

El organismo modelo *Caenorhabditis elegans* en la investigación en cronobiología

María Olmedo

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla.

Los relojes circadianos se encuentran en organismos desde bacterias a humanos, facilitando la organización temporal de los procesos biológicos acomodada a la alternancia de luz/oscuridad que tiene lugar cada día. Dado su nivel de conservación, especialmente como proceso biológico, el enfoque comparativo se ha utilizado con gran éxito en el campo de la cronobiología para identificar los componentes y mecanismos relevantes en el control de los ritmos circadianos. Modelos invertebrados como *Drosophila melanogaster* o microorganismos como *Neurospora crassa* y *Synechococcus elongatus*, entre otros, han contribuido a la comprensión de los ritmos circadianos a nivel molecular desde la década de 1970. Sin embargo, otros organismos modelo se han ido incorporando de forma más tardía al campo de la cronobiología. Tal es el caso del gusano *Caenorhabditis elegans*, organismo modelo fundamental en campos como la biología de desarrollo, la neurobiología y el estudio del envejecimiento.

C. ELEGANS COMO ORGANISMO MODELO

C. elegans es un pequeño nematodo de aproximadamente 1 mm de longitud en su etapa adulta, que en la naturaleza se encuentra creciendo en materia orgánica en descomposición. Ciertas características clave han contribuido a su establecimiento como organismo modelo. Su periodo de desarrollo desde el embrión al adulto dura tres días aproximadamente, en los que *C. elegans* completa el desarrollo embrionario y el postembrionario, compuesto de cuatro estadios larvario (L1-L4). Además, *C. elegans* tiene un patrón de divisiones somáticas estereotípico. Esta característica, junto con su transparencia, permitieron trazar el linaje de cada una de las 959 células somáticas del organismo

adulto. Entre las células somáticas, 302 son neuronas, de las que se han trazado sus conexiones. Tras alcanzar el estado adulto, *C. elegans* vive durante aproximadamente tres semanas en condiciones estándar de laboratorio, haciéndolo también un modelo muy práctico en estudios de envejecimiento.

Aparte de las ventajas obvias de incorporar al campo de la cronobiología un modelo manejable, susceptible de manipulación genética, y que cuenta con numerosos recursos para la comunidad investigadora, hay ciertos procesos del nematodo que han atraído la atención de investigadores interesados en los ritmos biológicos. Por un lado, el proceso de desarrollo posembriionario tiene un carácter marcadamente repetitivo. En cada uno de los estadios larvarios (L1-L4) se produce una alternancia entre un estado de actividad/alimentación y otro de sueño/inanición. Estos dos procesos corresponden respectivamente a periodos de intermuda y de muda. Durante la muda se genera una nueva cutícula, y al final de esta, la larva se libera de la cutícula antigua (ecdysis). Al mismo tiempo, durante la muda, las larvas entran en un estado de quiescencia y dejan de alimentarse. Este estado muestra paralelismos con el sueño de vertebrados y dura aproximadamente un 25% del estadio larvario, recordando a la organización temporal del sueño/vigilia en mamíferos. Además, durante el desarrollo larvario, unos 3700 genes (aproximadamente el 20% del genoma de *C. elegans*) muestra un patrón de expresión oscilatoria. Uno de los genes que oscila es *lin-42*, el homólogo de *period*, gen de ritmo circadiano de *Drosophila*. Finalmente, la progresión del desarrollo larvario está controlada genéticamente y las cuatro fases tienen una duración similar, aumentando los paralelismos con >>>



Imagen 1. *Caenorhabditis elegans*.

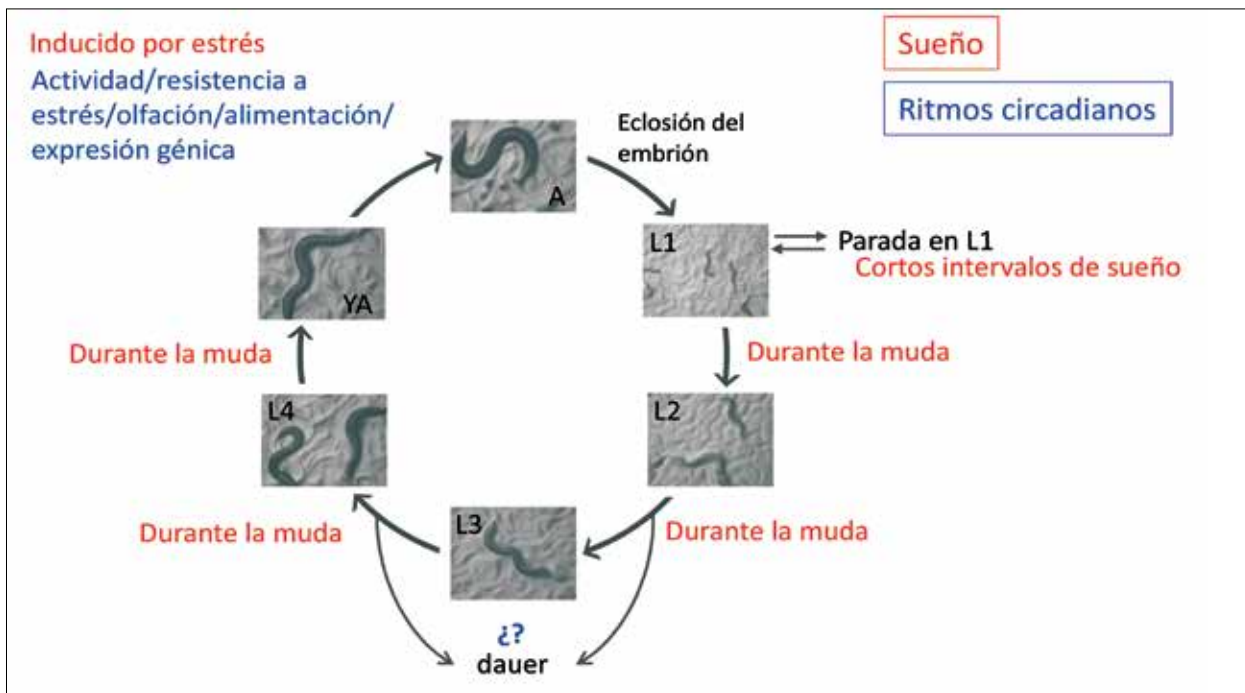


Figura 1

Esquema representativo del ciclo de vida de *C. elegans* en el que se indican las distintas fases en las que se han reportado procesos de sueño (en rojo) o ritmos circadianos (en azul). YA indica adulto joven y A indica adulto.

>>> los ritmos circadianos. Así, tanto el intervalo de sueño como las oscilaciones en la expresión génica están acopladas al proceso de muda de la cutícula, controlado por un reloj endógeno, y muestran una fase fija dentro del ciclo completo que representa el estadio larvario. Sin embargo, el desarrollo larvario carece de al menos una de las propiedades clave del reloj de los sistemas circadianos. La duración de los ciclos del desarrollo larvario varía con la temperatura, mientras que una característica fundamental de los ritmos circadianos es que el periodo de las oscilaciones permanece relativamente constante en un rango fisiológico de temperaturas. Por esta razón, los estudios de ritmos circadianos en *C. elegans*, generalmente se han estudiado fuera del proceso de desarrollo.

RITMOS CIRCADIANOS EN *C. ELEGANS*

Una de las aproximaciones clásicas para la identificación de componentes del reloj circadiano en distintos organismos ha sido la búsqueda de genes homólogos a los genes de reloj circadiano en *Drosophila* o mamíferos. Los homólogos en *C. elegans* de PER y CLOCK/BMAL1, son respectivamente LIN-42 y AHA-1, pero estas proteínas funcionan fundamentalmente en el desarrollo postembrionario. Si *C. elegans* tiene un reloj circadiano basado en proteínas distintas a las de otros organismos, la opción más inmediata para identificar los componentes de dicho reloj sería realizar escrutinios de genética

directa. Para ello, es fundamental tener fenotipos que sean robustos, preferiblemente a nivel de individuo, y ensayos de alto rendimiento que permitan el análisis de un alto número de gusanos en paralelo.

A pesar de la falta de conocimiento sobre el mecanismo del reloj circadiano, se han descrito abundantes características rítmicas en *C. elegans*. Para analizar ritmos circadianos en cualquier organismo, primero hay que sincronizar el reloj circadiano. En mamíferos, la luz es la señal más importante para la sincronización. La luz es transmitida al núcleo supraquiasmático, que marca el ritmo a los tejidos periféricos. Los ciclos de temperatura también sincronizan el reloj circadiano de mamíferos y *Drosophila*. Debido a que *C. elegans* es capaz de responder tanto a la luz como a la temperatura, diversos estudios han utilizado ciclos de luz/oscuridad, ciclos de temperatura, o combinaciones de ambos para provocar el encarrilamiento del reloj circadiano de los nematodos.

Las oscilaciones en la actividad locomotora son un importante indicador de ritmos circadianos, y se usan de forma rutinaria en mamíferos y *Drosophila*. Esta fue también la primera aproximación exitosa en la búsqueda de ritmos circadianos en *C. elegans*. En 2002, se publicó el primer hallazgo de ritmicidad en la actividad locomotora tras encarrilamiento con ciclos de luz/oscuridad. El análisis se hizo también en

condiciones de curso libre, en este caso en oscuridad continua. Junto a este artículo, se publicó otro en el que se informó de la presencia de ritmos en la resistencia al estrés osmótico en larvas paradas en L1. Este estado se caracteriza por la ausencia de desarrollo, ya que provienen de embriones que han eclosionado en ausencia de comida. Resulta interesante que este es un estado en el que se ha demostrado un papel fisiológico del sueño de *C. elegans*, ya que su supresión durante la parada en L1 lleva a una reducción de la supervivencia de las larvas. El patrón de sueño en L1 es ultradiano, con varios intervalos de sueño por hora.

Tras estos primeros indicios, el grupo de Diego Golombek, en la Universidad Nacional de Quilmes, realizó un esfuerzo importante para automatizar las labores de análisis de la actividad locomotora. Realizando protocolos de encarrilamiento con ciclos de luz y ciclos de temperatura, reportaron ritmicidad en dichas condiciones, así como en condiciones constantes tras el encarrilamiento. El mismo grupo, demostró ritmos circadianos en la alimentación y ritmos diarios, que no se mantenían en condiciones de curso libre, en el consumo de oxígeno y en la síntesis de melatonina. Una característica de los relojes circadianos es que provocan oscilaciones en la expresión génica de forma global. También en *C. elegans*, la expresión de un gran grupo de genes muestra patrones de regulación por ciclos de luz, temperatura, y también oscilaciones circadianas en condiciones constantes. Con estos antecedentes, en 2012 informamos de ritmos circadianos en la olfacción, fenómeno anteriormente conservado en *Drosophila* y en ratones, así como en la abundancia de una proteína involucrada en el proceso, y en la hiperoxidación de peroxiredoxinas, un marcador conservado de ritmo circadiano. Todos estos hallazgos fueron esperanzadores, pero tras más de una década de trabajo por parte de varios grupos, todavía carecíamos de ensayos de alto rendimiento para abordar el estudio de los ritmos circadianos de forma automatizada.

En 2016, de nuevo el grupo de Diego Golombek, publicó un valioso método basado en el uso de reporteros de bioluminiscencia. El análisis de expresión génica mediante bioluminiscencia también es un método ampliamente utilizado en cronobiología. Este método les permitió mostrar ritmos en ciclos de luz y temperatura y en condiciones constantes. Además, demostraron que el periodo estaba compensado para los cambios en temperatura, y que la fase durante el encarrilamiento se podía reajustar. Finalmente, este método permitió demostrar que la mutación de genes codificantes de proteínas involucradas en la recepción de señales de luz y temperatura daba lugar a una importante pérdida de ritmicidad en las poblaciones

analizadas. Lo que es más importante, este método automatizado, abre la puerta a la realización de escrutinios genéticos o de ARN de interferencia para identificar los componentes del elusivo reloj circadiano de *C. elegans*.

Un problema por afrontar sigue siendo la aparente variabilidad entre individuos. Quizás la falta de ritmos robustos podría reflejar cierta prescindibilidad de este proceso en las condiciones en las que se suele analizar. En el campo de la cronobiología, a menudo surgía la duda sobre qué ventajas adaptativas ofrecería un reloj circadiano a un organismo que se encontraba en el suelo. La investigación de poblaciones naturales por parte del equipo de Marie-Anne Félix (Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Paris) han contribuido a comprender mejor la ecología de *C. elegans*, que en la actualidad ya no se describe como un nematodo del suelo, al encontrarse fundamentalmente en materia orgánica como flores, frutas y tallos en estado de descomposición. Es interesante, que en estas investigaciones también ha evidenciado que *C. elegans* en la naturaleza se encuentra fundamentalmente en estados de resistencia como son las larvas dauer, un estadio alternativo al L3 que aparece en respuesta a condiciones adversas, o los gusanos parados en L1. Estos estados podrían ser aquellos en los que sea más relevante la adaptación a los ciclos diurnos, y así, el mecanismo del reloj circadiano podría ser más robusto en estas formas de vida. ■

PARA LEER MÁS

- Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. "A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*". Worm-Book. (2015) 18:1-31.
- Goya ME, Romanowski A, Caldart CS, Bénard CY, Golombek DA. "Circadian rhythms identified in *Caenorhabditis elegans* by *in vivo* long-term monitoring of a bioluminescent reporter". Proc Natl Acad Sci USA (2016) 113(48):E7837-E7845.
- Olmedo M, Mero M, Geibel M. "Sleeping Beauty? Developmental Timing, Sleep, and the Circadian Clock in *Caenorhabditis elegans*". Adv Genet. (2017) 97:43-80.
- Olmedo M, O'Neill JS, Edgar RS, Valekunja UK, Reddy AB, Mero M. "Circadian regulation of olfaction and an evolutionarily conserved, nontranscriptional marker in *Caenorhabditis elegans*". Proc Natl Acad Sci USA. (2012) 109(50):20479-84.
- Trojanowski NF, Raizen DM. "Call it Worm Sleep". Trends Neurosci. (2016) 39(2):54-62.
- Van Der Linden AM, Beverly M, Kadener S, Rodriguez J, Wasserman S, Rosbash M, Sengupta P. "Genome-wide analysis of light- and temperature-entrained circadian transcripts in *Caenorhabditis elegans*". PLoS Biol. (2010) 8(10):e1000503.