Facultad de Medicina
Centro de Investigaciones Biomédicas

"Análisis genético de la regeneración neuronal en diapausa en *C. elegans*"

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Mauricio Andrés Caneo Contreras

Director de Tesis: Andrea Calixto Mohor

Supervisor Programa: Mario Parraga San Román

Fecha: 1 de Marzo 2016

Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Programa de Magíster en Ciencias Médicas

Mención Biología Celular y Molecular

"Análisis genético de la regeneración neuronal en diapausa en *C. elegans*"

Mauricio Andrés Caneo Contreras

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión de la Directora de Tesis Andrea Calixto Mohor en el laboratorio de Neurobiología y Comportamiento, Universidad Mayor, aprobado por los miembros de la Comisión.

Dr. Andrea Calixto Mohor
Directora de Tesis

Dr. Andrés Stutzin
Comisión Evaluación Tesis. Profesor Informante

Dr. John Ewer
Comisión Evaluación Tesis. Profesor Informante

Dr. Mario Párraga San Román
Comisión Evaluación Tesis. Profesor Patrocinante

Valparaíso, Chile. 2016

ABREVIATURAS

- L1, L2, L3, L4: Del inglés : "Larval stage" (1, 2, 3, 4)
- Larva dauer: Estado alternativo del desarrollo en *C. elegans.*
- AVM: Del inglés: Anterior Ventral Microtubule (neurona mecanosensorial).
- ALM: Del inglés: Anterior Lateral Microtubule (neurona mecanosensorial).
- PLM: Del inglés: Posterior Lateral Microtubule (neurona mecanosensorial).
- PVM: Del inglés: Postertior Ventral Microtubule (neurona mecanosensorial).
- ENaC: Canal epitelial de sodio.
- MEC-4: Subunidad formadora del poro del canal mecanotransductor MEC-4.
- MEC-5: Isoforma de colágeno.
- MEC-1: Proteína de la matriz extracelular.
- MEC-2: Proteína citosolica tipo-estomatina.
- MEC-9: Proteína de la matriz extracelular.
- MEC-10: Subunidad del canal iónico MEC-4.
- MEC-6: Proteína transmembrana tipo-peroxidasa.
- MEC-7: α tubulina.
- MEC-12: β tubulina.
- MEC-4(d): Mutación (valina-treonina), en la sub unidad MEC-4
- DAF-2: Receptor de tipo insulínico.
- DAF-16: Factor transcripcional.
- AKT-1: Proteína quinasa de la vía DAF-2/DAF-16.
- AKT-2: Proteína quinasa de la via DAF-2/DAF-16.
- APP-1: Amino-peptidasa P.
- AGE-1: Ortólogo de la proteína PI3K (vía DAF-2/DAF-16).
- Pad de agarosa: Porta objetos preparado con una capa de agarosa a 2% para visualización de animales.
- AxW: Categoría morfológica neuronal "Axon Wild Type".
- AxG: Categoría morfológica neuronal "Axon Growing".
- AxB: Categoría morfológica neuronal "Axon Beaded".
- AxTL: Categoría morfológica neuronal "Axon Truncated Long".
- AxT: Categoría morfológica neuronal "Axon Truncated".
- AxØ: Categoría morfológica neuronal "Axon Degenerated".
- SoW: Categoría morfológica neuronal "Soma Wild Type".

- SoV: Categoría morfológica neuronal “Soma Vacuolated”.
- SoØ: Categoría morfológica neuronal “Soma Degenerated”.
- Medio LB: Medio Luria Bertani.
- NGM: Del inglés: “Nematode Growth Media”.

ÍNDICE

Abreviaturas III-IV

Índice V-VI

Índice figuras VII

1. Resumen8

2. Introducción 9

    2.1. *Caenorhabditis elegans* 9

    2.2. Degenerinas 11

        2.2.1 Complejo mecanotransductor MEC-412

    2.3. Diapausa 16

        2.3.1 Protección neuronal en dauer 20

    2.4. Regeneración neuronal 20

3. Materiales y métodos 26

    3.1. Mantención de animales 26

    3.2. Preparación del medio NGM 26

    3.3. Sincronización de animales 26

    3.4. Mutagénesis y revisión de animales mutantes 27

    3.5. Criterios para la evaluación neuronal de los animales 28

        3.5.1. Categorías 28

            3.5.1.1. Morfología axonal 28

    3.6. Análisis estadistico 29

    3.7. Protocolo de determinación de la larva dauer y su seguimiento 29

        3.7.1. Determinación de la larva dauer 29

        3.7.2. Seguimiento de la larva dauer 30

        3.7.3. Medidas para evitar la contaminación 31

    3.8. Prueba de respuesta al tacto 32

    3.9. Experimento de curso temporal de la degeneración axonal 32

    3.10. Experimento con mutantes sensibles a la temperatura 33

    3.11. Experimento de restricción dietaria 33

4. Resultados 34

    4.1. La diapausa promueve la regeneración morfológica y funcional de las neuronas degeneradas en el modelo *mec-4d* 34

    4.2. La regulación negativa del receptor de insulina DAF-2 otorga

    protección y regeneración axonal que es menor a la lograda en diapausa 37

    4.3. La restricción dietaría protege pero no causa regeneración los axones dañados 39

4.4. DLK-1 es requerido para la regeneración de la neurona AVM en diapausa y tiene un desconocido rol en la degeneración axonal así como en el desarrollo de la neurona AVM 40

4.5. Análisis genético para descubrir la red de genes involucrados en regeneración axonal en diapausa 42

4.6. Esquema conceptual de resultados 43

5. Discusión44

5.1. Regeneración neuronal en diapausa 45

5.2. DLK-1 tiene un rol fundamental en la regeneración axonal observada en la larva dauer 46

5.3. Restricción dietaria y vías asociadas 47

5.4. Modelo integrativo de regeneración en diapausa 47

6. Conclusión 49

7. Proyecciones 50

8. Bibliografía 51

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Diagrama del ciclo de vida de *C. elegans*11
Figura 2. Circuito del tacto suave12
Figura 3. Esquema de asociación y funcionamiento del canal MEC-413
Figura 4. Modelo degeneración neuronal canal MEC-4d14
Figura 5. Degeneración neuronal progresiva en modelo *mec-4d*15
Figura 6. Vía de señalización de DAF-2 que regula entrada en dauer19
Figura 7. Expresión de genes regenerativos y antiregenerativos durante la diapausa21
Figura 8. Vías de activación de DLK-1 para promover la regeneración axón23
Figura 9. Genes candidatos para actuar en regeneración 24
Figura 10. Categorías morfológicas axonales29
Figura 11. Protocolo de restricción dietaria 34
Figura 12. Análisis de la morfología de la neurona AVM, luego del ingreso a diapausa 36
Figura 13. Inactivación de DAF-2 promueve la protección y regeneración axonal en animales no-dauer 38
Figura 14. Restricción dietaría genera protección en la neurona AVM, pero no causa regeneración 40
Figura 15. DLK-1 es esencial para la regeneración observada en diapausa, y tiene un desconocido rol en la degeneración y normal desarrollo de la neurona AVM 41-42
Figura 16. Análisis genético para descubrir genes involucrados en la regeneración en diapausa 43
Figura 17. Esquema conceptual y resumen de resultados 44
Figura 18. Modelo regenerativo en dauer 49

1. Resumen.

Cuando los animales con la capacidad de entrar en estados de dormancia enfrentan la falta de alimento, decrecen su metabolismo, minimizan su consumo de energía y sobreviven gracias a sus reservas de grasas. El hipometabolismo está asociado a cambios en la expresión de genes y en la actividad enzimática. En respuesta a la falta de alimento el nemátodo *Caenorhabditis elegans,* detiene su desarrollo normal y entra en diapausa, formando la larva dauer, lo cual está acompañado de cambios dramáticos en su morfología y metabolismo que le permiten sobrevivir hasta cuatro meses sin alimento. En este trabajo descubrimos que la formación de diapausa protege y regenera, tanto morfológica como funcionalmente las neuronas sensoriales de *C. elegans* que han sido inducidas a morir por la hiperactivación de la degenerina *mec-4d*. Estudios previos han demostrado que la disminución en la regulación del receptor de la insulina DAF-2 durante la diapausa, y la activación de DAF16/FOXO causa neuroprotección. Para evaluar si la regulación negativa de DAF-2 en diapausa tiene un efecto regenerativo, seguimos el comportamiento axonal del doble mutante, *daf-2; mec-4d*. En estos animales observamos un efecto regenerativo, pero que fue menor al observado en dauer, sugiriendo que existen otros actores en el proceso regenerativo durante diapausa. Otro fenómeno propio de la diapausa es la restricción calórica, por lo cual evaluamos su efecto en la regeneración axonal. Los animales expuestos a regímenes de restricción calórica presentaron un potente efecto protector, sin embargo no observamos regeneración de los axones dañados. Basándonos en análisis de microarreglos de DNA que compararon la expresión génica de animales dauer versus no dauer, nos enfocamos en analizar los genes que han sido previamente reportados como regenerativos. DLK-1, uno de los principales reguladores de la regeneración, esta elevado durante la diapausa. DLK-1 actúa mediante la activación de vías asociadas a quinasas p38 y *jnk.* Considerando esto, evaluamos DLK-1 en nuestro modelo de degeneración *mec-4d,* generando un animal con ambas mutaciones *mec-4d* y *dlk-1.* Estos animales fueron incapaces de regenerar sus axones. Sin embargo, el 50% de ellos tuvieron axones normales al momento de entrar en dauer, en contraste con el 8-10% de los animales no dauer, indicándonos un efecto regenerativo dauer dependiente, independiente de DLK-1. Ante estos resultados realizamos una mutagénesis sobre animales *mec-4d* con el objetivo de encontrar genes o una red de genes involucrados en la regeneración axonal.

2. Introducción.

2.1. *Caenorhabditis elegans.*

C. *elegans* es un nemátodo de vida libre, bacterívoro, de 1 mm de longitud y 80 µm de diámetro en la adultez. Fue introducido como modelo de estudio por Sydney Brenner en 1974, con el objetivo de estudiar el desarrollo del sistema nervioso central y los mecanismos genéticos que lo subyacen (Brenner, 1974). En la actualidad *C. elegans* es ampliamente utilizado para el estudio de una gran variedad de procesos biológicos incluyendo la señalización celular, el metabolismo y el envejecimiento (Riddle et al., 1997). *C. elegans* es principalmente hermafrodita, con apariciones espontáneas de machos de un 0.2% por generación, asociado a la no disyunción del cromosoma X (Hodgkin et al., 1979). Su ciclo de vida bajo condiciones de laboratorio (alimentándose con *E. coli* OP50, en placas de agar, a 20°C) es de tres días y medio, desde su etapa embrionaria pasando por 4 estadios larvales, desde L1 hasta L4, hasta llegar a la adultez y gravidez (**fig. 1**). Bajo estas condiciones, los gusanos silvestres (N2) viven alrededor de tres semanas (Brenner, 1975), pero frente al estrés ambiental tal como sobrepoblación, falta de alimento y altas temperaturas, pueden arrestar su desarrollo y formar la larva dauer, donde la sobrevivencia aumenta hasta los 4 meses. Esto es posible gracias a cambios genéticos, físicos y metabólicos que permiten al animal resistir las adversas condiciones ambientales (Cassada & Russell, 1975). Cada hermafrodita puede generar una progenie de 300 animales, y con la presencia de un macho esta puede aumentar hasta 1200 (Hodgkin, 1988). *C. elegans* es translúcido y puede ser examinado a nivel celular *in vivo*, observándose los núcleos de cada célula mediante la utilización de microscopía de contraste de interferencia diferencial Nomarski. Esto permitió el estudio completo del proceso de división celular desde el huevo fertilizado hasta la adultez del animal (Sulston & Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). Además de una completa descripción anatómica, el linaje celular está caracterizado, conociéndose el destino físico de cada una de las células (Sulston & Horvitz, 1977). *C. elegans* tiene 1062 células somáticas, de las cuales 302 son neuronas, con un patrón de conexiones sinápticas conocido e invariante (White JG et al., 1986). Este conocimiento ha permitido establecer circuitos neuronales asociados a diversos comportamientos tales como la mecanosensación (Chalfie et al., 1985). Otras ventajas del modelo son el uso de marcadores fluorescentes, que permite observar

células individuales, facilitando el seguimiento y observación de procesos degenerativos y regenerativos. Debido a la auto fertilización de los hermafroditas, su linaje es invariable (Brenner, 1973; Byerly et al., 1976; Sulston et al., 1983; Wood, 1988; Lewis & Fleming, 1995). La utilización de machos permite generar mayor variabilidad genética, así como la generación de dobles mutantes, y la limpieza genética de una cepa después de haberla mutado (Ward y Carrel, 1979). Adicionalmente, *C. elegans* es un potente modelo para la manipulación genética ya sea por mutagénesis (Brenner, 1973) o usando RNA de interferencia (Fire et al.1998; Fraser et al., 2000; Kamath et al., 2003). Además, existen cepas mutantes con alteraciones en una gran variedad de comportamientos y fenotipos, que están disponibles para la comunidad (http://biosci.umn.edu/CGC/CGChomepage.htm).

A pesar de la simplicidad de su anatomía, *C. elegans* realiza una gran variedad de comportamientos tales como locomoción, alimentación, defecación, postura de huevos, respuesta sensorial al tacto, olfato, gusto y temperatura, así como complejos comportamientos como apareamiento, aprendizaje y la entrada a dauer (Rankin et al., 2002; De bono et al., 2003; Cassada y Russell, 1975). Esto hace de *C. elegans* un excelente modelo no solo para el descubrimiento de genes y sus funciones asociadas, sino que además para entender los mecanismos moleculares que subyacen cada uno de estos fenómenos.

Junto a su accesibilidad como modelo de estudio, la comunidad de investigadores que trabaja con *C. elegans* tiene diversos recursos online a su disposición. Las principales fuentes de datos son Wormbase (http://www.wormbase.org) y Wormatlas (http://www.wormatlas.org) que entregan información actualizada sobre genes individuales: patrones de expresión génica, fenotipos mutantes, ontología génica, función de proteínas e información sobre más de 5500 interacciones proteicas (http://vidal.dfci.harvard.edu), entre otros. Asimismo el *Caenorhabditis* Genetics Center (http://biosci.umn.edu/CGC/CGChomepage.htm), almacena una gran variedad de cepas mutantes disponibles a la comunidad para facilitar el uso y manejo de *C. elegans.*

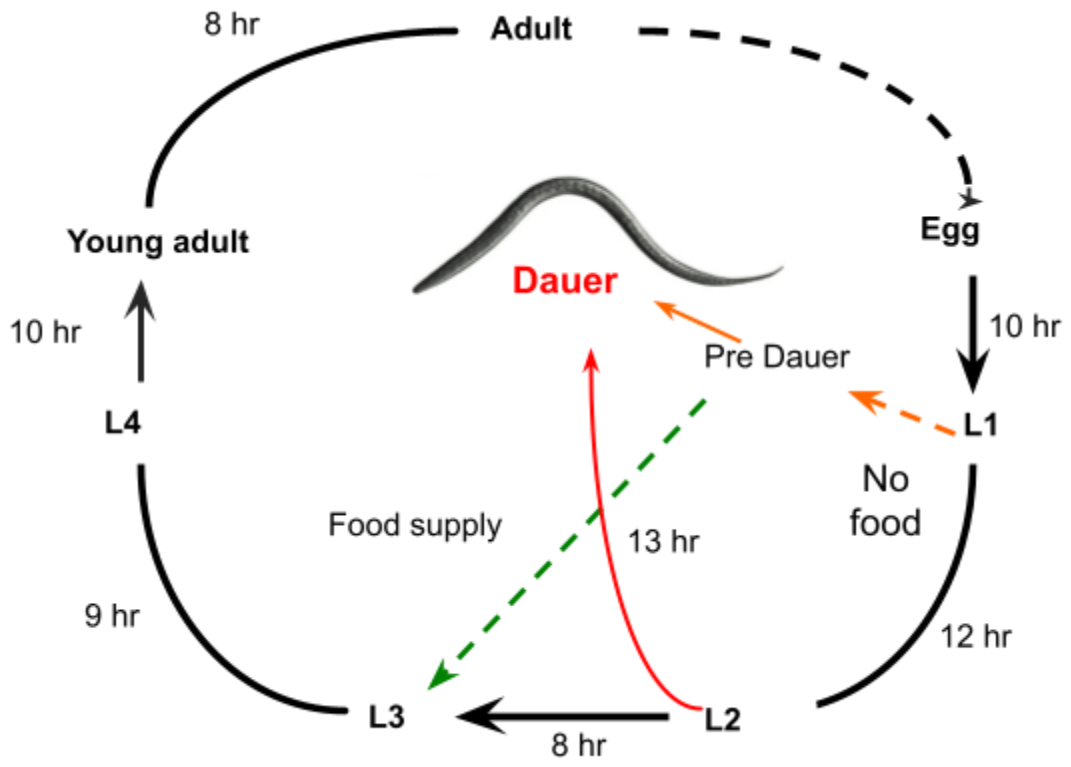


Figura 1. Diagrama del ciclo de vida de *C. elegans*. Se observa el tiempo promedio que dura cada cambio larval en el desarrollo de *C. elegans.* La larva dauer se forma cuando las condiciones ambientales no son adecuadas para el desarrollo del animal, tales como sobrepoblación, falta de comida y altas temperaturas.

2.2. Degenerinas.

C. *elegans* posee un sistema nervioso compuesto por 302 neuronas (Sulston et al., 1983), divididas en dos grandes grupos: sistema nervioso somático (282 neuronas) y faríngeo (20 neuronas). *C. elegans* depende de 6 neuronas sensoriales para detectar el tacto suave, las cuales responden a estímulos como la composición del terreno en el cual se desplaza, animales circundantes, y además le permite escapar de posibles depredadores (Chalfie et al., 1985, Pirri & Alkema, 2012, **fig. 2**). Las neuronas que conforman este circuito son denominadas células microtubulares por su composición intracelular de protofilamentos (Chalfie et al., 1979). Cuatro mecanoreceptores se ubican lateralmente, dos en la mitad anterior del animal (ALMR y ALML), dos en la mitad posterior (PLMR y PLML), y dos se ubican ventralmente, la AVM (microtúbulo anterior ventral) en la mitad anterior y la PVM (microtúbulo ventral posterior) en la

mitad posterior (**fig. 2**). Las cuatro neuronas laterales son de origen embrionario, mientras que las neuronas ventrales son generadas post-embrionariamente (Chalfie & Sulston 1981, Chalfie & Sulston 1985). De esta manera, y por su distribución anatómica, las 6 neuronas del tacto abarcan todo el animal, lo cual lo faculta para censar con todo su cuerpo los estímulos mecánicos suaves, y responder con cambios en la dirección y velocidad del movimiento (Chalfie et al., 1985).

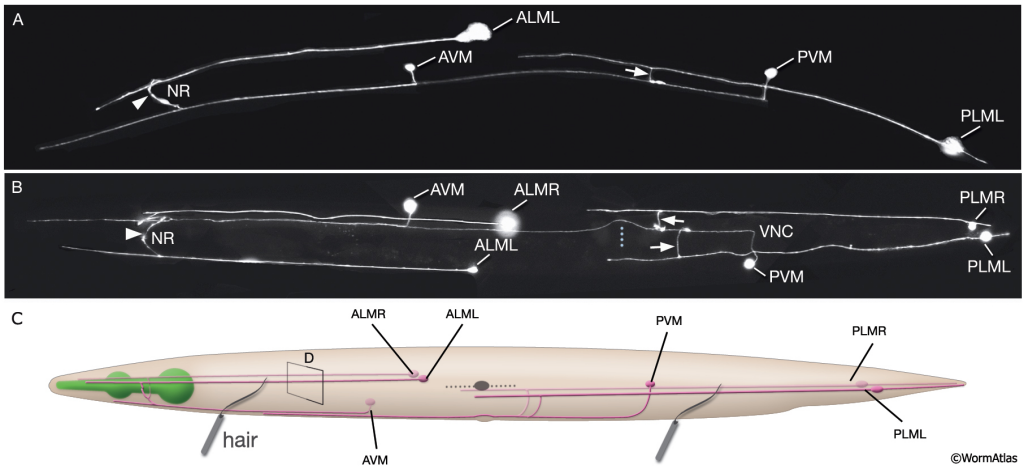


Figura 2. Circuito del tacto suave

Circuito del tacto suave formado por 6 neuronas mecanosensoras, AVM, PVM, PLM y ALM. **a.** Ubicación espacial de las 6 neuronas y **b.** la manera en que están conectadas. Su distribución le permite cubrir todo el cuerpo del animal. **c.** Representación grafica de las neuronas respecto de los puntos de estimulación para el tacto suave. Imagen extraída de www.wormatlas.org.

2.2.1 Complejo mecanotransductor MEC-4

Para entender las bases moleculares de la mecanotransducción, se realizaron mutagénesis saturantes y posterior análisis de animales que perdieran la habilidad de responder al tacto suave (Chalfie & Au, 1989). Los candidatos que se encontraron fueron denominados *mec* (por **mec**hanosensory defective), y codifican proteínas que forman parte del complejo mecanotransductor, proteínas de la matriz extracelular, factores de transcripción, reguladores de *splicing* alternativo, entre otros. Los principales elementos del complejo mecanotransductor son las subunidades MEC-4 (Driscoll & Chalfie 1991, Lai C et al., 1996) y MEC-10 (Huang & Chalfie 1994) pertenecientes a la familia de Degenerinas/Canales epiteliales de sodio (DEG/ENaC).

MEC-4 se expresa exclusivamente en las 6 neuronas del tacto (Mitani et al., 1993) y MEC-10 se encuentra en las 6 neuronas del tacto y en las neuronas FLP L/R y PVD L/R, que median la respuesta al estiramiento (Huang & Chalfie 1994). Los dominios extracelulares de ambas proteínas están asociados a una especializada matriz extracelular específica de las células del tacto. Esta matriz esta formada por MEC-5, isoforma de colágeno (Du H-P et al., 1996); MEC-9, proteína con múltiples sitios EGF (Du et al., 1996), y MEC-1, con varios dominios Kunitz (Emtage et al., 2004). MEC-1 facilita la acumulación de MEC-5, y une los procesos de los receptores del tacto con la cutícula del animal (Emtage et al., 2004). Los dominios intracelulares de MEC-4 están asociados a los microtúbulos, MEC-12 y MEC-7, α y β tubulina respectivamente, mediante la acción de MEC-2, una proteína tipo estomatina, con dominios PHB (Goodman et al., 2002; Zhang et al, 2005). MEC-6, proteína de transmembrana con actividad peroxidasa, actúa como una subunidad auxiliar, favoreciendo la actividad del canal MEC-4 (Chelur et al., 2002).

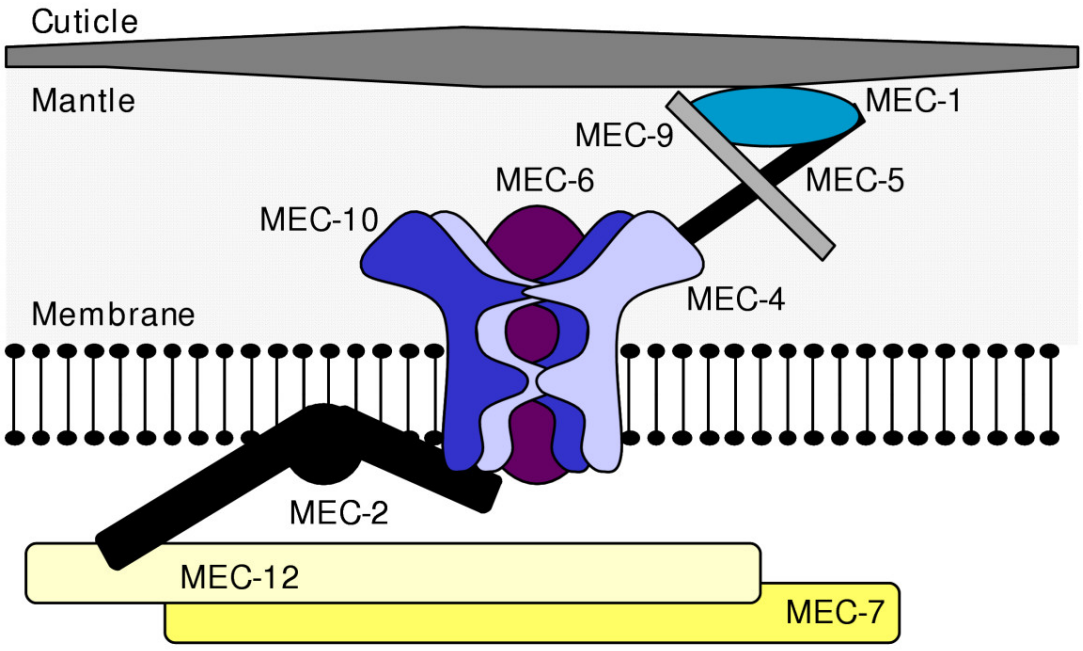


Figura 3. Esquema de asociación y funcionamiento del canal MEC-4.
Ante ausencia de estímulo mecánico el canal se encuentra cerrado. Cuando un estimulo mecanosensitivo es percibido, se abre el canal MEC-4, ingresando Na^{+} y Ca^{2+} al interior de la célula. Imagen extraída de Tavernarakis & Driscoll, 1997.

El estímulo mecánico activa el complejo mecanotransductor, generándose la apertura de este canal y permitiendo el ingreso de Na^+ a la célula (O'Hagan et al., 2005; Bianchi & Driscoll 2004). Esta entrada de Na^+ desencadena la respuesta de la neurona y de esta manera la integración perceptiva del estímulo sensitivo (Tavernarakis & Driscoll, 1997, **fig. 3**).

Estudios realizados sobre el funcionamiento de MEC-4 descubrieron que las mutaciones específicas *e1611*, *u231*, y *u56* en el gen *mec-4*, producen la proteína defectuosa MEC-4(d) y la muerte progresiva en la neuronas del tacto, mediante necrosis (Driscoll & Chalfie., 1991). La mutación *u231* (A713V o A713T) (Driscoll & Chalfie, 1991; Lai C et al., 1996) provoca la apertura constitutiva del canal, favoreciendo el ingreso de Na^+ en altas cantidades al interior de la célula, pero además la entrada de Ca^{2+}, fundamental en el proceso de muerte neuronal (Bianchi et al., 2004). La entrada de Ca^{2+} a través del canal MEC-4d y la posterior salida de más Ca^{2+} del retículo endoplásmico son claves en la muerte neuronal mediada por la mutación *mec-4d* (Bianchi et al., 2004). El Ca^{2+} citoplasmático en altas concentraciones activa proteasas y genera disfunción mitocondrial, lo que desencadena el desmantelamiento y muerte neuronal por necrosis de las neuronas del tacto (Syntichaki et al., 2002, **fig. 4**).

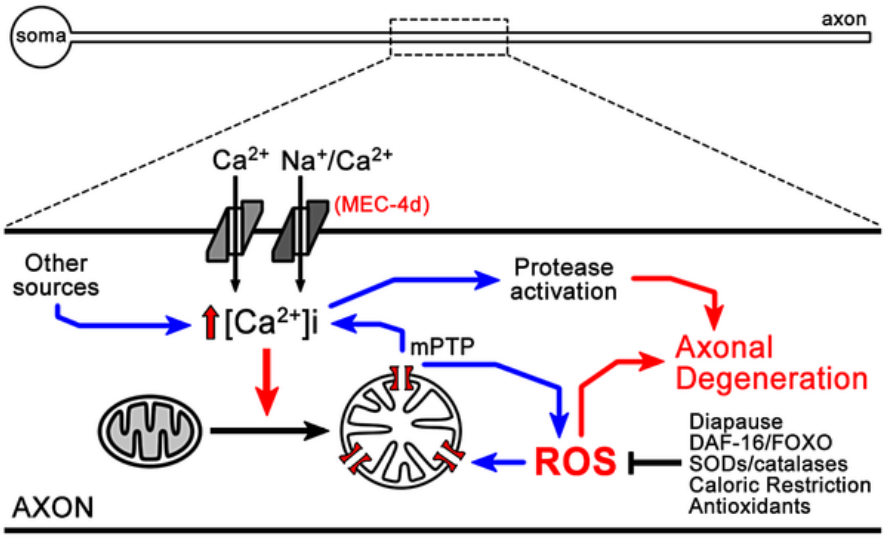
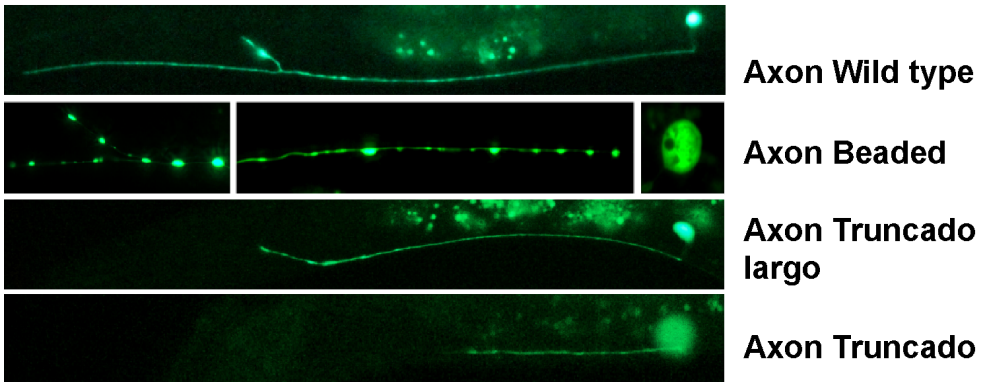


Figura 4. Modelo degeneración neuronal mediado por MEC-4d

La entrada de Ca^{2+} a través MEC-4d desencadena una serie de eventos que conllevan a la destrucción tanto del soma como del axón en las neuronas del tacto. Imagen extraída de Calixto et al. (2012).

La mutación *mec-4d(e1611)* y la expresión específica de GFP en las neuronas mecanoreceptoras son un excelente modelo para la visualización *in vivo* de procesos neurodegenerativos. Las neuronas embrionarias ALM y PLM ya han degenerado cuando el animal eclosiona, mientras que la AVM nace a las 12 horas post-eclosión, permitiendo la visualización completa del proceso degenerativo, desde el nacimiento hasta la muerte (Calixto et al., 2012, **fig. 5**)

A



B

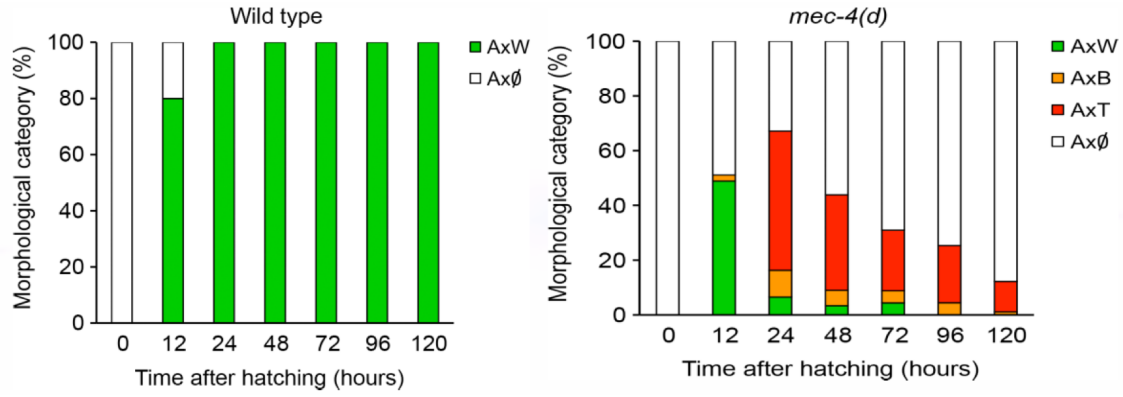


Figura 5. Degeneración neuronal progresiva en el modelo MEC-4d

a. Imagen de las distintas etapas morfológicas de la muerte neuronal inducida por la mutación *mec-4d.* Se puede observar el axón silvestre (verde), en collar (naranjo), truncado (rojo) o sin axón (blanco). **b.** Curva temporal de la degeneración mediada por *mec-4d* desde el nacimiento de la neurona post eclosión hasta 120 horas. Imagen extraída de Calixto et al., 2012.

2.3. Diapausa

La disponibilidad de alimento determina el ritmo de desarrollo, así como el comportamiento y sobrevivencia de los animales. Los animales con capacidad de entrar en estados de dormancia como hibernación o diapausa tienen ventajas evolutivas que le permiten sobrellevar situaciones de estrés ambiental. Estos procesos están asociados a cambios metabólicos en los cuales el consumo y gasto energético disminuyen dramáticamente (Calixto, 2015).

La hibernación está caracterizada por cambios profundos en el metabolismo oxidativo y temperatura corporal (Barnes, 1989), mientras que la diapausa causa arresto en el desarrollo del animal (Hand et al., 2011). Ambos estados requieren de la supresión del metabolismo celular. El hipometabolismo de los animales en dormancia está asociado con cambios en la expresión génica (Wang & Kim, 2003; Jones et al., 2001; Schwartz et al., 2013), cambios en el repertorio proteico de las células (Hindle & Martin, 2013), inhibición selectiva de síntesis proteicas (Storey & Storey, 2004), y cambios en la actividad enzimática (McMullen & Storey, 2008).

En condiciones ambientales desfavorables, tales como falta de alimento, sobrepoblación y altas temperaturas, *C. elegans* tiene la capacidad de entrar en diapausa y detener su desarrollo hasta que las condiciones ambientales sean adecuadas (Cassada & Russell, 1975). Este arresto en el desarrollo es un estadio alternativo a la larva L3. *C. elegans* constitutivamente produce la feromona inductora de dauer o daumona (Jeong PY et al., 2005), la cual se incrementa ante un aumento en la población induciendo que animales en L1 activen las vías metabólicas y reestructuraciones morfológicas necesarias para formar la larva dauer (Fielenbach & Antebi, 2008). Además la feromona dauer actúa como señal positiva para la permanencia en dauer y evitar la salida del mismo, actuando antagónicamente a la comida (Golden & Riddle, 1982). La presencia de alimento suprime la acción de la feromona y promueve la salida de dauer (Golden and Riddle, 1984a; Golden and Riddle, 1984b; Golden and Riddle, 1984c). Una vez tomada la decisión de ingresar en dauer, los animales deben nutrirse con la cantidad necesaria de alimento que servirá de reservas energéticas para el tiempo de permanencia en diapausa. Iniciado el proceso, los animales suprimen completamente el consumo de alimento mediante el cierre del orificio oral, lo cual se produce por la formación de un tapón interno (Riddle et al., 1981). Posteriormente comienza un proceso de constricción radial que le otorga una apariencia muy delgada respecto de los animales L3 (Meléndez et al.,

2003). El musculo faríngeo, que permite el ingreso de alimento y la peristalsis del animal, deja de bombear y se cierra la faringe (Vowels & Tomas 1992). Asimismo, el tracto digestivo sufre modificaciones que lo mantienen en un estado no funcional. La cutícula de los animales dauer es impermeable, lo que le permite sobrevivir la disecación y otras amenazas del medio. Estas modificaciones lo hacen resistente a múltiples insultos ambientales, incluyendo el 1% SDS, lo cual facilita su aislamiento e identificación dentro de la población no dauer de animales (Cassada & Russell, 1975).

El comportamiento de dauer es distinto del resto de los estadios larvales. En los primeros días, tienden a estar muy activos en búsqueda de alimento (Ward, 1973; Cassada and Russell, 1975) y luego se inmovilizan, aunque pueden responder al ser tocados (Cassada & Russell, 1975; Calixto et al., 2012), evidenciando la funcionalidad de las neuronas del tacto y musculatura. Los animales dauer realizan nictación, subiéndose a superficies sobresalientes y ondeando su cuerpo apoyados en la cola (Croll and Matthews, 1977). La nictación les permite ser transportados por insectos hacia lugares con condiciones más favorables para restablecer su desarrollo (Riddle & Albert, 1997).

Desde un punto de vista molecular, la entrada en diapausa es un proceso altamente regulado, depende tanto de la acción inductora de la feromona dauer, como de una compleja red de vías de señalización encargadas de poner en marcha el programa. Mutaciones en estas vías pueden resultar en animales incapaces de formar dauer (dauer defectivos Daf-d), o animales que entran en dauer de manera constitutiva e independiente de las señales ambientales (dauer constitutivo Daf-c). La feromona dauer es detectada por neuronas sensoriales, las cuales son las encargadas de censar la cantidad de feromona y tomar la decisión de entrar en diapausa o seguir el desarrollo normal del animal (Riddle & Albert, 1997; Riddle, 1988). Este proceso es llevado a cabo a través de las vías de señalización de TGFβ (Ren et al., 1996) y cGMP (Birnby et al., 2000). Ambas vías actúan mediante la activación de cascadas de señalización que promueven programas reproductivos y reprimen el arresto en dauer. Sin embargo en condiciones desfavorables, la actividad de TGFβ y cGMP está suprimida permitiendo la activación de programas genéticos asociados con longevidad, resistencia a estrés y entrada en dauer (**fig. 6**). DAF-2, receptor de insulina en *C. elegans* (Kimura et al., 1997), controla la entrada en dauer mediante un mecanismo independiente de la feromona dauer (Gottlieb & Ruvkun, 1994). DAF-2 es un receptor tirosina quinasa, ortólogo del receptor de insulina en humanos,

el cual regula el desarrollo, la respuesta a estrés y la longevidad (Gems, et al. 1998), y regula negativamente el factor de trascripción DAF-16/FOXO (Kenyon et al., 1993; Gottlieb & Ruvkun, 1994). En ambientes favorables, DAF-2 es activado por péptidos similares a la insulina o ILP (insulin like peptides, Wolkow et al. 2002), resultando en la activación de AGE-1/PI3 quinasa y producción de PIP_3 (Morris et al., 1996). En presencia de PIP_3 y la quinasa activadora PDK-1 (Paradis et al., 1999), las quinasas AKT-1,2 y SGK fosforilan DAF-16/FOXO (Paradis & Ruvkun 1998; Hertweck et al. 2004), reteniéndolo en el citoplasma (Henderson & Johnson 2001; Lee et al. 2001; Lin et al. 2001), lo cual es potenciado por las proteínas FTT-2/14-3-3 (Wang et al. 2006; Li et al., 2007). Esto desencadena el crecimiento normal del animal. Bajo condiciones que favorecen el desarrollo de la larva dauer, DAF-2 se inactiva y DAF-16/FOXO se transloca al núcleo, causando la transcripción de genes que favorecen la resistencia al estrés, formación de dauer y longevidad (Paradis & Ruvkun., 1998; **fig. 6**). Finalmente un eje neuroendocrino integra la información de las vías TGFβ, cGMP y DAF-2 y comunica la decisión de entrar o salir de diapausa a tejidos específicos (Chung et al., 2013), dependiente del receptor hormonal nuclear DAF-12 (Antebi et al., 2000). De este modo el cambio metabólico hacia el hipometabolismo es indispensable para la supervivencia de los animales dauer.

Los embriones y las larvas L1 utilizan el ciclo del glioxalato para convertir acetil CoA proveniente de la β-oxidación de los ácidos grasos, en carbohidratos (VB & Burnell, 1990). Cuando los animales transitan a L2, ocurre una restructuración metabólica del ciclo de glioxalato hacia el TCA. La larva dauer, no realiza este cambio metabólico y continua en el ciclo del glioxalato (Wadsworth & Riddle, 1989).

Dauer exhibe un bajo consumo de oxígeno (Vanfleteren & De Vreese, 1996; Houthoofd et al., 2002), un activo ciclo del glioxalato (Vanfleteren & De Vreese, 1996) y actividad enzimática asociada a la oxidación de ácidos grasos, lo cual indica la capacidad de convertir grasas en carbohidratos (VB & Brunell, 1990). El ciclo del glioxalato se encarga de transferir 2 moléculas de acetil-CoA a una molécula de oxaloacetato, y así logra convertir grasas en carbohidratos. Además, la larva dauer tiene la capacidad de metabolizar glicógeno (Braekman et al., 2000), lo cual se corroboró con análisis transcriptómicos en los cuales genes que codifican enzimas claves en este proceso como lo son la piruvato quinasa (PK) y fosfofructoquinasa (PFK) se encontraron con una mayor expresión (Wang & Kim, 2003, VB & Brunell, 1990). Junto con esto, la actividad de AMPK (*aak-2*) regula el consumo de ácidos

grasos lo que permite la viabilidad y longevidad de la larva dauer (Narbonne & Roy, 2009).

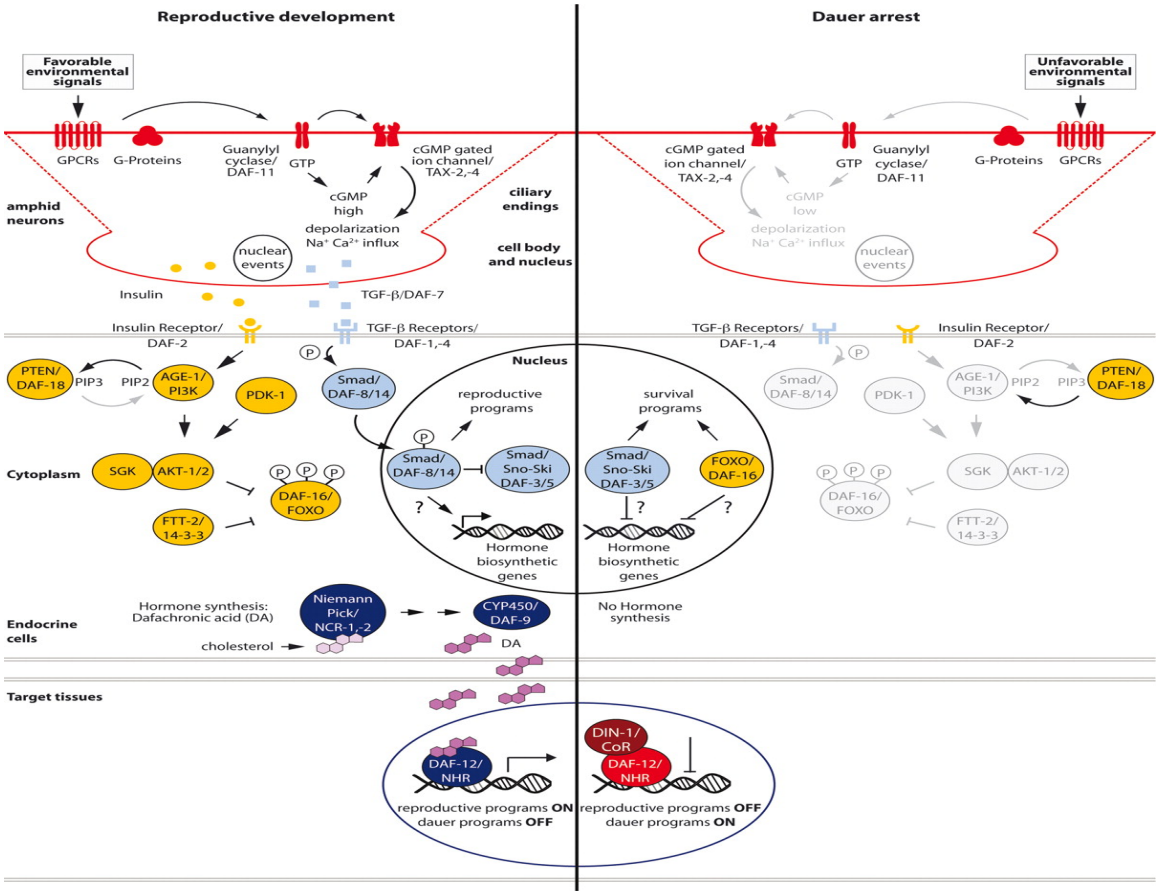


Figura 6. Vía de señalización de DAF-2 que regula entrada en Dauer

Las señales ambientales y alimenticias son detectadas por neuronas sensoriales especializadas. Si el ambiente es el adecuado para continuar el desarrollo normal del animal, se activan vías asociadas a DAF-2 y TGFβ, lo cual desencadena cascadas de señalización que determinan la puesta en marcha de programas de desarrollo normal, apagando los programas dauer. Cuando las condiciones ambientales son poco favorables se inactivan las vías DAF-2 y TGFβ, lo cual activa DAF-16/FOXO y promueve la entrada en dauer. Imagen extraída de Fielenbach & Antebi, 2008.

2.3.1 Protección neuronal en diapausa.

Las neuronas del tacto que expresan *mec-4d* y por tanto degeneran, están protegidas durante la diapausa, incluso si a la entrada en diapausa los axones ya muestran truncaciones (Calixto et al., 2012). Lo interesante es que dicha protección es completamente dauer dependiente, ya que una vez que el animal sale de diapausa la degeneración vuelve a tomar su curso (Calixto et al., 2012). Este efecto observado en dauer está asociado a la inactivación de DAF-2 y la consecuente translocación de DAF-16/FOXO al núcleo, que permite la activación de proteínas tales como superóxido dismutasa y catalasas, lo cual determina una mayor capacidad antioxidativa, promoviendo un ambiente neuroprotector (Calixto et al., 2012). La evaluación individual de mutantes *daf-2* y la restricción dietaría en animales *mec-4d* no dauer, evidenció efectos protectores bajos pero significativos, aunque no fueron comparable con lo observado en dauer (Calixto et al., 2012). Esto sugiere que dauer confiere un amplio abanico de factores, más allá de los mencionados, que favorecen el efecto neuroprotector.

Junto con esto, análisis transcriptomicos realizados mediante microarreglos llevados a cabo por Wang y Kim (2010) permitieron tener ideas de lo que ocurre en dauer a nivel transcriptómico. El análisis de estos datos, revelo que durante la diapausa, genes relacionados con la regeneración axonal, como DLK-1 (Hammarlund et al., 2007) y sus vías de señalización relacionadas, están sobreexpresados, mientras que genes conocidos por ser anti-regenerativos tales como EFA-6 (Chen et al, 2011) se encuentran con una menor expresión (Calixto, 2015, **fig. 7**).

De esta manera, la formación de dauer, mediante cambios metabólicos, genéticos y morfológicos establece un ambiente propicio para la protección y posible regeneración axonal (Calixto, 2015).

2.4. Regeneración neuronal

C. elegans es un modelo potente para el estudio de la regeneración neuronal ya que sus axones son capaces de regenerarse luego de sufrir daño (Yanik et al., 2004). Esto ha hecho posible el uso de estrategias genéticas para investigar los mecanismos que subyacen la respuesta del axón al daño y como esta respuesta permite la formación de un cono de crecimiento (Chisholm, 2013). Los mecanismos intrínsecos

que median la regeneración están conservados a través de las especies (Hammarlund & Jin, 2014).

Regenerative genes ***Upregulated in dauers***			**Antiregenerative genes** **Downregulated in dauers**		
locus	fold change in dauer	ref	locus	fold change in dauer	ref
dlk-1	1,64	Hammarlund et al., 2009	*klp-7*	0,68	Ghosh-Roy et al., 2012
mkk-4	3,43	Nix et al., 2011	*efa-6*	0,81	Chen et al., 2011
pmk-3	2,07	Nix et al., 2011	*pxn-2*	0,70	Chen et al., 2011
mak-2	2,47	Nix et al., 2011	*spon-1*	0,38	Chen et al., 2011
cebp-1	5,18	Nix et al., 2011	*vab-19*	0,61	Chen et al., 2011
mlk-1	1,58	Nix et al., 2011	*sax-3*	0,69	Chen et al., 2011
hif-1	4,89	Nix et al., 2014	*slt-1*	0,85	Chen et al., 2011
daf-16	4,16	Nix et al., 2014	*hda-3*	0,37	Chen et al., 2011
nlg-1	2,93	Nix et al., 2014	rpy-1	0,49	Nix et al., 2014
xbp-1	2,21	Nix et al., 2014	F16A11.2	0,79	Nix et al., 2014
rad-26	2,08	Nix et al., 2014	*lin-42*	0,22	Nix et al., 2014
aak-2	1,98	Nix et al., 2014	*cyy-1*	0,77	Nix et al., 2014
nex-1	1,89	Nix et al., 2014	*hst-3.1*	0,78	Nix et al., 2014
unc-25	1,79	Chen et al., 2011	*snt-5*	0,85	Nix et al., 2014
sli-1	1,76	Nix et al., 2014			
unc-57	1,73	Chen et al., 2011			
dab-1	1,67	Chen et al., 2011			
fos-1	1,56	Nix et al., 2014			
cha-1	1,55	Chen et al., 2011			
unc-17	1,55	Chen et al., 2011			
kap-1	1,51	Chen et al., 2011			

Figura 7. Expresión de genes regenerativos y antiregenerativos durante la diapausa.

Niveles de expresión en dauer de genes regenerativos y anti-regenerativos comparados con el nivel de expresión en animales no dauer. *dlk-1* y la vía p38 están sobreexpresados, así como genes conocidos por su efecto anti-regenerativo como *efa-6* están regulados negativamente. Imagen extraída de Calixto, 2015.

Ante una injuria axonal por axotomía se desencadenan diversos procesos en la zona dañada que colectivamente promueven la transformación del axón afectado en un cono de crecimiento y posteriormente en un axón en proceso de extensión. Una acción temprana es el incremento transitorio en los niveles de Ca^{2+} (Ghosh-Roy et al, 2010) que activa vías de señalización responsables de iniciar los procesos de recrecimiento. Adicionalmente, las reservas internas de Ca^{2+} son liberadas, junto a lo cual se genera flujo de Ca^{2+} a través de canales presentes en la membrana.

Asimismo la propagación de la señal de Ca^{2+} se extiende desde el sitio de daño hasta las zonas más distales causando una activación completa de las vías asociadas al Ca^{2+} actuando de una manera directamente proporcional, ya que a mayor cantidad de Ca^{2+} la regeneración es mayor (Ghosh-Roy et al., 2010; Pinan-Lucarre et al,. 2012). El Ca^{2+} estimula la producción de cAMP, cuyo principal efector es la proteína quinasa A (PKA), que promueve la regeneración (Ghosh-Roy et al., 2010), activando factores de transcripción como CREB (Gao et al., 2004), y provocando modificaciones en el citoesqueleto para la formación del cono de crecimiento (Hur et al., 2012). Los niveles transitorios de Ca^{2+} gatillan cortes de microtúbulos y neurofilamentos promoviendo la inestabilidad del citoesqueleto (Chisholm, 2013). Asimismo la acción de proteínas tales como CED-3 y CED-4/Apaf-1, cuya acción es dependiente de Ca^{2+}, son necesarias para favorecer la regeneración axonal, actuando a nivel del citoesqueleto en la formación del cono de crecimiento. DLK-1, una MAPK3 quinasa, es clave para la regeneración en modelos de axotomía y daño espontáneo de axones (Hammarlund et al., 2007; Hammarlund et al., 2009; Yan et al., 2009). Estudios realizados por Yan y Jin (2012), sugieren que DLK-1 es activada en el mismo lugar y tiempo de la zona de daño, de una manera dependiente de Ca^{2+}. DLK-1 promueve estabilidad de los RNA mensajeros y traducción local de genes regenerativos en la zona de daño (Yan et al., 2009), y controla la dinámica microtubular durante el recrecimiento axonal, así como la formación de conos de crecimiento (Tedeschi & Bradke., 2013). DLK-1 actúa activando simultáneamente las vías de quinasas *jnk* y p38. En la vía p38, DLK-1,genera la activación en cadena de MKK-4 (MAP2K), PMK3 (MAPK), MAK-1 y finalmente CEB-1, una proteína tipo bZip requerida en el proceso de regeneración (Yan et al., 2009, **fig. 8**). En modelos de axotomía la activación de DLK-1/MAK-2 promueve la traducción local de cebp-1 (Yan et al., 2009). En paralelo a la vía p38, la vía *jnk* es activada mediante MLK-1–MEK-1–KGB-1 y FOS-1, promoviendo la regeneración axonal. DLK-1 puede activar ambas vías mediante MKK-4 (p38) y MEK-1 (*jnk*) para inducir regeneración axonal (Hammarlund et al., 2009; Nix et al., 2011).

Estudios genéticos enfocados a identificar genes involucrados en la regeneración axonal han revelado distintos genes que actúan de manera dependiente y parcialmente independiente de DLK-1. Estos estudios identificaron genes relacionados con la dinámica de los microtúbulos, matriz extracelular, neurotransmisión, factores de transcripción, vesículas de transporte y expresión de genes, habiendo genes pro y anti-regenerativos que entre todos crean el balance

adecuado para que la regeneración axonal tome curso (Chen et al., 2011; Nix et al., 2014, **fig. 9**).

En el proceso regenerativo, la estabilidad de microtúbulos en la zona del daño se torna altamente dinámica. DLK-1 actúa reduciendo la afinidad microtubular de KLP-7, una proteína despolimerizadora de microtúbulos en la zona de daño mientras que aumenta la actividad de la carboxipeptidasa citosólica CCPP-6, que modifica la estructura de la α-tubulina a una forma más estable para favorecer el persistente crecimiento axonal (Ghosh-Roy et al., 2012). DLK-1 es regulado negativamente por la ligasa E3 RPM-1, que degrada DLK-1 (Abrams et al. 2008; Nakata et al., 2005). Si bien la perdida de función de *rpm-1* no causa un efecto notorio en potenciar la regeneración (Hammarlund et al., 2009), probablemente ante la activación por daño axonal, la afinidad entre DLK-1 y RPM-1 disminuye para favorecer la acción de DLK-1 (Chisholm, 2013).

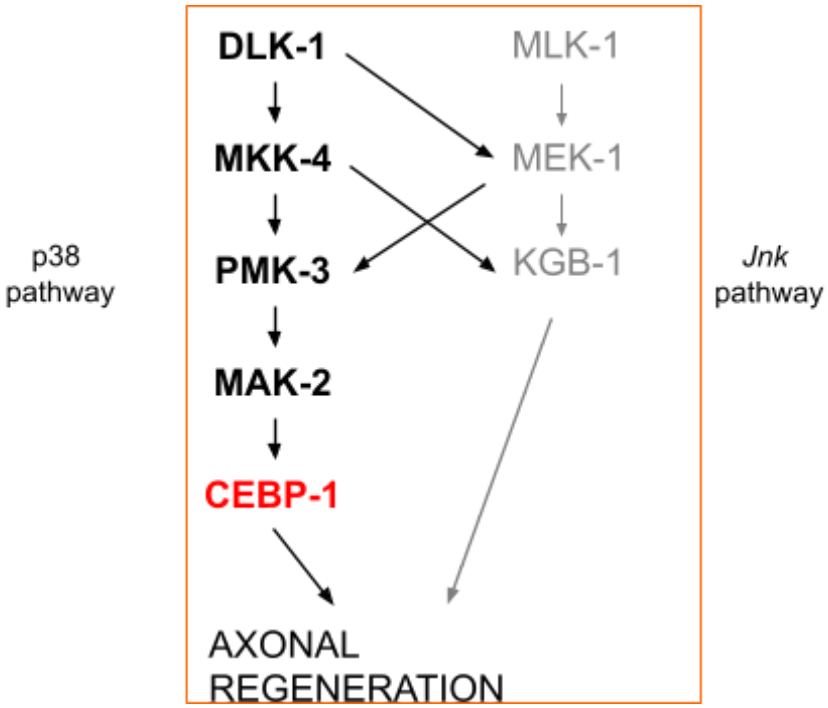


Figura. 8 Vías de activación de DLK-1 para promover la regeneración axonal

La activación de DLK-1 en el sitio del daño causa que la vías p38 y *jnk* se activen con el objetivo de promover la regeneración axonal. Como se observa en la imagen existe una relación cruzada entre ambas vías que favorece la activación conjunta de las vías. Imagen extraída de Calixto, 2015

Junto a DLK-1, la actividad de MLK-1 es importante para activar la vía *jnk* ya que al haber activación cruzada, se favorece la acción de ambas vías. Además MLK-1 es activada por la cascada de factores de crecimiento SVH-1/SVH-2, también requeridos para la regeneración que solo activan a MLK-1 y no DLK-1 (Li et al, 2012).

Además de los efectores positivos de la regeneración, existen proteínas anti-regenerativas. Uno de ellos es EFA-6, miembro de la familia Arf-6, que incluye factores de intercambio de nucleótidos de guanina (Franco et al., 1999) EFA-6 tiene un potente efecto anti-regenerativo, ya que favorece la catástrofe microtubular, alterando la estabilidad de los microtúbulos. La pérdida de función de *efa-6* genera una potenciación de la regeneración axonal en modelos de axotomía (Chen et al., 2011).

Otro factor interesante en el proceso regenerativo está asociado al control que ejercen los microRNA, los cuales influyen en los nivel de regeneración neuronal (Chen et al., 2011).

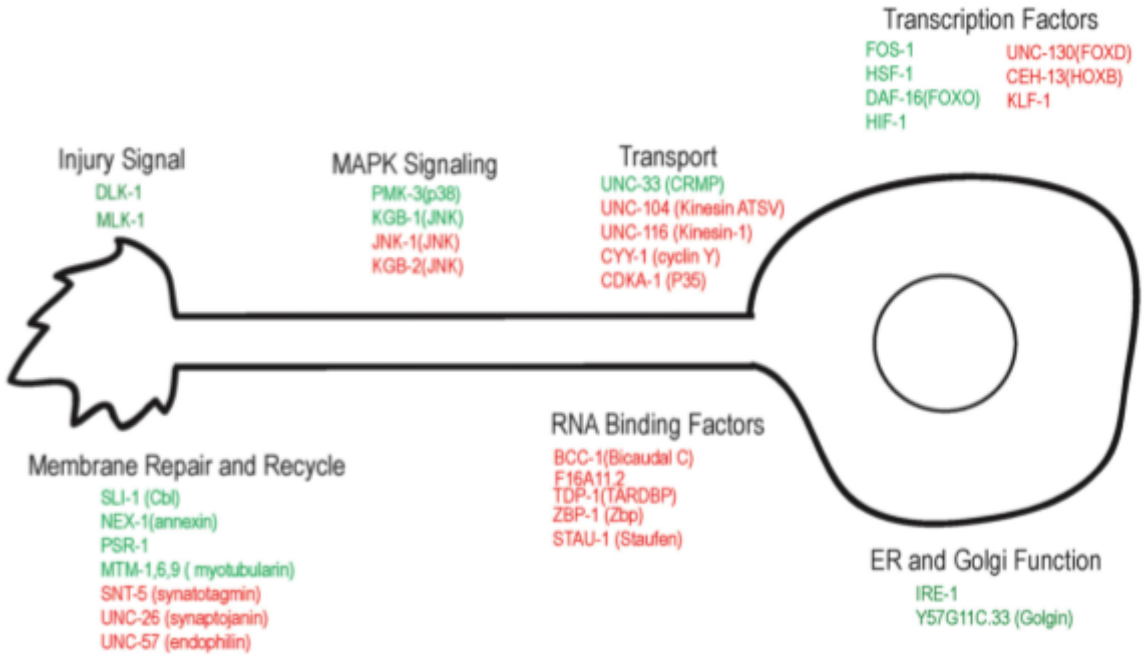


Figura 9. Genes candidatos para actuar en regeneración

En verde se muestran los genes pro regenerativos y en rojo los anti- regenerativos. En paréntesis se muestran los ortólogos en mamíferos. Existe una compleja red de componentes involucrados en diversos procesos, todos actuando en conjunto para logra llevar a cabo la regeneración axonal. Imagen extraída de Nix et al., 2014.

Estudios realizados por Yan et al. (2013) demostraron que *let-7* y *lin-41* tienen un rol fundamental en regular el potencial regenerativo de las neuronas del tacto. En neuronas jóvenes, *lin-41* inhibe a *let-7* mediante ALG-1, promoviendo la capacidad regenerativa de las neuronas, mientras que en estadios más avanzados, el control pasa a *let-7,* quien inactiva la acción de *lin-41,* declinando el potencial regenerativo de la neurona (Yan et al., 2013). De esta manera, en procesos de daño axonal, probablemente toda una maquinaria de microRNAs se active, favoreciendo el ambiente propicio para el desarrollo de la regeneración axonal.

Considerando el complejo y regulado escenario que involucra regenerar neuronas, y teniendo en cuenta el inmenso potencial protector que otorga el ingreso en dauer (Calixto et al., 2012), es razonable considerar que los cambios metabólicos, fisiológicos y en la expresión génica que ocurren durante el ingreso y permanencia en dauer, puedan promover las condiciones necesarias para que neuronas dañadas logren regenerar. La utilización de modelos de degeneración inducidos genéticamente, diferentes a los utilizados previamente, podría ser una excelente manera de descubrir nuevos efectores que pudieran promover la regeneración axonal en la diapausa.

En este trabajo, hipotetizamos que el ingreso en diapausa de animales *mec-4d* más que proveer protección neuronal, promueve la regeneración neuronal tanto morfológica como funcional. Para esto evaluamos diariamente la morfología y funcionalidad de los animales *mec-4d* desde el ingreso a dauer, por siete días. Junto a esto analizamos los efectores previamente reportados como responsables de la protección encontrada en dauer (Calixto et al., 2012), y probamos su rol en el fenómeno regenerativo. Además, evaluamos uno de los principales reguladores de la regeneración axonal, la proteína quinasa DLK-1 y analizamos su contribución en nuestro modelo de regeneración. Finalmente, y con el objetivo de comprender de una mejor manera el fenómeno observado, realizamos una mutagénesis para encontrar posibles efectores y nuevas vías que sean las encargadas de llevar a cabo dicho fenómeno en diapausa.

3. Materiales y Métodos

3.1. Mantención de animales.

C. elegans silvestres y mutantes (*mec-4d;uIs31 (e1611)X, (P_{mec-17}mec-17::gfp), dlk-1;mec-4d;uIs31 (e1611)X, (P_{mec-17}mec-17::gfp), daf-2(ts); mec-4d;uIs31 (e1611)X, (P_{mec-17}mec-17::gfp), dlk-1;uIs31 (e1611)X, (P_{mec-17}mec-17::gfp)*) fueron mantenidos en placas de agar NGM (Nematode Growth Media), las cuales fueron inoculadas con *E. coli* OP50 y mantenidas a 20˚C (Brenner., 1974).

3.2. Preparación medio NGM.

Para la preparación del medio NGM, se mezclan 3 g de NaCl, 17 g de Agar Agar, 2.5 g de peptona en 975 ml de agua destilada. La mezcla es tratada en autoclave por 20 minutos, la cual una vez que está a temperatura óptima se le adicionan 1 ml de $CaCl_2$ 1M, 1 ml de colesterol (5 mg/ml etanol), 1 ml $MgSO_4$ 1M, 25 ml buffer KPO_4 1M pH 6.0 (108.3 g KH_2PO4, 35.6 g K_2HPO_4 en 1 L de agua destilada), y 1 ml de estreptomicina (25 mg/ml). Posteriormente el líquido se transfiere a placas Petri (60x15 mm o 100x15 mm) y se espera a que el NGM se endurezca y seque completamente para ser inoculadas.

3.3. Sincronización de animales.

Para sincronizar animales se utilizaron placas NGM en las cuales había animales grávidos los cuales ya habían puesto gran cantidad de huevos. Posteriormente se lavó la placa con buffer M9 para remover todos los animales de la placa, dejando solo los huevos, los cuales se mantienen adheridos al NGM. Se esperó por un intervalo de dos horas para que los huevos comenzaran a eclosionar. Luego mediante la utilización de pipetas de boca y M9 se colectaron larvas L1. Para esto se agregó M9 para suspender los animales y luego recogerlos por capilaridad, y se transfirieron a placas nuevas, previamente inoculadas con *E. coli* OP50. El M9 utilizado es absorbido por las placas en un lapso de 1 a 2 minutos a temperatura ambiente y posterior a esto, los animales son capaces de acercarse al césped bacteriano para seguir con su normal desarrollo. Entre 30 y 40 L1 se sembraron en cada placa y se mantuvieron a 20˚C hasta realizar la observación.

3.4. Mutagénesis y revisión de gusanos mutantes.

Se realizo una mutagénesis sobre animales *mec-4d* mediante la utilización de EMS (etíl metanosulfanato), el cual genera principalmente mutaciones puntuales al azar (Brenner, 1974; Brookes & Lawley, 1961). Posteriormente se tomaron 1000 animales de la segunda generación para ser analizados una vez que ingresaran en el estado larval dauer, para observar la integridad de las neuronas luego de un mes de estar en diapausa. Luego dividimos los animales en dos categorías, aquellos que regeneraban sus neuronas, y los que no lograban hacerlo. Para separar los animales dauer del resto de la población en la placa, los animales fueron tratados con 1% SDS (dodecilsulfato sódico), con el que se lavó la placa y los animales fueron puestos en tubos eppendorff de 1.5 ml e incubados por un periodo de 20 a 30 minutos, y posteriormente centrifugados. De esta manera logramos obtener solo larvas dauer. Luego, y previa eliminación del sobrenadante, del pellet de animales se tomaron 2 a 5 ul los cuales contenían una cantidad superior a 30 gusanos dauer, los cuales fueron puestos en portaobjetos con agarosa al 2% para observar la integridad de la neurona AVM. La integridad de la neurona AVM fue evaluada observando con objetivo 60X en un microscopio Upright de fluorescencia (Nikon Eclipse). Los animales cuyas neuronas no regeneraban en un 80% o más, fueron considerados como potentes candidatos. Aquellos que regeneraban normalmente o que tenían porcentajes de neuronas que no regeneraban menores a 70%, se descartaron. Cada uno de los candidatos que fue seleccionado fue revisado y reevaluado su porcentaje de no regeneración neuronal 3 veces, realizando cada vez el mismo protocolo con el objetivo de estar completamente seguros que la población de animales dauer se comportaba de la misma manera que durante la selección inicial.

3.5. Criterios para la evaluación neuronal de los animales.

Para realizar la visualización de las neuronas se recolectaron los animales con una espátula de platino, se depositaron en portaobjetos con agarosa al 2% e inmovilizados con hidrocloruro de levamizol 1mM. Cada portaobjetos contenía 30 animales, los cuales se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ni.

3.5.1 Categorías.

Las categorías utilizadas para la evaluación morfológica de la degeneración de las neuronas del tacto de *C. elegans* fueron previamente definidas por Calixto et al. (2012). En este trabajo se incluyó una nueva categoría llamada Axón truncado largo (AxTL), con el fin de diferenciar axones truncados que tiene una longitud mayor y que se encuentran mas próximos a un axón silvestre que a uno truncado. Cada una de las categorías fueron registradas bajo microscopía de fluorescencia mediante el uso de objetivos 40x y 60x, usando criterios que se detallan a continuación.

3.5.1.1 Morfología Axonal.

- Axón "wild type" o normal (AxW): La neurona esta completa e íntegra, idéntica a un animal silvestre de la misma edad (color verde).
- Axón Beaded o en collar (AxB): Neuronas con aspecto de perlas a lo largo de toda su extensión. Los axones son de tamaño wild type (color amarillo).
- Axón "Truncated Long" o truncado largo (AxTL): Neuronas con axones que poseen la extensión al anillo nervioso ubicado en la faringe del animal (bifurcación visible del axón), pero que tienen truncado el axón restante (color naranja).
- Axón "Truncated" o truncado (AxT): Neuronas con extensiones mas cortas que las de AxTL. (color rojo).
- Axón Ø (AxØ): Neuronas sin axones (color blanco).

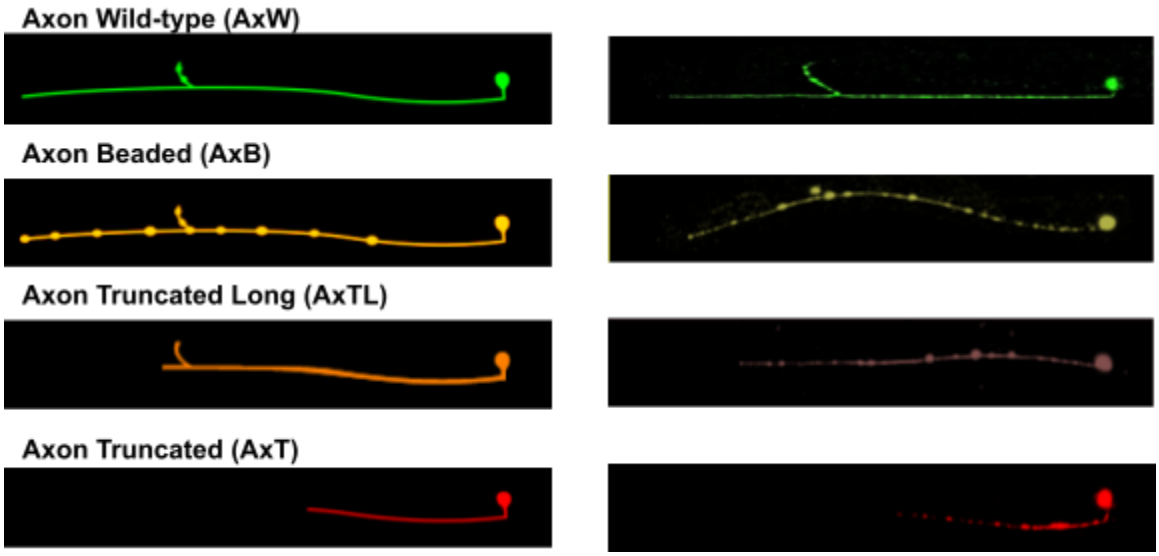


Figura 10. Categorías morfológicas axonales.
Distintas categorías axonales utilizadas para la evaluación de la degeneración y regeneración axonal. En la columna izquierda se observa la representación esquemática de las distintas etapas axonales de la neurona AVM y en la columna derecha se observan imágenes tomadas de la neurona AVM mediante microscopia confocal (Calixto., et al. 2012).

3.6. Análisis estadistico

Para realizar el análisis de datos y gráficos se utilizo el programa GraphPad Prism 6.0. Se realizo la prueba t de student para comparar los comportamientos de regeneración en las distintos experimentos realizados, * significa p-value ≤ 0.5, ** ≤0.01 y *** ≤ 0.001.

3.7. Protocolo de determinación de larvas dauer y su seguimiento temporal.

3.7.1 Determinación de la larva dauer.

Para la determinación y separación de animales dauer se utilizaron dos estrategias diferentes. En ambos casos la causa para la entrada en dauer fue la falta de alimento. La primera estrategia solo buscó separar dauer respecto del resto de la población sin importar el tiempo que estos llevaran en este estado. Para esto se

realizó el mismo procedimiento descrito en la mutagénesis: Se utilizo SDS al 1% por un periodo de 20 a 30 minutos, posteriormente se centrifugo y eliminó el sobrenadante y del pellet obtenido se separaron los animales dauer, sin tener precisión respecto de los días ni el tiempo en que estos animales llevaban en dauer. El único criterio para dicho procedimiento fue que las placas evidenciaran una completa depleción del alimento y tuvieran más de una semana desde el momento en que los gusanos fueron puestos en la placa de agar. Con este protocolo obtuvimos poblaciones dauer asincrónicas. Para la segunda estrategia nuestro objetivo fue tener claridad y precisión sobre el inicio de la diapausa y tener poblaciones sincrónicas respecto de la entrada en dauer. Para lograr esto, una vez que pusimos los animales en placas de agar frescas, se observaron diariamente las placas hasta ver que el césped de bacteria se acabara, y comenzar a evaluar desde ese momento la formación de dauer en la población. Así, una vez que la placa estaba en condiciones apropiadas para que hubieran animales dauer se colecto la población completa con M9, se centrifugo la muestra para separar el sobrenadante y, se tomaron 5 ul del pellet, para someterlo al tratamiento con 1% SDS. El resto del pellet se pasaba a placas de agar sin bacteria para conservar los animales. Posteriormente se observo si en estos 5 ul habían animales dauer, depositando los 5 ul en un portaobjetos y visualizándolo en la lupa estereoscópica binocular Nikon SMZ-745. Para considerar positiva la observación era necesario contar con un mínimo de 30 animales dauer en los 5 ul. De ser así, este se consideraba el día 1 de dauer. Si no se encontraban animales dauer, o la cantidad era mínima, se repetía el procedimiento al día siguiente con el resto de los animales mantenidos en placas sin alimentos. Esto se realizaba hasta obtener la cantidad de animales dauer necesarios como para considerar que la placa estaba en condiciones adecuadas para ser evaluados.
Posteriormente se realizó el tratamiento de 1% SDS con el resto del pellet de gusanos y los dauer obtenidos se pasaban nuevamente a placas sin alimento para seguir con las evaluaciones.

3.7.2. Seguimiento de la larva dauer.

Para el seguimiento de los animales dauer, una vez que se determino el día 1, y posterior tratamiento a toda la población los animales se separaron en placas sin alimento colocando en cada placa la cantidad mínima de 30 dauer, y se rotulo cada placa respecto de un día en especifico de evaluación (ya sea del primer al cuarto o

quinto día, o más tiempo). Las placas se mantuvieron incubadas a 20˚C y recubiertas con Parafilm para evitar la contaminación ambiental.

3.7.3. Medidas para evitar la contaminación.

Debido a que los animales dauer son sensibles de salir de diapausa cuando se encuentran con comida, es necesario prevenirlos del encuentro con cualquier fuente de alimento, ya sea bacteria, hongos e incluso levaduras, que puedan servir de estimulo para que los animales salgan de dauer y continúen su desarrollo normal. Para esto, se tomaron diversas medidas:

- Para cada experimento se utilizaron placas inoculadas con 200 a 250 ul de bacteria *E. coli* OP50, previamente crecida en caldo LB (Luria Bertani) durante la noche. Posteriomente las placas fueron expuestas a radiación ultravioleta por un lapso de 1 minuto y 30 segundos para matar las bacterias. Para corroborar que las bacterias estaban muertas, se sembro una muestra en placas de LB solido posterior a la irradiacion y se incubaron a 37˚C durante la noche.

- Junto con la inactivación de las bacterias, las placas de agar sin alimento que se utilizaron para el seguimiento de los animales dauer fueron preparadas adicionandoles carbenicilina (25 mg/ml), y fungizona (50 mg/ml) 1 ml por litro de NGM y mantenidas con Parafilm en incubador a 4˚C. Además, previa a la utilización de las placas, se agregaba nuevamente carbenicilina y fungizona a las placas, esta vez agregando 20 ul de cada uno, y esparciéndolo en las placas con asas de Drigalsky, todo esto bajo campana de flujo laminar.

- El M9 y SDS utilizados, fueron suplementados con 50 ul de carbenicilina (25 mg/ml) y fungizona (50 mg/ml) por cada 50 ml de M9 y SDS con el objetivo inactivar cualquier bacteria u hongo que estuviera en la placa y lograr la mayor descontaminación posible. Ademas, el SDS y M9 fueron autoclavados y filtrados para garantizar su esterilidad en el procedimiento de determinacion de dauer. Todo esto fue realizado en la campana de flujo laminar. La adicion de carbenicilina y fungizona se realizó previo a comenzar el protocolo, y para

realizar el experimento en dias posteriores se tomo nuevo SDS y M9 el cual fue adicionado ese mismo día.

3.8. Prueba de respuesta al tacto.

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de la neurona del mecanoreceptora AVM, se realizo la prueba de respuesta al tacto. Dicha prueba consiste en tocar suavemente la zona anterior del gusano y así generar la respuesta aversiva del animal, el cual retrocede. Para tocar al animal se utiliza una pestaña que se pega a un monda dientes con la cual se realiza un movimiento perpendicular suave sobre el segundo bulbo de la faringe. Es necesario evitar que se genere una respuesta debido a un toque demasiado fuerte que provoque deformación del gusano, ya que eso provoca la respuesta de otras neuronas involucradas en la respuesta al tacto duro.. Este experimento se realizo con triplicas biológicas, utilizando como control positivo animales wild type (N2), y como control negativo animales *mec-4,* los cuales tienen una mutación que causa la perdida de la función del canal MEC-4 y la respuesta al tacto es nula.

3.9. Experimentos de curso temporal de la degeneración axonal.

Se realizaron análisis de la morfología axonal en distintas poblaciones de animales tanto *mec-4d, mec-4d;dlk-1, daf-2(ts);mec-4d, dlk-1;uIs31,* alimentados con *E. coli* OP50, y evaluados a las 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas post eclosión y previa sincronización según los métodos explicados previamente. Para evitar que la progenie de los animales de 120, 144 y 168 horas interfiriera en los análisis, estos fueron removidos a placas nuevas para seguir específicamente a los animales puestos originalmente. En cada uno de los tiempos determinados para evaluación de la integridad neuronal de las neuronas del tacto se realizo la visualización mediante microscopia de fluorescencia, con una población de 30 animales por portaobjeto con agarosa al 2%, y realizándose el experimento con triplicas biológicas.

3.10. Experimentos con mutantes sensibles a la temperatura.

Con el objetivo de evaluar la acción y efecto de DAF-2 en los procesos regenerativos sobre las neuronas del tacto se utilizo el animal mutante WCH4 (*daf-2(ts); mec-4d; uIs31* (e1611)X, (P_{mec-17}*mec-17::gfp*)), el cual posee una mutación *ts* que le permite a 15˚C generar una función normal de la proteína DAF-2, mientras que a 25˚C es no funcional, y a 20˚C tiene una actividad media. Este mutante genera a las distintas temperaturas, alteraciones en la conformación de la proteína, no una perdida de función, por lo cual para ver la actividad se diseño un protocolo en el cual se dejaron placas con animales WCH4 que crecieron durante todo su desarrollo a 20˚C y otros a 15˚C. Posteriormente ambos fueron sincronizados cuando las placas estuvieron llenas de huevos, como se menciono previamente. Luego se montaron placas con un mínimo de 30 animales, unas para ser evaluadas en las 24 horas iniciales y otras para las 72 y 96 horas respectivamente. Para los gusanos que iniciaron a 20˚C se tomaron todas las placas y se incubaron las primeras 24 horas a 20˚C, y una vez que se analizaron las primeras placas para tener un control a las 24 horas, el resto de las placas que estaban por analizarse a las 72 y 96 horas se cambiaron a las distintas condiciones. Unas se mantuvieron a 20˚C, otras se transfirieron a 25˚C y otras a 15˚C. Con los gusanos que partieron a 15˚C el procedimiento fue similar. La observación de cada uno de los animales se realizó como se mencionó previamente.

3.11. Experimento de restricción dietaria.

Para evaluar los efectos de la restricción dietaria sobre la regeneración axonal diseñamos un régimen en el cual los gusanos fueron sincronizados y puestos en placas de NGM con *E. coli* OP50 hasta completar las primeras 24 horas de desarrollo. Luego se analizó la integridad neuronal de 30 animales, los cuales sirvieron como control. Después comenzamos con un régimen de 3 horas de alimentación *ad libitum* y 9 horas en placas sin comida, repitiéndolo hasta completar las siguientes 24 horas y volver a analizar las neuronas. Se repitió este protocolo hasta completar las 96 horas.

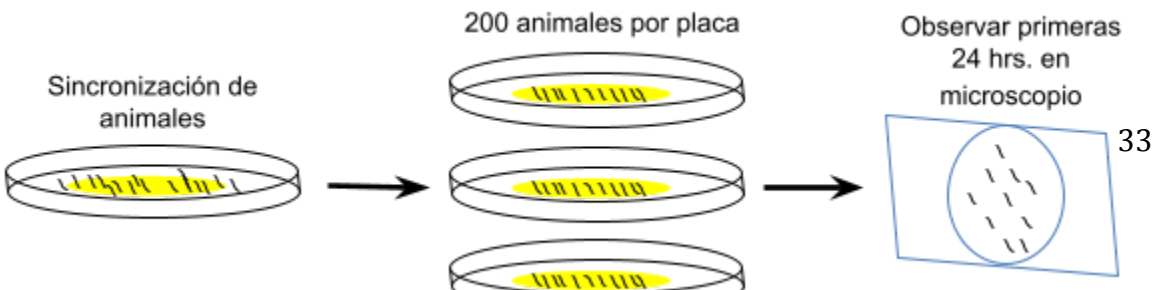


Figura 11. Protocolo de restricción dietaria

Para la determinación del efecto de la restricción dietaria en la regeneración axonal se diseño el régimen de 24 horas con desarrollo normal, y posterior inicio de régimen de 3 horas de alimentación *ad libitum* seguido de 9 horas sin alimento, hasta completar las 24 horas siguientes. Este régimen se realizo hasta completar las 72 horas posteriores a las 24 iniciales.

4. Resultados.

4.1. La diapausa promueve la regeneración morfológica y funcional de neuronas degeneradas en el modelo *mec-4d.*

En animales *mec-4d* las neuronas del tacto sufren degeneración progresiva y el ingreso en diapausa causa un potente fenómeno de protección neuronal, y las neuronas se encuentran morfológica y funcionalmente intactas mientras permanecen en este estado (Calixto et al., 2012). Cuando los animales entran en diapausa, un numero considerable de axones ya ha sufrido degeneración y están truncados. En la

presente tesis nos planteamos la pregunta de si la protección observada en animales que han entrado en diapausa involucra la regeneración de los axones de las neuronas del tacto. Para responder esta pregunta, evaluamos diariamente los animales dauer, considerando la morfología de la AVM previo al ingreso en dauer, y constatamos experimentalmente la progresión del comportamiento de los axones. Alimentamos animales *mec-4d* con *E. coli* OP50 y esperamos que la población creciera hasta agotar la comida y entraran en diapausa por deprivación de alimento. Luego determinamos el primer dia de dauer, que es la primera vez que aparecen dauer SDS resistentes después de agotada la comida. A partir de este día, se evaluó la morfología de la neurona AVM considerando las categorías previamente establecidas. El porcentaje de axones silvestres el dia 1 de dauer fue de un 52%, el cual fue aumentando progresivamente hasta llegar a un valor del 91% en el día 7, mientras que los porcentajes tanto de axones truncados como sin axones disminuyeron proporcionalmente al aumento de los silvestres (**fig. 10 b, c**). Al momento del ingreso en dauer, se observó un incremento sorprendente de axones silvestre respecto de los animales *mec-4d* no dauer, evidenciándose un potente efecto regenerativo asociado al ingreso en diapausa (**fig. 12c**). Para determinar la funcionalidad de sus neuronas mecanoreceptoras, los animales *mec-4d* fueron evaluados mediante la prueba del tacto (Chalfie & Sulston, 1981), durante los primeros días de dauer, para poder relacionar la recuperación morfológica con la funcionalidad de la neurona AVM. Para esto se usó como control positivo, animales wild type (N2) y como control negativo animales *mec-4(u253)* que tienen una mutación recesiva que causa la perdida de función del canal MEC-4. Los animales *mec-4d* mostraron una sensibilidad que aumentó de manera progresiva al paso de los días en dauer, que se correlaciona con el rescate morfológico de la neurona AVM. Los animales N2 responden de manera normal, sin observarse alteraciones en su respuesta (90 a 100% de sensibilidad). Los animales *mec-4(u253)* son completamente insensibles, demostrando que la respuesta al tacto en dauer es MEC-4 dependiente (**fig. 12**). Estos resultados sugieren que la protección observada en dauer (Calixto et al., 2012), es un proceso de regeneración axonal, el cual restablece tanto la morfología como la funcionalidad de la neurona AVM.

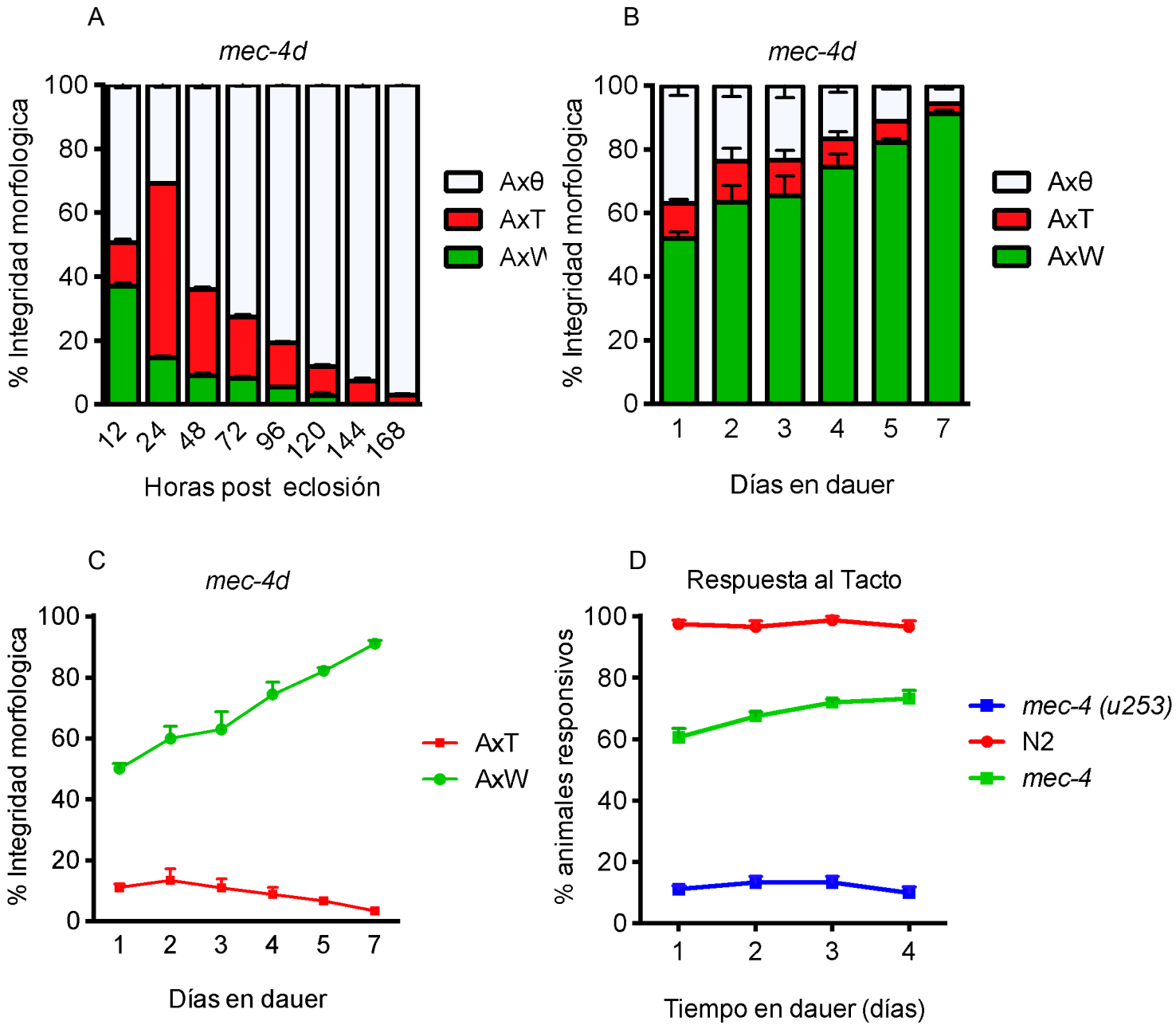


Figura 12. Análisis de la morfología de la neurona AVM, luego del ingreso a diapausa.

Análisis de la morfología neuronal AVM respecto del inicio en dauer y la progresión en los primeros días. **a**. Curso normal de degeneración axonal en animales *mec-4d.* (**b, c**). Análisis temporal de las distintas categorías axonales, AxW, axón silvestre completo, AxT, axón con truncación en la longitud normal del axón, AxØ, sin axón. **d**. Respuesta al tacto de animales *mec-4d, mec-4* y N2 en dauer.

4.2. La regulación negativa del receptor de insulina DAF-2 otorga protección y regeneración axonal que es menor a la lograda en diapausa.

Una vez establecido que en dauer se produce un potente fenómeno regenerativo, nos enfocamos en evaluar posibles candidatos encargados de llevar a cabo dicho proceso. En *C. elegans* la vía de la insulina media diversos procesos tales como extensión de la longevidad, resistencia al estrés y formación de dauer (Arantes-Olivera et al., 2002; Libina et al., 2003). DAF-2, receptor de la insulina, controla negativamente a DAF-16/FOXO, reteniéndolo en el citoplasma, impidiendo su translocación al núcleo. En dauer, DAF-2 esta inactivado y por lo tanto la cascada de fosforilaciones que mantiene a DAF-16 retenido en el citosol se interrumpe y DAF-16 puede translocar al núcleo activando la transcripción de sus genes blanco (Kenyon et al., 1993; Gottlieb y Ruvkun, 1994). Para estudiar la capacidad regenerativa causada por la pérdida de función *daf-2*, utilizamos animales que contienen la mutación sensible a la temperatura *daf-2 (e1370ts)* junto con *mec-4d,* y el arreglo *uIs31* (P_{mec-17}*mec-17::gfp*) para visualizar en verde las neuronas del tacto [WCH4 (*daf-2(ts); uIs31*; *mec-4d*)]. Estos animales son silvestres para *daf-2* a 15˚C y mutantes para *daf-2* a 25°C. A 20˚C hay una mezcla de animales silvestres con mutantes. Utilizando un animal sensible a la temperatura WCH4, diseñamos un protocolo (ver métodos) para determinar si DAF-2 tiene un efecto regenerativo, protector o ambos en el modelo *mec-4d.* Los animales se incubaron a 20˚ o 15˚C por las primeras 24 horas y posteriormente fueron cambiados a 25˚ y 15˚C respectivamente.

En animales que se mantuvieron a 20˚C durante las primeras 24 horas se observó un alto porcentaje de axones truncados (65%), mientras que la proporción de axones silvestres no superó el 9%. Cuando estos animales luego fueron cambiados a 25˚C y observados a las 72 horas, se observó un sorprendente aumento en los axones silvestres alrededor de 22% el cual bajo a 19% a las 96 horas (**fig. 13 a, b**), mientras que la proporción de axones truncados tendió a mantenerse. Siguiendo el protocolo opuesto transfiriendo los animales de 20˚C a 15˚C luego de 24 horas, el proceso degenerativo observado normalmente en los animales *mec-4d* siguió su curso (**fig. 13a**). En relación a los animales que nacieron a 15˚C, y fueron mantenidos a esa temperatura durante las primeras 24 horas, se observó un alto porcentaje de axones truncados (50%) y hubo un bajo porcentaje de axones

silvestres (2%). Sin embargo al hacer el cambio a 25˚C, un 17% de axones silvestres fueron observados a las 72 horas, y un 11% a las 96 horas (**fig. 13 c, d**), mientras

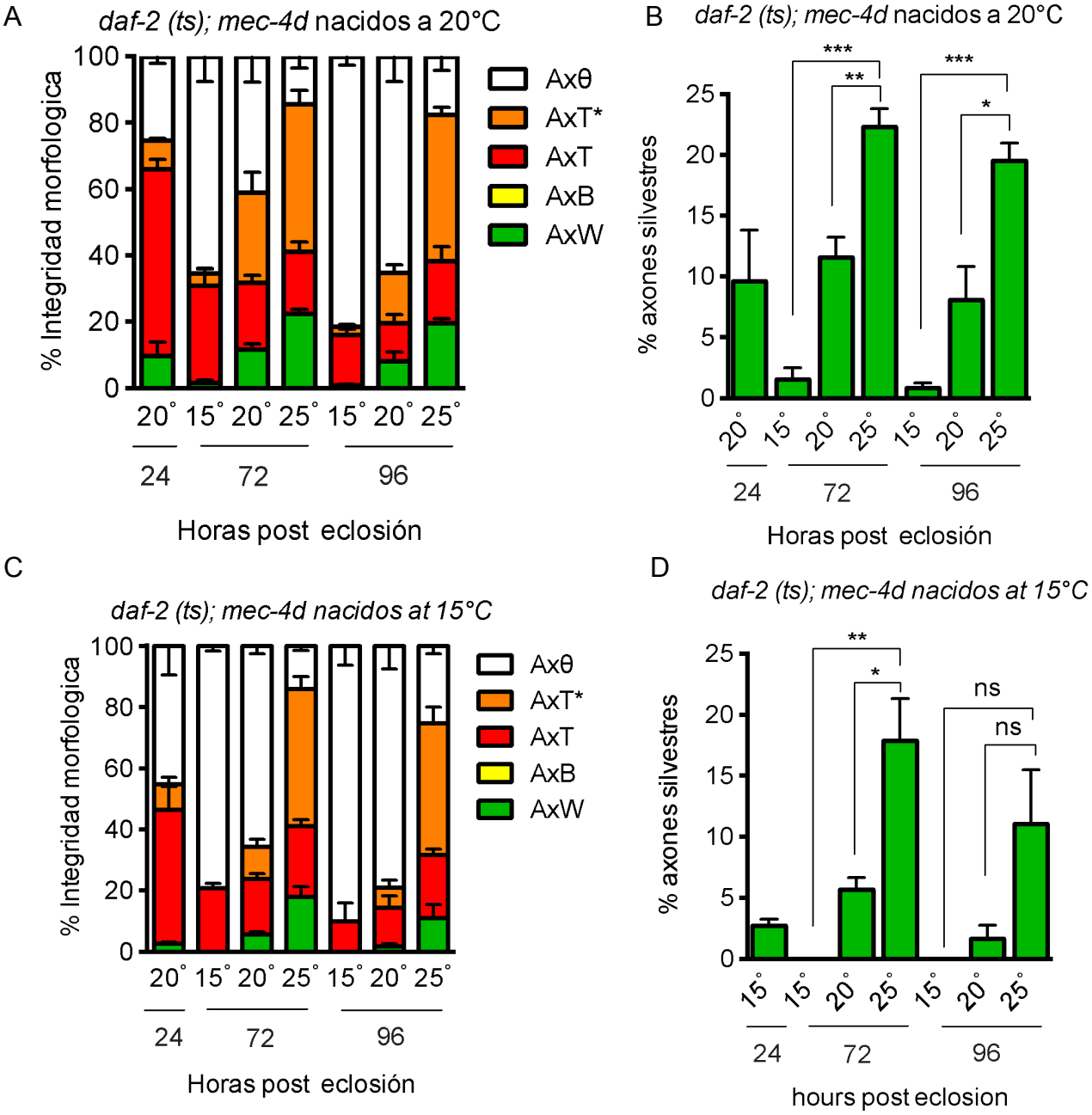


Figura 13. Inactivación de DAF-2 promueve la protección y regeneración axonal en animales no dauer.

Evaluación morfológica de la neurona AVM bajo el efecto de la inactivación selectiva de DAF-2. **a,b**. Se observa el efecto tanto a nivel protector como regenerativo al realizar los cambios de temperatura, tanto a 25˚ y 20˚C, en los cuales se observan neuronas silvestres, y un alto porcentaje de axones truncados respecto de los

mismos animales a 15˚C. **b.d.** Análisis estadísticos entre los axones silvestres en las diferentes condiciones (t student * p-value ≤ 0.5, ** ≤0.01 y *** ≤ 0.001).
que el porcentaje de axones truncados se mantuvo respecto de las 24 horas. En los animales que se mantuvieron a 15˚C no se observó diferencias respecto del normal proceso de muerte neuronal observado en animales *mec-4d.* Respecto de los animales que iniciaron a 20˚ o 15˚ y fueron cambiados a 20˚ sus axones silvestres mostraron algún grado de protección a las 72 horas, la cual a las 96 horas era prácticamente nula (**fig. 13 a, c**). Juntos estos resultados nos muestran un potente efecto protector generado por la inactivación de DAF-2 y la consecuente activación de DAF-16/FOXO, y además se observa un efecto regenerativo en la neurona AVM, significativo pero menor que el observado en dauer. Esto sugiere que en diapausa están operando otros factores, que además de DAF-2 promueven la regeneración de los axones.

4.3. La restricción dietaria protege pero no causa regeneración de axones dañados.

Animales mantenidos bajo regímenes de restricción calórica tienen niveles reducidos de estrés oxidativo, lo cual se ha propuesto como una de las bases de su longevidad y el retraso en problemas asociados a la edad (Sohal, 2002). Además, la restricción calórica genera protección neuronal en las neuronas AVM en animales *mec-4d* una vez que salen de diapausa (Calixto et al., 2012). Ya que los animales en diapausa están en restricción calórica, nos preguntamos de que manera la restricción calórica impacta en la regeneración de la neurona AVM en animales *mec-4d*. Para esto diseñamos un protocolo de ayuno intermitente que permitiera a los animales crecer de manera normal, pero restringiendo su consumo calórico (ver métodos), en el cual en las primeras 24 horas se alimentan normalmente, y posterior a estos se interrumpe su alimentación hasta las 72 horas, evaluándolos periódicamente cada 24 horas. Interesantemente, los animales que se mantuvieron bajo este protocolo no tuvieron alteraciones en su desarrollo, observándose un normal crecimiento y desarrollo hasta la adultez. Al observar la morfología de los animales, en las primeras 24 horas el comportamiento es similar al observado en animales *mec-4d*, y a medida que avanzan los periodos de evaluación se observó una mantención en la proporción de los axones silvestres, así como la de los axones truncados (**fig. 14**), lo cual difiere de lo observado en animales *mec-4d* para el mismo periodo de tiempo (**fig. 12a**).

Esto demuestra que la restricción dietaria genera un efecto protector en la neurona AVM, pero no causa la regeneración de las neuronas dañadas

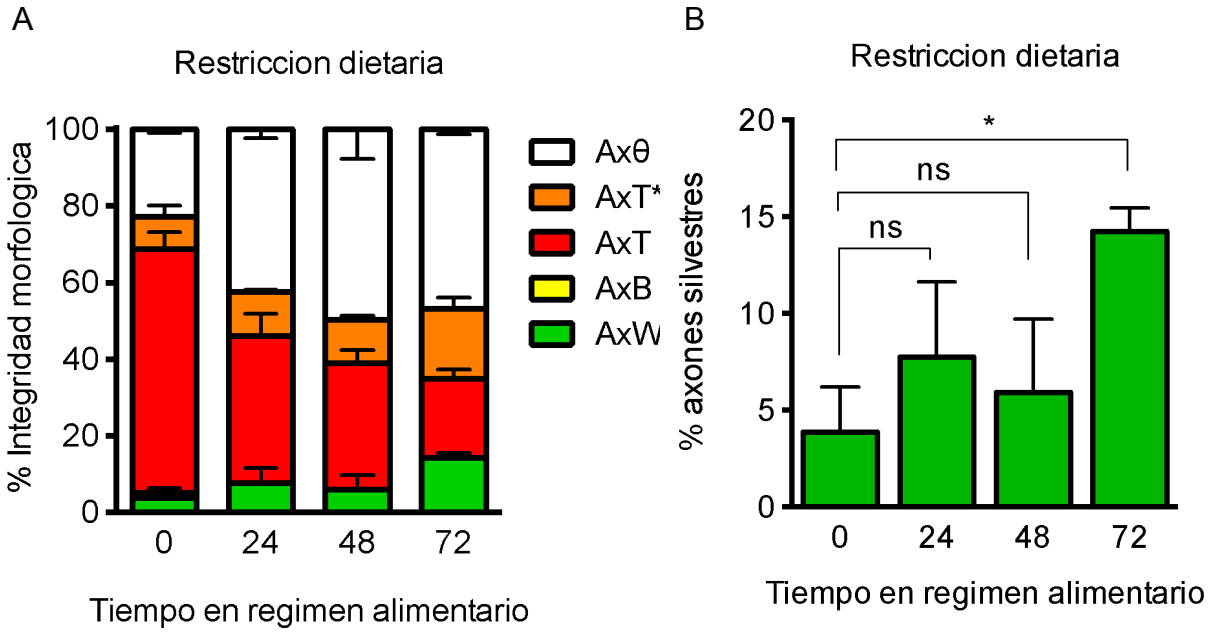


Figura 14. Restricción dietaria genera protección en la neurona AVM, pero no causa regeneración.

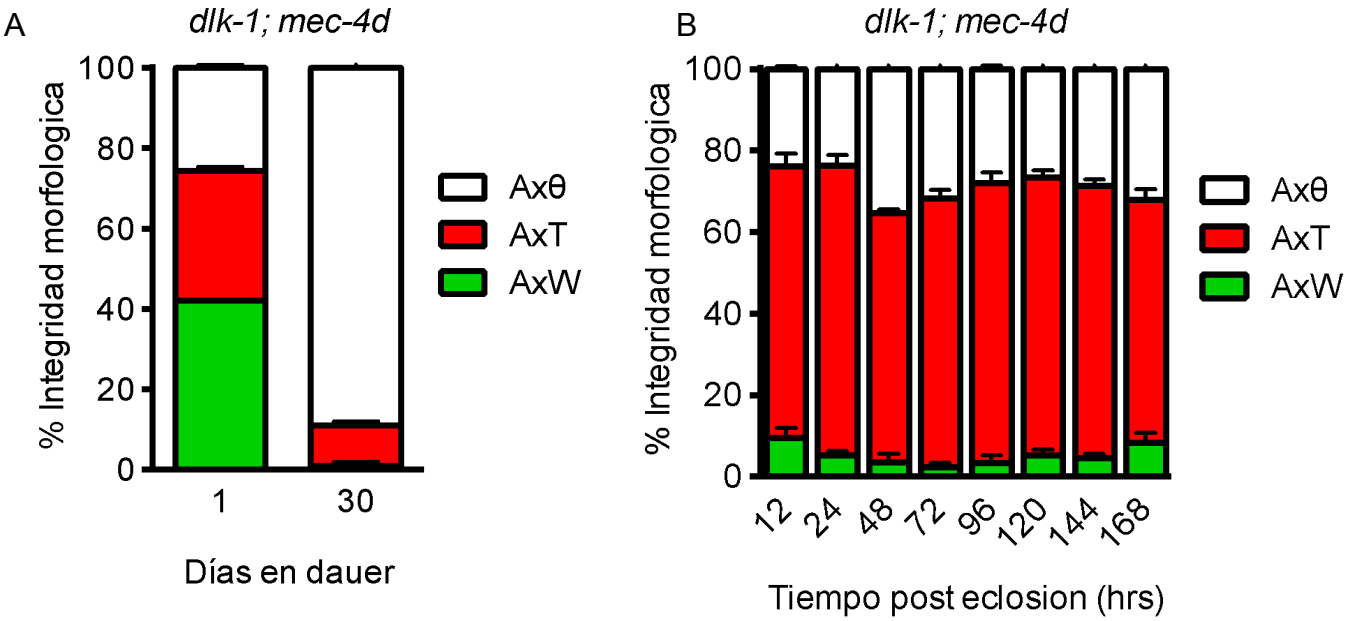
Al realizar el análisis morfológico de la neurona AVM en animales *mec-4d* expuestos a un régimen de ayuno intermitente (restricción calórica). **a**. Se observo un potente efecto protector el cual mantiene tanto los axones truncados (rojo) y silvestres (verde) mientras el animal se mantiene bajo el régimen alimentario, aunque no causa la regeneración neuronal. **b**. Análisis estadístico sobre los axones silvestres (t student * p-value ≤ 0.5)

4.4. DLK-1 es requerido para la regeneración de la neurona AVM en diapausa y tiene un desconocido rol en la degeneración axonal así como en el desarrollo de la neurona AVM.

DLK-1 es una proteína quinasa de tipo MAPK3 que es clave en la regulación del proceso de regeneración axonal en modelos de axotomía y quiebre espontaneo en mutantes de β-espectrina (Hammarlund et al., 2007; Hammarlund et al., 2009; Yan et al., 2009), actuando a nivel de citoesqueleto y mediante múltiples vía de señalización asociadas a proteínas quinasas (Yan et al., 2009; Nix et al., 2011). Considerando la importancia de este proteína, nos preguntamos si DLK-1 es

necesaria para la regeneración en el modelo *mec-4d*. Para responder esto, generamos un animal *mec-4d* con una mutación en *dlk-1*, generando el doble mutante *dlk-1; mec-4d*, en el cual evaluamos la regeneración observada en dauer. Al evaluar la morfología del animal en el día 30 de haber ingresado en dauer, notamos que la neuronas fueron incapaces de regenerar mostrando una completa dependencia por DLK-1 (**fig. 15a**). Sin embargo la regeneración que permite a los animales entrar en diapausa con un 50% de axones silvestres, es totalmente independiente de DLK-1, evidenciando que hay factores netamente dependientes de la entrada en dauer que contribuyen a regenerar los axones (**fig. 15a**).

Junto con esto, evaluamos los defectos del doble mutante *dlk-1; mec-4d*, en el normal desarrollo de los animales. Para esto evaluamos la morfología de los animales desde el nacimiento hasta las 168 horas, observándose durante todo el desarrollo del animal una mantención de los axones truncados y silvestres, sin observarse el fenotipo esperado para el *mec-4d*, lo cual sugiere una posible función de DLK-1 en la degeneración axonal (**fig. 15b**). Además observamos que un considerable porcentaje de los axones de la neurona AVM estaban truncados evidenciándose defectos en la extensión de neuritas (**fig. 15c**). De esta manera, DLK-1 mostro tener un relevante papel en la regeneración observada en dauer, probablemente de una manera diferente a la observada en otros modelos (axotomía y β espectrina) y probablemente interfiere en la extensión normal de la neurona AVM y en la degeneración neuronal inducida por *mec-4d.*



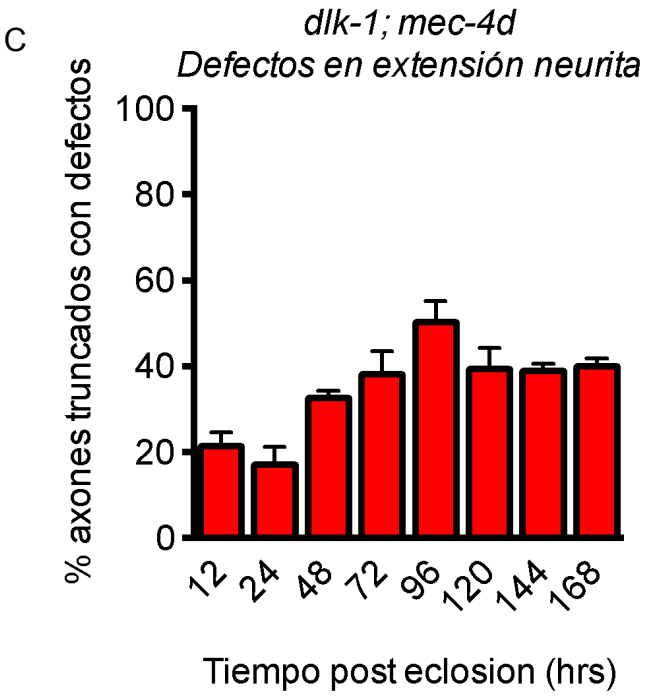


Figura 15. DLK-1 es esencial para la regeneración observada en dauer, y efectos en la degeneración y normal extensión de los axones.
Análisis morfológico de la acción de DLK-1 en la neurona AVM. **a**. Evaluación morfológica de animales *dlk-1; mec-4d* al cabo de un mes en dauer. **b**. Curso temporal en animales *dlk-1; mec-4d* desde el momento de la eclosión hasta las 168 horas. **c**. Análisis morfológico sobre los axones truncados respecto de defectos en extensión de neuritas en la neurona AVM.

4.5. Análisis genético para descubrir la red de genes involucrados en regeneración axonal en diapausa.

C. elegans es un excelente modelo para la realización de análisis genéticos y químicos enfocados en la búsqueda de factores que afectan la regeneración neuronal posterior a un daño (Grosh-Roy & Chisholm, 2010; Samara et al., 2010, Wang & Jin, 2010). De esta forma, diversos análisis genéticos han encontrado nuevas vías y participantes asociados al complejo escenario que involucra regenerar las neuronas

(Nix et al., 2014; Chen et al., 2011). De esta manera, y considerando el sorprendente fenómeno observado en diapausa, nos propusimos llevar a cabo un análisis genético para identificar genes que permiten que los animales *mec-4d* regeneren en dauer. Con este propósito se realizó una mutagénesis mediante la utilización de EMS sobre 1000 animales *mec-4d* y posteriormente se analizó su progenie para determinar fenotipos que no mostraran regeneración axonal al entrar en dauer (ver métodos).

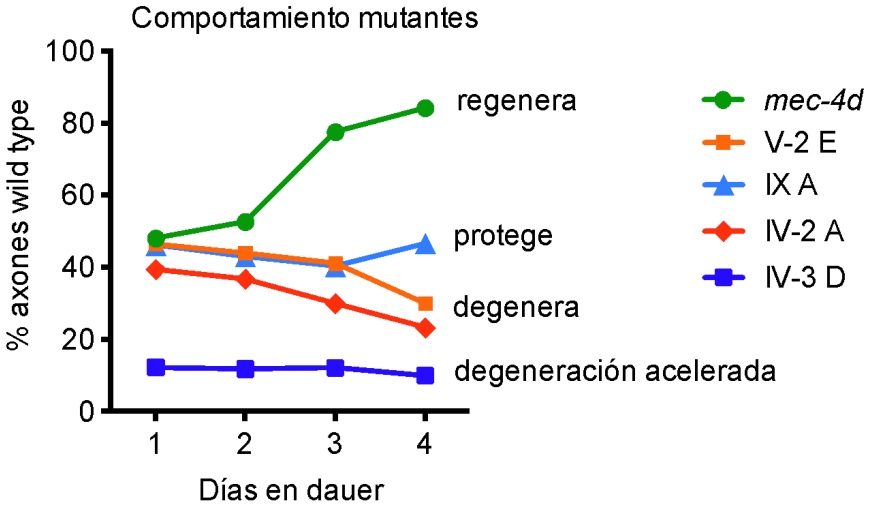


Figura 16. Análisis genético para descubrir genes involucrados en la regeneración en diapausa.

Ejemplos de comportamiento observado en mutantes candidatos comparados con el de animales *mec-4d*. Una vez seleccionados los mutantes, se determinó la proporción de axones silvestres y se comparó con la de animales *mec-4d*, generándose tres categorías: no degenera, pero protege; degenera y degenera de forma acelerada.

Como resultado de este análisis se obtuvieron 60 mutantes candidatos que cumplieron con los criterios de selección, los cuales fueron analizados morfológicamente en los primeros días de dauer, y clasificados en distintas categorías según el comportamiento de los axones silvestres.

4.6. Esquema conceptual de resultados.

Posterior a la realización de los experimentos mencionados previamente, se logró conceptualiza los efectos de la diapausa en el proceso degenerativo en animales

mec-4d y los actores principales que actúan en dicho proceso, lo cual se resume en la figura 17.

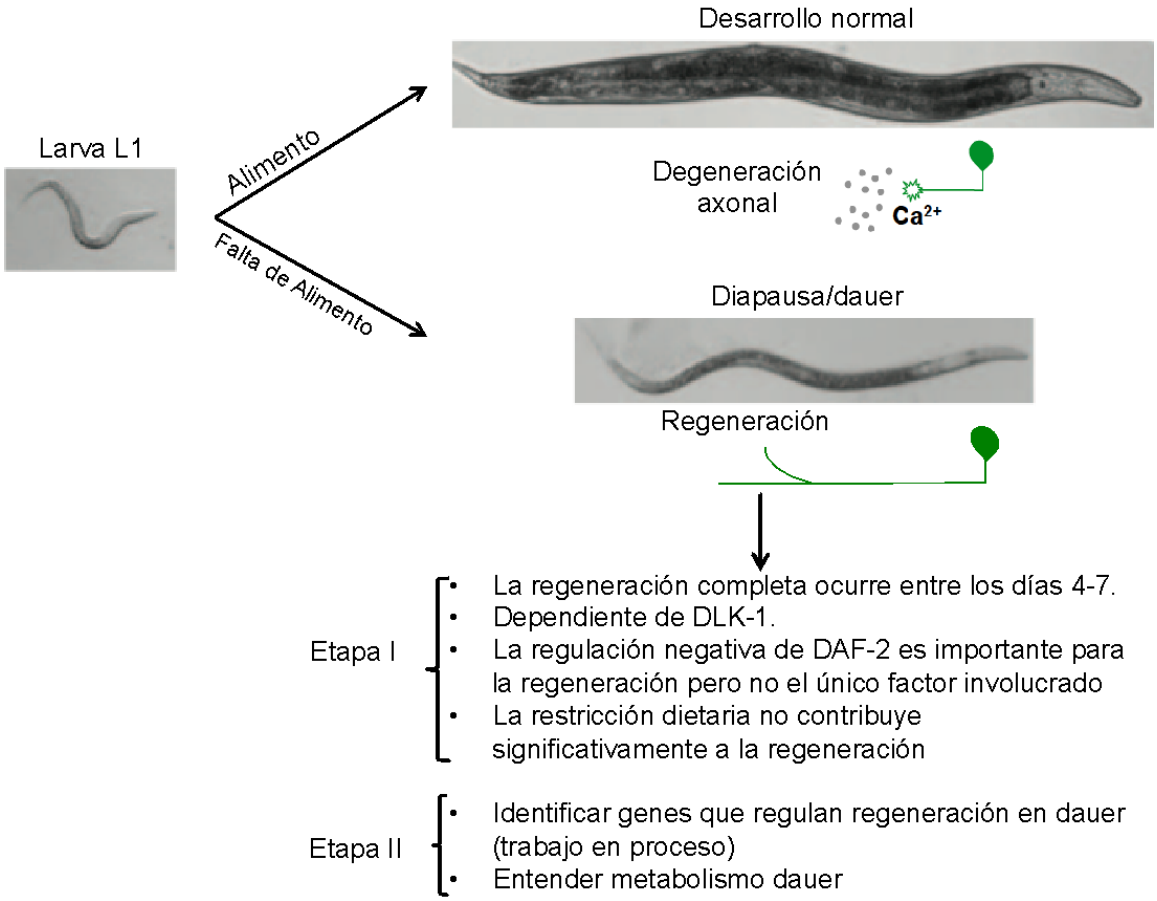


Figura 17. Esquema conceptual del resumen de resultados.
Resumen de los resultados obtenidos en el cual se observan los principales actores involucrados en el potente efecto regenerativo observado en dauer.

5. Discusión.

La regulación negativa del receptor de insulina junto con la formación de dauer, protege las neuronas inducidas genéticamente a morir, vía un proceso dependiente de DAF-16/FOXO y la capacidad antioxidante celular (Calixto et al., 2012). En este estudio, demostramos por primera vez que el ingreso en diapausa, no solo protege, sino que causa la regeneración de neuronas previamente degeneradas. El uso de las

neuronas del tacto, en especifico la AVM, nos permitió observar por completo el proceso de nacimiento y degeneración neuronal, así como evaluar la funcionalidad neuronal, gracias a lo cual, pudimos notar *in vivo* los efectos regenerativos en dauer, y seguir morfológicamente el proceso regenerativo.

5.1. Regeneración neuronal en diapausa.

Una de las características más llamativas de la diapausa es la capacidad de preservar tejidos y células individuales por largos periodos de tiempo, bajo condiciones estresantes (Calixto, 2015). Aquí observamos que la entrada en dauer produce la completa regeneración morfológica y funcional de axones previamente dañados, lo cual es dauer dependiente, ya que al salir de dauer y retomar el desarrollo normal, la degeneración de las neuronas se activa nuevamente. De esta manera, dauer representa un ambiente propicio para que todo el complejo mecanismo regenerativo tome curso. Dentro de los posibles factores responsables de llevar a cabo dicho proceso se encuentra DAF-2. Nuestros resultados sugieren que la inactivación, tanto completa como parcial de DAF-2 tiene un efecto regenerativo en la neurona AVM, sin embargo por si solo, no logra igualar el efecto observado en dauer (**fig. 12 b, c y 13**). La inactivación de DAF-2 que ocurre en dauer genera la activación de DAF-16/FOXO (Gottlieb & Ruvkun, 1994) lo cual potencia la actividad antioxidativa (Honda & Honda, 1999), y genera protección neuronal (Calixto et al., 2012). DAF-2 tiene como mayor sitio de acción las neuronas (Wolkow et al., 2000), y se encuentra mayormente expresado en las neuronas que forman parte del anillo nervioso (Kimura et al., 2015), dentro de las cuales se encuentra la AVM. Estudios recientes relacionan directamente a DAF-16/FOXO como responsable de la regeneración neuronal post axotomía en animales adultos, teniendo un rol autónomo celular, diferente a su rol antioxidativo (Byrne et al., 2014), y vinculado a la activación de genes claves para la regeneración como lo es *dlk-1* (Hammarlund et al., 2009). Interesantemente, los niveles de expresión en dauer de *dlk-1* y la vía de las quinasas p38 se encuentra elevada en dauer (Calixto, 2015), más aun, para el principal efector y mediador de la acción de DLK-1, *cebp-1* (Yan et al, 2009), su nivel de expresión es más de 5 veces mayor que en condiciones no dauer (Calixto, 2015). Además, en estudios realizados sobre aberraciones morfológicas axonales dependientes de la edad, efectuados en neuronas del tacto, se observo que la actividad de DAF-16/FOXO permite una correcta mantención de la morfología normal

de las neuronas (Pan et al., 2011; Tank et al., 2011; Toht et al., 2012), permitiéndonos especular que en animales *mec-4d,* el ingreso a dauer determina una acción múltiple por parte de DAF-16/FOXO. Inicialmente su activación determina un respuesta antioxidativa global que favorece la longevidad y sobrevivencia del animal, mientras que el estímulo degenerativo, determina una respuesta específica en la neurona AVM, que permite la activación de reguladores directos de la regeneración axonal, así como favorecer un adecuado desarrollo morfológico, así como al observado en los animales *mec-4d* una vez que han alcanzado la regeneración completa.

5.2. DLK-1 juega un rol fundamental en la regeneración axonal observada en diapausa.

La falta de DLK-1 inhibe la regeneración axonal en modelos de axotomía y daño axonal espontáneo (Hammarlund et al., 2007; Hammarlund et al., 2009; Yan et al., 2009). En nuestro trabajo DLK-1 resultó ser fundamental en el proceso regenerativo observado en animales *mec-4d* al evaluarlos luego de un mes de permanencia en estado dauer. DLK-1 es activado por Ca^{2+} (Yan & Jin, 2012) y por la despolimerización de microtúbulos (Bounoutas et al., 2011). En el modelo *mec-4d* el Ca^{2+} ingresa a través del canal MEC-4, junto al Na^{+} (Bianchi et al., 2004), lo que activa proteasas que desmantelan el citoesqueleto, lo cual podría favorecer la acción de DLK-1. Junto a su activación, DLK-1 ha sido vinculado con la dinámica microtubular durante la regeneración axonal a través de su acción sobre KLP-7 y CCPP-6 (Grosh-Roy et al., 2012). Interesantemente, según análisis realizados en dauer, *klp-7* que actúa favoreciendo la despolimerización microtubular se encuentra con una menor expresión y *ccpp-6* cuya acción favorece la modificaciones de la α-tubulina a una forma más estable para promover el crecimiento axonal, presenta una mayor expresión (Calixto et al, 2015), lo cual suponemos genera un escenario propicio para el desarrollo tanto del cono de crecimiento como la extensión axonal.
Junto a demostrar su rol en la regeneración axonal en dauer, encontramos que el doble mutante *dlk-1;mec-4d* presentaba un retraso en la normal degeneración neuronal observada en *mec-4d,* lo cual se evidenciaba debido a que a las 168 horas de desarrollo, aun gran cantidad de neuronas aún se mantenían truncadas y eran silvestres (**fig. 15b**). Estudios en *Drosophila melanoganster* han mostrado un rol de DLK-1 asociado a la degeneración axonal, en el cual la falta de DLK-1 inhibe la

degeneración (Bradley et al., 2009). Posiblemente, en nuestro modelo, DLK-1, en animales *dlk-1;mec-4d* pueda cumplir un rol similar en el proceso degenerativo en condiciones no dauer. Además, en el doble mutante *dlk-1;mec-4d* evidenciamos defectos en la morfología de la neurona AVM con extensiones de neuritas en dirección y forma inadecuada, sugiriendo que DLK-1 es necesario tanto para la degeneración de la neurona como para su regeneración (**fig. 15c**), lo cual podría estar asociado al rol de DLK-1 en el desarrollo neuronal (Bloom et al., 2007; Hirai et al., 2006; Itoh et al., 2011).

5.3. Restricción dietaria y vías asociadas.

La restricción calórica disminuye los niveles de estrés oxidativo en varios tejidos (Sohal, 2002), y en mamíferos disminuye los niveles de insulina con la consecuente activación de FOXO y acción sobre sus genes blanco (Martin et al., 2006). Individuos *C. elegans* con restricción calórica presentan dramáticos descensos en los niveles de DAF-2 (Kimura et al., 2015). En nuestro estudio, la restricción calórica protegió a los axones de la degeneración (**fig. 14b** y Calixto et al., 2012), pero su habilidad regenerativa fue solo evidente en una pequeña medida a las 72 horas de comenzado el régimen de ayuno intermitente (**fig. 14b**).

Interesantemente, una vía asociada a la regeneración axonal es la de DAF-18/PTEM, la cual actúa tanto en animales jóvenes como adultos, mediante la activación de TOR, de una manera DLK-1 dependiente (Byrne et al., 2014). Si bien no existen datos sobre los niveles de expresión de DAF-18 y TOR en dauer, TOR actúa mediante los complejos TORC1 y TORC2 promoviendo procesos tales como crecimiento celular, dinámica del citoesqueleto, organización de la actina y respuesta al estrés (Guertin & Sabatini, 2007), lo cual podría favorecer tanto la longevidad de dauer, como la regeneración axonal, además de estar aportando con otras señales que promueven la activación de DLK-1 y finalmente en la regeneración axonal.

5.4. Modelo integrativo de regeneración en diapausa.

El ingreso en diapausa genera múltiples cambios metabólicos (Hand et al., 2011) y morfológicos (Russell & Cassada, 1975) que permiten aumentar la longevidad del animal en más de 5 veces. Más sorprendente aún es notar que a pesar de sus múltiples limitaciones energéticas este estado es capaz de no solo proteger tejidos

(Calixto et al., 2012), sino que en nuestro caso, regenerar completamente las neuronas. Si bien este trabajo nos permitió descubrir este increíble fenómeno, también abrió las puertas ante un escenario completamente desconocido frente al cual mucho queda por comprender y descubrir. Nuestro trabajo junto con información publicada en la literatura nos ha permitido tener ideas y nociones del complejo mecanismo que se desencadena en el estado de dauer, indicándonos como fundamental el rol de DLK-1 (**fig. 15a**) apoyado en sus niveles de expresión y toda la vía de quinasas asociada (Calixto, 2015), así como los múltiples efectos de DAF-16/FOXO (Byrne et al., 2014; Pan et al., 2011; Tank et al., 2011; Toht et al., 2012). Sin embargo, aún con este conocimiento, gran parte de la regeneración observada en dauer ocurre en la transición entre la L1-L2 y dauer, momento en el cual el fenómeno regenerativo parece ser independiente de DLK-1 (**fig. 15 a,b**). De esta manera los 60 candidatos encontrados en el presente trabajo podrían ser una aproximación a posibles nuevos participantes en el proceso de regeneración axonal, como también una nueva forma en la cual conocidos participantes del proceso regenerativo tomen acción. La apertura constitutiva del canal MEC-4d resulta en un incremento de Ca^{2+} intracelular el cual junto con la contribución de liberación de Ca^{2+} por parte de fuentes internas, como el retículo endoplasmático (Xu et al., 2001), genera activación de proteasas (Syntichaki et al., 2002) actuando en la estabilidad microtubular (Chisholm, 2013). Tanto el Ca^{2+} como la inestabilidad microtubular actúan como señal de activación de DLK-1. Como resultado de nuestro trabajo, proponemos que DAF-16/FOXO interviene tanto a nivel antioxidativo (Honda y Honda, 1999; Paradis & Ruvkun., 1998), como en la activación de DLK-1 (Byrne et al., 2014). DLK-1 actúa a través de *cebp-1* a nivel transcripcional, mientras que favorece el crecimiento axonal mediante *ccpp-6* y la inactivación de *klp-7.* Junto a esto, probablemente DLK-1 actúe inhibiendo la acción de EFA-6, el cual se encuentra con una baja expresión en dauer (Calixto, 2015), promoviendo un mejor ambiente para la regeneración axonal. Asimismo, posible inhibidores de DLK-1, tales como RPM-1 disminuirían su afinidad mediante un mecanismo dauer dependiente, para potenciar el efecto de DLK-1. Sin embargo existe un inmenso potencial regenerativo aun desconocido, el cual se encarga de potenciar los efectos de DLK-1 y a la vez de actuar a través de distintas vías para lograr llevar a cabo el completo fenómeno observado en dauer (**fig. 18**). Todo este proceso de regeneración inevitablemente debe requerir de enormes gastos energéticos lo cual en las condiciones dauer debe ser un proceso complejo. Estudios recientes demuestran que en dauer, asociado al

gasto energético de la bomba Na^+/K^+, existen un ahorro energético 11.3 Kcal/mol por ciclo, lo cual es considerable, teniendo en cuenta que el consumo energético de la bomba Na^+/K^+ equivale cerca del 40% del gasto energético de la célula (Calixto, 2015).

Sin lugar a dudas, el fenómeno acá descrito posiblemente entregará nuevas ideas sobre el efecto de la diapausa, y posibles nuevos participantes del proceso regenerativo que servirán para entender mejor y de manera más íntegra la regeneración neuronal.

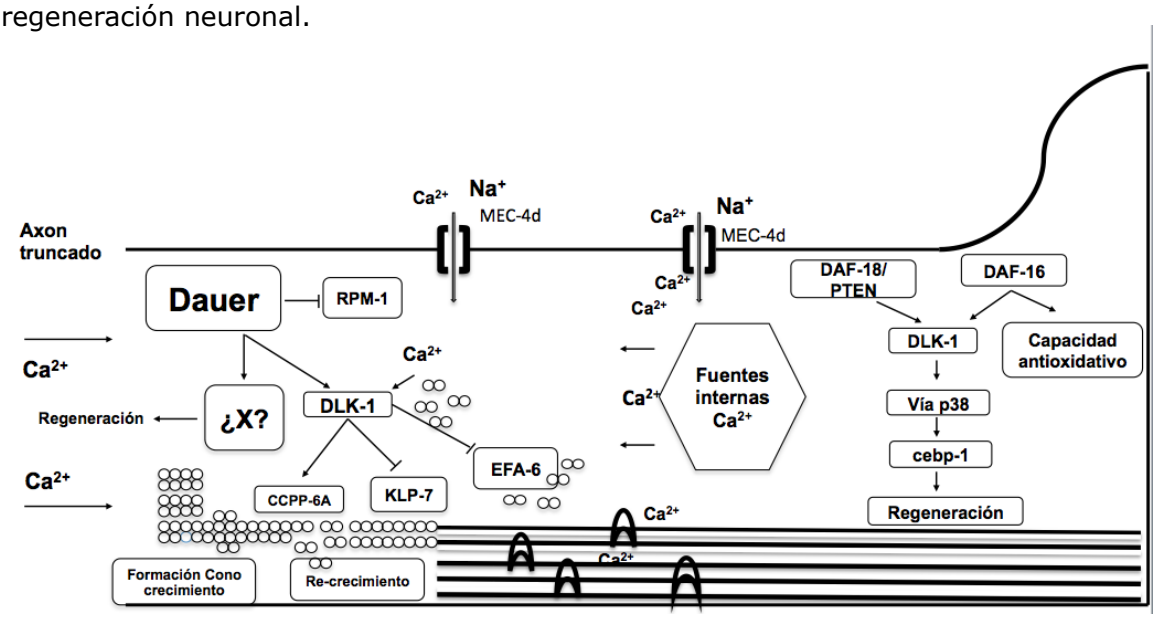


Figura 18. Modelo regenerativo en Dauer.

Ingreso en dauer permite la activación de diferentes vías asociadas a DLK-1 así como reguladores que potencian el efecto del mismo, tales como DAF-16/FOXO y DAF-18 permitiendo un ambiento propicio para favorecer la estabilidad de los microtúbulos así como la formación de cono de crecimiento y extensión del axón en crecimiento.

6. Conclusión.

Nuestro trabajo nos ha permitido vislumbrar un potente y sorprendente fenómeno biológico que ocurre bajo condiciones de diapausa. Conocido es el hecho que la dormancia permite a los animales sobrevivir ante condiciones desfavorables, pero más allá de la sobrevivencia, los cambios tanto metabólicos como morfo-fisiológicos dotan a los animales con ambientes y condiciones biológicas para que diversos procesos tomen acción durante estos estados.

Este estudio nos permitió establecer que más allá de la protección neuronal observada en diapausa en animales *mec-4d,* existe un potente fenómeno regenerativo, el cual no solo es morfológico sino también funcional y completamente dauer dependiente. Junto a esto, evidenciamos el importante rol de DLK-1, al igual que se ha observado en otros modelos de regeneración, e interesantemente notamos un efecto regenerativo especifico de DAF-16/FOXO. Sin embargo, a pesar de todos los participantes implicados en nuestro trabajo, aun desconocemos la forma en que todo este complejo mecanismo de regeneración neuronal es llevado a cabo. Y más aún, la manera en que de forma totalmente independiente, en dauer, se regeneran las neuronas.

7. Proyecciones.

Si bien nuestro trabajo nos reveló un sorprendente fenómeno regenerativo dependiente de la estancia en diapausa, asimismo nos abrió un escenario aun desconocido. Falta mucho por conocer sobre la manera en que las reestructuraciones metabólicas impactan en la regeneración axonal, y la manera en la cual se integran diversas señales, tanto metabólicas, genéticas, como ambientales para determinar el efecto final sobre el tejido dañado.

Dentro de los experimentos a realizar en el futuro se encuentran:

a) lograr identificar los genes mutados en los diferentes mutantes seleccionados, lo cual sin dudas no dará información sobre participantes conocidos en el ámbito de la regeneración, así como posibles nuevos actores, previamente desconocidos. Por lo cual el siguiente paso estará enfocado en secuenciar cada uno de los animales mutantes seleccionados.

b) determinar tanto los factores y mecanismos moleculares, así como los genes y/o red de genes involucrados en el proceso regenerativo.

c) realizar análisis transcriptómicos en distintos momentos del desarrollo de dauer, que nos permitan evidenciar de manera diferencial posibles actores que median la regeneración axonal.

8. Bibliografía

- Abrams B, Grill B, Huang X, Jin Y. (2008). Cellular and molecular determinants targeting the *Caenorhabditis elegans* PHR protein RPM-1 to perisynaptic regions. Dev. Dyn. 237:630 39.
- Arantes-Oliveira N, Apfeld J, Dillin A, Kenyon C (2002) Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans.* Science 295: 502–505.
- Antebi A, Yeh, W.H, Tait D, Hedgecock E.M, Riddle D.L. (2000). daf-12 encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*. Genes Dev 14, 1512-1527.
- Barnes, B.M. (1989). Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator. Science 244, 1593-1595.
- Bianchi L, Gerstbrein B, Frøkjaer-Jensen C, Royal D.C., Mukherjee G, Royal, M.A., Xue J., Schafer W.R., Driscoll M. (2004). The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation. Nat Neurosci 7, 1337-1344.
- Bianchi L, Driscoll M. (2004). The molecular basis of touch sensation as modeled in *Caenorhabditis elegans* in transduction channels in sensory cells (eds Frings, S and Bradley, J.) 1-29 (Wiley-VCH, Weinheim, Germany).
- Birnby D.A., Link E.M., Vowels J.J., Tian H, Colacurcio P.L., Thomas J.H. (2000). A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 155, 85-104.
- Braeckman, B.P., Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R. (2000). Patterns of metabolic activity during aging of the wild type and longevity mutants of *Caenorhabditis elegans*. J Am Aging Assoc 23, 55-73.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 71–94. Retrieved from http://www.genetics.org/content/77/1/71.short.
- Brown A.L., Liao Z., Goodman, M. (2008). MEC-2 and MEC-6 in the *Caenorhabditis elegans* Sensory mechanotransduction complex: Auxiliary subunits that enable channel activity. J Gen Physiol; 131(6): 605–616.

- Byerly L., Cassada R, Russell R. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology*.
- Calixto A, Jara J.S., Court F.A. (2012). Diapause formation and downregulation of insulin-like signaling via DAF-16/FOXO delays axonal degeneration and neuronal loss. PLoS Genet 8, e1003141.
- Calixto A. (2015). Life without food and the implications for neurodegeneration. *Advance in Genetics,* 92; 53-74.
- Cassada R.C., Russell R.L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 46, 326-342.
- Chalfie M, Sulston J. (1981). Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 82:358–70.
- Chalfie M, Au M. (1989). Genetics control of differentiation of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Science 1027-33.*
- Chalfie M, Sulston JE, White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. (1985). The neural circuit for touch sensitivity in *C. elegans*. J. Neurosci. 5:956–64.
- Chalfie M, Thomson N.J. (1979) Organization of neuronal microtubules in the nematode *Caenorhabditis elegans*. J Cell Biol;82:278–289.
- Chelur D.S., Ernstrom G.G., Goodman M.B., Yao C.A., Chen L., O' Hagan R., Chalfie, M. (2002). The mechanosensory protein MEC-6 is a subunit of the *C. elegans* touch-cell degenerin channel. Nature; 420 (6916): 669-73.
- Chen L, Wang Z, Ghosh-Roy A, Hubert T, Yan D, et al. 2011. Axon regeneration pathways identified by systematic genetic screening in *C. elegans*. Neuron 71:1043–57.
- Chisholm, A. (2013). Cytoskeletal dynamics in *Caenorhabditis elegans* axon regeneration. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 29:10.1–10.27.
- Chung, S.H., Schmalz, A., Ruiz, R.C., Gabel, C.V., Mazur, E. (2013). Femtosecond laser ablation reveals antagonistic sensory and neuroendocrine signaling that underlie *C. elegans* behavior and development. Cell Rep 4, 316-326.
- Croll N.A., Matthews B.E. (1977). "Biology of Nematodes." Glasgow, Blackie.
- Du H, Gu G, William C, Chalfie M. (1996). Extracellular proteins needed for *C. elegans* mechanosensation. Neuron 16:183–94.

- Driscoll M, Chalfie M. (1991). The mec-4 gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Reactions*, *179*(1), 14–16.
- Emtage L, Gu G, Hartwieg E, Chalfie M. Extracellular proteins organize the mechanosensory channel complex in *C. elegans* touch receptor neurons. Neuron. (2004);44:795–807.
- Fraser A, Kamath R, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*;408(6810):325-30.
- Franco M, Peters PJ, Boretto J, Van Donselaar E, Neri A, et al. (1999). EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. EMBO J. 18:1480–91.
- Fielenbach N, Antebi A. (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. Genes Dev. 2008 22: 2149-2165.
- Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S.E., Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(February), 806–811.
- Gao Y, Deng K, Hou J, Bryson J.B., Barco A, Nikulina E, Spencer T, Mellado, W, Kandel E.R., Filbin M.T. (2004) Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration in vivo. Neuron 44, 609–621.
- Gems D, Sutton A, Sundermeyer M. (1998). Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*.
- Golden J.W., Riddle D.L. (1982) A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science 218: 578–80.
- Golden J.W., Riddle, D.L. (1984a). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. Dev. Biol. *102*, 368–378.
- Golden J.W., Riddle, D.L. (1984b). A pheromone-induced developmental switch in *Caenorhabditis elegans*: Temperature-sensitive mutants reveal a wild-type temperature-dependent process. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *81*, 819–823.

- Golden J.W., Riddle D.L. (1984c). A gene affecting production of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. Mol. Gen. Genet. *198*, 534–536.
- Goodman M.B. et al. (2002). MEC-2 regulates *C. elegans* DEG/ENAC channels needed for mechanosensation. *Nature* 415, 1039-1042.
- Gottlieb S, Ruvkun G. (1994). daf-2, daf-16 and daf-23: Genetically interacting genes controlling Dauer formation in *C. elegans*. Genetics 137: 107–120.
- Ghosh-Roy A, Chisholm AD. *Caenorhabditis elegans*: a new model organism for studies of axon regeneration. Dev Dyn. 2010;239:1460–1464.
- Ghosh-Roy A, Goncharov A, Jin, Y. and Chisholm, A.D. (2012) Kinesin-13 and tubulin post-translational modifications regulate microtubule growth in axon regeneration. Dev. Cell 23, 716–728.
- Ghosh-Roy A, et al. Calcium and cyclic AMP promote axonal regeneration in *Caenorhabditis elegans* and require DLK-1 kinase. J Neurosci. 2010; 30:3175–3183.
- Hammarlund M, Jorgensen EM, Bastiani MJ. 2007. Axons break in animals lacking β-spectrin. J. Cell Biol. 176:269–75.
- Hammarlund M, Nix P, Hauth L, Jorgensen EM, Bastiani M. 2009. Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. Science 323:802–6.
- Hammarlund M, Jin Y. (2014). Axon regeneration in *C. elegans*. Curr Opin Neurobiol. 2014 Aug;27:199-207.
- Henderson, S.T. Johnson, T.E. (2001). daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *C. elegans*. Curr. Biol. 11: 1975–1980.
- Hertweck, M., Gobel, C., Baumeister, R. (2004). *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. Dev. Cell 6: 577–588.
- Hindle, A.G., Martin, S.L. (2013). Cytoskeletal regulation dominates temperature-sensitive proteomic changes of hibernation in forebrain of 13-lined ground squirrels. PLoS One 8, e71627.
- Hodgkin, J., Horvitz, H.R., Brenner, S. (1979). Nondisjuntion mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans. Genetics;* 91(1): 67-94.
- Hodgkin, J. (1988). In "The nematode *C. elegans*" (W. B. Wood ed.) pp243-280. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J.R. (2002). Ageing is reversed, and metabolism is reset to young levels in recovering dauer larvae of *C. elegans*. Exp Gerontol 37, 1015-1021.
- Huang M, Chalfie M. (1994). Gene interactions affecting mechanosensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. Nature: 367:467–70.
- Hur, E.-M., Saijilafu Zhou, F.-Q. (2012) Growing the growth cone: remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration. Trends Neurosci. 35, 164–174.
- Jeong PY, Jung M, Yim YH, Kim H, Park M, et al. (2005) Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. Nature 433: 541–545.
- Jones, S. J., Riddle, D. L., Pouzyrev, A. T., Velculescu, V. E., Hillier, L., Eddy, S. R., Stricklin, S. L., Baillie, D. L., Waterston, R., Marra, M. A. (2001). Changes in gene expression associated with developmental arrest and longevity in *Caenorhabditis elegans.* Genome Res 11, 1346-1352.
- Kamath R, Fraser A, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, Welchman D, Zipperlen P, Ahringer J (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*;421(6920):231-7.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. Nature 366: 461–464.
- Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., Ruvkun, G. (1997). Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *C. elegans*. Science 277: 942–946.
- Lai, C.C., Hong, K., Kinnell, M. Chalfie, M., Driscoll, M. (1996). Sequence and transmenbrane topology of MEC-4, an ion channel subunit required for mechanotransduction in *C. elegans. J. Cell Biol.* 133. 1071-1081.
- Lee, R.Y., Hench, J., Ruvkun, G. (2001). Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. Curr. Biol. 11: 1950–1957.
- Lewis, J., Fleming, J. (1995). Basic culture methods. *C. elegans: Modern Biological Analysis of an.*

- Li C, Hisamoto N, Nix P, Kanao S, Mizuno T, et al. 2012. The growth factor SVH-1 regulates axon regeneration in *C. elegans* via the JNK MAPK cascade. Nat. Neurosci. 15:551–57.
- Li, J., Tewari, M., Vidal, M., Lee, S.S. (2007). The 14–3–3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in *Caenorhabditis elegans.* Dev. Biol. 301: 82–91.
- Libina N, Berman JR, Kenyon C (2003) Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. Cell 115: 489–502.
- Lin, K., Hsin, H., Libina, N., Kenyon, C. (2001). Regulation of the *C. elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. Nat. Genet. 28: 139–145.
- Meléndez, A., Tallóczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E. L., Hall, D. H., and Levine, B. 2003. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. Science **301:** 1387-1391.
- Mitani S, Du H, Hall D, Driscoll M, Chalfie M. (1993). Combinatorial control of touch receptor neurons expression in *Caenorhabditis elegans*. Development 119:773–83.
- Morris, J.Z., Tissenbaum, H.A., and Ruvkun, G. (1996). A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *C. elegans.* Nature 382: 536–539.
- McMullen, D.C., Storey, K.B. (2008). Suppression of Na+K+ -ATPase activity by reversible phosphorylation over the winter in a freeze-tolerant insect. J Insect Physiol 54, 1023-1027.
- Nakata K, Abrams B, Grill B, Goncharov A, Huang X, et al. (2005). Regulation of a DLK-1 and p38 MAP kinase pathway by the ubiquitin ligase RPM-1 is required for presynaptic development. Cell 120:407–20.
- Narbonne, P., Roy, R. (2009). *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. Nature 457, 210-214.
- Paradis, S., Ailion, M., Toker, A., Thomas, J.H., Ruvkun, G. (1999). A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *C. elegans*. Genes & Dev. 13: 1438–1452.
- Paradis, S., Ruvkun, G. 1998. *C. elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. Genes & Dev. 12: 2488–2498.

- Pinan-Lucarre B, Gabel CV, Reina CP, Hulme SE, Shevkoplyas SS, et al. 2012. The core apoptotic executioner proteins CED-3 and CED-4 promote initiation of neuronal regeneration in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Biol. 10:e1001331
- Pirri J.K., Alkema M.J. (2012). The neuroethology of *C. elegans* escape. Curr Opin Neurobiol. 22(2):187-93.
- Ren, P., Lim, C.S., Johnsen, R., Albert, P.S., Pilgrim, D., Riddle, D.L. (1996). Control of *C. elegans* larval development by neuronal expression of a TGF-beta homolog. Science 274, 1389-1391.
- Riddle, D.L., Swanson, M.M., Albert, P.S. (1981). Interacting genes in nematode dauer larva formation. Nature *290*, 668–671.
- Riddle, D.L. (1988). The dauer larva. In "The nematode *Caenorhabditis elegans"* ed.), pp. 393-412. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- Riddle, D. L., Albert, P.S. (1997). *C. elegans* II. In "*C. elegans* II" eds.), pp. 739-768. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Samara C, Rohde CB, Gilleland CL, Norton S, Haggarty SJ, Yanik MF. Large-scale in vivo femtosecond laser neurosurgery screen reveals small-molecule enhancer of regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:18342–18347.
- Storey, K.B., Storey, J.M. (2004). Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. Biol Rev Camb Philos Soc 79, 207-233.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 100:64–119.
- Sulston JE, Horvitz HR. (1977). Postembryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 56:110–56.
- Sohal RS (2002) Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. Free Radic Biol Med 33: 37–44.
- Schwartz, C., Hampton, M., Andrews, M.T. (2013). Seasonal and regional differences in gene expression in the brain of a hibernating mammal. PLoS One 8, e58427.
- Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M., Tavernarakis, N. (2002). Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. Nature 419, 939-944.

- Tavernarakis, N., Driscoll, M. (1997). Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis Elegans*. Annu. Rev. Physiol. 1997. 59:659–89.
- Vanfleteren, J.R., De Vreese, A. (1996). Rate of aerobic metabolism and superoxide production rate potential in the nematode *Caenorhabditis elegans*. J Exp Zool 274, 93-100.
- VB, O., Burnell, A.M. (1990). Intermediary metabolism in the dauer larvae of the nematode *Caenorhabditis elegans.*2. The glyoxalate cycle and fatty-acid oxidation. comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol 95, 125-130.
- Vowels, J.J., Thomas, J.H. (1992). Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. Genetics *130*, 105–123.
- Yan, D., Wu, Z., Chisholm, A. D., and Jin, Y. (2009). The DLK-1 kinase promotes mRNA stability and local translation in *C. elegans* synapses and axon regeneration. Cell 138, 1005-1018.
- Yan D, Jin Y. (2012). Regulation of DLK-1 kinase activity by calcium-mediated dissociation from an inhibitory isoform. Neuron. 2012 Nov 8;76(3):534-48.
- Yan Z, Hui C, Zinovyeva A, Ambros V, Chuang C, Chang C. (2013). Developmental decline in neuronal regeneration by the progressive change of two intrinsic timers in *C. elegans. Science.; 340(6130): 372–376.*
- Wadsworth, W. G., Riddle, D. L. (1989). Developmental regulation of energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 132, 167-173.
- Wang, Y., Oh, S.W., Deplancke, B., Luo, J., Walhout, A.J., Tissenbaum, H.A. (2006). *C. elegans* 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO. Mech. Ageing Dev. 127: 741–747.
- Wang Z, Jin Y. Genetic dissection of axon regeneration. Curr Opin Neurobiol. 2010.
- Wang, J., Kim, S.K. (2003). Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*. Development 130, 1621-1634.
- Ward, S. 1973. Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: Identification of attractants and analysis of the response by use of mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **70:** 817-821.
- Wood, W. (1988). Determination of pattern and fate in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *The Molecular Biology of Cell Determination and Cell.*
- Wolkow, C.A., Munoz, M.J., Riddle, D.L., and Ruvkun, G. (2002.) Insulin receptor substrate and p55 orthologous adaptor proteins function in the

Caenorhabditis elegans daf-2/insulinlike signaling pathway. J. Biol. Chem. 277: 49591–49597.

- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. (1986). The structure of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 314:1–340.