The effects of transient starvation persist through direct interactions between CaMKII and ether-a-go-go K⁺ channels in *C. elegans* males. *Neuroscience* 175:1-17.

Lee, J. E. y I. Edery. 2008. Circadian regulation in the ability of *Drosophila* to combat pathogenic infections. *Curr Biol* 18:195-199.

Lee, S. S., S. Kennedy, A. C. Tolonen y G. Ruvkun. 2003. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* 300:644-647.

Leloup, J. C. y A. Goldbeter. 2003. Toward a detailed computational model for the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7051-7056.

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, A. L. y J. T. Fleming. 1995a. Basic culture methods. en H. F. Epstein y D. C. Shakes, editores. *Caenorhabditis elegans: modern biological analysis of an organism*. Academic Press, San Diego,

Lewis, J. A. y J. T. Fleming. 1995b. 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. *Neuroscience* 5:967-989.

Liang, B., M. Moussaif, C. J. Kuan, J. J. Gargus y J. Y. Sze. 2006. Serotonin targets the DAF-16/FOXO signaling pathway to modulate stress responses. *Cell Metab* 4:429-440.

Lin, Y., G. D. Stormo y P. H. Taghert. 2004. The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *J Neurosci* 24:7951-7957.

Link, C. D., J. R. Cypser, C. J. Johnson y T. E. Johnson. 1999. Direct observation of stress response in *Caenorhabditis elegans* using a reporter transgene. *Cell Stress Chaperones* 4:235-242.

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.

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.

Loudon, A. S. 2012. Circadian biology: a 2.5 billion year old clock. *Curr Biol* 22:R570-571.

Lujan, A. M., A. J. Moyano, I. Segura, C. E. Argarana y A. M. Smania. 2007. Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa* *mutS* strain. *Microbiology* 153:225-237.

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

Mahajan-Miklos, S., M. W. Tan, L. G. Rahme y F. M. Ausubel. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96:47-56.

Martinez-Granero, F., S. Capdevila, M. Sanchez-Contreras, M. Martin y R. Rivilla. 2005. Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151:975-983.

McClung, C. R. 2006. Plant circadian rhythms. *Plant Cell* 18:792-803.

McFarlane, R. J., S. Mian y J. Z. Dalgaard. 2010. The many facets of the Tim-Tipin protein families' roles in chromosome biology. *Cell Cycle* 9:700-705.

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.

McWatters, H. G. y P. F. Devlin. 2011. Timing in plants--a rhythmic arrangement. *FEBS Lett* 585:1474-1484.

Meelkop, E., L. Temmerman, T. Janssen, N. Suetens, I. Beets, L. Van Rompay, N. Shanmugam, S. J. Husson y L. Schoofs. 2012. PDF receptor signaling in *Caenorhabditis elegans* modulates locomotion and egg-laying. *Mol Cell Endocrinol* 361:232-240.

Mehta, N., P. M. Loria y O. Hobert. 2004. A genetic screen for neurite outgrowth mutants in

- Caenorhabditis elegans reveals a new function for the F-box ubiquitin ligase component LIN-23. *Genetics* 166:1253-1267.
- Mertens, I., A. Vandingenen, E. C. Johnson, O. T. Shafer, W. Li, J. S. Trigg, A. De Loof, L. Schoofs y P. H. Taghert. 2005. PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron* 48:213-219.
- 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., A. Romanowski, S. H. Simonetta, D. Valdez, M. Guido y D. A. Golombek. 2012. Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Pineal Res* 53:38-46.
- 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.
- Millar, A. J. y S. A. Kay. 1997. The genetics of phototransduction and circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Bioessays* 19:209-214.
- 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.
- 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. y J. P. Card. 1985. Visual pathways and the entrainment of circadian rhythms. *Ann N Y Acad Sci* 453:123-133.
- 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.
- Murakami, S. y T. E. Johnson. 1996. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 143:1207-1218.
- Murphy, J. T., J. J. Bruinsma, D. L. Schneider, S. Collier, J. Guthrie, A. Chinwalla, J. D. Robertson, E. R. Mardis y K. Kornfeld. 2011. Histidine protects against zinc and nickel toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 7:e1002013.
- Nguyen, M., A. Alfonso, C. D. Johnson y J. B. Rand. 1995. *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. *Genetics* 140:527-535.
- Notredame, C., D. G. Higgins y J. Heringa. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205-217.
- O'Neill, J. S. y A. B. Reddy. 2011. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 469:498-503.
- O'Neill, J. S., G. van Ooijen, L. E. Dixon, C. Troein, F. Corellou, F. Y. Bouget, A. B. Reddy y A. J. Millar. 2011. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* 469:554-558.
- Olmedo, M., J. S. O'Neill, R. S. Edgar, U. K. Valekunja, A. B. Reddy y M. Mero. 2012. Circadian regulation of olfaction and an evolutionarily conserved, nontranscriptional marker in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:20479-20484.

Ooe, N., K. Saito, K. Oeda, I. Nakatuka y H. Kaneko. 2007. Characterization of *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* NXF-like-factors, putative homologs of mammalian NXF. *Gene* 400:122-130.

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

Park, J. H. y J. C. Hall. 1998. Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment-dispersing factor gene in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 13:219-228.

Park, J. H., C. Helfrich-Forster, G. Lee, L. Liu, M. Rosbash y J. C. Hall. 2000. Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3608-3613.

Pedersen, A. L., O. Nybroe, A. Winding, F. Ekelund y L. Bjornlund. 2009. Bacterial feeders, the nematode *Caenorhabditis elegans* and the flagellate *Cercomonas longicauda*, have different effects on outcome of competition among the *Pseudomonas* biocontrol strains CHA0 and DSS73. *Microb Ecol* 57:501-509.

Pegoraro, M. y E. Tauber. 2011. Animal clocks: a multitude of molecular mechanisms for circadian timekeeping. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:312-320.

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.

Pennartz, C. M., M. T. de Jeu, N. P. Bos, J. Schaap y A. M. Geurtsen. 2002. Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock. *Nature* 416:286-290.

Peschel, N. y C. Helfrich-Forster. 2011. Setting the clock--by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 585:1435-1442.

Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne y H. Nielsen. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785-786.

Petrillo, E., S. E. Sanchez, A. R. Kornblihtt y M. J. Yanovsky. 2011. Alternative splicing adds a new loop to the circadian clock. *Commun Integr Biol* 4:284-286.

Pezza, R. J., A. M. Smania, J. L. Barra y C. E. Argarana. 2002. Nucleotides and heteroduplex DNA preserve the active conformation of *Pseudomonas aeruginosa* MutS by preventing protein oligomerization. *Biochem J* 361:87-95.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.

Pittendrigh, C. S. 1954. On Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40:1018-1029.

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.

Pittendrigh, C. S. 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 55:16-54.

Powell-Coffman, J. A. 2010. Hypoxia signaling and resistance in *C. elegans*. *Trends Endocrinol Metab* 21:435-440.

Powell-Coffman, J. A., C. A. Bradfield y W. B. Wood. 1998. *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2844-2849.

Prahlad, V., T. Cornelius y R. I. Morimoto. 2008. Regulation of the cellular heat shock response in *Caenorhabditis elegans* by thermosensory neurons. *Science* 320:811-814.

Qian, H., B. Hu, S. Yu, X. Pan, T. Wu y Z. Fu. 2012. The effects of hydrogen peroxide on the circadian rhythms of *Microcystis aeruginosa*. *PLoS One* 7:e33347.

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

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.

Renner, M. 1960. The contribution of the honey bee to the study of time-sense and astronomical orientation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25:361-367.

Rensing, L. y C. Monnerjahn. 1996. Heat shock proteins and circadian rhythms. *Chronobiol Int* 13:239-250.

Reppert, S. M. y D. R. Weaver. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.

Richter, S. 1993. Phoretic association between the dauerjuveniles of *Rhabditis stammeri* (Rhabditidae) and life history stages of the burying beetle *Nicrophorus vespilloides* (Coleoptera: Silphidae). *Nematologica* 39:346-355.

Riddle, D. L. 1988. The nematode *C. elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Riddle, D. L. 1997. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. Riddle, D. L., T. Blumenthal, B. J. Meyer y J. R. Priess. 1997. Introduction to *C. elegans*. en D. L.

Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer y J. R. Priess, editores. *C. elegans* II, Cold Spring Harbor (NY).

Ripperger, J. A., C. Jud y U. Albrecht. 2011. The daily rhythm of mice. *FEBS Lett* 585:1384-1392. Roenneberg, T. y M. Merrow. 2002. "What watch?...such much!" Complexity and evolution of circadian clocks. *Cell Tissue Res* 309:3-9.

Rogers, L. A. y G. R. Greenbank. 1930. The Intermittent Growth of Bacterial Cultures. *J Bacteriol* 19:181-190.

Rohlfing, A. K., Y. Miteva, S. Hannenhalli y T. Lamitina. 2010. Genetic and physiological activation of osmosensitive gene expression mimics transcriptional signatures of pathogen infection in *C. elegans*. *PLoS One* 5:e9010.

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.

Ruijter, J. M., C. Ramakers, W. M. Hoogaars, Y. Karlen, O. Bakker, M. J. van den Hoff y A. F. Moorman. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37:e45.

Ruvkun, G. 1997. Patterning the Nervous System. en D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer y J. R. Priess, editores. *C. elegans* II, Cold Spring Harbor (NY).

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.

Sambrook, J., P. MacCallum y D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3 edition. CSHL Press.

Sanchez, S. E., E. Petrillo, E. J. Beckwith, X. Zhang, M. L. Rugnone, C. E. Hernando, J. C. Cuevas, M. A. Godoy Herz, A. Depetris-Chauvin, C. G. Simpson, J. W. Brown, P. D. Cerdan, J. O. Borevitz, P. Mas, M. F. Ceriani, A. R. Kornblihtt y M. J. Yanovsky. 2010. A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. *Nature* 468:112-116.

Sandrelli, F., R. Costa, C. P. Kyriacou y E. Rosato. 2008. Comparative analysis of circadian clock genes in insects. *Insect Mol Biol* 17:447-463.

Schafer, F. Q. y G. R. Buettner. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30:1191-1212.

Schibler, U. y P. Sassone-Corsi. 2002. A web of circadian pacemakers. *Cell* 111:919-922.
Schlimme, W., M. Marchiani, K. Hanselmann y B. Jenni. 1999. BACTOX, a rapid bioassay that uses protozoa to assess the toxicity of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65:2754-2757.

Schmidt-Koenig, K., J. U. Ganzhorn y R. Ränvaud. 1991. Orientation in birds. The sun compass. *EXS* 60:1-15.

Schnider-Keel, U., A. Seematter, M. Maurhofer, C. Blumer, B. Duffy, C. Gigot-Bonnefoy, C. Reimann, R. Notz, G. Defago, D. Haas y C. Keel. 2000. Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J Bacteriol* 182:1215-1225.

Schulte, F. 1989. The association between *Rhabditis necromena* Sudhaus and Schulte, 1989 (Nematoda: Rhabditidae) and native and introduced millipedes in South Australia. *Nematologica* 35:82-89.

Schwartz, M. S., J. L. Benci, D. S. Selote, A. K. Sharma, A. G. Chen, H. Dang, H. Fares y O. K. Vatamaniuk. 2010. Detoxification of multiple heavy metals by a half-molecule ABC transporter, HMT-1, and coelomocytes of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 5:e9564.

Siddiqui, I. A., D. Haas y S. Heeb. 2005. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl Environ Microbiol* 71:5646-5649.

Sidow, A. y W. K. Thomas. 1994. A molecular evolutionary framework for eukaryotic model organisms. *Curr Biol* 4:596-603.

Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82:291-295.

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.

Snodgrass-Belt, P., J. L. Gilbert y F. C. Davis. 2005. Central administration of transforming growth factor- α and neuregulin-1 suppress active behaviors and cause weight loss in hamsters. *Brain Res* 1038:171-182.

Solomon, A., S. Bandhakavi, S. Jabbar, R. Shah, G. J. Beitel y R. I. Morimoto. 2004. *Caenorhabditis elegans* OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyperosmotic environments. *Genetics* 167:161-170.

Soriano, M. I., B. Roibas, A. B. Garcia y M. Espinosa-Urgel. 2010. Evidence of circadian rhythms in non-photosynthetic bacteria? *J Circadian Rhythms* 8:8.

Stergiou, L., R. Eberhard, K. Doukoumetzidis y M. O. Hengartner. 2011. NER and HR pathways act sequentially to promote UV-C-induced germ cell apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* 18:897-906.

Sudhaus, W. y D. Fitch. 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of the rhabditidae (nematoda). *J Nematol* 33:1-70.

Sudhaus, W. y F. Schulte. 1989. *Rhabditis* (*Rhabditis*) *necromena* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae) from South Australian diplopoda with notes on its sibling *R. myriophila* Poinar, 1986 and *R. caulleryi* Maupas, 1919. *Nematologica* 35:15-24.

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

Sullivan, J. M., M. C. Genco, E. D. Marlow, J. L. Benton, B. S. Beltz y D. C. Sandeman. 2009. Brain photoreceptor pathways contributing to circadian rhythmicity in crayfish. *Chronobiol Int* 26:1136-1168.

Sweeney, B. M. y J. W. Hastings. 1960. Effects of temperature upon diurnal rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25:87-104.

Takahashi, J. S. y P. L. Lowrey. 2011. Genetics of Circadian Rhythms in Mammalian Model Organisms. en S. Brody, editor. *The Genetics of Circadian Systems*.

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., S. Mahajan-Miklos y F. M. Ausubel. 1999a. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:715-720.

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

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.

Tomchik, S. M. y R. L. Davis. 2008. Cyclic AMP imaging sheds light on PDF signaling in circadian clock neurons. *Neuron* 58:161-163.

Tomioka, K. y A. Matsumoto. 2010. A comparative view of insect circadian clock systems. *Cell Mol Life Sci* 67:1397-1406.

Treinin, M., J. Shliar, H. Jiang, J. A. Powell-Coffman, Z. Bromberg y M. Horowitz. 2003. HIF-1 is required for heat acclimation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Genomics* 14:17-24.

Trent, C., N. Tsuing y H. R. Horvitz. 1983. Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 104:619-647.

Tvermoes, B. E., W. A. Boyd y J. H. Freedman. 2010. Molecular characterization of *numr-1* and *numr-2*: genes that increase both resistance to metal-induced stress and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 123:2124-2134.

Uchida, Y., J. Hirayama y H. Nishina. 2010. A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses. *Biol Pharm Bull* 33:535-544.

Ueda, H. R., S. Hayashi, W. Chen, M. Sano, M. Machida, Y. Shigeyoshi, M. Iino y S. Hashimoto. 2005. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* 37:187-192.

Valverde, C. y D. Haas. 2008. Small RNAs controlled by two-component systems. *Adv Exp Med Biol* 631:54-79.

Valverde, C., S. Heeb, C. Keel y D. Haas. 2003. RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol* 50:1361-1379.

van den Broek, D., A. W. T. F. Chin, G. V. Bloemberg y B. J. Lugtenberg. 2005. Molecular nature of spontaneous modifications in *gacS* which cause colony phase variation in *Pseudomonas* sp. strain PCL1171. *J Bacteriol* 187:593-600.

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 Raamsdonk, J. M. y S. Hekimi. 2010. Reactive Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Casual Relationship? *Antioxid Redox Signal* 13:1911-1953.

Vanden Driessche, T., J. L. Guisset y G. M. Petiau-de Vries. 2000. The redox state and circadian rhythms. Kluwer Academic, Dordrecht; Boston, MA.

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe y F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.

Vasalou, C., E. D. Herzog y M. A. Henson. 2011. Multicellular model for intercellular synchronization in circadian neural networks. *Biophys J* 101:12-20.

Voisard, C., C. T. Bull, C. Keel, J. Laville, M. Maurhofer y M. Schnider. 1994. Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. en F. O'Gara, D. N. Dowling y B. Boesten editores. *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms*. VCH Verlagsgesellschaft mbH.

Voisard, C., C. Keel, D. Haas y G. Defago. 1989a. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J* 8:351-358.

Voisard, C., C. Keel, D. Haas y G. Defago. 1989b. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J* 8:351-358.

Voisard, C., M. Rella y D. Haas. 1988. Conjugative transfer of plasmid RP1 to soil isolates of *Pseudomonas fluorescens* is facilitated by certain large RP1 deletions. *FEMS Microbiol Lett* 55:9-14.

Wang, D., P. Liu y X. Xing. 2010a. Pre-treatment with mild UV irradiation increases the resistance of nematode *Caenorhabditis elegans* to toxicity on locomotion behaviors from metal exposure. *Environ Toxicol Pharmacol* 29:213-222.

Wang, D., P. Liu, Y. Yang y L. Shen. 2010b. Formation of a combined Ca/Cd toxicity on lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1221-1230.

Wang, X., H. Jia y H. M. Chamberlin. 2006. The bZip proteins CES-2 and ATF-2 alter the timing of transcription for a cell-specific target gene in *C. elegans*. *Dev Biol* 289:456-465.

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.

Wareham, D. W., A. Papakonstantinou y M. A. Curtis. 2005. The *Pseudomonas aeruginosa* PA14 type III secretion system is expressed but not essential to virulence in the *Caenorhabditis elegans*-*P. aeruginosa* pathogenicity model. *FEMS Microbiol Lett* 242:209-216.

Weinshenker, D., A. Wei, L. Salkoff y J. H. Thomas. 1999. Block of an ether-a-go-go-like K(+) channel by imipramine rescues egl-2 excitation defects in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 19:9831-9840.

Wes, P. D. y C. I. Bargmann. 2001. *C. elegans* odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons. *Nature* 410:698-701.

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

Wood, W. B. 1988. *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

WormBase. 2012. Species Available Through WormBase.
<http://www.wormbase.org/species/all#0--10>.

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

Wu, C. H., L. S. Yeh, H. Huang, L. Arminski, J. Castro-Alvear, Y. Chen, Z. Hu, P. Kourtesis, R. S. Ledley, B. E. Suzek, C. R. Vinayaka, J. Zhang y W. C. Barker. 2003. The Protein Information Resource. *Nucleic Acids Res* 31:345-347.

Wu, Y., G. Cao, B. Pavlicek, X. Luo y M. N. Nitabach. 2008. Phase coupling of a circadian neuropeptide with rest/activity rhythms detected using a membrane-tethered spider toxin. *PLoS Biol* 6:e273.

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.

Yang, Z. y A. Sehgal. 2001. Role of molecular oscillations in generating behavioral rhythms in *Drosophila*. *Neuron* 29:453-467.

Ye, B., Q. Rui, Q. Wu y D. Wang. 2010. Metallothioneins are required for formation of cross-adaptation response to neurobehavioral toxicity from lead and mercury exposure in nematodes. *PLoS One* 5:e14052.

Yoshida, Y., H. Iigusa, N. Wang y K. Hasunuma. 2011. Cross-talk between the cellular redox state and the circadian system in *Neurospora*. *PLoS One* 6:e28227.

Yuan, Q., D. Metterville, A. D. Briscoe y S. M. Reppert. 2007. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol Biol Evol* 24:948-955.

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, Y., B. Ye y D. Wang. 2010. Effects of metal exposure on associative learning behavior in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Arch Environ Contam Toxicol* 59:129-136.

Zuber, S., F. Carruthers, C. Keel, A. Mattart, C. Blumer, G. Pessi, C. Gigot-Bonnefoy, U. Schnider- Keel, S. Heeb, C. Reimann y D. Haas. 2003. GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interact* 16:634-644.