



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Tesis de Doctorado en Bioquímica

**Estudios comportamentales y farmacológicos en
Caenorhabditis elegans: circuitos neuronales
implicados en la alimentación**

Farmacéutica María Gabriela Blanco

Bahía Blanca

Argentina

2021

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María José De Rosa

Profesora Adjunta Biología Molecular - Lic. En Ciencias Biológicas

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

Investigadora Independiente – CONICET

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Diego Hernán Rayes

Profesor Adjunto Farmacología I - Farmacia

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

Investigador Independiente – CONICET

Prefacio

“Estudios comportamentales y farmacológicos en *Caenorhabditis elegans*: circuitos neuronales implicados en la alimentación”

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para acceder al grado académico de Doctora en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Neurobiología de Invertebrados, del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del CONICET y de la Universidad Nacional del Sur (UNS). Estos ensayos se realizaron durante el período comprendido entre abril de 2016 y diciembre de 2020, bajo la dirección de la Dra. María José De Rosa y la co-dirección del Dr. Diego Hernán Rayes.



Farmacéutica María Gabriela Blanco



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la calificación de(.....)

*A mis papás, Alfredo y Marité
y a Benja*

Agradecimientos

Gracias a la Universidad Nacional del Sur por haberme formado como farmacéutica y, ahora una vez más, permitirme acceder a otro título. Gracias por la calidad de educación que brinda y por los excelentes profesionales que forma. Agradezco también a CONICET por haber hecho posible que realizara este doctorado.

Doy gracias a mis directores, Jo y Diego. Me considero afortunada de ser su primogénita. Gracias por el grupo que formaron, por enseñarme a querer la ciencia, por mostrarme la pasión que le dedican a su trabajo y por contagiarla, por los consejos en cada decisión tomada, por las discusiones de los resultados y por el tiempo que me dedicaron. Agradezco haber “caído” en su laboratorio.

Gracias a mis compañeros, Tania, Nati y Seba. Me encanta compartir todos los días en el lab con ustedes. Hicieron que estos cinco años los recuerde siempre con mucho cariño. Agradezco todas las discusiones científicas y no tan científicas que tenemos. Hicieron que pudiese trabajar motivada y cómoda todos los días. Les doy gracias por todas las veces q les pedí una mano y me la dieron, por las charlas de los viernes en el cuartito y por el equipo que formamos.

Gracias a Ignacio por todas las veces que te pedí ayuda y me resolvías el problema rápidamente.

Gracias al INIBIBB, a los chicos de al lado, y a todas las personas que me cruzo todos los días en los pasillos e intercambiamos una charla.

Gracias a la cátedra la Principios de Farmacología y Fisiopatología por aceptarme con la mejor onda.

Gracias a mis amigos fuera del INIBIBB, por todos los momentos compartidos durante tantos años. Por bancarme en las buenas y en las malas. Por ser mi desconexión y ayudarme a volver con más ganas al día siguiente al lab.

Gracias a toda mi familia. A mi mamá y papá por apoyarme en todas las decisiones que fui tomando en mi vida y por motivarme a hacer lo que más me gusta. Gracias a mi compañero de vida, Fede, por compartir todos los días conmigo y por el aguante, paciencia y amor que me tenés.

Publicaciones en Revistas Científicas

- “ β -cyclodextrin coating: improving biocompatibility of magnetic nanocomposites for biomedical applications”
Agotegaray M*, **Blanco MG**, Campeloc A, García E, Zyslerd R, Massheimer V, De Rosa MJ* & Lassalle V*
J Mater Sci Mater Med. 30 de enero 2020; 31(2):22. doi: 10.1007/s10856-020-6361-4
- “The flight response impairs cytoprotective mechanisms by activating the insulin pathway”
De Rosa MJ, Veuthey T, Florman J, Grant J, Blanco MG, Andersen N, Donnelly J, Rayes D* & Alkema M*
Nature. 28 de agosto 2019; 573(7772):135-138. doi: 10.1038/s41586-019-1524-5
- “Diisopropylphenyl-imidazole (DII): A new compound that exerts anthelmintic activity through novel molecular mechanisms”
Blanco MG, Vela Gurovic MS, Silbestri GF, Garelli A, Giunti S, Rayes D* & De Rosa MJ*
PLoS Negl Trop Dis. 17 de diciembre 2018; 12(12):e0007021. doi: 10.1371/journal.pntd.0007021

Trabajos presentados en Reuniones Científicas

- Presentación oral: “Neural Modulation of Foraging Strategies in *C. elegans*”. II Latin American Worm Meeting. Bolsa de Comercio de Rosario, Rosario, Santa Fe, Argentina. 19-21 de febrero 2020.
Blanco MG, Zabala Agustina, Alkema M, De Rosa MJ & Rayes D.
- “Diisopropylphenyl-imidazole (DII): A new compound that exerts anthelmintic activity through novel molecular mechanisms”. LI Reunión Anual de la Asociación Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 13-16 noviembre 2019.
Blanco MG, Vela Gurovic MS, Silbestri GF, Garelli A, Giunti S, Rayes D & De Rosa MJ.
- Presentación oral: “Serotonin and catecholamines coordinate antagonistic food-related behaviors in *C. elegans*”. XXXIV Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN). Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. 3-5 de octubre 2019.
Blanco MG, De Rosa MJ & Rayes D
- “Diisopropylphenyl-imidazole exerts anthelmintic activity through novel molecular mechanisms”. Drug Discovery for Neglected Diseases International Congress 2018, 4th Scientific Meeting of ResNet NPND. Departamento de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Buenos Aires, CABA, Argentina. 4-6 de diciembre 2018.
Blanco MG, Aletto F, Masson C, Vela Gurovic MS, Silbestri G, Garelli A, Rayes D & De Rosa MJ

- “Serotonin and Catecholamines Neuronal Circuits regulate opposing behaviors in *Caenorhabditis elegans*”. XXXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN). Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad de Córdoba, Argentina. 23-26 de octubre 2018.
Blanco MG, Rayes D & De Rosa MJ.
- “Opposing effects of catecholaminergic and serotonergic systems in *C. elegans*: potential implications for human posttraumatic stress disorders”. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. XLIX Reunión Anual de Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Palais Rouge, Buenos Aires, Argentina. 13-17 de noviembre 2017.
Blanco MG, Veuthey T, Andersen N, Rayes D and De Rosa MJ.

Índice

Resumen	11
Summary	15
Introducción General	20
<i>Caenorhabditis elegans</i> en investigación biomédica	21
Breve historia de <i>C. elegans</i>	21
Formas sexuales y características anatómicas	23
Ciclo de vida.....	25
¿Por qué elegir a <i>C. elegans</i> como modelo en investigación?.....	26
Materiales y Métodos	29
Mantenimiento y cultivo de <i>Caenorhabditis elegans</i>	30
Preparación de fuente de comida <i>Escherichia coli</i> OP50	32
Medición de la velocidad en medio sólido.....	32
Microscopía de Imágenes de calcio	34
Generación de cruzas genéticas.....	35
Ensayo de locomoción en medio líquido	37
Retrocruzamiento de cepas.....	37
Cribado de compuestos imidazólicos.....	39
Curvas dosis-letalidad de DII.....	40
Toxicidad en células humanas HEK-293	40
Generación de cepa transgénica OAR61.....	41
Ensayos de letalidad sobre cepas mutantes	41
Ensayos de recuperación a la exposición a DII.....	42
Curvas dosis-parálisis aguda	42
Ensayos de parálisis aguda utilizando animales cortados	42
Ensayos de evaluación de la contracción muscular mediante mediciones de la longitud del gusano	43
Ensayos de deposición de huevos	43
Medición de la tasa de bombeo faríngeo.....	43
Toxicidad en estadios tempranos del desarrollo.....	44
Análisis estadístico.....	45
Anexo: Medios y soluciones	46
CAPÍTULO I: Modulación neuronal de conductas relacionadas con la alimentación en <i>Caenorhabditis elegans</i>	49
Introducción.....	50
Conductas relacionadas a la búsqueda de alimento en animales.....	51
Modulación de la alimentación por aminas biogénicas en el sistema nervioso	52
Aminas biogénicas implicadas en la alimentación	53
<i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo para el estudio de circuitos neuronales	55
Comportamientos relacionados con la alimentación en <i>C. elegans</i>	57
Regulación de conductas relacionadas con la alimentación por el sistema nervioso en <i>C. elegans</i>	58
Objetivos.....	65
Resultados	67
Modulación serotoninérgica de la locomoción en la realimentación	68
Evaluación de la locomoción en la realimentación luego de distintos períodos en ausencia de comida	68
Estudio de la locomoción del mutante deficiente de 5-HT en la realimentación	73
Imágenes de calcio de neuronas serotoninérgicas en la realimentación.....	77
Intermodulación entre la señal serotoninérgica y tiraminérgica.....	80

SDR del mutante deficiente de TA.....	81
Actividad del sistema tiraminérgico durante el ayuno y realimentación.....	84
Circuitos involucrados en el antagonismo entre la señal serotoninérgica y tiraminérgica.....	88
Modulación tiraminérgica de la liberación neuronal de 5-HT.....	88
Antagonismo fisiológico de los efectos ejercidos por 5-HT y TA.....	91
Discusión.....	96
La disminución de la locomoción en el encuentro con la comida depende del tiempo de ayuno.....	99
La acción de la TA se opone a los efectos dependientes de 5-HT en la realimentación.....	100
La actividad tiraminérgica disminuye en el ayuno.....	102
La TA inhibe la señal serotoninérgica.....	105
La TA aumenta la locomoción a través de TYRA-2 y TYRA-3 y la disminuye activando a SER-2.....	107
Conclusión.....	111

CAPÍTULO II: Búsqueda de compuestos con potencial terapéutico utilizando el nematodo modelo *Caenorhabditis elegans*..... 114

Introducción.....	115
Parasitosis por nematodos.....	116
Drogas antihelmínticas.....	117
Actividad biológica de los derivados del Imidazol.....	118
Uso de <i>Caenorhabditis elegans</i> para la búsqueda de drogas antihelmínticas.....	120
Objetivos.....	124
Resultados.....	126
El compuesto diisopropilfenil-imidazol presenta actividad antihelmíntica específica.....	127
Cribado de compuestos imidazólicos con actividad antihelmíntica.....	127
Análisis de la actividad antihelmíntica de DII.....	130
Evaluación de la acción del DII sobre otras especies.....	131
Actividad antihelmíntica del DII a menor tiempo de exposición.....	133
El DII media sus efectos nematocidas a través de un mecanismo que difiere de los antihelmínticos clásicos.....	136
Búsqueda del blanco molecular del DII.....	136
Receptor ionotrópico colinérgico de tipo L.....	138
El DII y levamisol actúan a través de diferentes mecanismos.....	139
Identificación del tejido donde actúa el DII.....	147
Efectos adicionales del DII en nematodos.....	148
El DII es activo en estadios inmaduros de <i>C. elegans</i>	150
Discusión.....	154
El compuesto DII presenta actividad nematocida específica.....	155
Modo de acción del DII en estadios maduros.....	157
Acción del DII sobre la subunidad UNC-29 en estadios maduros.....	160
Modo de acción del DII en estadios inmaduros.....	161
El DII actúa a través de más de un blanco molecular.....	163
Conclusión.....	164

Conclusión General.....166

Bibliografía..... 168

Abreviaturas

5-HT	Serotonina
ABC	Área Bajo la Curva
ACh	Acetilcolina
AChR	Receptor Ionotrópico de Acetilcolina
AD	Adrenalina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA	Análisis de la Varianza
ARN	Ácido Ribonucleico
BSR	<i>Basal Slowing Response</i>
CA	Catecolaminas
CaM	Calmodulina
Células HEK-293	Células Embrionarias de Riñón Humano
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
DA	Dopamina
DII	Diisopropil-fenil imidazol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC50	Concentración Efectiva 50
ESR	<i>Enhanced Slowing Response</i>
FPA	Fluido Perientérico Artificial
GABA	Ácido Gamma Amino Butírico
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GPCR	Receptor Acoplado a Proteína G
IP	Yoduro de Propidio
L1-L4	Larvas estadio 1 – larvas estadio 4
L-AChR	Receptor Ionotrópico de Acetilcolina sensible a Levamisol
LB	Medio Luria Bertani
LC50	Concentración Letal 50
MBC	Concentración Bactericida Mínima
MI	Mesitil imidazol

MIC	Concentración Inhibitoria Mínima
MWT	<i>software</i> Multi-Worm Tracker
NA	Noradrenalina
NGM	<i>Nematode Growth Media</i>
OA	Octopamina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDMS	Polidimetilsiloxano
SDR	<i>Slowing Down Response</i>
TA	Tiramina
TBH-1	Tiramina β -hidroxilasa
TDC-1	Tirosina Decarboxilasa
TPH-1	Triptófano Hidroxilasa

Resumen

Candidata: María Gabriela Blanco

Directora: Dra. María José De Rosa

Co-director: Dr. Diego Hernán Rayes

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca – CONICET

“Estudios comportamentales y farmacológicos en *Caenorhabditis elegans*: circuitos neuronales implicados en la alimentación”

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre utilizado para responder interrogantes biológicos generales desde hace aproximadamente 60 años. Su fácil manipulación genética, el conocimiento del conectoma completo y la sencillez para estudiar su comportamiento, lo convierten en un excelente modelo para abordar preguntas neurobiológicas fundamentales y realizar ensayos farmacológicos. En esta tesis doctoral, empleamos al nematodo *C. elegans* como modelo para el estudio de la modulación neuronal de conductas asociadas a la alimentación y para la búsqueda de compuestos con potencial terapéutico.

Una adecuada alimentación es esencial para la supervivencia de los animales. El sistema nervioso modula la actividad motora en función de la disponibilidad de alimento en el medio ambiente y del estado nutricional interno. Cuando los animales han experimentado un ayuno prolongado y encuentran comida nuevamente, permanecen en un área pequeña para explotar al máximo la nueva fuente de nutrientes. El estímulo de comida tanto en ratones como en invertebrados produce la liberación de serotonina (5-HT). En *C. elegans*, la 5-HT modula comportamientos relacionados principalmente con la presencia de alimento: aumenta el bombeo faríngeo y la deposición de huevos y suprime la locomoción. Cuando *C. elegans* ha permanecido en ausencia de comida por un largo período y retorna al alimento, exhibe un drástico descenso de la velocidad e incrementa el bombeo faríngeo para favorecer la ingesta de comida. Se sabe que la abrupta reducción de la locomoción en el encuentro con el alimento depende de la liberación de 5-HT desde dos neuronas serotoninérgicas denominadas NSM y ADF. Por otro lado, la tiramina (TA) y octopamina (OA), análogos de noradrenalina y adrenalina

en invertebrados, respectivamente, son capaces de ejercer efectos opuestos a la 5-HT reduciendo el bombeo faríngeo y la puesta de huevos. A su vez, así como la 5-HT modula comportamientos que favorecen la alimentación en presencia de comida, la OA, por el contrario, regula conductas que son importantes durante el ayuno, como por ejemplo el aumento de la locomoción para facilitar la búsqueda de alimento. Sin embargo, las acciones ejercidas por la TA con respecto a la alimentación y locomoción aún no son del todo claras.

A pesar de que existen evidencias de los efectos antagónicos entre las vías serotoninérgicas y tira/octopaminérgicas, los mecanismos y significancia de esta interacción aún no se conocen con exactitud. Es así que, mediante técnicas de biología molecular, microscopia, ensayos comportamentales y farmacológicos, nos propusimos estudiar el rol de estas aminas biogénicas en la conducta de alimentación en *C. elegans*.

Mediante ensayos de comportamiento, observamos que mutantes nulos *tdc-1*, deficientes de la síntesis de TA, aun estando bien alimentados, son hipersensibles a la disminución de la locomoción en el encuentro con el alimento (lo cual se asemeja al comportamiento de animales hambreados). Esto sugiere que la 5-HT y TA ejercen efectos antagónicos en este comportamiento. Mediante ensayos de imágenes de calcio *in vivo*, observamos que la actividad del par de neuronas tiraminérgicas (llamadas RIM) disminuye en ausencia de alimento y aumenta paulatinamente en el regreso al mismo. Además, el agregado exógeno de TA durante el ayuno rescata parcialmente la gran desaceleración de la locomoción en la realimentación. Estos resultados en conjunto, nos permiten hipotetizar que la inhibición de la actividad de la neurona tiraminérgica durante el ayuno favorece la exacerbación de los efectos dependientes de la señal serotoninérgica en la realimentación. Finalmente, intentamos caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en esta intermodulación. Al evaluar la actividad de las neuronas serotoninérgicas NSM y ADF en animales deficientes de TA, determinamos que la falta de TA exagera la señal serotoninérgica en la vuelta al alimento. Esto sugiere que la TA inhibe la actividad de las neuronas serotoninérgicas apoyando nuestra hipótesis de que la disminución de la actividad tiraminérgica en el ayuno es necesaria para la exacerbada liberación de 5-HT en la realimentación. Además, de los cuatro receptores tiraminérgicos conocidos (tres GPCRs TYRA-2, TYRA-3 y SER-2 y un canal de cloruro LGC-55), encontramos que tres de ellos están implicados en la modulación de la locomoción a través de un circuito paralelo río abajo de las neuronas serotoninérgicas: los receptores TYRA-2 y TYRA-3 estimulan la locomoción, mientras que SER-2 la disminuye.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la inhibición de las neuronas tiraminérgicas durante el ayuno es clave para el comportamiento de los animales en la realimentación. Considerando las similitudes que existen en las conductas de alimentación y a la conservación de los componentes neuronales implicados en su regulación en el reino animal, nuestros resultados podrían colaborar al entendimiento del rol de estas señales no sólo en invertebrados sino también en otros animales.

Hemos mencionado además que *C. elegans* es un excelente modelo para realizar ensayos farmacológicos. Aprovechando esta ventaja y la cercanía evolutiva entre *C. elegans* y otras especies de nematodos parásitos, realizamos una búsqueda de compuestos con potencial actividad antihelmíntica. Las infecciones producidas por nematodos parásitos generan una sustancial morbilidad en billones de personas y pérdidas considerables del ganado y agricultura. Dado a las deficientes políticas de salud pública y a las malas condiciones de calidad de vida e higiene, estas infecciones afectan principalmente a los países más empobrecidos. A su vez, la aparición de parásitos resistentes en el ganado se ha convertido en una preocupación global y es una complicación emergente en las helmintiasis humanas. A pesar de esto, la industria farmacéutica ha relegado el desarrollo de nuevos antihelmínticos en las últimas décadas. Por lo expuesto, la investigación de moléculas con nuevos mecanismos de acción antihelmínticos es una necesidad urgente. La dificultad para realizar ensayos con parásitos en el laboratorio, la cercanía filogenética con las demás especies dentro del filo nematoda y su fácil manipulación genética convierten al nematodo de vida libre *C. elegans* en un modelo eficiente para el estudio de moléculas con potencial antihelmíntico.

En el segundo capítulo de esta tesis realizamos un cribado de moléculas derivadas del imidazol en *C. elegans* con el objetivo de identificar nuevos compuestos con acción terapéutica, específicamente con potencialidad antihelmíntica. Encontramos un compuesto, el Diisopropil-fenil imidazol (DII), que produce letalidad selectiva en nematodos adultos, siendo inocuo para células humanas en cultivo HEK-293 y larvas de *D. melanogaster*. Al presentar un efecto nematocida específico, decidimos estudiar en mayor profundidad su modo de acción. Evaluando la resistencia a la droga de cepas mutadas en genes que codifican para blancos moleculares de antihelmínticos conocidos, encontramos que el DII actúa a través de la subunidad no- α UNC-29 de un receptor ionotrópico colinérgico muscular (AChR). UNC-29, junto con las subunidades UNC-38, UNC-63, LEV-1 y LEV-8, ha sido tradicionalmente considerada como parte del AChR de tipo L sensible a la droga antihelmíntica Levamisol (L-AChR).

Las drogas, como el levamisol, que actúan como agonistas de receptores ionotrópicos colinérgicos generan la despolarización rápida de la célula muscular y parálisis del gusano. Observamos que el DII no genera estos efectos tradicionales de los agonistas nicotínicos y tampoco desplaza la curva dosis-respuesta del levamisol, como lo haría un antagonista del L-AChR. Además, determinamos que los mutantes deficientes de las demás subunidades que conforman el L-AChR clásico, son sensibles al DII. Estos resultados en conjunto sugieren que el DII actúa a través de un AChR muscular, que contiene la subunidad UNC-29, distinto al L-AChR clásico. Existen suficientes evidencias que avalan la presencia de múltiples clases de AChRs musculares con composiciones de subunidades diferentes distribuidas en el cuerpo del animal. Esto apoya nuestra hipótesis de que el blanco molecular del DII en gusanos adultos podría ser un AChR aún no identificado.

En general, las larvas de parásitos son más resistentes a los antihelmínticos clásicos como el levamisol. Sin embargo, determinamos que el DII es letal para las larvas y que existe otro blanco molecular distinto a UNC-29 implicado en este mecanismo. Esto presenta una ventaja terapéutica, ya que antihelmínticos que actúan a través de más de un mecanismo de acción otorgan una terapia más efectiva y retrasan la expansión de resistencias.

Creemos que el DII constituye el puntapié inicial para el desarrollo de un compuesto con potencialidad terapéutica. El hecho de que el DII presente actividad nematicida específica y que actúe a través de un blanco molecular diferente al de los antihelmínticos clásicos, sienta las bases para la dilucidación completa de su mecanismo de acción, así como la evaluación de su efectividad en nematodos parásitos.

En conclusión, en este trabajo de tesis explotamos la potencialidad del nematodo *C. elegans* con dos objetivos bien diferentes: 1) en el capítulo I nos centramos en intentar de contribuir con el entendimiento de un interrogante biológico fundamental: ¿cómo los circuitos neuronales producen comportamientos específicos que responden a las necesidades metabólicas del organismo?, y 2) en el capítulo II, con un perfil más aplicado, nos propusimos identificar nuevas moléculas con potencialidad antihelmíntica, que en el futuro puedan ser consideradas posibles terapias antiparasitarias.

Summary

Ph. D. candidate: María Gabriela Blanco

Director: Dra. María José De Rosa

Co-director: Diego Hernán Rayes

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca – CONICET

“Behavioral and pharmacological studies in *Caenorhabditis elegans*: neural circuits involved in feeding”

Caenorhabditis elegans is a free-living nematode that has been used for approximately 60 years to answer to general biological questions. Its easy genetic manipulation, the knowledge of its entire connectome and the simplicity to study its behavior, make it an excellent model for addressing fundamental neurobiological questions and carry out pharmacological assays. In this Ph. D. thesis, we used the nematode *C. elegans* as a model to study the neural modulation of feeding behaviors and to search for compounds with therapeutic potential.

An adequate feeding is essential for animal survival. The nervous system modulates motor activity depending on the availability of food in the environment and the nutritional internal state. When animals have experienced a long fasting period and find food again, they stay in a small area to fully exploit the new source of nutrients. The food stimulus both in mice and invertebrates produces serotonin (5-HT) release. In *C. elegans*, 5-HT modulates behaviors primarily related to the presence of food: it enhances pharyngeal pumping and egg-laying and suppresses locomotion. When *C. elegans* has been in absence of food for a long period of time and returns to food, the worm exhibits a drastic decrease in speed and stimulates pharyngeal pumping to promote food intake. It is known that the abrupt decrease in locomotion upon food encounter depends on 5-HT release from two serotonergic neurons called NSM and ADF. On the other hand, tyramine (TA) and octopamine (OA), norepinephrine and epinephrine analogs in invertebrates, respectively, have the potential of exerting opposite effects to 5-HT, reducing pharyngeal pumping and egg-laying. Moreover, just as 5-HT modulates behaviors that promote feeding in the presence of food, OA, on the contrary, regulates behaviors that are important during starvation, like increasing locomotion to ease the

foraging for food. Nevertheless, TA feeding-and-locomotion-related behaviors are still not entirely clear.

Even though there is evidence of the serotonergic and tyra/octopaminergic antagonistic effects, the mechanisms and relevance of this interaction are not yet known exactly. Thus, using molecular biology technics, microscopy, behavioral and pharmacological assays, we decided to study the role of these biogenic amines in food-related behaviors in *C. elegans*.

Performing behavioral assays, we observed that *tdc-1* null mutants, deficient in TA synthesis, even though well-fed, are hypersensitive to the decrease in locomotion upon food encounter (which resembles the behavior of starved animals). This suggests that 5-HT and TA exert antagonistic effects on this behavior. By calcium imaging *in vivo* assays, we observed that the activity of the pair of tyraminergetic neurons (called RIM) decreases in absence of food and increases gradually when animals return to food. Furthermore, the addition of exogenous TA during starvation partially rescues the enhanced slowdown of locomotion in refeeding. Taken together, these results allow us to hypothesize that the inhibition of the tyraminergetic neuron activity during starvation favors the exacerbation of serotonergic signal-dependent effects on refeeding. Finally, we tried to characterize the molecular mechanisms involved in this intermodulation. When evaluating the activity of the serotonergic neurons NSM and ADF in TA-deficient animals, we determined that the lack of TA exacerbates the serotonergic signal on the return to food. This suggests that TA inhibits the activity of serotonergic neurons supporting our hypothesis that the reduction in tyraminergetic activity during starvation is necessary for the exacerbated release of 5-HT upon refeeding. In addition, of the four known tyramine receptors (three GPCRs TYRA-2, TYRA-3 and SER-2 and a chloride channel LGC-55), we found that three of them are involved in the modulation of locomotion through a parallel circuit downstream of serotonergic neurons, namely TYRA-2 and TYRA-3 receptors stimulate locomotion, while SER-2 decreases it.

Summing up, our results suggest that the inhibition of tyraminergetic neurons during starvation is key for animals' behavior upon refeeding. Taking into account the similarities in feeding behaviors and the conservation of neuronal components involved in their regulation in the animal kingdom, our results could contribute to the understanding of the role of these signals not only in invertebrates but also in other animals.

We have also claimed that *C. elegans* is an excellent model to carry out pharmacological assays. Thus, taking advantage of this and the evolutionary closeness between *C. elegans* and other parasitic nematode species, we conducted a search for compounds with potential anthelmintic activity. Parasitic nematode infections generate substantial morbidity in billions of people and considerable losses to livestock and agriculture. Due to deficient public health policies and low quality of life and hygiene conditions, these infections mainly affect the poorest countries. Moreover, the appearance of resistant parasites in livestock has become a global concern and is an emerging complication in human helminth infections. In spite of this, the pharmaceutical industry has relegated the development of new anthelmintics in the last decades. Therefore, the investigation of molecules with new anthelmintic mechanisms of action is an urgent need. The difficulty in testing parasites in the laboratory, the phylogenetic relationship with other species within the phylum Nematoda and the ease of its genetic manipulation, make the free-living nematode *C. elegans* an efficient model for the study of molecules with anthelmintic potential.

In the second chapter of this Ph. D. thesis, we screened imidazole-derived molecules in *C. elegans* with the aim to identify new compounds with therapeutic action, specifically with anthelmintic potential. We found one compound, Diisopropylphenyl-imidazole (DII), that produces selective lethality in adult nematodes, being innocuous for cultured human HEK-293 cells and *D. melanogaster* larvae. As this compound has a specific nematicidal effect, we decided to study its mode of action in greater depth. By the assessment of drug resistance of strains mutated in genes encoding known anthelmintic molecular targets, we found that DII acts through a non- α UNC-29 subunit of a muscle cholinergic ionotropic receptor (AChR). UNC-29, along with the UNC-38, UNC-63, LEV-1 and LEV-8 subunits, has traditionally been considered as part of the L-type AChR, sensitive to the anthelmintic drug Levamisole.

Drugs, such as levamisole, which act as ionotropic cholinergic receptor agonists, generate rapid depolarization of the muscle cell and worm paralysis. We observed that DII does not generate these well-known effects of nicotinic agonists and does not shift the dose-response levamisole curve either, as a L-AChR antagonist would do. Furthermore, we determined that mutants deficient in the other subunits that form the classic L-AChR are sensitive to DII. Altogether, these results suggest that DII acts through a muscle AChR, which contains the UNC-29 subunit, different from the classic L-AChR. There is sufficient evidence to support the presence of multiple classes of

muscle AChRs with different subunit compositions distributed throughout the body of the animal. This supports our hypothesis that de DII molecular target could be a still unidentified AChR.

In general, parasite larvae are more resistant to classic anthelmintics like levamisole. Nonetheless, we determined that DII is lethal to larvae and that there is another molecular target other than UNC-29 involved in this mechanism. This has a therapeutic advantage since anthelmintics that act through more than one mode of action provide a more effective therapy and delay the expansion of resistance.

We believe that DII constitutes the starting point for the development of a compound with therapeutic potential. The fact that DII has specific nematicidal activity and that acts through a different classic anthelmintic molecular target lays the groundwork for the complete elucidation of its mechanism of action, as well as the evaluation of its effectiveness in parasitic nematodes.

In conclusion, in this thesis work we exploited the potentiality of the nematode *C. elegans* with two very different objectives: 1) in chapter I, we focused on trying to contribute to the understanding of a fundamental biological question, namely how neural circuits produce specific behaviors that respond to the organism metabolic needs?, and 2) in chapter II, with a more applied view, we proposed to identify new molecules with anthelmintic potential that could in the future be considered as possible antiparasitic therapies.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridos por los jurados.



Directora de Tesis
Dra. María José De Rosa



Co-director de Tesis
Dr. Diego Hernán Rayes

Introducción General

***Caenorhabditis elegans* en investigación biomédica**

Caenorhabditis elegans es un nematodo pequeño de vida libre que habita principalmente en suelos ricos en materia orgánica y en frutas y tallos de plantas en pudrición, abundantes en bacterias necesarias para su alimentación (Félix y Duveau, 2012; Blaxter y Denver, 2012). Hace aproximadamente 60 años que Sydney Brenner presentó a *C. elegans* como un modelo biológico para la comprensión de interrogantes fundamentales sobre neurobiología y biología del desarrollo. Propuso que era necesario un organismo experimental que fuese adecuado para estudios genéticos, seguimiento de linajes celulares y en el que se pudiera determinar la estructura completa del sistema nervioso (Brenner, 1974). Hoy en día se ha convertido en un organismo importante que se utiliza para estudiar funciones de la célula eucariota, circuitos neuronales, interacciones hospedador-microorganismo, blancos moleculares de drogas, procesos patológicos de enfermedades humanas, etc (Ellis y Horvitz, 1986; Wu y Xue, 2003; Gray, Hill y Bargmann, 2005a; Chamberlain y Benian, 2000; Wu *et al.*, 2015; Burns *et al.*, 2015; Blanco *et al.*, 2018). Se estima que hoy en día existen más de mil laboratorios en el mundo que investigan a *C. elegans* de manera activa (www.wormbase.org). La clave en el estudio de *C. elegans* ha sido la capacidad de responder a interrogantes biológicos tanto a nivel de un organismo entero como a nivel de una única célula bien identificada, utilizando como principal herramienta su fácil manipulación genética. Mas allá de la docilidad genética, su pequeño tamaño, su sencillo mantenimiento, su bajo costo, su corto ciclo de vida, su transparencia, el conocimiento de su conectoma, genoma y linaje celular, convierten a *C. elegans* en un excelente modelo experimental. En este trabajo de tesis aprovechamos todas estas ventajas para estudiar mecanismos moleculares a nivel neuronal implicados en comportamientos relacionados con la alimentación. A su vez, explotamos la facilidad para realizar ensayos farmacológicos realizando un cribado de compuestos derivados del imidazol en búsqueda de una molécula con potencial actividad antihelmíntica.

Breve historia de *C. elegans*

Antes del siglo XIX los estudios en nematodos eran dedicados a su colección, observación morfológica, clasificación de especies y descripción de su hábitat (Nigon y Félix, 2005-2018). A fines del siglo XIX los nematodos comenzaron a utilizarse como

especies modelos para estudiar mecanismos biológicos generales. Una figura clave de esta época es Emile Maupas, quien nombró al actual *C. elegans* como *Rhabditis elegans* (Maupas, 1900). Fue el primero en realizar cruces para analizar el mecanismo de determinación del sexo. El siguiente período en la investigación de nematodos corresponde a los años 40, cuando Victor M. Nigon y Ellsworth C. Dougherty, quienes lograron establecer condiciones de cultivo controladas en el laboratorio, analizaron la reproducción y nutrición del animal (Nigon y Dougherty, 1949; Dougherty *et al.*, 1959). La siguiente fase, y posiblemente la más significativa en el estudio de nematodos de vida libre, no fue hasta los años 1950-1960 cuando uno de los fundadores de la biología molecular y genetista bacteriano, Sydney Brenner, comienza un nuevo proyecto en biología del desarrollo y neurobiología en *C. elegans*. Su trabajo lo lleva a publicar en 1974 su primer artículo en *C. elegans*, presentando a este animal como un organismo modelo por primera vez (Brenner, 1974). Él sostiene que *C. elegans* es un animal dócil para realizar análisis genéticos, resaltando las ventajas como, su pequeño tamaño, su corto ciclo de vida y la capacidad de auto-fertilización de las hermafroditas que permiten el fácil mantenimiento de una cepa mutante. A Brenner lo siguieron grandes científicos que describieron el linaje celular completo (Kimble y Hirsh, 1979; Sulston y Horvitz, 1977; Sulston, Albertson y Thomson, 1980; Sulston *et al.*, 1983), el conectoma entero (White *et al.*, 1986; White *et al.*, 1976; Jarrell *et al.*, 2012; Cook *et al.*, 2019) y la total secuenciación del genoma (*C. elegans Genome Consortium*, 1998) de *C. elegans*. Estos tres extraordinarios proyectos han ayudado a comprender mecanismos moleculares generales, como por ejemplo la regulación de la apoptosis (Hengartner y Horvitz, 1994). Estos hallazgos son relevantes no solo para la fisiología de nematodos sino también para todo el reino animal, ya que la evolución ha conservado una gran cantidad de genes que juegan un rol similar, y en algunos casos idéntico, en nematodos y otros animales, incluidos los humanos (Lai *et al.*, 2000). Los avances impactantes en la investigación biomédica realizada en *C. elegans* fueron origen de tres premios Nobel. En el año 2002, Sydney Brenner, Robert Horvitz y John Sulston recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología por la significancia en el proyecto del linaje celular utilizado como plataforma para el descubrimiento de genes asociados a la muerte celular programada (Hengartner y Horvitz, 1994; Sulston y Horvitz, 1977; Brenner, 1974). Años más tarde, Craig Mello y Andrew Fire recibieron el mismo premio Nobel por el descubrimiento de los ARN de interferencia y su rol en la regulación de la expresión de genes (Fire *et al.*, 1998). Por último, Martin Chalfie fue galardonado con el premio Nobel de Química por

la introducción de la proteína verde fluorescente (GFP) como un marcador biológico en organismos vivos (Chalfie *et al.*, 1994).

Formas sexuales y características anatómicas

C. elegans presenta dos formas sexuales: hermafroditas autofertilizantes y machos (Fig. 1A y 1B) (Brenner, 1974). Los hermafroditas producen esperma temporalmente antes de producir los ovocitos. La autofertilización de los hermafroditas simplifica el mantenimiento de un stock ya que un único animal da lugar a una gran población genéticamente idéntica. Ambos sexos poseen cinco cromosomas autosomales diploides idénticos y difieren en los cromosomas sexuales: el hermafrodita presenta dos cromosomas sexuales X (XX), mientras que los machos presentan un solo cromosoma sexual X (X0). La mayoría de la descendencia producida por autofertilización es hermafrodita; únicamente un 0,1-0,2 % de la progenie son machos (Corsi, Wightman y Chalfie, 2015). Estas proporciones pueden ser alteradas por condiciones ambientales (ver Materiales y Métodos).

Este nematodo, que se alimenta de bacterias, es fácilmente cultivable en el laboratorio. Los animales se crecen sobre agar en placas de Petri sembradas con bacteria *Escherichia coli*, como fuente nutricional (Fig. 2). Cuando las larvas eclosionan miden 0,25 mm y cuando alcanzan la vida adulta tienen ~1 mm de largo. Su pequeño tamaño permite el cultivo de grandes cantidades de animales en el laboratorio en espacios reducidos. A pesar de su simplicidad, *C. elegans* presenta tejidos bien definidos y un número fijo de células somáticas (959 en hermafroditas y 1033 en machos). La capa epitelial más externa de células, la epidermis, encierra una cavidad llena de fluido, el pseudoceloma que contiene a los órganos internos (Fig. 1C). Las células de la epidermis secretan la cutícula, una capa protectora de matriz extracelular formada por colágeno, lípidos y glicoproteínas (Chisholm y Hardin, 2005; Page y Johnstone, 2007). En el interior, y conectado a la epidermis, se encuentran el tejido de pared muscular y el cordón nervioso ventral y dorsal que inerva a los músculos (Fig. 1A y C). La contracción y relajación de las 95 células musculares, dispuestas de manera longitudinal en el cuerpo del animal, generan el “elegante” movimiento sinusoidal característico de *C. elegans*. Dentro de la región neuro-muscular se encuentran los sistemas digestivo, excretor y reproductivo (Fig. 1C). El intestino se conecta con la boca a través de la faringe (Fig. 1B). Es una bomba neuromuscular que tritura a la bacteria antes de que pase hacia el intestino

para su digestión. Está formada por células epiteliales, marginales, glándulas, 20 células musculares dispuestas de manera radial y 20 neuronas. Los principales neurotransmisores que liberan estas neuronas para regular el bombeo faríngeo son acetilcolina, glutamato y serotonina (Avery y You, 2012). Además, en la cavidad pseudocelómica hay seis células llamadas celomocitos, que se comportan de manera similar a los macrófagos de vertebrados (Grant y Sato, 2006), endocitando y limpiando el material en el pseudoceloma del animal.

Una de las principales ventajas de *C. elegans* es su transparencia. Esta característica permite visualizar los tejidos internos, células individuales y detalles subcelulares mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC). A su vez, posibilita la caracterización de la expresión de proteínas marcadas con proteínas fluorescentes. Asimismo, se pueden utilizar reporteros fluorescentes (GCaMP) para detectar el flujo de calcio en una célula y medir, por ejemplo, la actividad de una neurona específica. La transparencia también permite que mediante ensayos de optogenética se pueda alterar la actividad de neuronas individuales (De Rosa *et al.*, 2019).

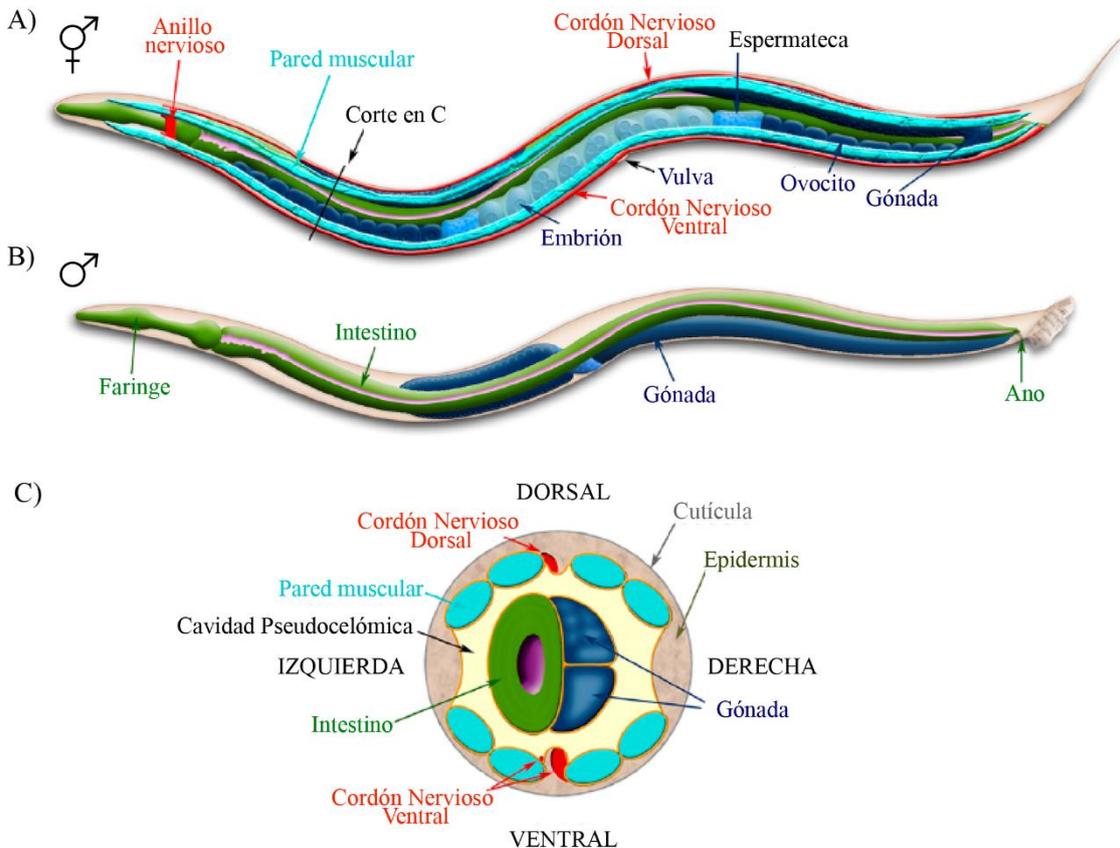


Fig 1. Anatomía de *C. elegans*. Vista lateral de las principales estructuras anatómicas de un hermafrodita (A) y un macho (B). A) El hermafrodita tiene una cola larga y afilada. B) Los machos presentan una cola

característica en forma de abanico. El sistema nervioso y músculos han sido omitidos. C) Corte transversal de la región anterior del animal hermafrodita (marcado con la línea negra en A). Adaptado de *WormBook* (Corsi, Wightman y Chalfie, 2015)

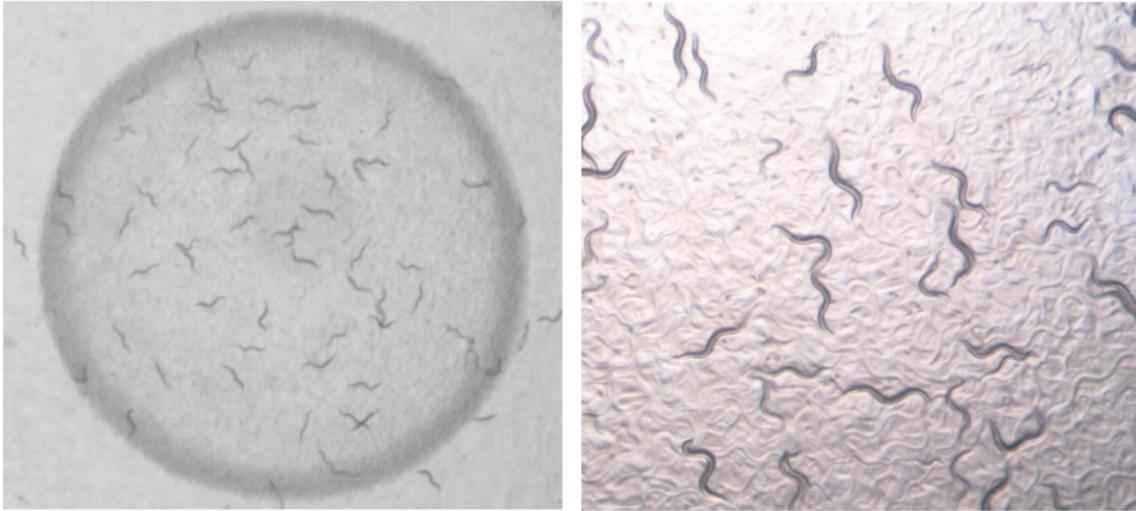


Fig 2. Cultivo de *C. elegans* en agar sembrado con bacteria *Escherichia coli*. Izquierda: animales dentro del césped de bacteria *E. coli* OP50 de la cual se alimentan. Derecha: población de gusanos de diferentes edades.

Ciclo de vida

C. elegans presenta un ciclo de vida rápido: aproximadamente 3 días a 20°C desde huevo a adulto grávido. En la etapa reproductiva los hermafroditas pueden producir alrededor de 300 huevos autofecundados y en caso de haberse apareado con machos son capaces de depositar ~1000 huevos. Un hermafrodita joven puede acumular 10-15 huevos en el útero y expulsa 1 o 2 huevos en cada apertura de la vulva siguiendo un patrón temporal. En condiciones favorables para la deposición de huevos (disponibilidad de alimento), los depositarán en tiempos cortos de 1 - 2 minutos separados de períodos largos de 20 minutos (Waggoner *et al.*, 1998). Esta etapa reproductiva dura 2-3 días hasta que se consume todo el esperma almacenado en la espermateca. La deposición de huevos va a estar regulada por un programa motor que involucra motoneuronas y 16 células musculares, que al contraerse abren la vulva y comprimen el útero para expulsar los huevos. Las principales neuronas implicadas en este comportamiento consisten en un par de neuronas serotoninérgicas llamadas HSN y 6 neuronas colinérgicas pertenecientes al cordón nervioso ventral (VC1-6) (Schafer, 2005). La embriogénesis tarda unas 14-16 horas y cuando el huevo eclosiona, el embrión se transforma en larva 1 (L1). En presencia de alimento el animal atraviesa 4 estadios larvarios (L1-L4) y luego alcanza la adultez

(Fig. 3). Los animales pueden vivir aproximadamente 3-4 semanas en condiciones adecuadas de alimentación y temperatura (Corsi, Wightman y Chalfie, 2015). En situaciones desfavorables, como depleción de comida o alta densidad de animales, la larva L2 activa un ciclo de vida alternativo generando un estadio ultrarresistente llamado dauer (Hu, 2007). Las larvas dauer pueden sobrevivir muchos meses y es la forma en que se dispersan en la naturaleza comúnmente.

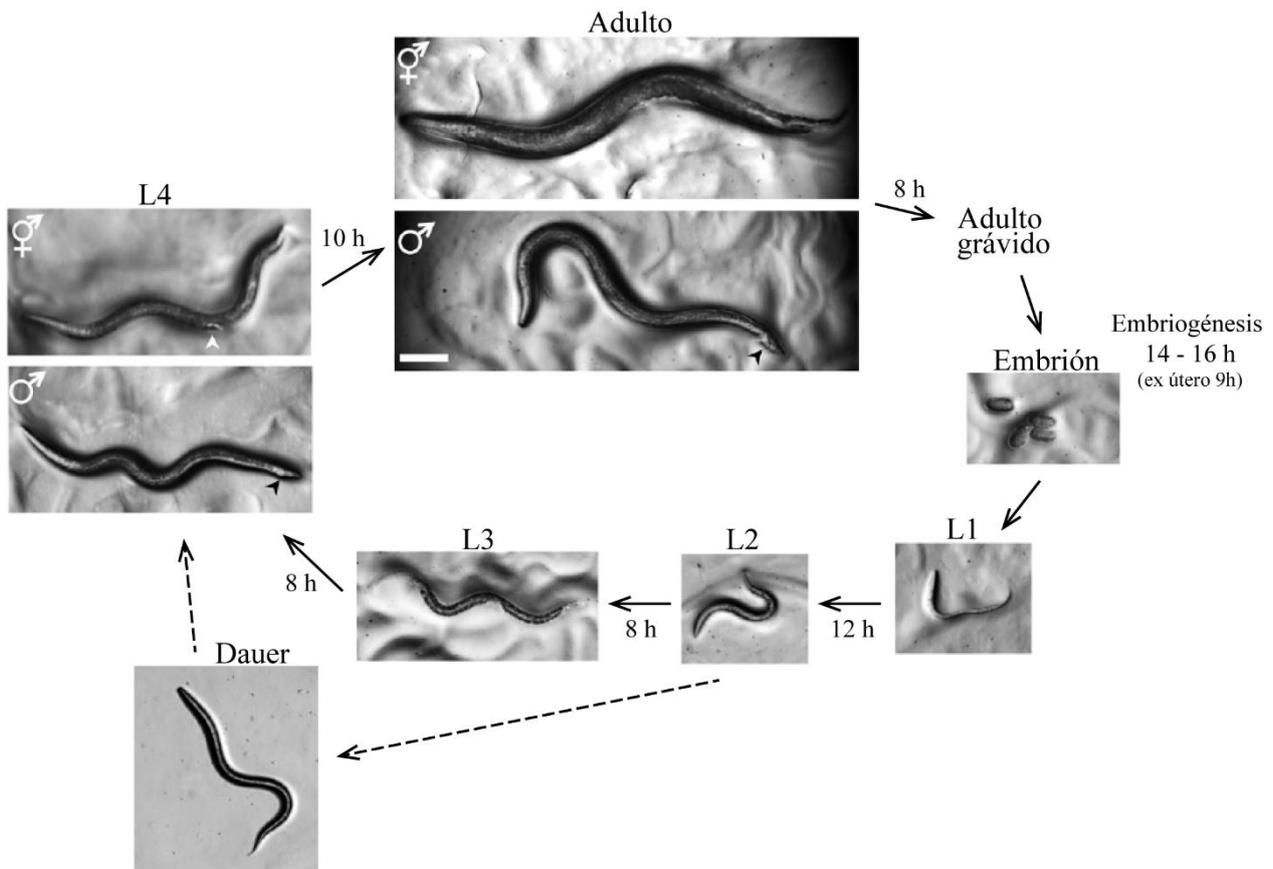


Fig 3. Ciclo de vida de *C. elegans*. Los sexos no se distinguen fácilmente hasta el estadio L4. En el estadio L4 los hermafroditas tienen una cola afilada y se puede observar la vulva en desarrollo (flecha blanca) como un medio círculo en el centro del lado ventral. Por otro lado, los machos tienen una cola más ancha (flecha negra). En la etapa adulta los dos sexos se distinguen por la cola afilada del hermafrodita y en forma de abanico del macho (flecha negra). Escala de barra: 0,1 mm. Adaptado de *WormBook* (Corsi, Wightman y Chalfie, 2015).

¿Por qué elegir a *C. elegans* como modelo en investigación?

C. elegans presenta numerosas ventajas para ser utilizado como modelo biológico de organismos eucariontes. Algunas de estas características son su pequeño tamaño, fácil cultivo, bajo costo de mantenimiento, corto ciclo de vida, transparencia, docilidad para

realizar estudios genéticos y la posibilidad de modular la expresión de genes utilizando ARN de interferencia o promotores tejido-específicos. Además, la presencia de dos sexos y el rápido ciclo de vida permiten realizar cruza genéticas en un corto tiempo en el laboratorio. Las fortalezas experimentales y las similitudes de los mecanismos celulares y moleculares entre este nematodo y otros animales (metabolismo, regulación de genes, maquinaria sináptica, biología proteica, etc.) han hecho que *C. elegans* sea un organismo excelente para estudiar procesos biológicos generales (Bargmann, 1998; Das y Arur, 2017; Jia, Chen y Riddle, 2004; Jannot *et al.*, 2011; Blumenthal, 2012). Se estima que 60 - 80 % de los genes humanos están conservados en *C. elegans* (Kaletta y Hengartner, 2006) y que ~52 % de los genes que codifican para proteínas en humanos presentan un ortólogo funcional en *C. elegans* (Kim *et al.*, 2018). Por esta razón, es que muchos descubrimientos en este nematodo tienen relevancia en la biología e, incluso, en la fisiología y enfermedades humanas.

C. elegans es el único animal cuyo diagrama completo de conexiones neuronales ha sido establecido (White *et al.*, 1986; Jarrell *et al.*, 2012; Cook *et al.*, 2019), constituyendo un excelente modelo para responder a interrogantes neurobiológicos. Además, los innovadores desarrollos tecnológicos, la sofisticación en el análisis de comportamientos y la posibilidad de cuantificar la actividad neuronal son empleados para describir circuitos neuronales que modulan comportamientos como, por ejemplo, la actividad motora (Pierce-Shimomura *et al.*, 2008). Hay que destacar también, que los componentes y estructuras que conforman las sinapsis (neurotransmisores, receptores y moléculas de transporte) presentes en vertebrados se encuentran en *C. elegans*. En el primer capítulo de esta tesis, utilizamos todas estas ventajas para estudiar la modulación neuronal del comportamiento de alimentación en animales que han experimentado un período prolongado de ayuno.

Otra característica destacada de *C. elegans* es que es un organismo benigno no patógeno para humanos. Es un animal de vida libre, no parásito que no representa un peligro para el manipulador. Ha sido reportado por trabajadores de laboratorios, que gusanos adultos y extractos de gusanos del nematodo parásito *Ascaris suum* pueden generar la aparición ocasional de reacciones alérgicas (Kennedy, 2013). Sin embargo, hasta el momento no han sido documentadas alergias a *C. elegans*. Mas allá de la ventaja de no presentar un riesgo de infección para el humano, la cercanía evolutiva de *C. elegans* y otras especies de nematodos parásitos y la similitud en su fisiología, ha impulsado su uso como modelo para el desarrollo de nuevas alternativas para el control de parasitosis

(Burns *et al.*, 2015). Las infecciones de nematodos parásitos generan un gran impacto en la salud humana, especialmente en países poco desarrollados, y pérdidas económicas significativas en cultivo y ganado (Bethony *et al.*, 2006b; Rist *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2013). *C. elegans* ha jugado un rol crítico en la elucidación de mecanismos de acción de drogas antihelmínticas (Holden-Dye y Walker, 2014). Más aún, dado el alarmante surgimiento de resistencias frente a los antihelmínticos (Fuller, Lilley y Urwin, 2008), *C. elegans* representa una plataforma útil para acelerar el proceso de desarrollo de nuevas drogas. En el segundo capítulo de esta tesis, realizamos un cribado de moléculas con potencial actividad biológica e identificamos un compuesto, el diisopropil-fenil imidazol, capaz de causar letalidad específica en nematodos. Creemos que el novedoso mecanismo de acción de este compuesto podría convertirlo en un candidato para el desarrollo de una nueva droga antihelmíntica.

En conclusión, *C. elegans* ha sido un valioso recurso de descubrimientos científicos a través de los años. Aprovechando las ventajas y versatilidad que presenta este modelo biológico, en este trabajo de tesis intentamos contribuir con el conocimiento en dos áreas diferentes:

- i) Procuramos estudiar un mecanismo neurobiológico general que contribuya a la comprensión de cómo el sistema nervioso es capaz de modular comportamientos que responden a un estímulo externo, como la comida, en base a las necesidades nutricionales del organismo.
- ii) Aprovechando la cercanía evolutiva que presenta *C. elegans* con los nematodos parásitos, nos propusimos identificar nuevas moléculas con potencial antihelmíntico, que en el futuro podrían contribuir al tratamiento de enfermedades parasitarias desatendidas.

Materiales y Métodos

Mantenimiento y cultivo de *Caenorhabditis elegans*

Los gusanos *C. elegans* se cultivaron y mantuvieron en *Nematode Growth Medium* (NGM, Anexo 1) en cápsulas sembradas con *Escherichia coli* OP50 como fuente de comida a 20°C (Stiernagle, 2006). Las cápsulas se guardaron invertidas para evitar que condense la humedad. La cepa Bristol N2 es utilizada como cepa salvaje en todos los experimentos. La mayoría de las cepas mutantes fueron obtenidas del *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), el cual es financiado por el NIH *Office of Research Infrastructure Programs* (P40 OD010440). En las tablas 1 y 2 se detallan las cepas mutantes utilizadas en el capítulo I y II, respectivamente. Dado al proceso de mutagénesis espontánea, varias cepas de la librería del CGC contienen otras mutaciones además de la mutación de interés. Esas mutaciones indeseadas se eliminaron mediante el retrocruzamiento con la cepa salvaje (mínimo 4 retrocruzamientos para ser considerada pura).

Los experimentos fueron realizados con huevos o animales sincronizados en estadio larval L1, L4 o adulto joven según indique cada ensayo. Para obtener animales sincronizados en estadio L4 o adulto, se transfirieron 10-15 hermafroditas grávidos a una cápsula sembrada con *E. coli*, se dejaron depositar huevos por ~5 horas y luego se retiraron las madres. Se dejó crecer la progenie por ~2,5 días hasta alcanzar el estadio L4. Para los experimentos realizados con L4, se seleccionaron los gusanos con el medio círculo característico de la vulva en desarrollo (ver Introducción General, Fig. 3) el día del ensayo. Para los experimentos realizados con adultos, se seleccionaron animales L4 el día anterior. Con respecto a los ensayos realizados con huevos y L1, ver extracción y aislamiento de huevos y ensayos de viabilidad de larvas.

Para transferir los gusanos de una cápsula a otra se utilizó un *worm picker*. El *worm picker* se obtuvo introduciendo aproximadamente 2 cm de un alambre de platino en la punta de una pipeta Pasteur de vidrio y se aplanó la punta con una pinza. Con la punta del alambre se tomó una pequeña cantidad de bacteria que se utilizó para pegar un gusano y transferirlo a otra cápsula. El alambre de platino se calienta y enfría rápidamente, por lo que se flameó entre cada transferencia para evitar la contaminación entre stocks de gusanos.

Cepa	gen (alelo) cromosoma	Origen
MT14894	<i>tph-1 (n4622)</i> II	CGC
MT10661	<i>tdc-1 (n3420)</i> II	CGC
MT9455	<i>tbh-1 (n3247)</i> X	CGC
QW331	zfls (<i>ptbh-1::tdc-1; tdc-1</i>)	Lab Alkema
SWF108	fluEx59 [<i>ptph-1::GCaMP7F; myo-3::mCherry</i>]	Lab Alkema
QW2134	<i>tdc-1 (n3420)</i> II; fluEx59 [<i>ptph-1::GCaMP7F; myo-3::mCherry</i>]	Esta tesis
QW2135	<i>tbh-1 (n3247)</i> X; fluEx59 [<i>ptph-1::GCaMP7F; myo-3::mCherry</i>]	Esta tesis
QW1602	<i>lin-15 (n765ts); zflEx758 [pcex-1::NLSmCherry::GCaMP6]</i>	Lab Alkema
CX11839	<i>tyra3 (ok325)</i> X	CGC
QW42	<i>tyra2 (tm1815)</i> X	CGC
OH313	<i>ser2 (pk1357)</i> X	CGC
QW89	<i>lgc55 (tm2913)</i> V	CGC
QW830	<i>tyra-3 (ok325)</i> X; <i>tyra-2 (tm1815)</i> X	Lab Alkema
QW399	<i>tyra-3 (ok325)</i> X; <i>lgc-55 (tm2913)</i> V	Lab Alkema
QW832	<i>tyra-3 (ok325)</i> X; <i>ser-2 (pk1357)</i> X	Lab Alkema
QW865	<i>tyra-3 (ok325)</i> X; <i>tyra-2 (tm1815)</i> X; <i>lgc-55 (tm2913)</i> V	Lab Alkema
QW828	<i>tyra-3 (ok325)</i> X; <i>tyra-2 (tm1815)</i> X; <i>ser-2 (pk1357)</i> X	Lab Alkema
QW833	<i>tyra-3(ok325)</i> X; <i>tyra-2(tm1815)</i> X; <i>ser-2(pk1357)</i> X; <i>lgc-55(tm2913)</i> V	Lab Alkema
OAR87	<i>ptph-1::GFP; tyra-3::mCherry</i>	Esta tesis

Tabla 1. Cepas utilizadas en el capítulo I

Cepa	gen (alelo) cromosoma	Origen
CB1072	<i>unc-29 (e1072)</i> I	CGC
CB3474	<i>ben-1 (e1880)</i> III	CGC
CB407	<i>unc-49 (e407)</i> III	CGC
	<i>avr-14 (ad1305)</i> I	
DA1316	<i>avr-15 (vu227)</i> V	CGC
	<i>glc-1 (pk54)</i> V	
RB918	<i>acr-16 (ok789)</i> V	CGC
OAR 114	<i>acr-23 (ok2804)</i> V	CGC (retrocruzada para esta tesis)
CB904	<i>unc-38 (e264)</i> I	CGC
ZZ26	<i>unc-63 (x26)</i> I	CGC
OAR59	<i>lev-8 (ok1519)</i> X	CGC (retrocruzada para esta tesis)
OAR60	<i>lev-1 (ok3201)</i> IV	CGC (retrocruzada para esta tesis)
OAR61	<i>myo-3::unc-29;unc-29 (e1072)</i> I	Esta tesis

Tabla 2. Cepas utilizadas en el capítulo II

Preparación de fuente de comida *Escherichia coli* OP50

La *E. coli* OP50 ha sido obtenida del CGC. Del cultivo original se aislaron colonias en medio LB agar (ver Anexo 2) que se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche. Se inoculó una única colonia en medio líquido LB, se dejó crecer con agitación a 37°C durante la noche y se utilizó para sembrar las cápsulas de NGM.

Capítulo I

Medición de la velocidad en medio sólido

Para medir la dinámica de velocidad de los animales durante el encuentro con la comida (*Slowing Down Response*, SDR) primero se sembraron 40 µl de bacteria *E. coli* OP50, crecida en LB durante toda la noche, en un borde de una cápsula de 60 mm de NGM y se esparció alrededor de la cápsula dejando el centro libre de bacteria. Se incubaron las cápsulas a 37°C durante toda la noche, permitiendo que la bacteria creciera

en forma de césped homogéneo y se usaron al día siguiente. Aquellas cápsulas que no fueron utilizadas inmediatamente se guardaron a 4°C para impedir el sobrecrecimiento de la bacteria. A continuación, se transfirieron aproximadamente 8-10 adultos jóvenes (24 horas después de L4) sobre una gota de 2 µl de buffer M9 (ver *Anexo 3*) en el centro de la cápsula. Una vez absorbida la gota, se grabó el desplazamiento de los gusanos hacia la bacteria y durante el encuentro con la misma. Se utilizó el *software* Multi-Worm Tracker (MWT) (Swierczek *et al.*, 2011) para obtener las grabaciones de la dinámica de locomoción con una alta resolución temporal. Posteriormente, se cuantificó la velocidad en función del tiempo (µm/seg) de cada animal mediante el *software* Choreography y un *script* customizado de MATLAB (Yemini, Kerr y Schafer, 2011). Se obtuvieron los datos de velocidad cada 0,25 segundos. Dado que se puede distorsionar la locomoción normal de los gusanos cuando se los transfiere de una cápsula a otra con el alambre de platino, aquellos animales que alcanzaron la bacteria antes de los 2 minutos de grabación fueron eliminados del ensayo. Dependiendo del experimento y como ha sido indicado en el apartado Resultados, los ensayos se realizaron con animales saciados o hambreados (durante 10, 20 o 120 minutos) expuestos o no a TA exógena (20 mM en medio sólido NGM durante 120 minutos previos al ensayo). Todos los experimentos fueron realizados a 20°C.

Una vez obtenidas las grabaciones se identificó manualmente como tiempo 0 el momento en que la cabeza del animal entraba en contacto con el borde de la bacteria. Seguidamente, se graficaron las curvas de velocidad en función del tiempo (µm/seg) desde 50 segundos antes y después del tiempo 0 con el *software* Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Luego, a partir de los datos de velocidad en función del tiempo se calculó, dependiendo el experimento, el promedio de velocidad dentro de un rango de 3 segundos en el comienzo del ensayo (-47 a -44 segundos), antes (-8 a -5 segundos) e inmediatamente después (1 a 4 segundos) de la llegada de cada animal a la bacteria. Posteriormente, se calculó el porcentaje de velocidad inicial como la velocidad media entre 1 - 4 segundos/velocidad media entre -47 - -44 segundos x 100 de cada animal. Cada experimento se repitió al menos tres veces de manera independiente con 8-10 animales.

Microscopía de Imágenes de calcio

Las cámaras microfluídicas utilizadas para la obtención de las imágenes de la dinámica de calcio neuronal en animales que se mueven libremente se prepararon mediante litografía suave con polidimetilsiloxano (PDMS) (los moldes fueron realizados por D. Albrecht de Worcester Polytechnic Institute). Dependiendo del ensayo, animales L4 que expresan GCaMP7 en la neuronas serotoninérgicas NSM, ADF y HSN (*fluEx59 [ptph-1::GCaMP7F; myo-3::mCherry]*) salvajes o cruzados con mutantes nulos en los genes *tdc-1* y *tbh-1* y animales que expresan GCaMP6 en el par de neuronas tiraminérgicas RIM (*lin-15 (n765ts); zfEx758 [pcex-1::NLSmCherry::GCaMP6]*) se sincronizaron 24 horas antes del ensayo. El sensor de calcio GCaMP es una proteína construida por la fusión de la proteína verde fluorescente (GFP), calmodulina (CaM) y el péptido M13 de la cadena liviana de la miosina quinasa que interacciona con CaM (*Ca²⁺-CaM binding domain*). Cuando el Ca^{2+} intracelular aumenta, se une a la CaM, formándose el complejo CaM-M13, lo cual genera una deprotonación en GFP aumentando la fluorescencia verde cuando se irradia con luz UV (Chen *et al.*, 2013; Lin y Schnitzer, 2016).

Aproximadamente 15 animales adultos jóvenes se transfirieron a buffer S-basal (ver Anexo 4) y se inyectaron en la cámara microfluídica, a través de la cual se perfunde S-basal por gravedad. Los animales que se cargaron en la cámara fueron tratados con S-basal solo o con S-basal con bacteria *E. coli* OP50 para evaluar la actividad neuronal durante la privación de comida o en la realimentación, respectivamente. La bacteria *E. coli* OP50 se creció durante la noche a 37°C con agitación en medio LB, luego se centrifugó 3 veces a 6000 x g durante 15 minutos y se resuspendió en S-basal a una concentración de 10^9 cel/ml ($DO_{600} = 2$). Después de cargar los animales en la cámara y luego de 15 minutos de aclimatación, las imágenes de fluorescencia fueron capturadas cada 30 segundos con una emisión de luz de 20 ms a una magnificación de 5X con un microscopio AxioObserver A1 invertido (Zeiss) conectado a una cámara ORCA-Flash 4.0 digital CMOS (Hamamatsu). Se utilizó el *software* Micromanager (Edelstein *et al.*, 2014) para controlar el tiempo entre cada emisión de la luz y de captura de imagen. La fluorescencia de las neuronas NSM y ADF o RIM se cuantificó mediante el *software* Fiji-ImageJ. Se dibujó una región de interés (ROI) circular de 7 píxeles de diámetro alrededor de la neurona a analizar y también en el fondo. Se calculó la intensidad de fluorescencia de cada neurona y se sustrajo el fondo. Finalmente, se graficó el promedio del cambio de

fluorescencia en el tiempo, medido como $\Delta F/F_0$ ($(F_t - F_0)/F_0$) siendo F_0 el valor de fluorescencia 5 minutos antes del cambio de condición (momento en que se perfunde S-basal en animales saciados y S-basal con comida en animales hambreados) y F_t el valor de fluorescencia en un punto temporal determinado t.

En el ensayo de actividad neuronal de RIM durante la privación de alimento la fluorescencia de GCaMP6 y mCherry se capturó en simultáneo con la cámara ORCA-Flash 4.0 digital CMOS (Hamamatsu) equipada con un separador óptico Photometrics Dual-View 2. Cada experimento se repitió al menos 3 veces de manera independiente con ~15 animales.

Generación de cruzas genéticas

Para la generación de la cepa QW2134 y QW2135 se cruzaron mutantes nulos *tdc-1* (n3420) y *tbh-1* (n3247) hermafroditas con machos de la cepa transgénica SWF108 fluEx59 [*ptph-1::GCaMP7F*; *myo-3::mCherry*]. Para producir esta craza existe la ventaja que la cepa SWF108 presenta el reportero rojo mCherry bajo el promotor *myo-3* el cual se expresa en el músculo del animal, y permite identificar fácilmente los animales que poseen el plásmido con GCaMP. Los machos aparecen de manera espontánea en una frecuencia muy baja (0,1 - 0,2 %) a raíz de la autofecundación de hermafroditas salvajes (Fig. 4A). Por esta razón, antes de comenzar una craza, se generaron machos mediante el método de *heat shock*. La frecuencia de machos generados espontáneamente aumenta cuando la hermafrodita se expone al comienzo de la gametogénesis a una temperatura levemente superior a la normal durante varias horas (Meneely, Dahlberg y Rose, 2019). Se tomaron 5-6 cápsulas de NGM sembradas con *E. coli* OP50 y se colocaron 5-7 hermafroditas L4 en cada una de ellas. Las cápsulas se incubaron a 30°C durante 3-4 horas y luego se transfirieron a 20°C. Unos 3 días después se buscaron los machos en la progenie (suelen obtenerse entre un 2 y 5 % de machos en la generación F1) (Fay, 2006). Los machos pueden distinguirse fácilmente de gusanos hermafroditas por la forma de su cola (Fig. 1 y 3). Se mantuvo la población de machos mediante el apareamiento con hermafroditas, donde la mitad de la progenie proveniente de la craza son machos (Fig. 4B).

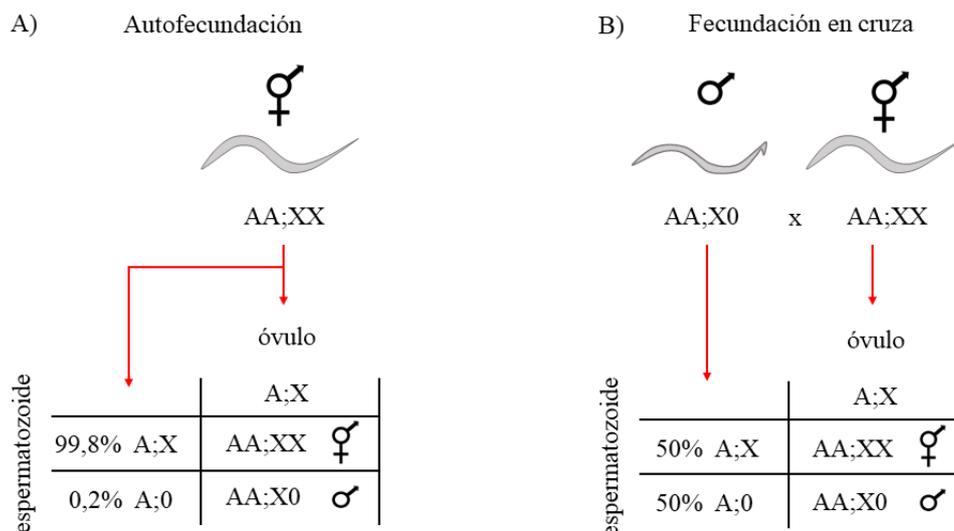


Fig 4. Diagramas de la autofecundación y fecundación en una crucea en *C. elegans*. A) En la autofecundación el esperma y el óvulo del mismo animal generan cigotos hermafroditas que resultan en una generación F1 genéticamente idéntica a la madre. B) En la fecundación producto de una crucea los cigotos se dividen en XX (hermafroditas) y X0 (machos), los cuales reciben un alelo de cada gen de cada padre. Los hermafroditas apareados también generan prole de su autofecundación.

Una vez obtenidos los machos SW108, se transfirieron 2 gusanos hermafroditas L4 *tdc-1* o *tbh-1* y 7-8 gusanos machos L4 SW108 a una cápsula de NGM de 35 mm sembrada con *E. coli* OP50. En la progenie (F1) hay heterocigotas provenientes de la crucea y gusanos provenientes de la autofecundación de los hermafroditas. Existen ligeras variaciones en el diseño de cada crucea. Brevemente, para la crucea entre SW108 y *tdc-1* se aislaron 8-12 gusanos heterocigotas de la F1 que expresan mCherry en músculo. De la progenie F2 de estos animales se buscó el homocigota *tdc-1* con mCherry en músculo. A diferencia de los animales salvajes, el mutante *tdc-1* no logra suprimir las oscilaciones de la cabeza en el movimiento hacia atrás cuando se lo toca suavemente en la parte anterior (Alkema *et al.*, 2005), de forma que se identificaron sus homocigotas mediante la búsqueda de este fenotipo. Por otro lado, para obtener la crucea *tbh-1*; SW108, los machos de la progenie F1 con mCherry en músculo, los cuales poseen la mutación nula en el gen *tbh-1* (en el cromosoma sexual X) proveniente de la hermafrodita madre, se cruzaron con hermafroditas *tbh-1* homocigotas. De la progenie F2 (que es homocigota para la mutación *tbh-1*) se buscaron los animales que expresan mCherry en músculo.

La cepa OAR87 obtenida de la crucea de un animal que expresa las proteínas fluorescentes GFP y mCherry bajo los promotores *tph-1* y *tyra-3*, respectivamente, se realizó de manera similar aprovechando la ventaja de los marcadores fluorescentes.

Ensayo de locomoción en medio líquido

Para evaluar la sensibilidad a la 5-HT de los animales deficientes de TA/OA y de los receptores tiraminérgicos empleamos un método adaptado de Gürel y colaboradores (2012). Primero preparamos una solución madre de 5-HT 500 mM en medio M9 (ver *Anexo 3*) que fue conservada a -20°C. Previamente a cada ensayo, se preparó fresca una dilución 1/50 para obtener una solución de 5-HT 10 mM de concentración final y luego se alicuotaron 100 µl de esta solución en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se transfirieron 12 gusanos adultos jóvenes (1 por pocillo para anular el efecto del contacto entre animales en el nado) al M9 con 5-HT y se cuantificó el número de animales paralizados cada 3 minutos durante 30 minutos. Se consideró paralizado a aquel animal que no exhibía espontáneamente un nado completo a lo largo de todo el cuerpo. Los experimentos se realizaron a 20°C y de manera ciega para desconocer el genotipo de cada una de las cepas evaluadas en cada ensayo. Posteriormente, se graficó la media del porcentaje de animales paralizados a lo largo del tiempo de cada cepa evaluada. Se calculó el área bajo la curva (ABC) de cada cepa en cada experimento con el *software* Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) y se la expresó como el ABC relativa al control. Cada experimento se realizó por lo menos 3 veces de manera independiente.

Capítulo II

Retrocruzamiento de cepas

Para la eliminación de mutaciones espontáneas acumuladas en las cepas mutantes *acr-23*, *lev-1* y *lev-8* obtenidas del CGC se cruzaron animales hermafroditas con la mutación deseada con machos de la cepa salvaje N2. Una vez obtenidos los machos (ver Generación de cruza genéticas), se transfirieron 2 gusanos hermafroditas L4 de la cepa mutante y 7-8 gusanos machos L4 de N2 a una cápsula de NGM de 35 mm sembrada con *E. coli* OP50. En la progenie hay heterocigotas provenientes de la cruza y gusanos provenientes de la autofecundación de los hermafroditas. Los machos provienen de la cruza, de manera que estos se volverán a cruzar con hermafroditas N2. De la progenie de esta segunda cruza, se aislaron 8-12 gusanos y luego se identificaron los heterocigotas de la mutación, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para

evaluar el genotipo. Luego, se volvió a aislar la progenie de los gusanos heterocigotas para identificar los homocigotas de la mutación, mediante el uso de la misma técnica. Ha variado el diseño de cada cruce de acuerdo a la ubicación de la mutación (ya sea en alguno de los cinco autosomas o en el cromosoma sexual).

PCR para genotipado

Se utilizó la técnica de PCR para el genotipado de cepas obtenidas del CGC luego del retrocruzamiento con la cepa salvaje N2. Primero, se realizó el diseño de los oligonucleótidos o *primers* utilizados para amplificar el ADN en la región deseada. Este diseño se llevó a cabo utilizando el *software* A plasmid editor (ApE, versión 2.0.49). Las secuencias de ADN de cada gen y sus respectivas deleciones las obtuvimos de la plataforma *Wormbase: Nematode Information Resource* (www.wormbase.org). Para identificar los individuos homocigotos de cada cepa mutante diseñamos tres oligonucleótidos, los cuales los llamamos: *primer forward* y *primer reverse* (hibridan por fuera de la deleción) y *primer* interno ya sea *forward* o *reverse* (hibrida en la región donde se encuentra la deleción). En la Tabla 3 se presentan las secuencias de oligonucleótidos utilizados para realizar las PCR de estas cruces.

Antes de realizar la PCR, se extrajo el ADN mediante la lisis de los animales. Se transfirió la hermafrodita madre o 10-20 animales provenientes de su progenie a un tubo de 0,2 ml con 6 μ l o 10-20 μ l del buffer de lisis (ver *Anexo 5*), respectivamente. Subsecuentemente, los tubos se sometieron a un ciclo de 65°C por 1 hora y luego a 95°C por 15 minutos (último paso sirve para inactivar a la Proteinasa K presente en el buffer de lisis). Estas muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Una vez obtenido el ADN, se prepararon los *mix* de las reacciones de PCR con un volumen final de 20 μ l en tubos de 0,2 ml (ver *Anexo 6*) con el par de oligonucleótidos específicos para cada mutación, y luego la PCR se llevó a cabo en un termociclador.

Los productos de amplificación fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (permite la visualización de ácidos nucleicos en luz U.V.), a 70-80 V por 20-30 minutos en buffer TAE 1X (ver *Anexo 7*). Posteriormente, los geles se visualizaron en un transiluminador ultravioleta.

Gen (alelo)	Primer Forward	Primer Reverse	Primer Interno	Producto Kb (salvaje-mutante)
<i>acr-23</i> (<i>ok2804</i>)	GTGGAGCAGTGTGTAGTTGACC	AGCTGCTTGAACACTTGGTCC		1089 - 405
	GTGGAGCAGTGTGTAGTTGACC		AATCAAGGTGCAATGGTGAAC	667 - x
<i>lev-1</i> (<i>ok3201</i>)	GCTTCAGGCGACAGCTCATC	CTCGACTTCTCACTTCGGACC		1334 - 674
		CTCGACTTCTCACTTCGGACC	CCTAACCCAAGGTGGTAATCG	444 - x
<i>lev-8</i> (<i>ok1519</i>)	CGTGGAATCCGACAGACTGG	CCCTCCATTTGTTGGTTGTG		1921 - 528
		CCCTCCATTTGTTGGTTGTG	GTTGGAGCACACACTAGGAC	319 - x

Tabla 3. Secuencias de primers utilizadas para el retrocruzamiento de los mutantes *acr-23*, *lev-1* y *lev-8* con la cepa salvaje y los tamaños esperados de los productos de la PCR.

Cribado de compuestos imidazólicos

Se transfirieron 100-150 (~ 50 por pocillo) gusanos adultos jóvenes a placas de 96 pocillos con los compuestos imidazólicos disueltos a una concentración de 150 µg/ml en 100 µl de medio líquido S-basal (ver Anexo 4) conteniendo *E. coli* OP50 como fuente de comida. La concentración utilizada para realizar estos ensayos es similar a la utilizada en otro trabajo (Dutta, 2010). Se utilizaron tres pocillos para cada compuesto imidazólico. Las concentraciones micromolares equivalentes a 150 µg/ml de cada compuesto son: 487 µM para **1**, 428 µM para **2**, 410 µM para **3**, 375 µM para **4**, 789 µM para **5**, 735 µM para **6**, 389 µM para **7**, 319 µM para **8**, 263 µM para **9**, 806 µM para **10** y 657 µM para **11**. En la tabla 4 se detallan los nombres y pesos moleculares de los once compuestos. Los compuestos sólidos se disolvieron en agua o en dimetilsulfóxido (DMSO, grado para biología molecular, AppliChem) según sus respectivas solubilidades: compuestos 1, 2, 3, 5, 6 y 9 se disolvieron en agua y compuestos 4, 7, 8, 10 y 11 se disolvieron en DMSO. Se agregaron tres pocillos de S-basal y otros tres pocillos de S-basal con DMSO al 0,75 % (equivalente a la concentración máxima de DMSO utilizada en las diluciones de las drogas) como controles negativos. Esta concentración de DMSO no es tóxica para *C. elegans*. Luego de las 72 horas de exposición se analizó la supervivencia de los animales. Se consideró a un animal como muerto si no realizó ningún movimiento en respuesta a un toque suave con un alambre de platino. No se observaron defectos en la movilidad en los controles con S-basal y S-basal con DMSO. Se analizaron tres experimentos independientes.

N°	Nombre del compuesto	PM (g/mol)
1	1-Mesitil-3-(3-propil sulfonato) imidazol	308
2	1-(2,6-Diisopropil-fenil)-3-(3-propil sulfonato) imidazol	350
3	Bromuro de 1-(2,6-Diisopropil-fenil)-3-propil imidazol	365
4	Bromuro de 1-(2,6-Diisopropil-fenil)-3-benzil imidazol	399
5	1-(3-propil sulfonato) imidazol	190
6	1-Metil-3-(3-propil sulfonato) imidazol	204
7	Bromuro de 1,3-bis (Mesitil) imidazol	385
8	Bromuro de 1,3-bis(2,6-diisopropil-fenil) imidazol	469
9	1,3-bis (2,6-diisopropil-4-fenil sulfonato de sodio) imidazol	570
10	Mesitil imidazol	186
11	Diisopropil-fenil imidazol	228

Tabla 4. Nombres y pesos moleculares de los compuestos imidazólicos.

Curvas dosis-letalidad de DII

Para realizar las curvas de letalidad dependientes de la dosis se expusieron 40-50 gusanos L4 a la droga DII a concentraciones crecientes en medio sólido. Cada concentración se evaluó por duplicado en el mismo experimento (20-25 gusanos por cápsula). Se cuantificó la supervivencia a las 96 horas de exposición a DII (0 – 300 µM) a 13°C para evitar el crecimiento en el número de animales y el consecuente agotamiento de la comida. También se realizó el mismo ensayo a 20°C y se evaluó la letalidad a las 8 y 24 horas de exposición (0 - 1000 µM). Ambas curvas de dosis-letalidad se construyeron utilizando el *software* Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) ajustando los datos a la ecuación de Hill con 4 grados de libertad (Ec. 1) ya que obtuvimos curvas sigmoideas simétricas. Los valores de la pendiente, LC50 y R² se detallan en la leyenda de cada figura.

$$\text{Ec 1. } Y = \min + (\max - \min) / [1 + ((X/LC50)^{\text{pendiente}})]$$

Toxicidad en células humanas HEK-293

Las células HEK-293 se cultivaron en medio DMEM (Gibco, USA) conteniendo suero fetal bovino al 10 % (FBS) (Gibco, USA) y penicilina/estreptomicina (Gibco, USA) a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO₂. Antes de la exposición al DII, se disociaron las

células con tripsina-EDTA y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/ml. Las células se resuspendieron en medio fresco y luego se les agregó distintas concentraciones de DII. Después de 8 horas de incubación con 0, 200 y 600 μM de DII o 96 horas de incubación con 0 y 100 μM de DII, se lavaron las células tres veces con PBS y luego se agregó ioduro de propidio (IP, 50 $\mu\text{g/ml}$ de concentración final) para teñir las células muertas. La incubación con IP se realizó en oscuridad y temperatura ambiente durante 10 minutos. Como vehículo y control positivo se utilizó DMSO (0 – 0,75%) y cloroquina (50 – 200 μM), respectivamente. Por último, se tomaron 8-10 imágenes de las células en distintos campos al azar con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000 y el número de células teñidas se cuantificaron manualmente. Se analizaron tres experimentos independientes.

Generación de cepa transgénica OAR61

Para rescatar el gen *unc-29* únicamente en el tejido muscular se procedió como fue descrito anteriormente (De Rosa *et al.*, 2019). Se realizó la construcción con el promotor *myo-3* (el cual regula los genes de la cadena pesada de miosina que se expresan en músculo de la pared corporal del gusano) y el ADNc de *unc-29*. Este plásmido se co-inyectó con el marcador de selección *lin-15*, sobre la línea germinal de doble mutantes nulos en *lin-15; unc-29* (fenotipo Multivulva (Muv)). Los animales transgénicos no Muv de la F1 fueron aislados, para luego identificar las cepas que transmitieron de forma estable el transgén *pmyo-3::unc-29* en músculo del cuerpo.

Ensayos de letalidad sobre cepas mutantes

Para evaluar los efectos nematicidas del DII en cepas mutantes se ensayaron dos condiciones diferentes: 1) se expusieron 40-50 gusanos L4 a 600 μM de DII disuelto en cápsulas de NGM sólido y se cuantificó la supervivencia a las 8, 24, 48 y 72 horas; 2) se expusieron 40-50 gusanos L4 a 50 μM de DII y se cuantificó la supervivencia a las 96 horas. Se consideró a un animal como “muerto” si no lograba responder a un toque suave con el alambre de platino. Cada cepa se ensayó por duplicado en el mismo experimento (40-50 gusanos por cápsula).

Para la preparación de las cápsulas de medio sólido con DII, se autoclavó el NGM y cuando descendió la temperatura a $\sim 60^\circ\text{C}$ se agregó el volumen apropiado de droga o vehículo DMSO. Se homogenizó adecuadamente el agar y luego se vertieron 2 ml de la

preparación en cada cápsula de 35 mm. Una vez solidificado el NGM se sembró con *E. coli* OP50. Las cápsulas se prepararon de la misma manera en todos los ensayos en medio sólido. Cada experimento se repitió al menos tres veces de manera independiente.

Ensayos de recuperación a la exposición a DII

Para evaluar la capacidad de recuperación de los animales tratados con DII, se transfirieron ~100 gusanos L4 a cápsulas de NGM conteniendo DII (600 μ M). Luego de 4 y 8 horas de exposición, los animales sobrevivientes se transfirieron a cápsulas de NGM sin droga. 24 horas después se cuantificaron los animales vivos. El ensayo se repitió tres veces de manera independiente.

Curvas dosis-parálisis aguda

Los ensayos de parálisis aguda se realizaron en placas de 96 pocillos conteniendo buffer M9 (ver *Anexo 3*) con DII o levamisol a distintas concentraciones (0 – 800 μ M). Se utilizó un volumen final de 100 μ l por pocillo. Se transfirieron ~30 gusanos L4 salvajes a cada pocillo y luego de 10 minutos se cuantificaron los animales paralizados. Cada concentración se ensayó por duplicado en el mismo experimento (conteniendo 30 animales cada pocillo). Las curvas dosis-respuesta de levamisol (agonista de AChR) en presencia de concentraciones fijas de DII (0, 100, 200 μ M), se llevaron a cabo realizando el mismo protocolo. Las curvas de dosis-respuesta se construyeron utilizando el *software* Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) ajustando los datos a la ecuación de Hill con 4 (Ec. 1) o 5 (Ec. 2) grados de libertad en caso de curvas sigmoideas simétricas o asimétricas, respectivamente. Los valores de la pendiente, EC50 y R² están detallados en la leyenda de cada figura.

$$\text{Ec 2. } Y = \min + [(\max - \min) / (1 + (X/Xb)^{-\text{pendiente}})]^S$$
$$Xb = \text{EC50} * 10^{[(1/\text{pendiente}) * \log((2^{(1/S)} - 1))]}$$

Ensayos de parálisis aguda utilizando animales cortados

Los ensayos de parálisis aguda con gusanos cortados se realizaron como se ha descrito en otros trabajos (Ruiz-Lancheros *et al.*, 2011), pero con algunas modificaciones. Animales adultos jóvenes se montaron en Fluido Perientérico Artificial (FPA) (ver *Anexo 8*) sobre un portaobjetos. Se cortó la cola a 10 animales con la punta de una aguja biselada, aproximadamente a dos tercios del extremo anterior del cuerpo.

Luego, se transfirió cada gusano a un pocillo de una placa de 96 pocillos conteniendo FPA o DII/levamisol disueltos en FPA. A los 10 minutos de exposición se cuantificó el número de gusanos paralizados. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces de manera independiente.

Ensayos de evaluación de la contracción muscular mediante mediciones de la longitud del gusano

Se transfirieron ~10 gusanos L4 a cápsulas de NGM sólido conteniendo DII o levamisol a 600 μM . Se utilizaron cápsulas con vehículo DMSO (0,75 %) como control. Luego de 2 horas de exposición, se tomaron fotos con una cámara adaptada a una lupa y se midió la longitud del cuerpo con el *software* FIJI-ImageJ. Se realizaron tres experimentos independientes.

Ensayos de deposición de huevos

4 adultos grávidos sincronizados 16 horas antes como gusanos L4 se transfirieron a cápsulas de NGM sólido conteniendo DII o levamisol a distintas concentraciones (100 – 300 μM). Se utilizaron cápsulas con vehículo DMSO (0,38%) como control. Cada condición se ensayó por triplicado (12 gusanos en total). Después de 1 hora de exposición se cuantificó el número de huevos depositados y el resultado se expresó como el número de huevos depositados por gusano en 1 hora. Este ensayo se repitió cuatro veces de manera independiente.

Medición de la tasa de bombeo faríngeo

Cápsulas de NGM sólido conteniendo DII (0, 100, 300 y 600 μM) se sembraron con *E. coli* OP50 y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente para lograr una fina capa de bacteria. 5 adultos salvajes y mutantes nulos *unc-29* sincronizados 24 horas antes como gusanos L4 se transfirieron a las cápsulas de NGM con DII y cápsulas control sin droga. Luego de una hora de exposición se cuantificaron las contracciones del bulbo terminal de la faringe (bombeos faríngeos) (Avery y Horvitz, 1989) durante 30 segundos utilizando una lupa. Este ensayo se repitió tres veces de manera independiente.

Toxicidad en estadios tempranos del desarrollo

Extracción y aislamiento de huevos

Para evaluar el efecto tóxico del DII en estadios tempranos del desarrollo se procedió a realizar el aislamiento de huevos. Para esto, se recolectaron gusanos grávidos de 3 cápsulas de 60 mm con M9 y se expusieron a una solución de hipoclorito de sodio alcalina (0.5 M NaOH y 1 % NaOCl) para lisar el tejido del gusano adulto. Dado que la quitina de la cáscara del huevo es resistente al hipoclorito de sodio, el huevo permanece intacto. La reacción de lisis se detuvo luego de ~5 minutos diluyendo a la solución de hipoclorito de sodio con *egg buffer* estéril (ver Anexo 9). Los huevos liberados por medio de este tratamiento se sedimentaron mediante una centrifugación y se los lavó tres veces con *egg buffer* estéril. Luego, las carcasas de los animales adultos se separaron de los huevos mediante una centrifugación con una solución estéril de sacarosa al 60 %. La capa superior de huevos se removió con una pipeta Pasteur de vidrio y se los lavó una vez con agua estéril (Christensen *et al.*, 2002; Rayes *et al.*, 2007).

Ensayos de viabilidad desde huevos

Los huevos se sembraron en cápsulas de 35 mm de NGM sólido con DII a distintas concentraciones (100 – 300 – 600 μ M) o DMSO (0,75 %) como control. Cada condición se evaluó por triplicado. A las 48 horas se cuantificaron los animales eclosionados. El resultado se expresó como el porcentaje de animales vivos en función del número de huevos iniciales. Este experimento se repitió tres veces de manera independiente.

Imágenes de eclosión de huevos

Para evaluar el efecto ovicida, los huevos aislados se sembraron en cápsulas de NGM con DII (600 μ M) o DMSO (0,75 %) como control. Se tomaron fotos con una cámara adaptada a la lupa cada 10 minutos durante 12 horas para observar la eclosión de los huevos. Se consideró no viable a un huevo si no lograba eclosionar en el tiempo del ensayo. Este experimento se repitió tres veces de manera independiente.

Ensayos de desarrollo desde huevos

Para estudiar la tasa de desarrollo, se sembraron huevos aislados en cápsulas de NGM con DII (600 μ M) o DMSO (0,75 %) como control. Se cuantificó el número de

animales en cada estadio del desarrollo (L1-L3, L4 y adultos) a las 24, 48 y 72 horas de exposición. Cada condición se evaluó por triplicado. El resultado se expresó como el porcentaje de animales en un estadio determinado en función del número total de animales en ese punto de tiempo. Se repitió el experimento tres veces de manera independiente.

Ensayos de viabilidad de larvas

Para evaluar el efecto larvicida, se incubaron huevos aislados en medio líquido M9 con ampicilina y sin comida durante toda la noche. Este protocolo permite obtener una población homogénea de gusanos L1, que fueron sembrados en cápsulas de NGM con DII (100 – 300 – 600 μ M) o DMSO como control. Se cuantificó el número de animales vivos a las 24, 48 y 72 horas de exposición. El resultado se expresó como el porcentaje de animales vivos en función del número de gusanos L1 iniciales. Cada condición se evaluó por triplicado. El experimento se repitió tres veces de manera independiente.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados en el *software* Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) o SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). La normalidad de los datos se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba *t-student* (entre dos grupos) o ANOVA Holm-Sidak (entre más de dos grupos) para datos paramétricos y la prueba Mann-Withney (entre dos grupos) o el método de Dunn (entre más de dos grupos) para datos no paramétricos según se especifique en cada leyenda, considerando significativo un valor $p < 0,05$.

Anexo

Medios y soluciones

1. *Nematode Growth Medium* (NGM)

Agar	17 g
NaCl	3 g
Peptona	2,5 g
ddH ₂ O c.s.p.	1 L

Autoclavar, enfriar a 60°C e incorporar soluciones estériles de:

CaCl ₂ (1M)	1 ml
MgSO ₄ (1M)	1 ml
Buffer fosfato (1M)*	25 ml
Colesterol (5mg/ml)	1 ml

*Buffer fosfato 1M:

KH ₂ PO ₄	108,3 g
K ₂ HPO ₄	35,6 g
ddH ₂ O c.s.p.	1L

(pH 6,0)

2. Medio LB

Extracto de levadura	5 g
Peptona	10 g
NaCl	10 g
ddH ₂ O c.s.p.	1L

Ajustar a pH 7,0 con NaOH

3. Solución M9

Na ₂ HPO ₄	5,8 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
dH ₂ O c.s.p	1 L

4. Medio S-basal

NaCl	5,85 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	6 g
Colesterol (0,5% en etanol)	1 ml
ddH ₂ O c.s.p	1 L

5. Buffer de lisis

KCl	100 mM
Tris (pH 8,3)	20 mM
MgCl ₂	5 mM
IGEPAL (o NP40)	0.9 %
Tween-20	0.9 %
Gelatina	0.02 %
Proteinasas K	400 µg/ml
dH ₂ O	

6. Reacciones para *end-point* PCR

Buffer (10X)	2 µl
dNTPs	1 µl
Oligonucleótido Fw	1 µl
Oligonucleótido Rev	1 µl
Enzima TAQ polimerasa	1 µl
ddH ₂ O	13 µl
ADN	1 µl

7. Buffer TAE (50X)

Base Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	242 g
Ácido acético glacial	57,1 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,2 g
ddH ₂ O c.s.p.	1L

Para 1X diluir 20ml en 1L de ddH₂O

8. Fluido Perientérico Artificial (FPA)

NaCl	67 mM
NaCH ₃ COOH	67 mM
KCl	3 mM
MgCl ₂	15,7 mM
CaCl ₂	3 mM
Tris	5 mM
(pH 7,6)	

9. Egg buffer

NaCl	118 mM
KCl	48 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	2 mM
Hepes	25 mM
(pH 7,3)	

CAPÍTULO I

Modulación neuronal de conductas relacionadas con la alimentación en *Caenorhabditis elegans*

Introducción

Conductas relacionadas a la búsqueda de alimento en animales

La alimentación es un comportamiento esencial para la supervivencia animal y está regulada, además de por el sistema digestivo, por los sistemas endócrino, sensorial y nervioso. El sistema nervioso le permite al animal adaptarse a cambios en el ambiente y modificar sus patrones de movilidad de acuerdo a la disponibilidad de comida y a sus necesidades metabólicas internas. Cuando la disponibilidad de nutrientes disminuye, el animal exhibe conductas exploratorias que serán necesarias para la búsqueda de una nueva fuente de alimentación y mantener un adecuado balance energético. Si bien la manera de movilización durante el forrajeo varía según la especie (volar, nadar, caminar, arrastrar) esta conducta exploratoria intensiva ante la ausencia de comida ocurre en muchos animales (Benedix, 1993; Dias, Granadeiro y Palmeirim, 2009; Papastamatiou, DeSalles y McCauley, 2012; Robinson *et al.*, 2012; Eifler *et al.*, 2012). Una vez que la fuente nutricional es localizada el animal evidencia un cambio en su locomoción que le permite permanecer en una pequeña área y maximizar la obtención de nutrientes (Fauchalda, 2003; Haskell, 1997; Iwanir *et al.*, 2016; Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000).

Los comportamientos innatos son flexibles y cambian rápidamente en respuesta a las condiciones ambientales. Mas allá de estar influenciados por el ambiente que los rodea, la reacción de un animal a un determinado estímulo dependerá también de su experiencia previa. Es así que ha sido extensamente observado en la naturaleza que los animales pueden responder con distintas intensidades a un mismo estímulo de acuerdo a sus necesidades en cada momento determinado. De manera que, un organismo privado de comida por mucho tiempo adoptará conductas características a un estado de hambre, que lo diferenciarán de un animal saciado. Por ejemplo, cuando la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, que se alimenta de sangre, no ha comido por varios meses incrementa la frecuencia de mordeduras al encontrar una región de calor; mientras que sanguijuelas recientemente alimentadas muerden raramente (Groome, Clark y Lent, 1993). Algo similar sucede con el molusco *Aplysia californica*, el cual aumenta la fuerza de la mordedura frente a algas marinas cuando se encuentra hambriento (Rosen *et al.*, 1989). Estas conductas favorecerán la alimentación luego de un período de escasez de nutrientes. Asimismo, hay estudios que demuestran que muchos animales aumentan o disminuyen el

riesgo para obtener alimento dependiendo de su estado de hambre o saciedad, respectivamente (Sweitzer, 1996; Mukherjee y Heithaus, 2013). Muchos animales carnívoros sólo cazan presas peligrosas o se exponen a sus depredadores cuando se encuentran hambrientos (Boutin, 2018). Por ejemplo, el *Puma concolor* aumenta los ataques a puercoespines (los cuales no son la presa ideal, dado a que disponen de púas que pueden causar heridas) cuando no se ha alimentado por varios días (Elbroch, Feltner y Quigley, 2017). Con respecto a invertebrados, *C. elegans*, también aumenta la tolerancia al peligro en condiciones de escasez de comida con el fin de hallar una fuente de alimentos. Por ejemplo, los gusanos sólo tomarán el riesgo de atravesar un anillo hiperosmótico, que representa una amenaza a la desecación, cuando se encuentran hambreados (Ghosh *et al.*, 2016).

Todos estos comportamientos evidencian cómo la respuesta del animal puede variar frente a un mismo estímulo (en este caso la presencia de alimento) dependiendo de su estado nutricional interno. Es fundamental que sea capaz de tomar una decisión rápida, frente a un ambiente en constante cambio, que le permita aprovechar la fuente nutricional disponible al máximo. Esa respuesta rápida le puede proveer al animal una ventaja competitiva cuando los recursos nutricionales no son abundantes.

Si bien la conducta de la alimentación ha sido estudiada por muchos grupos durante décadas, aún no se conocen con detalle los mecanismos que generan distintas respuestas frente a la comida en animales hambrientos y bien alimentados. La investigación de las señales que modulan estos comportamientos podría contribuir al tratamiento de desórdenes de la alimentación y nutrición como anorexia y obesidad.

Modulación de la alimentación por aminas biogénicas en el sistema nervioso

El sistema nervioso de los animales modula el complejo comportamiento de la alimentación reflejando las necesidades metabólicas internas. Esta modulación está presente en animales con diversas organizaciones de su sistema nervioso, sugiriendo funciones conservadas en el reino animal.

Ha sido propuesto que las señales de las aminas biogénicas en el sistema nervioso permiten a los animales adaptarse a cambios rápidos en el ambiente, mientras que vías

mediadas por la transcripción de péptidos, como la insulina, modulan cambios adaptativos más lentos (Ben Arous, Laffont y Chatenay, 2009). Las aminas biogénicas son compuestos nitrogenados orgánicos de bajo peso molecular, que constituyen un importante grupo de neurotransmisores presentes en todos los organismos pluricelulares conocidos (Cooper, Bloom y Roth, 2003). Son sintetizadas a partir de la descarboxilación de aminoácidos o aminación y transaminación de aldehídos y cetonas, e incluyen a: acetilcolina, serotonina, histamina y las catecolaminas: dopamina, adrenalina y noradrenalina (Erdag, Merhan y Yildiz, 2018; Purves, Augustine y Fitzpatrick, 2001). En general, las aminas biogénicas juegan un papel crítico en la neurofisiología de los organismos multicelulares a partir de la modulación de procesos cognitivos, del control motor, del apetito, de la memoria, de la respuesta a estrés y del estado de ánimo (Cooper, Bloom y Roth, 2003; De Rosa *et al.*, 2019).

Aminas biogénicas implicadas en la alimentación

Los neurotransmisores, serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA), participan en la modulación del control nervioso de las conductas relacionadas con la alimentación en el humano, y una desregulación de las mismas se la ha relacionado con obesidad (Hainer *et al.*, 2006).

Conocida vulgarmente como “la hormona de la felicidad”, la 5-HT está involucrada en la modulación del humor y su deficiencia genera trastornos de ansiedad y depresión. Participa, además, en la modulación de la actividad motora, del sueño, de la agresividad, del aprendizaje, memoria y de la alimentación (Bacque-Cazenave *et al.*, 2020; Andrews *et al.*, 2015). Muchas de las funciones de la 5-HT, su vía metabólica y sus receptores comparten similitudes entre especies. Es sintetizada a partir del aminoácido triptófano mediante una hidroxilación catalizada por la enzima triptófano hidroxilasa, seguido de una descarboxilación por la aminoácido aromático descarboxilasa (Blundell y Halford, 1998).

Hace aproximadamente 45 años que se conoce que la 5-HT está involucrada en la regulación del apetito tanto en animales como en humanos (Bray y York, 1972; Blundell y Hill, 1987). Estudios farmacológicos realizados con drogas, como la fenfluramina, que elevan la concentración de 5-HT en la hendidura sináptica (aumenta su liberación e inhibe su recaptación en la terminal presináptica) y cuyo metabolito nor-fenfluramina actúa como agonista de varios subtipos de receptores de 5-HT, generaron hipofagia y

disminución del peso corporal de ratas y humanos (Grinker *et al.*, 1980; McGuirk *et al.*, 1991). Estos trabajos proponen que la 5-HT suprime el consumo de alimentos mediante la generación de saciedad. Contrariamente, estudios más recientes con ratones mutantes deficientes de la enzima triptófano hidroxilasa advierten que la falta de síntesis de 5-HT conduce a anorexia (Yadav *et al.*, 2009). Parecería que estas discrepancias entre los ensayos farmacológicos y genéticos que manipulan la vía serotoninérgica podrían reflejar diferencias entre efectos agudos y crónicos (o posiblemente del desarrollo) de la 5-HT. Además, al existir siete familias con más de 16 subtipos de receptores serotoninérgicos en mamíferos, algunos de estos receptores podrían presentar acciones antagónicas entre sí (Bacque-Cazenave *et al.*, 2020; Hoyer, Hannon y Martin, 2002).

Otro grupo en la Universidad de Princeton monitoreó la liberación neuronal de 5-HT mediante ensayos de microdiálisis en ratones durante la ingestión de alimento. En dos de sus trabajos demostraron que la concentración de 5-HT extracelular en el hipotálamo de los ratones aumenta por el olor y la visión de la comida previamente a la ingesta. Esos niveles de 5-HT se mantienen altos durante la primer media hora en que el animal realmente consume el alimento y luego disminuyen hasta el estado basal (Schwartz, Hernandez y Hoebel, 1990; Schwartz *et al.*, 1989). Estos resultados indican que la concentración de 5-HT hipotalámica se eleva por el estímulo de la presencia de alimento cuando el animal anticipa comer y durante la ingesta, pero no luego de este comportamiento.

Por su lado, si bien se la relaciona principalmente con la respuesta aguda al estrés, se ha descrito que las catecolaminas (CA) también están implicadas en la regulación del apetito, contribuyendo en el control negativo de la ingestión de alimentos. La destrucción de este sistema en el hipotálamo de ratones resulta en la generación de hiperfagia disponiendo, a menudo, al desarrollo de obesidad (Ahlskog, 1974; Lenard y Hahn, 1982; Carey, 1976). Este podría ser el mecanismo por el cual la administración de anfetaminas, que inhiben la recaptación de NA en la terminal presináptica aumentando su concentración en la hendidura sináptica, suprimen la alimentación (Jones y Caul, 1992).

Pese a que se conoce que estos neurotransmisores regulan la alimentación para controlar la homeostasis energética interna, el rol de estos sistemas en la regulación del apetito en estados de privación de comida aún no ha sido completamente dilucidado. Sería interesante conocer si los circuitos neuronales de las vías serotoninérgica y catecolaminérgica se interconectan para modular los comportamientos relacionados con el hambre y saciedad.

Caenorhabditis elegans como modelo para el estudio de circuitos neuronales

La complejidad del sistema nervioso de vertebrados con billones de neuronas que establecen miles de conexiones sinápticas hace que el estudio de procesos neuronales sea una tarea difícil. Por esta razón es que, dada la simplicidad de su sistema nervioso, el nematodo *Caenorhabditis elegans* es un organismo modelo poderoso para estudiar circuitos neuronales que modulan múltiples comportamientos. La estructura de su sistema nervioso ha sido reconstruida mediante microscopía electrónica de transmisión en serie del gusano entero (White *et al.*, 1986; Jarrell *et al.*, 2012; Cook *et al.*, 2019). White y colaboradores fueron capaces de identificar todas las conexiones sinápticas y dilucidar por completo el circuito neuronal, resultando en el primer conectoma diagramado de cualquier especie. Determinaron que cada neurona tiene una posición y conectividad única que permite identificarla. La disponibilidad de toda la información que recopilaron sobre la conectividad del sistema nervioso es esencial para comprender su funcionamiento. No obstante, existe la posibilidad de que la transmisión de información también se dé entre neuronas ubicadas a una distancia considerable y que no presentan contacto directo. Estas rutas de señales neuro-humorales no pueden ser reconstruidas mediante las técnicas de microscopía electrónica. Mas allá de estas limitaciones, la reconstrucción de todo el circuito sináptico entre neuronas ha permitido a través de los años generar hipótesis y explicar comportamientos del animal, como por ejemplo, la termotaxis (Kimata *et al.*, 2012), la respuesta a un estímulo mecánico (Li *et al.*, 2011) o cómo son atraídos o repelidos por odorantes (Fu *et al.*, 2018), por nombrar algunos pocos. Otros comportamientos, como la respuesta motora de escape, puede explicarse no sólo en base a las conexiones sinápticas, sino que también a la activación extrasináptica neurohumoral de neuronas motoras gabaérgicas (Donnelly *et al.*, 2013; Pirri *et al.*, 2009).

El sistema nervioso de *C. elegans* está conformado por 302 neuronas en el gusano hermafrodita adulto. 20 de estas neuronas conforman un sistema nervioso pequeño en la faringe y las otras 282 neuronas integran el sistema nervioso somático distribuido en ganglios en la cabeza, cola y cordón ventral (Fig. 5). La mayoría de las neuronas se ubican en la cabeza del animal formando su “cerebro”. A su vez, se las puede clasificar en tres grupos según su funcionalidad: sensoriales, interneuronas y motoneuronas. A pesar de ello, a varias neuronas se las asigna dentro de más de un grupo, ya que combinan dos o

más funciones (White *et al.*, 1986). En la cabeza se encuentra el par de anfidios, el órgano quimiosensorial del nematodo, conformado por 12 neuronas anfidas sensoriales cada uno. Las dendritas de estas neuronas están abiertas al exterior y juegan un papel importante en la quimiotaxis, osmotaxis, termotaxis y en la mecanorrecepción. (Driscoll y Kaplan, 1997; Bargmann y Mori, 1997).

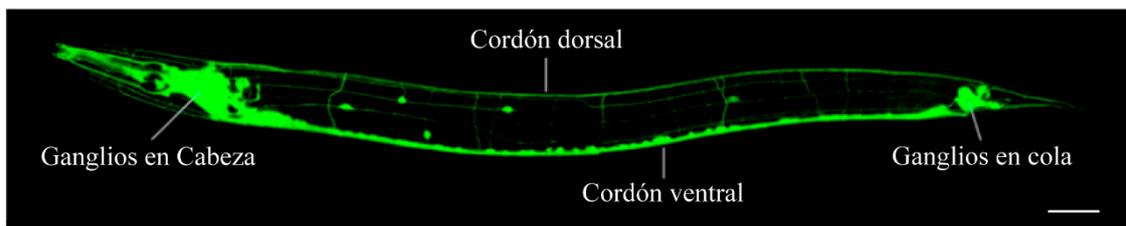


Fig 5. Sistema nervioso de *C. elegans*. Vista lateral de un animal adulto con el marcador pan-neuronal *Prgef-1::GFP (evIs111)*. Escala de barra: 50 μ m. (Chisholm *et al.*, 2016).

Varios neurotransmisores presentes en vertebrados, tales como acetilcolina, glutamato, GABA, 5-HT y dopamina están presentes en *C. elegans* (Hosono, Sassa y Kuno, 1987; McIntire *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1999; Sulston, Dew y Brenner, 1975; Horvitz *et al.*, 1982). Además, al igual que la mayoría de los invertebrados, sintetizan tiramina (TA) y su derivado hidroxilado octopamina (OA), ampliamente considerados como los análogos estructurales y funcionales de la noradrenalina y adrenalina (Roeder, 1999; Roeder *et al.*, 2003; Alkema *et al.*, 2005; De Rosa *et al.*, 2019). Más adelante describiré el rol que juegan algunos de estos neurotransmisores durante la alimentación y el hambre.

Más allá del conocimiento de su conectoma completo, la simple anatomía, la sencilla manipulación genética y la facilidad de realizar ensayos comportamentales y farmacológicos (Brenner, 1974; Meneely, Dahlberg y Rose, 2019) convierten a *C. elegans* en un excepcional organismo para el estudio de los procesos neurofisiológicos que regulan las conductas relacionadas con la alimentación. Además, el hecho de ser transparentes permite monitorear la actividad neuronal *in vivo* utilizando sondas genéticas de calcio (Chung, Sun y Gabel, 2013; De Rosa *et al.*, 2019; Kerr, 2006; Kahn-Kirby *et al.*, 2004), lo cual permite estudiar en mayor profundidad los circuitos que modulan ciertos comportamientos.

Comportamientos relacionados con la alimentación en *C. elegans*

Al igual que la mayoría de los animales, *C. elegans* también exhibe comportamientos que le permiten mantener un estado nutricional adecuado. Hay efectos evidentes que genera la comida, como modular la locomoción en respuesta a la disponibilidad de alimento en el ambiente. No obstante, hay otros efectos que son más complejos y dependen no solo del ambiente, sino también del estado interno y de la experiencia previa del animal, como, por ejemplo, cuán recientemente ha comido (Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000).

Los nematodos *C. elegans* bien alimentados se mueven lentamente y dentro de una pequeña área cuando se encuentran en presencia de comida (lo que se denomina como *Basal Slowing Response* en inglés, Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000). Contrariamente, aceleran la velocidad y recorren mayor distancia cuando la fuente nutricional es escasa o está ausente (Fig. 6). Como ya se mencionó previamente, este comportamiento conservado en la naturaleza, aumenta el potencial de descubrir nuevas fuentes de alimento (Ben Arous, Laffont y Chatenay, 2009; Gallagher *et al.*, 2013). Además, cuando animales hambreados encuentran comida exhiben una disminución muy marcada de su locomoción en comparación con gusanos saciados. El grupo de Horvitz llamó a esta marcada disminución de la locomoción en el reencuentro con el alimento como *Enhanced Slowing Response* (Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000). Este comportamiento que adoptan, el cual no depende únicamente de la presencia de comida, sino también de su experiencia previa, asegura que el animal explote al máximo la nueva fuente de nutrientes, lo cual resulta clave luego de un período de ayuno prolongado. Si bien se sabe que esta disminución drástica de la locomoción que se observa en animales hambreados que han reencontrado comida depende de la liberación de 5-HT (ver más adelante, Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000, Iwanir *et al.*, 2016), cómo la experiencia del ayuno modula positivamente la señal serotoninérgica no se conoce.

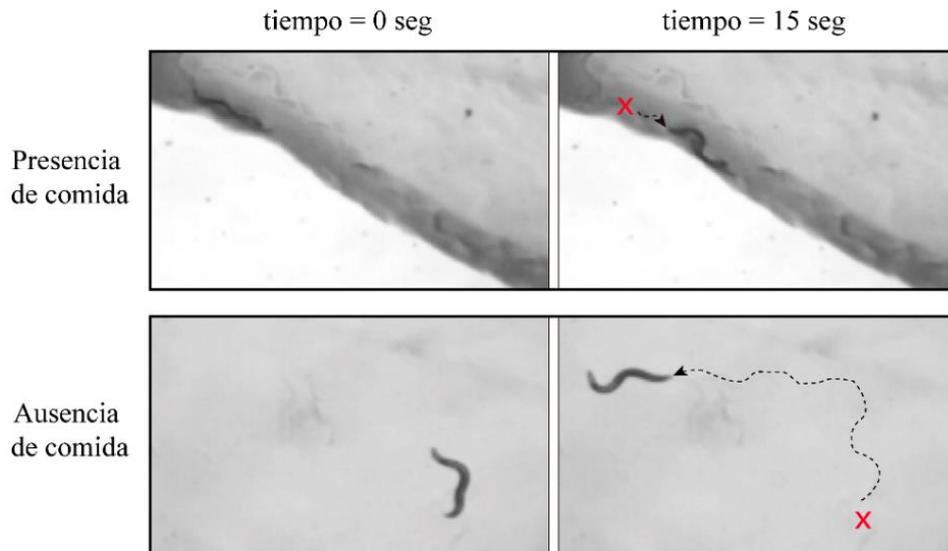


Fig 6. Distancia recorrida de *C. elegans* en presencia o ausencia de comida. Arriba: en presencia de comida (bacteria *E. coli* OP50) el animal recorre una distancia muy corta en 15 segundos. Abajo: en ausencia de comida el animal aumenta la distancia recorrida en 15 segundos. La línea punteada (---) indica el recorrido realizado por el animal y **X** indica el punto de partida del animal en el tiempo 0.

Regulación de conductas relacionadas con la alimentación por el sistema nervioso en *C. elegans*

Ha sido ampliamente establecido que las aminas biogénicas dopamina (DA) y 5-HT inhiben dramáticamente la locomoción en presencia de la comida. La DA modula la *Basal Slowing Response* (BSR), la cual depende del ambiente y se observa en animales que han permanecido siempre en presencia de alimento, y la 5-HT la *Enhanced Slowing Response* (ESR) en el encuentro con la comida, que depende de la experiencia previa del animal, observándose sólo si el animal está hambreado (Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000; Iwanir *et al.*, 2016). Por el contrario, se ha observado que el agregado exógeno de los análogos de las catecolaminas de mamíferos, TA y OA inducen conductas antagónicas a las ejercidas por 5-HT. Por ejemplo, mientras que la 5-HT reduce la locomoción, la OA la estimula (Churgin *et al.*, 2017).

Sistema serotoninérgico

Varios grupos han determinado que la 5-HT no solo induce la marcada disminución del movimiento en el reencuentro con la comida, sino que también estimula el bombeo faríngeo y la deposición de huevos en presencia de alimento (Chase y Koelle, 2007; Avery y Horvitz, 1990; Hapiak *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2013; Horvitz *et al.*, 1982).

Curiosamente, los comportamientos que favorecen la alimentación luego de un largo período de ayuno en la sanguijuela *Hirudo medicinalis* y el molusco *Aplysia californica*, mencionados previamente, están modulados también por el neurotransmisor 5-HT (Groome, Clark y Lent, 1993; Rosen *et al.*, 1989). Asimismo, el rol de la 5-HT en esta conducta parecería estar conservado en mamíferos, puesto que Schwartz y colaboradores demostraron que el nivel hipotalámico de 5-HT se eleva cuando el ratón accede a la comida (Schwartz, Hernandez y Hoebel, 1990).

Existen tres pares de neuronas que biosintetizan 5-HT en *C. elegans*: la anfidia sensorial ADF, la neurosecretora-motora de la faringe NSM (ambas se encuentran en la cabeza) y la motora específica de hermafroditas HSN (está ubicada en la vulva) (Fig. 7). Estas neuronas expresan la enzima triptófano hidroxilasa (TPH-1) necesaria para la síntesis de 5-HT (Kullyev *et al.*, 2010; Sze *et al.*, 2000).

Ha sido descrito que las neuronas NSM y ADF median la ESR característica de gusanos hambreados que hallan una nueva fuente nutricional. Mediante técnicas de imágenes de calcio *in vivo*, Iwanir y colaboradores (2016) estudiaron la activación de las neuronas NSM y ADF en el reencuentro con la comida. Determinaron que la neurona NSM responde al contacto directo con la bacteria y es la responsable de la disminución abrupta de la locomoción cuando el animal vuelve a la comida luego de un período en ausencia de alimento (Iwanir *et al.*, 2016). Esto le permite al animal permanecer en una pequeña área de bacteria para aprovechar al máximo la nueva fuente de nutrientes. Tres años más tarde, otro grupo también le otorgó la función de neurona entérica sensorial a NSM, asemejándose a las células enteroendócrinas del epitelio gastrointestinal de mamíferos, puesto que censan el contenido de bacteria en la faringe del animal. De esta forma, NSM libera 5-HT que actúa en neuronas río abajo para disminuir la locomoción del animal en presencia de comida (Rhoades *et al.*, 2019). Por su lado, la neurona anfidia quimiosensorial ADF se activa previamente al contacto con el alimento. Esto permite que cuando el animal percibe la fuente de comida en su cercanía, disminuya su locomoción, aun cuando no ha llegado a ella (Iwanir *et al.*, 2016). Este aumento de los niveles de 5-HT en el sistema nervioso de *C. elegans* con antelación a la llegada a la comida y en el momento del encuentro con la misma, se asemeja a lo que ocurre en el hipotálamo de los ratones cuando anticipan la ingesta y una vez que logran acceder a la comida (Schwartz, Hernandez y Hoebel, 1990; Schwartz *et al.*, 1989). A su vez, ADF ha sido asociada al aumento del bombeo faríngeo en presencia de alimento (Cunningham *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013). En conjunto, la acción de estas dos neuronas serotoninérgicas, ADF y NSM,

son esenciales para que el animal adopte rápidamente una conducta que le permita estimular la ingesta en el reencuentro con la nueva fuente de alimentos luego de un período prolongado de ayuno. Por último, como hemos mencionada en la Introducción General, la liberación de 5-HT desde la neurona HSN estimula la deposición de huevos, que es un comportamiento típico en presencia de alimento y condiciones de crecimiento favorables (Waggoner *et al.*, 1998; Brewer *et al.*, 2019).

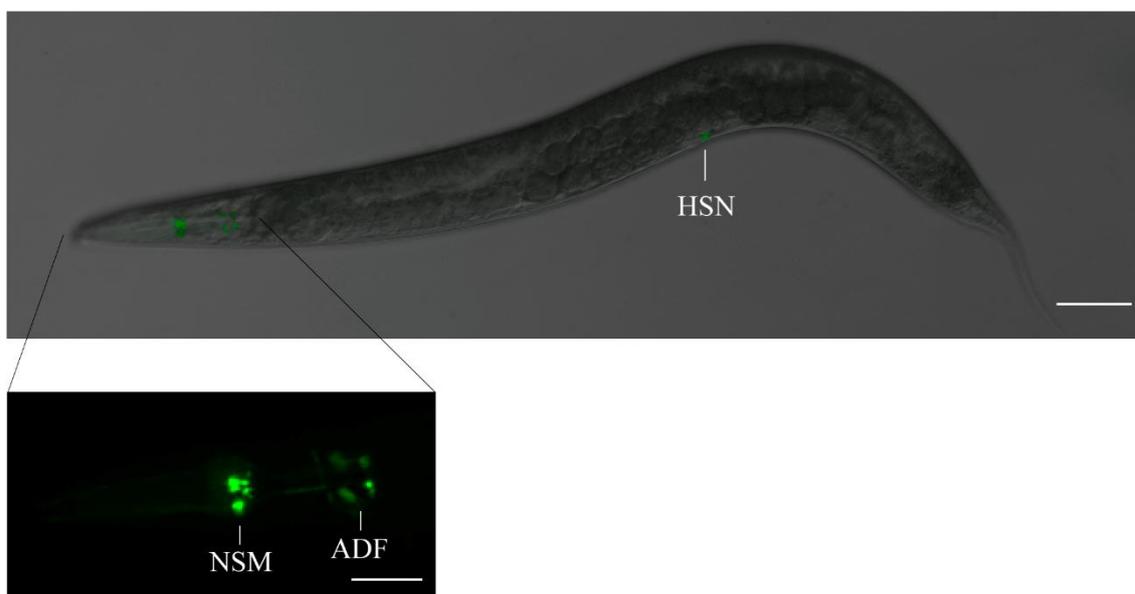


Fig 7. Neuronas serotoninérgicas en *C. elegans*. La cepa transgénica MT13471 (*ptph-1::GFP*) expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en las neuronas serotoninérgicas que expresan la enzima TPH-1 necesaria para la biosíntesis de 5-HT. Escala de barra arriba: 50 μ m, abajo: 20 μ m.

En *C. elegans* se han identificado cinco receptores de 5-HT: cuatro GPCRs, SER-1, SER-4, SER-5 y SER-7, que se estima que están acoplados a $G\alpha_q$, $G\alpha_o$, $G\alpha_s$, $G\alpha_s$, respectivamente (Olde y McCombie, 1997; Hamdan *et al.*, 1999; Hapiak *et al.*, 2009; Hobson *et al.*, 2003) y un canal iónico permeable a cloruro, MOD-1. (Ranganathan, Cannon y Horvitz, 2000). Los receptores SER-4 (ortólogo del receptor 5-HT1 de mamíferos) y MOD-1 están implicados en la regulación de la locomoción del animal (Gürel *et al.*, 2012; Ranganathan, Cannon y Horvitz, 2000; Flavell *et al.*, 2013) y actúan de manera sinérgica para mediar la rápida disminución de la velocidad en la vuelta a la comida (Iwanir *et al.*, 2016). SER-4 tiene expresión neuronal en la cabeza y cola únicamente, mientras que MOD-1 además de expresarse en neuronas de la cabeza y cola, también está presente en neuronas del cordón ventral que controlan directamente la locomoción y en músculos a lo largo del cuerpo (Gürel *et al.*, 2012). Esto sugiere que

probablemente SER-4 afecte la locomoción de manera central y en contraste, MOD-1 lo haga de manera directa, actuando en neuronas motoras y músculos. A su vez, a través de distintos circuitos y actuando en diferentes células, los cinco receptores serotoninérgicos parecerían estar implicados en el aumento del bombeo faríngeo (Li *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2017; Cunningham *et al.*, 2012; Hobson *et al.*, 2006). Asimismo, todos modularían la deposición de huevos, pero con acciones antagónicas. En este sentido, los receptores excitatorios SER-1, SER-5 y SER-7 estimularían la puesta de huevos (Carnell *et al.*, 2005; Hapiak *et al.*, 2009; Hobson *et al.*, 2006), mientras que los receptores inhibitorios SER-4 y MOD-1 la reducirían (Hobson *et al.*, 2006; Carnell *et al.*, 2005).

En resumen, está claro el rol clave de la señalización serotoninérgica en la vuelta a comida de animales hambreados. Ahora bien, los mecanismos por los cuales se produce la exacerbación de la señal serotoninérgica en animales hambreados, y no en animales saciados, es una incógnita.

Sistema tiraminérgico/octopaminérgico

Como mencionamos anteriormente, las aminas biogénicas, TA y OA, presentes en invertebrados son los análogos de la adrenalina (AD) y noradrenalina (NA) en vertebrados (Roeder, 2005). Al igual que en vertebrados, modulan la respuesta de “lucha o huida” de gran demanda energética frente a un estrés agudo, como puede ser el ataque de un predador (Pirri *et al.*, 2009; De Rosa *et al.*, 2019; Donnelly *et al.*, 2013). A su vez, regulan otra gran variedad de conductas como la actividad motora (Churgin *et al.*, 2017; Donnelly *et al.*, 2013) y la alimentación (Suo, Culotti y Van Tol, 2009; Rex *et al.*, 2004).

Como describimos previamente, la TA y OA se sintetizan a partir del aminoácido tirosina, siendo la TA la sustancia precursora de OA. La tirosina se decarboxila mediante la enzima tirosina decarboxilasa (TDC-1) para convertirse en TA y luego esta sufre una hidroxilación por medio de la enzima tiramina β -hidroxilasa (TBH-1) para obtener OA (Fig. 8A). Durante muchos años, la TA fue considerada simplemente como un intermediario en la biosíntesis de la amina biogénica OA y, por lo tanto, no se le otorgaban funciones como neurotransmisor. Es así que existen una gran cantidad de trabajos que recopilan los efectos generados por OA en el comportamiento de invertebrados, pero escasa información del papel fisiológico que cumple la TA (Roeder, 2020). Sin embargo, la caracterización de receptores activados por TA (Chase y Koelle, 2007) y el descubrimiento de células que sintetizan TA pero no OA, advirtieron que podría cumplir un rol como molécula de señalización (Alkema *et al.*, 2005).

En el año 2005, se determinó que la enzima TBH-1, necesaria para la síntesis de OA a partir de TA, no se expresa exactamente en todas las mismas células que expresan la enzima TDC-1, la cual sintetiza TA a partir de tirosina (Fig. 8). Esto sugiere, que hay células tiraminérgicas distintas a las octopaminérgicas que podrían funcionar de manera independiente. *tdc-1* y *tbh-1* están co-expresados en la interneurona RIC ubicada en la cabeza (Fig. 8B) y en las células gonadales (*sheath cells*), sugiriendo que estas células son octopaminérgicas. Por el contrario, la motoneurona RIM (Fig. 8B) y las células UV1 de la vulva expresan *tdc-1* únicamente, determinando que estas neuronas son tiraminérgicas (Alkema *et al.*, 2005).

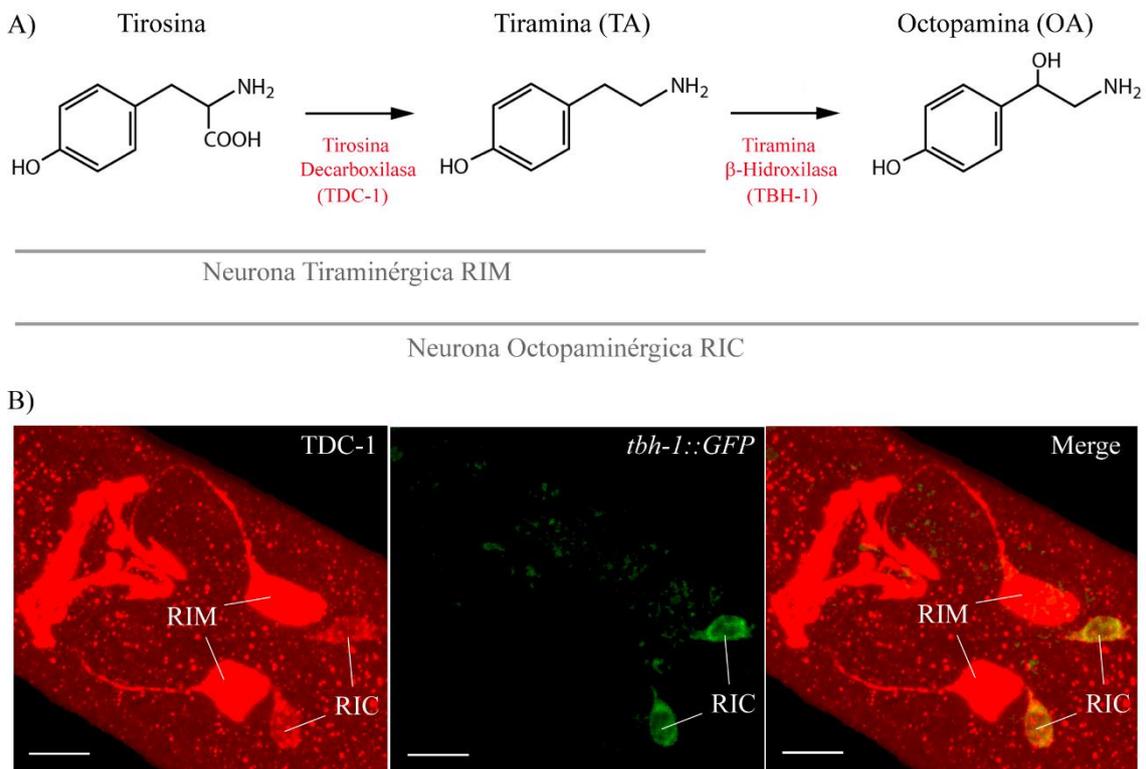


Fig 8. Ruta biosintética de tiramina (TA) y octopamina (OA). A) La TA es sintetizada a partir del aminoácido tirosina mediante la enzima tirosina decarboxilasa (TDC-1) en la neurona tiraminérgica RIM y octopaminérgica RIC. Consecuentemente, la OA es sintetizada a partir de la TA mediante la enzima tiramina β-hidroxilasa (TBH-1) únicamente en la neurona octopaminérgica RIC. B) Tinción del animal transgénico *tbh-1::GFP* marcado con anticuerpos policlonales de conejo anti-TDC-1 (anticuerpo secundario Cy3 (rojo)). Izquierda: TDC-1 se expresa en el par de neuronas RIM y RIC en la cabeza (su expresión en RIC es menor, posiblemente por la conversión de TA en OA). Medio: expresión de TBH-1 en el par de interneuronas RIC. Derecha: fusión (*merge*) de ambas imágenes. La parte anterior del animal es hacia la izquierda. Escala de barra: 10 μm. Adaptado de Alkema *et al.*, 2005.

Haciendo referencia al efecto que generan estas aminas, se conoce que el agregado exógeno de OA estimula la locomoción de *C. elegans* (Churgin *et al.*, 2017), e inhibe el bombeo faríngeo y la puesta de huevos (Horvitz *et al.*, 1982; Segalat, Elkes y Kaplan, 1995; Niacaris y Avery, 2003; Liu *et al.*, 2019). Sin embargo, menos se conoce sobre los efectos de la TA, dado que siempre se le ha otorgado mayor importancia a la OA en la regulación de comportamientos relacionados con la presencia de comida. Es así que recién en los últimos años la TA ha cobrado importancia y se ha descripto su implicancia en la disminución de la puesta de huevos (Alkema *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2016) y en la inhibición del bombeo faríngeo causado por olores desagradables o repelentes (Rex *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2018). Es interesante observar que los efectos producidos por OA y TA son contrarios a los generados por 5-HT sugiriendo un posible antagonismo entre las señales octopa/tiraminérgicas y serotoninérgicas.

Así como la 5-HT regula los comportamientos que favorecen la alimentación en presencia de comida, la OA, por el contrario, regula aquellas conductas que son importantes cuando *C. elegans* está en ausencia de comida (Churgin *et al.*, 2017). La expresión de la enzima TBH-1 (media la biosíntesis de OA) y la concentración de OA, se elevan durante el período de hambre (Tao *et al.*, 2016). Este aumento de la OA media el incremento de la actividad motora necesaria para la localización de una nueva fuente de alimento. Esta hiperactividad física durante períodos de hambre mediada por OA está conservada también en insectos como *Drosophila melanogaster* (Yang *et al.*, 2015).

En *C. elegans* se han identificado tres receptores de OA hasta el momento, todos GPCRs: SER-3, SER-6 y OCTR-1 (Suo, Kimura y Van Tol, 2006; Wragg *et al.*, 2007; Mills *et al.*, 2012), acoplados a $G\alpha_q$, $G\alpha_{s/q}$ y $G\alpha_o$, respectivamente (Komuniecki, Harris, *et al.*, 2012). Los receptores SER-3 y SER-6 están implicados en el aumento de la locomoción de animales hambreados. En este sentido, la OA liberada desde la neurona RIC activa estos dos receptores en una interneurona-motora llamada SIA (Churgin *et al.*, 2017) para generar hiperactividad en animales privados de comida. A su vez, estos dos receptores también modulan la disminución del bombeo faríngeo (Liu *et al.*, 2019).

Por otro lado, se conocen cuatro receptores activados por TA en *C. elegans*, tres GPCRs: SER-2, TYRA-2 y TYRA-3 (Rex *et al.*, 2004; Rex *et al.*, 2005; Hapiak *et al.*, 2013), acoplados probablemente a $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_o$ y $G\alpha_q$, respectivamente (Komuniecki, Harris, *et al.*, 2012), y un canal iónico permeable a cloruro: LGC-55 (Pirri *et al.*, 2009). Se ha reportado que en respuesta a olores repelentes SER-2 y TYRA-2 median la inhibición del bombeo faríngeo. Este efecto se opone a la acción de la 5-HT, la cual

estimula el bombeo faríngeo frente a olores atrayentes (Rex *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2018). Por otro lado, el receptor TYRA-3 parecería estar implicado en evitar que el animal abandone el césped de comida (Bendesky *et al.*, 2011). A diferencia de las conductas claras que ejercen la 5-HT y la OA sobre la actividad motora en función de la disponibilidad de comida, hay que mencionar que la información sobre la TA con respecto a la locomoción aún no está clara.

En este capítulo, nos planteamos entender los mecanismos neuronales y moleculares subyacentes a los distintos comportamientos alimenticios en función del estado nutricional en el nematodo *C. elegans*. En particular, nos centraremos en el rol de 5-HT y TA/OA en estos procesos. Debido a las similitudes en las conductas de alimentación en todo el reino animal y a la conservación de los componentes moleculares implicados en su modulación, es probable que los resultados de esta tesis resulten significativos para la comprensión de este fenómeno no solo en *C. elegans* sino también en otros organismos.

Objetivos

La alimentación es esencial para la supervivencia de todos los animales. El sistema nervioso modula el comportamiento de manera de maximizar el aprovechamiento del alimento disponible. En períodos de hambre, los animales aumentan la búsqueda de comida y una vez que localizan una fuente nutricional tienden a permanecer en un lugar reducido. Una vez saciados, en cambio, se mueven en regiones cada vez mayores, comportamiento que probablemente le permita encontrar sitios aún más favorables (mejores fuentes de alimento, ausencia de predadores, probabilidad de apareamiento, etc). En este trabajo de tesis utilizamos al nematodo *C. elegans*, para estudiar los mecanismos que regulan los comportamientos asociados a la presencia de alimentos. La 5-HT en *C. elegans* modula conductas que favorecen la alimentación, como aumento del bombeo faríngeo y disminución de la locomoción. Por el contrario, los análogos de catecolaminas de mamíferos, TA y OA, ejercen acciones opuestas a la 5-HT (Churgin *et al.*, 2017; Horvitz *et al.*, 1982; Ben Arous, Laffont y Chatenay, 2009; Liu *et al.*, 2019; Wragg *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2018). **En este capítulo utilizamos técnicas farmacológicas, de microscopia, de biología molecular y registros de actividad neuronal con el objeto de dilucidar el rol de estas aminas biogénicas en la conducta alimentaria de *C. elegans*.**

Para cumplir con este objetivo, nos planteamos:

- 1- Evaluar cómo la experiencia previa del animal afecta la conducta de realimentación mediante el análisis de la locomoción en el encuentro con la comida luego de distintos períodos de ayuno.
- 2- Evaluar si animales deficientes de la síntesis de TA/OA presentan algún defecto de la locomoción en el encuentro con la comida
- 3- Estudiar los circuitos celulares y moleculares implicados en la interacción entre las distintas señales aminérgicas que modulan las conductas relacionadas con la alimentación.

Resultados

Como ha sido descrito en la introducción, en un trabajo del grupo de Horvitz describieron la conducta de *Enhanced Slowing Response* (ESR) cuando el animal se encuentra con comida luego de un período de ayuno (Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000). Ellos midieron esta respuesta mediante la cuantificación de las curvaturas del cuerpo del gusano durante 20 segundos al transferirlo a la bacteria. Sugirieron que este comportamiento depende, no solamente de la presencia del alimento, sino también de la experiencia previa del animal. En este sentido, demostraron que un animal saciado exhibe un mayor número de cambios de curvatura del cuerpo por unidad de tiempo (*body bends*, una medida de la locomoción de *C. elegans*) que un animal que ha sido privado de comida cuando se lo coloca en la bacteria (Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000). El animal hambreado es más sensible al estímulo de la presencia del alimento. De esta manera, reduce su locomoción y aprovecha al máximo la nueva fuente de nutrientes. Esta conducta y el aumento del bombeo faríngeo, que favorecen la alimentación, están modulados por la amina biogénica 5-HT (Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000; Iwanir *et al.*, 2016). Por el contrario, las aminas OA y TA han demostrado modular conductas antagónicas a la 5-HT (Alkema *et al.*, 2005; Churgin *et al.*, 2017; Rex *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Wragg *et al.*, 2007).

El hambre afecta la conducta de los animales cuando se los expone al alimento. Estos modifican rápidamente su actividad motora para favorecer la ingesta luego del período de ayuno. Este encuentro de comida posterior a un período de ayuno lo denominaremos realimentación (*refeeding* en inglés). En este trabajo nos centramos principalmente en evaluar la locomoción del animal durante la realimentación como parámetro para estudiar los circuitos neuronales y las bases moleculares que expliquen cómo el estado nutricional de un animal modula las conductas relacionadas con el alimento.

Modulación serotoninérgica de la locomoción en la realimentación

Evaluación de la locomoción en la realimentación luego de distintos períodos en ausencia de comida

Dado que ha sido reportado que la ESR depende de la experiencia previa del animal (Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000) comenzamos evaluando cómo distintos períodos de hambre podrían afectar la respuesta de *C. elegans* en el momento del encuentro con una nueva fuente nutricional. Para cumplir con dicho objetivo, comparamos la velocidad en el momento preciso del primer contacto con el alimento de animales saciados y animales incubados en ausencia de comida durante diferentes tiempos (10 minutos, 20 minutos y 120 minutos). Para ello, diseñamos un ensayo en el cual sembramos la bacteria *E. coli* OP50, alimento para *C. elegans*, alrededor de una cápsula de NGM sólido (ver Materiales y Métodos, *Anexo 1*) en forma de círculo, dejando el centro libre de bacteria. Permitimos que la bacteria creciera durante toda la noche a 37°C formando un césped homogéneo y delgado (Fig. 9). Posteriormente, colocamos aproximadamente 10 gusanos adultos jóvenes en el centro de la cápsula, donde hay ausencia de comida, y grabamos su desplazamiento hacia la bacteria. Para obtener las grabaciones de la dinámica de locomoción con una alta resolución temporal utilizamos el *software* Multi-Worm Tracker (MWT) (Swierczek *et al.*, 2011) y luego la velocidad ($\mu\text{m}/\text{seg}$) la cuantificamos en función del tiempo mediante el *software* Choreography y un *script* customizado de MATLAB (Yemini, Kerr y Schafer, 2011) (Fig. 9).

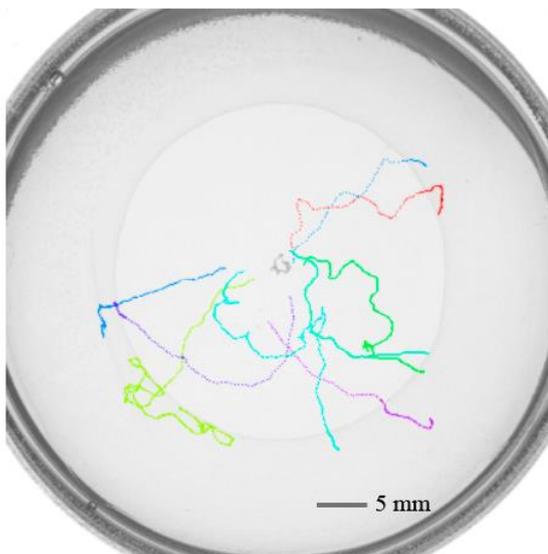


Fig 9. Ensayo de locomoción en medio sólido NGM. Trayectorias de los animales desde el centro de la cápsula hacia la bacteria *E. coli* OP50 sembrada en forma de círculo alrededor de la cápsula de NGM.

En este ensayo observamos que aquellos animales que permanecieron en presencia de comida toda la vida exhiben una ligera disminución de la locomoción cuando se encuentran con el borde de la bacteria y rápidamente reinician el movimiento hacia adelante (Video 1: encuentro con el borde de la bacteria *E. coli* OP50 de animales saciados: <https://youtu.be/Ix9vPgVsANo>). Por el contrario, los animales que han sido

incubados en ausencia de comida muestran una abrupta disminución de la locomoción en el nuevo contacto con la bacteria. (Video 2: encuentro con el borde de la bacteria *E. coli* OP50 de animales hambreados por 120 minutos: <https://youtu.be/-KZTa1bHtwY>). A la disminución de la locomoción en la llegada al borde de la bacteria, tanto de animales hambreados como saciados, nosotros la llamaremos *Slowing Down Response* (SDR).

Luego de obtenidas las grabaciones de cada condición (animales saciados y hambreados 10, 20 y 120 minutos), graficamos las curvas de velocidad versus el tiempo: desde 50 segundos antes hasta 50 segundos después del encuentro con el alimento, siendo el tiempo 0 el momento de contacto de la cabeza del gusano con el borde de la bacteria (Fig. 10A y 10B). Nos centramos en estudiar este rango de tiempo dado que el efecto agudo de la 5-HT en este comportamiento suele observarse unos pocos segundos antes (por la acción de la neurona ADF) y después (por la acción de la neurona NSM) de la llegada a la comida (Iwanir *et al.*, 2016). A partir de los datos obtenidos de estas curvas calculamos las velocidades medias dentro de rangos de 3 segundos en tres momentos determinados: al inicio del ensayo (-47 a -44 segundos), poco antes (-8 a -5 segundos) e inmediatamente después (1 a 4 segundos) que el animal alcanzara el borde de la bacteria (ver Materiales y Métodos). Determinamos que no existe diferencia entre las velocidades iniciales de cada condición, excepto en los animales que han sido hambreados por 120 min (Fig. 10B). Esto tiene sentido, debido a que ha sido reportado que *C. elegans* exhibe una exploración activa en un período corto de ayuno, y al extenderse este tiempo, modifica el comportamiento a un estado de quiescencia en el que presenta una baja actividad motora (Skora, Mende y Zimmer, 2018). Esta conducta está modulada por los cambios en los niveles de insulina. Mientras el suministro de energía interno sea suficiente, la insulina mantiene el estado exploratorio al principio de la privación de comida. Sin embargo, al prolongarse este período, los niveles de insulina declinan provocando la disminución de la locomoción (Skora, Mende y Zimmer, 2018). Observamos, además, que poco antes e inmediatamente después del contacto con la bacteria los animales hambreados durante distintos tiempos son significativamente más lentos que los animales saciados (Fig. 10B). Adicionalmente, determinamos que los animales hambreados por 20 y 120 minutos presentan una velocidad aún más lenta en la SDR (intervalo de 1-4 segundos) que aquellos hambreados por sólo 10 minutos (Fig. 10B). A su vez, con el objetivo de determinar la magnitud de la SDR en cada condición evaluada, calculamos el porcentaje de la velocidad promedio inmediatamente luego del encuentro con la comida (en intervalo $t = 1$ a 4 segundos) con respecto a la velocidad promedio inicial (en intervalo

t= -47 a -44 segundos) y la denominamos “porcentaje de velocidad inicial” (ver Materiales y Métodos). Determinamos que los animales saciados presentan un $50,56 \pm 3,03$ % de la velocidad inicial una vez que llegan a la bacteria, mientras que los animales hambreados durante 10, 20 y 120 minutos exhiben el $37,78 \pm 3,07$ %, $24,53 \pm 2,86$ % y $27,27 \pm 2,47$ % de la velocidad inicial, respectivamente (Fig. 10C). Estos resultados en conjunto, sugieren que la disminución de la velocidad en el encuentro con la comida es mayor en estados de hambre que en estados de saciedad y que se exagera luego de 20 minutos en ausencia de alimento permaneciendo prácticamente igual luego de períodos de hambre más prolongados. Estos datos discrepan de aquellos reportados en el trabajo de Iwanir y colaboradores, en el que indican que la SDR es similar luego de 5 o 120 minutos de ausencia de comida (Iwanir *et al.*, 2016), lo cual resulta llamativo que sólo 5 minutos sean suficientes para alcanzar un estadio de hambre.

Dado que determinamos que la SDR se exagera luego de períodos de ayuno, nos preguntamos qué es lo que está ocurriendo en el sistema nervioso del animal que produce que los animales saciados y hambreados respondan de manera diferente al mismo estímulo.

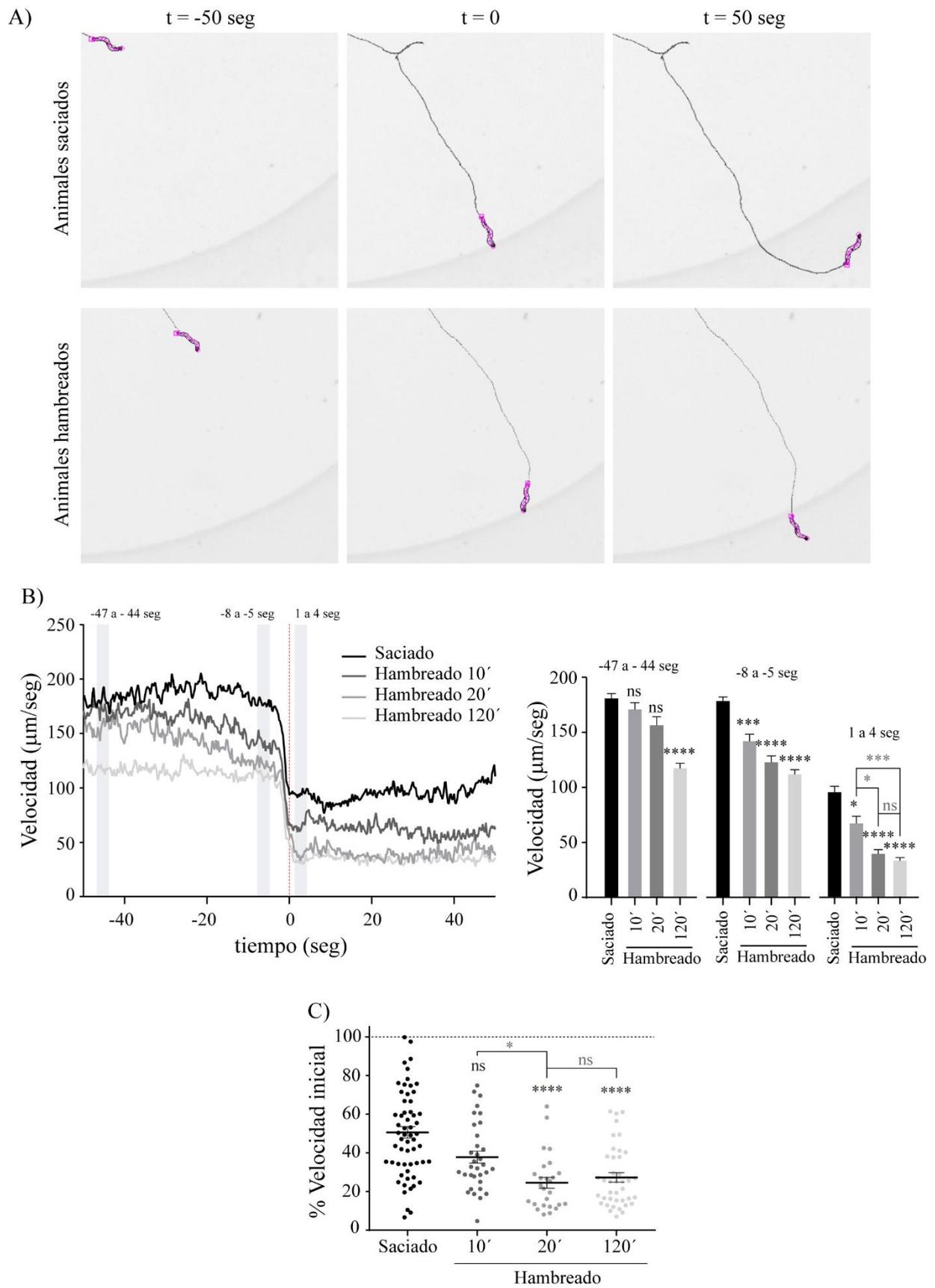


Fig 10. Locomoción en la SDR de animales saciados y hambreados. A) Trayectoria de un animal saciado (arriba) y hambreado durante 120 minutos (abajo), 50 segundos antes del encuentro con la comida,

en el encuentro con la comida (t=0) y 50 segundos después del encuentro con la comida. B) Izquierda: la velocidad de los animales rastreados alineada en el tiempo del encuentro con el borde de la bacteria (t=0). Cada curva representa la media de la velocidad de animales saciados ($n = 67$) y hambreados por 10 ($n = 36$), 20 ($n = 28$) y 120 minutos ($n = 42$), 50 segundos antes y 50 segundos después del encuentro con la bacteria (las curvas se muestran sin los errores estándar para una mejor visualización; las franjas grises indican los tiempos analizados en el gráfico de la derecha). Derecha: la velocidad promedio de los animales (del panel de la izquierda) al inicio del ensayo (t= -47 a -44 segundos), antes del encuentro (t= -8 a -5 segundos) e inmediatamente luego del encuentro con el borde de la bacteria (t= 1 a 4 segundos). Los datos están presentados como la media de la velocidad promedio en el rango de 3 segundos indicado en cada tiempo \pm ES. Significancia estadística comparada con la velocidad media de los animales saciados en cada tiempo y determinada por prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Dunn) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; $n = 5$) C) Porcentaje de velocidad inicial de cada animal inmediatamente luego del encuentro con la comida (calculado como velocidad promedio en t = 1 a 4 segundos / velocidad promedio en t = -47 a -44 segundos x 100). Los animales hambreados por 10 minutos no presentan diferencias significativas con respecto a los animales saciados, mientras que los animales hambreados por 20 y 120 minutos si lo hacen. Los datos están presentados como la media del porcentaje de velocidad inicial inmediatamente después del encuentro con la bacteria \pm ES y cada punto representa un individuo. La significancia estadística comparada con animales saciados es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Dunn) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$; $n = 5$).

Estudio de la locomoción del mutante deficiente de 5-HT en la realimentación

Si bien la 5-HT había sido reportada como clave en la exacerbación de la SDR en animales hambreados (Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000; Iwanir *et al.*, 2016), decidimos confirmar su rol en nuestro sistema experimental. Evaluamos si gusanos mutantes MT14894 *tph-1* (*n4622*) deficientes de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH-1), necesaria para la síntesis de 5-HT en *C. elegans*, presentan una SDR alterada. Para ello, empleando el mismo ensayo descrito anteriormente, cuantificamos la dinámica de velocidad de las cepas salvaje y *tph-1* en el encuentro con la bacteria luego de haber permanecido 2 horas en una cápsula sin alimento. De manera similar a lo reportado previamente (Iwanir *et al.*, 2016; Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000), observamos que los animales mutantes *tph-1* hambreados exhiben una disminución de la velocidad menos abrupta que los animales salvajes en la vuelta a la comida (Fig. 11A). Comparamos las velocidades medias de cada cepa antes e inmediatamente después del encuentro con el borde de la bacteria (Fig. 11A). Los mutantes nulos *tph-1* son mínimamente más rápidos

que la cepa salvaje al inicio del ensayo. Mientras que, en el intervalo de 1 - 4 segundos luego de arribar a la bacteria presentan una locomoción extremadamente mayor que los animales salvajes (Fig. 11A). El porcentaje de velocidad inicial inmediatamente luego del contacto con la comida (en intervalo $t= 1 - 4$ segundos) de la cepa salvaje es $27,38 \pm 3,66$ %, mientras que la del mutante nulo *tph-1* es del $90,86 \pm 4,58$ % (Fig. 11B). Esto demuestra que los gusanos deficientes de 5-HT no se detienen de manera brusca en el encuentro con la comida incluso en estados de hambre. Cabe aclarar que, en las curvas de velocidad versus tiempo se observa que al cabo de unos segundos de estar en presencia de comida el mutante *tph-1* reduce su velocidad prácticamente al nivel de la cepa salvaje (Fig. 11A). Esto sugiere que la 5-HT es necesaria para generar un efecto agudo sobre la locomoción en la vuelta al alimento. Esta respuesta podría ser crucial para que el animal cambie drásticamente su comportamiento y permanezca dentro de la comida una vez que la halla. Dado que la llegada al césped de bacterias, también activa neuronas dopaminérgicas mecano-sensoriales que afectan la locomoción, no podemos descartar que esta vía contribuya a la disminución de la velocidad observada luego de unos minutos en la lámina de bacteria. (Omura *et al.*, 2012; Oranth *et al.*, 2018). Se cree que la dopamina (DA) liberada desde una de sus neuronas, la PDE, en presencia de comida podría activar el receptor GPCR DOP-3 acoplado a $G\alpha_o$ en neuronas colinérgicas del cordón ventral nervioso para reducir la locomoción (Chase, Pepper y Koelle, 2004). Más recientemente se reportó que en presencia de comida, la DA también puede inhibir la interneurona AVK y activar la interneurona DVA que, mediante la liberación de neuropéptidos, promueve e inhibe la locomoción, respectivamente (Oranth *et al.*, 2018).

Repetimos el mismo ensayo con animales bien alimentados, y al igual que los resultados obtenidos con gusanos hambreados, el mutante *tph-1* presenta menor disminución de la locomoción que la cepa salvaje en la llegada a la comida (Fig. 11C). La velocidad promedio y el porcentaje de velocidad inicial inmediatamente después de la llegada a la bacteria ($t= 1 - 4$ segundos) es mayor en el mutante *tph-1* que en animales salvajes (Fig. 11C y 11D). Esto demuestra que la 5-HT no solo modula la disminución de la actividad motora en el encuentro con el alimento en animales hambreados, sino que también en aquellos gusanos que se hallan saciados. No obstante, como describimos en la Fig. 10, la magnitud de la SDR varía en ambas condiciones, demostrando que la señal serotoninérgica es más intensa en animales hambreados.

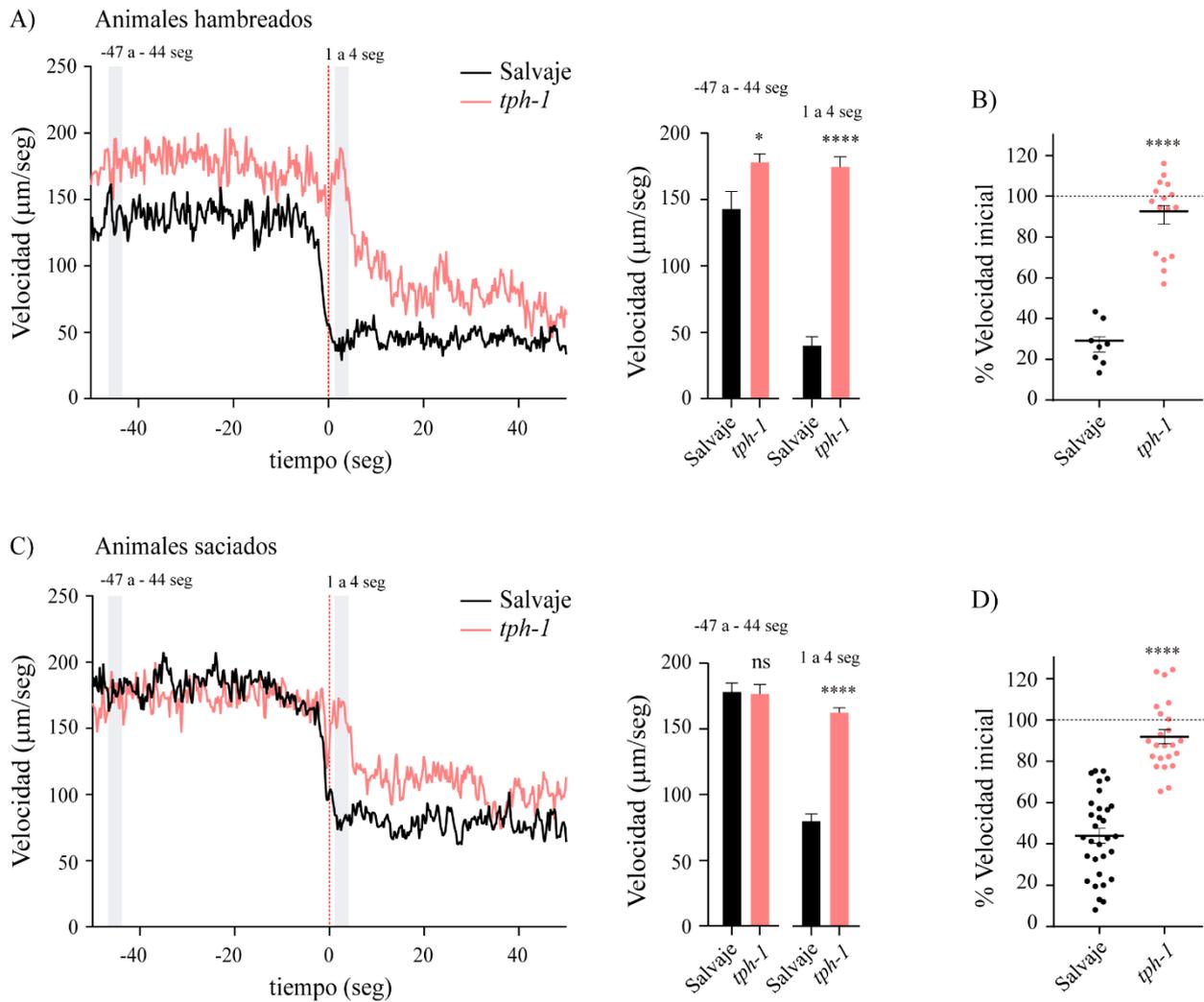


Fig 11. Locomoción en la SDR de animales salvajes y deficientes de la síntesis de 5-HT. A) Izquierda: Velocidad en el encuentro con la comida de animales salvajes ($n = 8$) y animales mutantes *tph-1* (deficientes de la enzima TPH-1 necesaria para la síntesis de 5-HT, $n = 16$) hambreados. El tiempo del encuentro con el borde de la bacteria fue definido como $t = 0$. La curva presenta la velocidad media sin los errores estándar para una mejor visualización. Las franjas grises indican los tiempos analizados en el gráfico de la derecha. Derecha: la velocidad promedio de los animales (del panel de la izquierda) al inicio del ensayo ($t = -47$ a -44 segundos) e inmediatamente luego del encuentro con el borde de la bacteria ($t = 1$ a 4 segundos). Los mutantes nulos *tph-1* presentan una disminución de la velocidad menos abrupta que los animales salvajes. Los datos se presentan como la media de la velocidad promedio en el rango de 3 segundos indicado en cada tiempo \pm ES. La significancia estadística comparada con la velocidad media de los animales salvajes en cada intervalo de tiempo es determinada por la prueba de Mann-Whitney (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$; $n = 2$). B) Porcentaje de velocidad inicial de cada animal inmediatamente luego del encuentro con la comida (calculado como velocidad promedio en $t = 1$ a 4 segundos / velocidad promedio en $t = -47$ a -44 segundos $\times 100$). Los mutantes nulos *tph-1* presentan un % de velocidad inicial significativamente mayor a los animales salvajes. Los datos están presentados como la media del porcentaje de velocidad inicial inmediatamente después del encuentro con la bacteria \pm ES y cada punto representa un individuo. Significancia estadística determinada por prueba de Mann-Whitney (**** $p < 0,0001$; $n = 2$). C) Izquierda:

Velocidad en el encuentro con la comida de animales salvajes ($n = 31$) y animales mutantes *tph-1* ($n = 23$) saciados. La curva presenta la velocidad media sin los errores estándar para una mejor visualización. Las franjas grises indican los tiempos analizados en el gráfico de la derecha. Derecha: la velocidad promedio de los animales (del panel de la derecha) al inicio del ensayo ($t = -47$ a -44 segundos) e inmediatamente luego del encuentro con el borde de la bacteria ($t = 1$ a 4 segundos). Los mutantes nulos *tph-1* presentan una disminución de la velocidad menos abrupta que los animales salvajes. Los datos se presentan como la media de la velocidad promedio en el rango de 3 segundos indicado en cada tiempo \pm ES. La significancia estadística comparada con la velocidad media de los animales salvajes en cada intervalo de tiempo es determinada por la prueba de Mann-Whitney (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, **** $p < 0,0001$; $n = 3$). D) Porcentaje de velocidad inicial de cada animal inmediatamente luego del encuentro con la comida (calculado como velocidad promedio en $t = 1$ a 4 segundos / velocidad promedio en $t = -47$ a -44 segundos $\times 100$). Al igual que con los animales hambreados, los mutantes nulos *tph-1* presentan un % de velocidad inicial significativamente mayor a los animales salvajes en un estado de saciedad. Los datos están presentados como la media del porcentaje de velocidad inicial inmediatamente después del encuentro con la bacteria \pm ES y cada punto representa un individuo. Significancia estadística determinada por la prueba de Mann-Whitney (**** $p < 0,0001$; $n = 3$).

Comparamos, además, la velocidad del desplazamiento del mutante *tph-1* bajo ambas condiciones: saciados y hambreados por 2 horas. Observamos que en ambas situaciones los animales exhiben la misma locomoción y el mismo porcentaje de velocidad inicial en el momento del encuentro con la bacteria (Fig. 12A y 12B). Esto indica que, a pesar de haber estado privado de comida, el comportamiento de la cepa *tph-1* hambreada se asemeja a la de animales saciados. En conjunto, todos estos resultados corroboran que la 5-HT es necesaria para que los animales reduzcan la velocidad en la SDR.

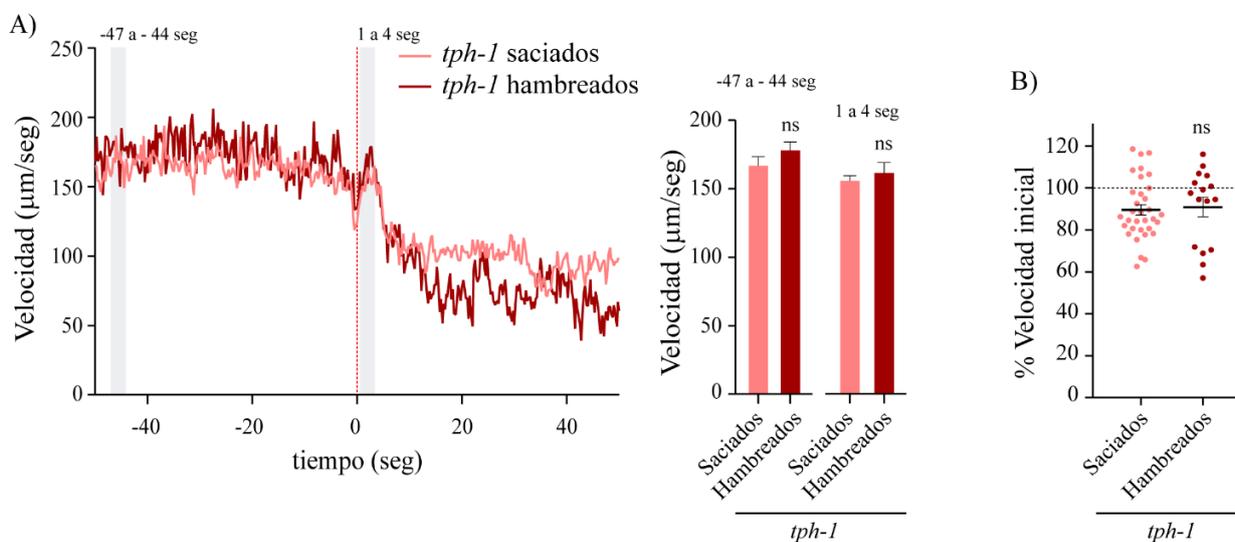


Fig 12. Locomoción en la SDR de animales deficientes de la síntesis 5-HT saciados y hambreados. A) Izquierda: Velocidad en el encuentro con la comida de mutantes nulos *tph-1* saciados ($n = 33$) y hambreados ($n = 16$) hambreados. El tiempo del encuentro con el borde de la bacteria fue definido como $t = 0$. La curva representa la velocidad media sin los errores estándar para una mejor visualización. Las franjas grises indican los tiempos analizados en el gráfico de la derecha. Derecha: velocidad promedio de los animales (del panel de la izquierda) al inicio del ensayo ($t = -47$ a -44 segundos) e inmediatamente luego del encuentro con el borde de la bacteria ($t = 1$ a 4 segundos). Los mutantes nulos *tph-1* saciados y hambreados no presentan diferencias de la velocidad en el encuentro con la bacteria. Los datos se presentan como la media de la velocidad promedio en el rango de 3 segundos indicado en cada tiempo \pm ES. La significancia estadística comparada con la velocidad media de los animales saciados en cada intervalo de tiempo es determinada por la prueba de Mann-Whitney) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$; $n = 3$). B) Porcentaje de velocidad inicial de cada animal inmediatamente luego del encuentro con la comida (calculado como velocidad promedio en $t = 1$ a 4 segundos / velocidad promedio en $t = -47$ a -44 segundos $\times 100$). No hay diferencias significativas entre los animales *tph-1* saciados y hambreados. Los datos están presentados como la media del porcentaje de velocidad inicial inmediatamente después del encuentro con la bacteria \pm ES y cada punto representa un individuo. Significancia estadística determinada por la de Mann-Whitney) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$; $n = 3$).

Imágenes de calcio de neuronas serotoninérgicas en la realimentación

Como ha sido mencionado en la introducción, Iwanir y colaboradores reportaron que las neuronas serotoninérgicas ADF y NSM, ubicadas en la cabeza de *C. elegans* (Fig. 7), aumentan su actividad durante el encuentro con una nueva fuente nutricional. La liberación de 5-HT desde estas dos neuronas regula la ESR en el animal (Iwanir *et al.*, 2016). Mediante la técnica de microscopía empleada para medir la dinámica de los niveles de calcio intracelular con la sonda genética de calcio GCaMP expresada en las neuronas serotoninérgicas, podemos obtener una aproximación de la actividad neuronal de ADF y NSM cuando el animal vuelve a exponerse a comida. La transparencia de *C. elegans* hace que sea particularmente adecuado para realizar mediciones de cambios de fluorescencia celular *in vivo* (Leifer *et al.*, 2011). De manera que, para constatar el aumento de actividad de las neuronas serotoninérgicas, empleamos la cepa SWF108 (fluEx59 [*ptph-1::GCaMP7F*; *myo-3::mCherry*]), que expresa la sonda genética de calcio GCaMP7 en las neuronas que sintetizan 5-HT. Luego de un período de 2 horas de privación de comida, colocamos aproximadamente 15 gusanos en una cámara microfluídica de polidimetilsiloxano (PDMS) a través de la cual se perfunde el buffer S-basal (ver Materiales y Métodos y Anexo 4) (Chronis, 2010) (Fig. 13A). Dejamos que los gusanos,

que pueden moverse libremente dentro de la cámara, se aclimataran durante 15 minutos. Posteriormente, abrimos la válvula que permite el ingreso de S-basal con bacteria *E. coli* OP50, fuente de comida para *C. elegans*, y con un microscopio de fluorescencia tomamos fotografías de los animales. Luego, cuantificamos la intensidad de fluorescencia de cada neurona en diversos puntos de tiempo mediante el *software* Fiji-ImageJ (ver Materiales y métodos) (Fig. 13B). Observamos que la fluorescencia de ambas neuronas serotoninérgicas, ADF y NSM, en animales hambreados se incrementa inmediatamente al perfundir la comida (Fig. 13B, 13C y 13D). Luego, la actividad neuronal disminuye levemente, pero no alcanza la actividad basal inicial (Fig. 13C y 13D). Estos resultados confirman que las neuronas serotoninérgicas se activan al exponer a los animales a una nueva fuente de alimentos. No obstante, difieren ligeramente de lo reportado, lo cual indica que pocos segundos después del aumento de la fluorescencia de ADF y NSM en el encuentro con la comida, la actividad neuronal de ambas neuronas vuelve al estado basal (Iwanir *et al.*, 2016). Esta disparidad podría deberse al empleo de distintos métodos de microscopía. Ellos midieron la actividad neuronal en animales que se encuentran con el borde de la bacteria en medio sólido, mientras que nosotros perfundimos la bacteria de manera continua dentro de la cámara que contiene a los gusanos en medio líquido. Optamos por utilizar esta técnica debido a que permite analizar un mayor número de animales por experimento y a que no requiere del difícil seguimiento manual del animal que se mueve velozmente sobre el NGM sólido. Para descartar que el pico de fluorescencia que observamos en el instante que perfundimos la comida no se deba a un efecto mecánico producido por el cambio del flujo que atraviesa la cámara, realizamos el mismo ensayo, pero perfundimos buffer sin comida a gusanos bien alimentados. No observamos cambios en la fluorescencia de las neuronas serotoninérgicas al abrir la válvula del buffer, de manera que pudimos descartar un posible efecto mecánico que produjera el cambio en la actividad neuronal (Fig. 13C y 13D).

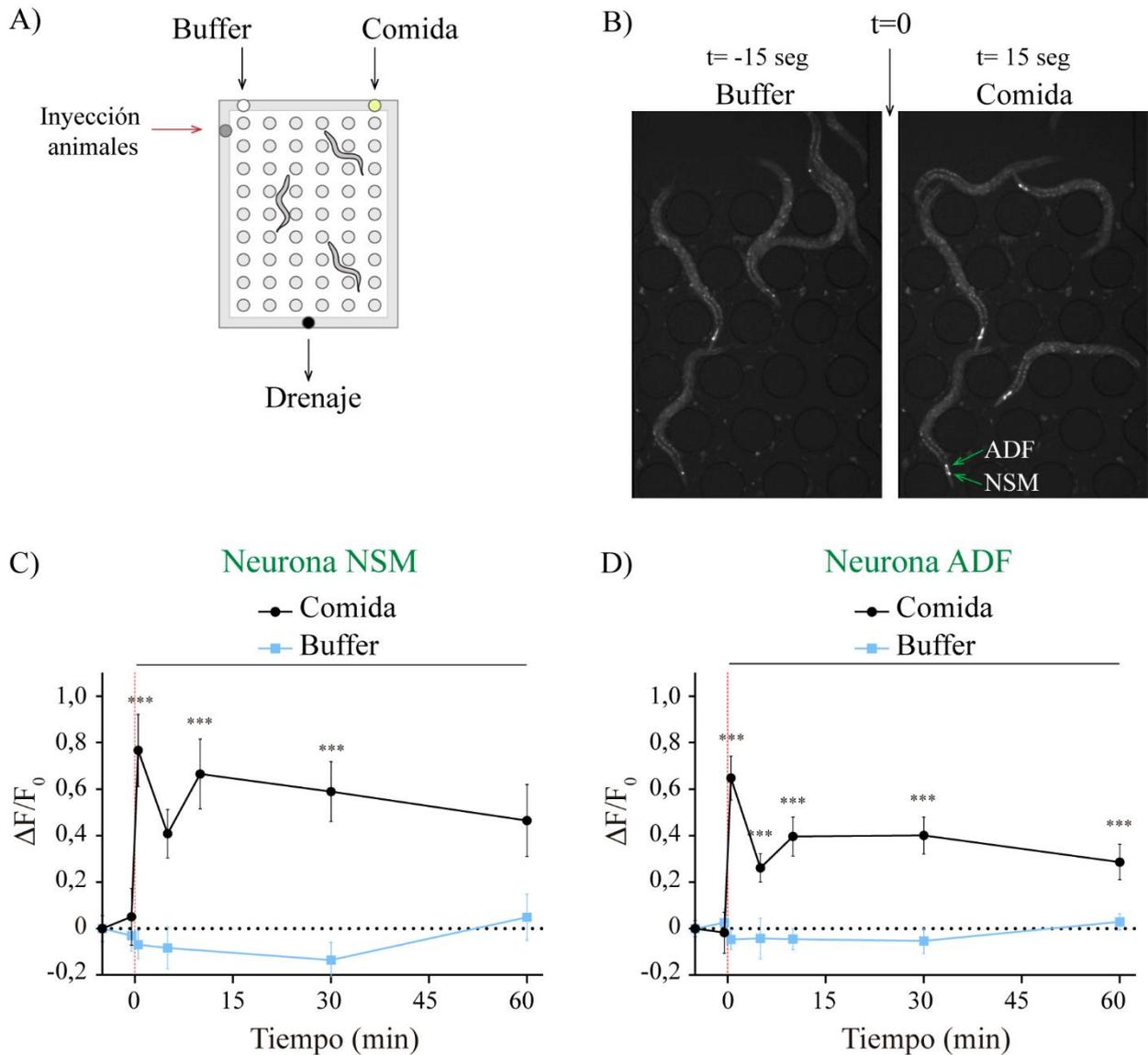


Fig 13. Actividad de las neuronas serotoninérgicas, ADF y NSM, dependiente de la disponibilidad de alimento. A) Representación de la cámara microfluídica de PDMS, en la cual se colocan los gusanos que pueden moverse libremente. Se perfunde buffer S-basal o buffer S-basal con comida según sea el caso y se drena el líquido a través de otro conducto por la acción de la gravedad. B) Imágenes de animales transgénicos SWF108 (expresan GCaMP7 en las neuronas serotoninérgicas) hambreados, que se mueven libremente dentro de la cámara, 15 segundos antes (izquierda) y 15 segundos después (derecha) de la perfusión de S-basal con comida. La fluorescencia de las neuronas NSM y ADF se incrementa en la exposición a la comida luego de un período de ayuno. C) y D) Actividad neuronal de NSM y ADF. Luego de dos horas en ausencia de alimento, se midió el cambio de fluorescencia de las neuronas serotoninérgicas, NSM y ADF, al perfundir S-basal con comida dentro de la cámara (círculo negro, ●). Se observa un pico en los niveles de fluorescencia de ambas neuronas inmediatamente luego de la perfusión de comida. Como control se midió el cambio de fluorescencia de ambas neuronas serotoninérgicas, en animales previamente bien alimentados, al perfundir buffer S-basal solo (cuadrado celeste: ■). No se observan cambios significativos de la fluorescencia neuronal. Los datos se presentan como la media del cambio de

fluorescencia relativo al valor de fluorescencia inicial $((F_t - F_0) / F_0)$, siendo F_t la fluorescencia en cada tiempo y F_0 la fluorescencia en el tiempo inicial, $t = -5$ minutos) \pm ES. La significancia estadística comparada con el tiempo inicial es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Dunn) ($p^{***} < 0,001$, $n = 60$).

En conjunto, los resultados obtenidos hasta ahora comprueban que la SDR se exacerba luego de ~ 20 minutos en ausencia de comida y que la 5-HT modula la disminución de la locomoción en el encuentro con la comida tanto de animales hambreados como saciados. A su vez, corroboramos que la actividad de las neuronas serotoninérgicas se incrementa en animales hambreados expuestos a alimento. Si bien el rol de la 5-HT en la conducta de realimentación había sido previamente reportado (Iwanir *et al.*, 2016; Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000), la confirmación de esto, utilizando nuestro propio sistema experimental, fue necesaria para poder avanzar en el estudio de las bases moleculares responsables de la exacerbación de la señal serotoninérgica que ocurre en animales hambreados que encuentran comida nuevamente.

Intermodulación entre la señal serotoninérgica y tiraminérgica

Los resultados presentados hasta el momento nos permitieron confirmar que la disminución de la velocidad en el encuentro con la comida depende de 5-HT. Por lo tanto, para continuar con este trabajo nos empeñamos en estudiar las vías moleculares involucradas en la modulación de la SDR. Teniendo en cuenta que existen reportes sobre las acciones opuestas ejercidas por la TA y la 5-HT (Alkema *et al.*, 2005; Rex *et al.*, 2004; Wragg *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2018), pero que los efectos de la TA en la locomoción del animal no son del todo claros, nos planteamos investigar la posible intervención de la vía tiraminérgica en la SDR mediada por 5-HT. Para ello, optamos por estudiar la sensibilidad a la disminución de la locomoción en el encuentro con la comida de animales mutantes deficientes de la síntesis de TA. A pesar de que algunos estudios proponen el antagonismo entre 5-HT y TA (Rex *et al.*, 2004; Wragg *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2018) y que se tiene conocimiento de cómo afecta la comida a la actividad neuronal serotoninérgica, aún no se conoce la dinámica de activación de la vía tiraminérgica en animales en presencia y ausencia de comida. Por esta razón, es que también nos propusimos estudiar la actividad

neuronal de RIM (neurona tiraminérgica) en períodos de privación de nutrientes y en la realimentación.

SDR del mutante deficiente de TA

Comparamos el comportamiento de las cepas MT10661 *tdc-1* (n3420) y salvaje saciadas en el momento del encuentro con la comida. Puesto que esta cepa es deficiente de la enzima triptófano hidroxilasa (TDC-1), necesaria para la síntesis de TA, tampoco será capaz de biosintetizar su derivado OA (Fig. 8). Por esta razón utilizamos la cepa MT9455 *tbh-1* (n3247), deficiente de la enzima tiramina β-hidroxilasa (TBH-1), como cepa control de presencia de TA y ausencia de OA. Luego de capturar los videos de la dinámica de locomoción de cada cepa durante la SDR, graficamos las curvas de velocidad versus tiempo como describimos anteriormente (Fig. 14A). Observamos que, incluso estando bien alimentados los gusanos mutantes *tdc-1* presentan una SDR mucha más pronunciada que la cepa salvaje (Fig. 14A). La velocidad inicial (t= -47 - -44 segundos), de la cepa *tdc-1* es similar, pero inmediatamente después de tener contacto con la bacteria (t= 1 - 4 segundos), es inferior a la de los gusanos salvajes (Fig. 14A). Además, el porcentaje de velocidad inicial luego del contacto con la bacteria es de $61,28 \pm 3,65$ % y $23,87 \pm 2,76$ % para gusanos salvajes y *tdc-1*, respectivamente (Fig. 14B). Estos resultados sugieren que la cepa *tdc-1* se comporta como hambreada, independientemente de su estado nutricional. Sin embargo, esto no confirma que la TA sea la amina relevante en este comportamiento, dado que el mutante *tdc-1* no sintetiza TA ni OA. Para garantizar la participación de la TA, la cepa *tbh-1*, la cual sintetiza TA, pero no OA, debería comportarse como la cepa salvaje o exhibir una magnitud de SDR intermedia entre la del mutante *tdc-1* y la cepa salvaje. Sin embargo, el mutante nulo *tbh-1* presenta una velocidad media significativamente más lenta que las otras dos cepas al inicio del ensayo (t= -47 - -44 segundos) (Fig. 14A). Considerando que la mutante nula *tbh-1* contiene más TA que los animales salvajes, por no ser capaz de convertir la TA en OA (Alkema *et al.*, 2005), no podemos descartar que el exceso de TA afecte la movilidad de los gusanos independientemente de la presencia o ausencia de comida. Si bien el porcentaje de velocidad inicial en el momento de la SDR del mutante *tbh-1* ($40,99 \pm 5,25$ %) es menor que el del salvaje, también es significativamente mayor al de la cepa *tdc-1* (Fig. 14B). Esto último sugiere que existe un efecto antagónico entre 5-HT y TA.

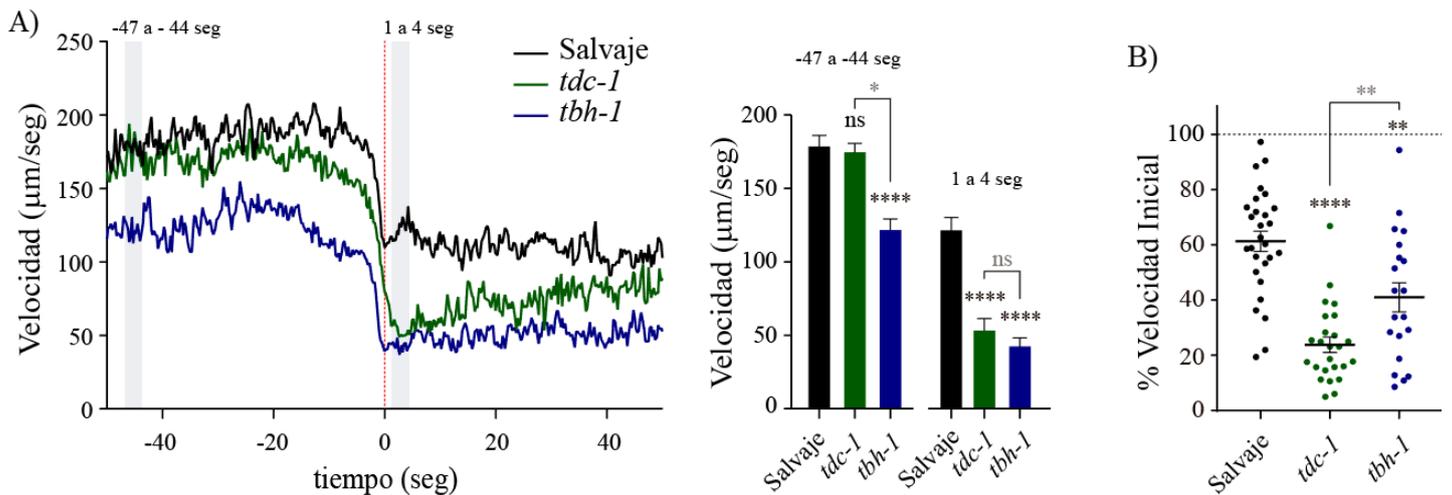


Fig 14. Locomoción en la SDR de animales salvajes y deficientes de la síntesis de TA/OA. A) Izquierda: Velocidad en el encuentro con la comida de mutantes nulos *tdc-1* ($n = 25$), *tbh-1* ($n = 20$) y animales salvajes ($n = 28$) saciados. El tiempo del encuentro con el borde de la bacteria fue definido como $t = 0$. La curva representa la velocidad media sin los errores estándar para una mejor visualización. Las franjas grises indican los tiempos analizados en el gráfico de la derecha. Derecha: la velocidad promedio de los animales (del panel de la derecha) al inicio del ensayo ($t = -47$ a -44 segundos) e inmediatamente luego del encuentro con el borde de la bacteria ($t = 1$ a 4 segundos). Los datos se presentan como la media de la velocidad promedio en el rango de 3 segundos indicado en cada tiempo \pm ES. La significancia estadística es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Tukey) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, $p^* < 0,05$, $p^{****} < 0,0001$; $n = 3$). B) Porcentaje de velocidad inicial de cada animal inmediatamente luego del encuentro con la comida (calculado como velocidad promedio en $t = 1$ a 4 segundos / velocidad promedio en $t = -47$ a -44 segundos $\times 100$). *tdc-1* y *tbh-1* presentan un menor % de velocidad inicial inmediatamente luego del encuentro con la bacteria con respecto a los animales salvajes y, además, *tdc-1* tiene un % de velocidad inicial significativamente menor a *tbh-1*. Los datos están presentados como la media del porcentaje de velocidad inicial inmediatamente después del encuentro con la bacteria \pm ES y cada punto representa un individuo. La significancia estadística es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Tukey) ($p^{**} < 0,01$, $p^{****} < 0,0001$; $n = 3$).

Con el objetivo de confirmar el antagonismo entre las señales serotoninérgicas y tiraminérgicas en la SDR, evaluamos la dinámica de velocidad de la cepa QW331 zfls (*tdc-1*; *ptbh-1::tdc-1*). Esta cepa es una mutante nula de *tdc-1* que expresa un transgén conteniendo el gen *tdc-1* bajo el promotor de *tbh-1*. De esta manera, el gusano no será capaz de sintetizar TA en RIM, pero al haber sido rescatada la expresión de TDC-1 en RIC, podrá producir OA. Observamos que los animales *tdc-1*; *ptbh-1::tdc-1*, al igual que el mutante nulo *tdc-1*, exhibe una menor velocidad que los gusanos salvajes en el momento del encuentro con la comida (Fig. 15A). No obstante, la locomoción del gusano

tdc-1 es aún menor que la de la cepa que expresa TDC-1 únicamente en RIC (Fig. 15A), posiblemente porque OA también participe en este antagonismo. Esto tiene sentido dado que ha sido reportado que OA aumenta la locomoción, efecto opuesto a la acción ejercida por 5-HT (Churgin *et al.*, 2017). Asimismo, el porcentaje de velocidad inicial en la SDR de ambas cepas, *tdc-1* y *tdc-1; ptbh-1::tdc-1*, es significativamente menor al de la cepa salvaje (Fig. 15B), demostrando que los animales deficientes de TA son más sensibles a la SDR ejercida por 5-HT. Esto demuestra que la TA modula efectos antagónicos a la 5-HT en la locomoción durante el encuentro con la comida.

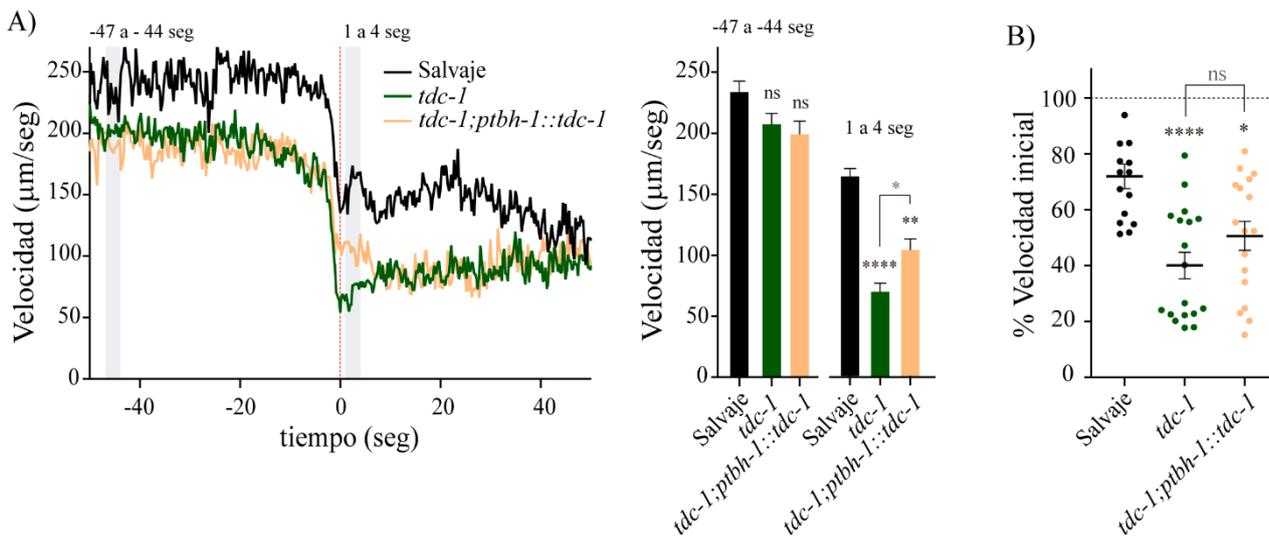


Fig 15. Locomoción en la SDR de animales salvajes, deficientes de TA/OA y deficientes únicamente de TA. A) Izquierda: Velocidad en el encuentro con la comida de *tdc-1* ($n = 18$), *tdc-1;ptbh-1::tdc-1* ($n = 17$) y animales salvajes ($n = 14$) saciados. El tiempo del encuentro con el borde de la bacteria fue definido como $t = 0$. La curva presenta la velocidad media sin los errores estándar para una mejor visualización. Las franjas grises indican los tiempos analizados en el gráfico de la derecha. Derecha: la velocidad promedio de los animales (del panel de la izquierda) al inicio del ensayo ($t = -47$ a -44 segundos) e inmediatamente luego del encuentro con el borde de la bacteria ($t = 1$ a 4 segundos). Los datos se presentan como la media de la velocidad promedio en el rango de 3 segundos indicado en cada tiempo \pm ES. La significancia estadística comparada con la velocidad media de los animales salvajes en cada intervalo de tiempo es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Tukey) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{****} < 0,0001$; $n = 3$). B) Porcentaje de velocidad inicial de cada animal inmediatamente luego del encuentro con la comida (calculado como velocidad promedio en $t = 1$ a 4 segundos / velocidad promedio en $t = -47$ a -44 segundos \times 100). *tdc-1* y *tdc-1;ptbh-1::tdc-1* presentan un % de velocidad inicial menor que los animales salvajes en la SDR. Los datos están presentados como la media del porcentaje de velocidad inicial inmediatamente después del encuentro con la bacteria \pm ES y cada punto representa un individuo. La significancia estadística es

determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Tukey) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, $p^* < 0,05$, $p^{****} < 0,0001$; $n = 3$).

Estos resultados sugieren que el antagonismo entre las señales serotoninérgicas y tiraminérgicas se pone de manifiesto en el momento del encuentro con la fuente de alimentos. Como consecuencia de estos resultados, nos surgieron otros interrogantes, a nuestro entender fundamentales, como: i) ¿Cuáles son las bases moleculares de este antagonismo? y ii) ¿Cuál es el rol fisiológico de esta interacción? Dado al alto grado de conservación en varios componentes moleculares de estas vías en el reino animal, es posible que los resultados obtenidos resulten significativos para entender esta interrelación en otros organismos.

Actividad del sistema tiraminérgico durante el ayuno y realimentación

Como ya reafirmamos, la actividad neuronal de ADF y NSM (neuronas serotoninérgicas) se incrementa cuando el animal retorna a la comida y en consecuencia disminuye bruscamente la velocidad y aumenta el bombeo faríngeo (Iwanir *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2017). Por otro lado, hemos demostrado que los gusanos deficientes de la síntesis de TA, aun saciados, presentan una SDR mayor que los gusanos salvajes en la misma condición. A diferencia de la dinámica de activación comida-dependiente de las neuronas serotoninérgicas, poco se sabe sobre la actividad de la vía tiraminérgica en respuesta a la presencia de alimento. Para comprender mejor cómo se lleva a cabo la interacción entre las señales serotoninérgicas y tiraminérgicas, y si esa interacción es fisiológicamente relevante en los comportamientos asociados a comida, nos propusimos estudiar la dinámica de activación de la neurona tiraminérgica RIM.

Mediante la técnica de microscopía, que detallamos anteriormente, medimos la actividad neuronal de RIM en gusanos en ausencia de comida y en la realimentación. Para ello, utilizamos un animal transgénico con la sonda genética GCaMP6 bajo el promotor de *cex-1*, análogo de la calexitina en mamíferos (Nelson *et al.*, 1996), el cual se expresa únicamente en la neurona tiraminérgica RIM (QW1602 *lin-15 (n765ts)*; zfEx758 [*pcex-1::NLSmCherry::GCaMP6*]) (Cohen *et al.*, 2009). Colocamos aproximadamente 15 gusanos adultos en la cámara microfluídica de PDMS. Perfundimos buffer en animales bien alimentados y buffer con bacteria en animales hambreados, con el objetivo de medir los cambios en la fluorescencia de la neurona tiraminérgica RIM durante la ausencia de

alimento y en la realimentación, respectivamente. En cada ensayo, obtuvimos fotografías de los animales que se mueven libremente en la cámara y optamos por cuantificar la fluorescencia de la neurona RIM a diversos puntos de tiempo durante 2 horas. Luego, graficamos el cambio de fluorescencia relativo al valor de fluorescencia inicial en función del tiempo (Fig. 16). Nuestros resultados muestran que la neurona tiraminérgica RIM disminuye su actividad luego de 20 minutos en que el animal permanece en ausencia de comida (Fig. 16A). A su vez, observamos que, si bien la neurona se activa en la realimentación, lo hace una vez que el animal ha permanecido en presencia del alimento por más de 10 minutos (Fig. 16B). A diferencia de la activación instantánea y corta de las neuronas serotoninérgicas por la reexposición al alimento (Fig. 13C y 13D) nuestros datos demuestran que la actividad de la neurona tiraminérgica RIM se activa de manera paulatina en la realimentación y luego permanece constante en el tiempo.

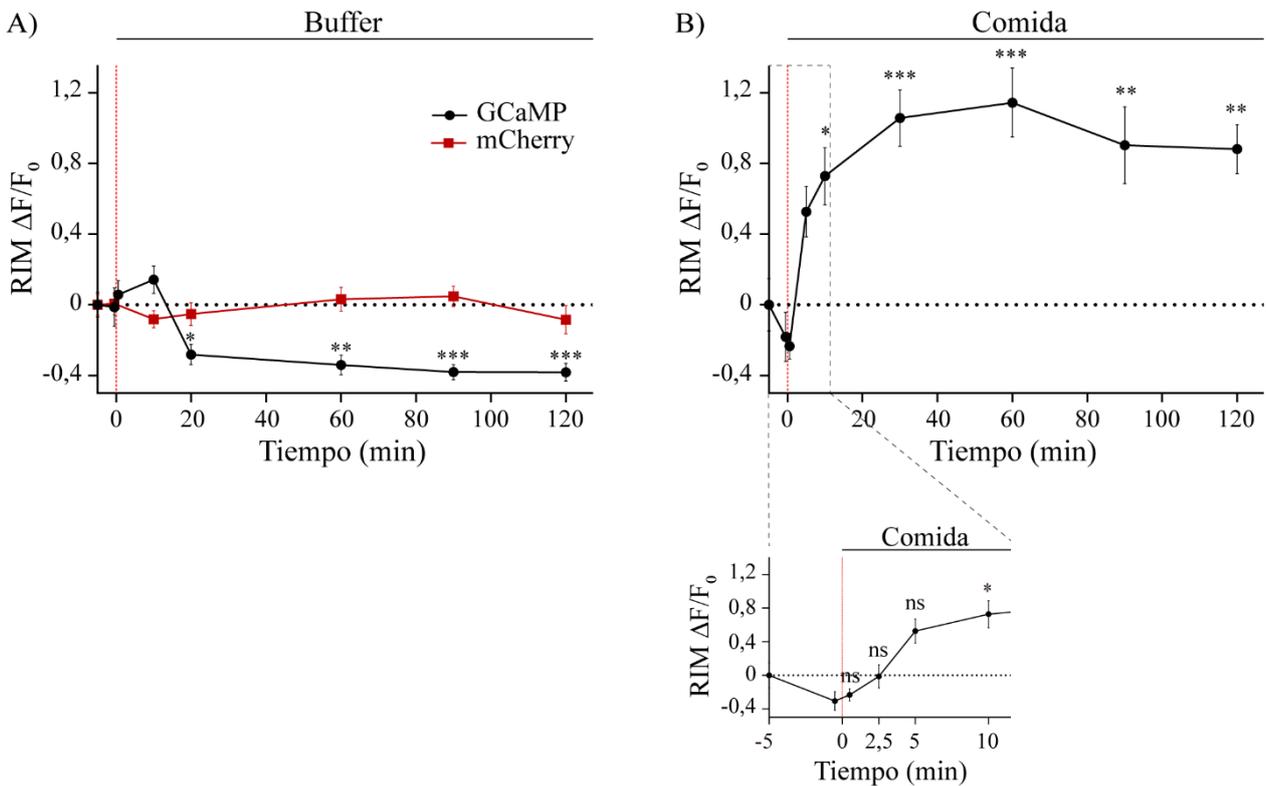


Fig 16. Actividad de la neurona tiraminérgica RIM en ausencia de comida y en la realimentación. A) Cambio de fluorescencia de RIM en gusanos QW1602 (expresan la sonda genética de calcio GCaMP6 únicamente en RIM) en ausencia de comida. Animales bien alimentados fueron privados de comida por 2 horas dentro de la cámara microfluídica (perfusión de buffer S-basal) y se cuantificó el cambio de fluorescencia de RIM. Al cabo de 20 minutos en ausencia de comida la fluorescencia de RIM disminuye significativamente. La fluorescencia de mCherry utilizada como control permanece sin cambios significativos durante todo el ensayo. B) Cambio de fluorescencia de RIM en gusanos QW1602 en la realimentación. A animales privados de comida por 2 horas en medio sólido NGM, se les perfundió S-basal

con bacteria *E. coli* OP50 dentro de la cámara microfluídica y se cuantificó la fluorescencia de RIM. Al cabo de 10 minutos de exposición a la comida la fluorescencia aumenta significativamente con respecto al nivel inicial. En la imagen de abajo (*inset* del gráfico de fluorescencia en la realimentación de -5 a 10 minutos) puede observarse que la fluorescencia de RIM aumenta paulatinamente en animales hambreados expuestos a comida. A) y B) Los datos se presentan como la media del cambio de fluorescencia relativo al valor de fluorescencia inicial $((F_t - F_0) / F_0)$, siendo F_t la fluorescencia en cada tiempo y F_0 la fluorescencia en el tiempo inicial, $t = -5$ minutos) \pm ES. La significancia estadística comparada con el tiempo inicial es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Dunn) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$; $n = 45$)

Teniendo en cuenta los siguientes resultados hasta el momento:

- i. la disminución de la locomoción dependiente de 5-HT está específicamente exacerbada en la realimentación,
- ii. la mutante nula en la síntesis de TA es hipersensible a esta disminución de la locomoción, lo cual sugiere que la TA se opone a los efectos ejercidos por 5-HT,
- iii. durante la ausencia de alimento disminuye la actividad de la neurona tiraminérgica RIM,

nuestra hipótesis es que **la exacerbación de la señal serotoninérgica en la realimentación, con la consecuente disminución drástica de la locomoción, se debe, al menos en parte, a la inhibición de la señal tiraminérgica durante el ayuno.** Esto podría asegurar la maximización en el aprovechamiento de la nueva fuente de nutrientes hallada, compensando así la falta de ingesta previa.

Considerando que la actividad tiraminérgica disminuye en el ayuno, decidimos estudiar el efecto en la SDR del agregado farmacológico de TA en animales durante la ausencia de alimento. Esperábamos que, si la inhibición de la señal tiraminérgica fuese necesaria para que el animal hambreado disminuya drásticamente la locomoción en el reencuentro con la comida, la TA exógena en el ayuno lograría disminuir la magnitud de la SDR. Con el objetivo de poner a prueba esta hipótesis, haremos animales salvajes en NGM sólido con y sin TA exógena (20 mM) durante 2 horas y luego grabamos la locomoción en la SDR, como hemos descrito anteriormente. A su vez, también, incubamos a los animales en presencia de alimento con y sin TA (20 mM) antes del ensayo, como control negativo. Posteriormente, graficamos la velocidad en función del tiempo de cada condición. Observamos que el agregado de TA exógena en animales saciados no genera cambios en la SDR con respecto al control sin TA (Fig. 17A, 17B y 17C). Contrariamente, los animales hambreados con TA exógena exhiben una SDR

de los animales saciados y hambreados (de A) al inicio del ensayo ($t = -47$ a -44 segundos) e inmediatamente luego del encuentro con el borde de la bacteria ($t = 1$ a 4 segundos). Los datos se presentan como la media de la velocidad promedio en el rango de 3 segundos indicado en cada tiempo \pm ES. Significancia estadística comparada con la velocidad media de los animales incubados en ausencia de TA en cada condición (saciados y hambreados) y en cada intervalo de tiempo. Análisis estadístico realizado por la prueba *t-student* (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, $p^{**} < 0,01$; $n = 3$). C) Porcentaje de velocidad inicial de cada animal inmediatamente luego del encuentro con la comida (calculado como velocidad promedio en $t = 1$ a 4 segundos / velocidad promedio en $t = -47$ a -44 segundos $\times 100$). Los animales incubados en presencia de comida con TA exógena (20 mM) no presentan diferencias en el % de velocidad inicial inmediatamente luego del encuentro con la bacteria con respecto a los animales incubados sin TA. Mientras que, los animales incubados en ausencia de comida con TA exógena (20 mM) exhiben un % de velocidad inicial significativamente mayor a los animales incubados sin TA. Los datos están presentados como la media del porcentaje de velocidad inicial inmediatamente después del encuentro con la bacteria \pm ES y cada punto representa un individuo. La significancia estadística comparada con el control sin TA de cada condición es determinada por la prueba *t-student* (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, $p^{**} < 0,01$; $n = 3$).

Circuitos involucrados en el antagonismo entre la señal serotoninérgica y tiraminérgica

Nuestros resultados nos han permitido demostrar que la actividad tiraminérgica disminuye en ausencia de alimento y que el agregado exógeno de TA en ayuno revierte parcialmente la SDR. Esto sugiere que la acción de la TA reduce los efectos dependientes de 5-HT. A continuación, nos focalizamos en caracterizar los mecanismos moleculares responsables de esta intermodulación. Encontramos dos posibles escenarios que no son mutuamente excluyentes: i) la TA modula la liberación de 5-HT desde NSM y AFD, ii) la TA produce efectos opuestos a la 5-HT liberada actuando río abajo de las neuronas serotoninérgicas.

Para evaluar la posible modulación tiraminérgica en la liberación neuronal de 5-HT, utilizamos ensayos de imágenes de calcio *in vivo*. Asimismo, estudiamos la probable existencia de un antagonismo fisiológico de vías serotoninérgicas y tiraminérgicas paralelas, mediante el empleo de mutantes deficientes de los receptores de TA.

Modulación tiraminérgica de la liberación neuronal de 5-HT

Dado que la inhibición de la señal tiraminérgica durante el ayuno exagera la SDR dependiente de 5-HT, decidimos evaluar si la TA es capaz de modular la actividad de las neuronas serotoninérgicas. Para cumplir con dicho objetivo, medimos la actividad neuronal de NSM y ADF en el retorno al alimento en animales mutantes deficientes de la síntesis de TA. Para esto, primero realizamos cruza genéticas entre los gusanos transgénicos que expresan la sonda genética GCaMP7 bajo el promotor de la enzima TPH-1, la cual se expresa únicamente en las neuronas serotoninérgicas (fluEx59 [*ptph-1::GCaMP7F*; *myo-3::mCherry*]), y los animales mutantes nulos *tdc-1* (no sintetizan TA ni OA) y *tbh-1* (no sintetizan OA, pero sí TA) como control. Luego colocamos aproximadamente 15 gusanos en la cámara microfluídica de PDMS, y perfundimos buffer con bacteria *E. coli* OP50 como fuente de comida. Al igual que en los demás ensayos de imágenes de calcio *in vivo*, tomamos fotos de los animales moviéndose libremente dentro de la cámara y optamos por cuantificar la fluorescencia de las neuronas serotoninérgicas en diversos tiempos durante 1 hora. Observamos que en los mutantes nulos *tdc-1*, incapaces de sintetizar TA y OA, el aumento de fluorescencia en la neurona NSM, al perfundir la comida dentro de la cámara, es significativamente mayor que en la cepa salvaje y la mutante *tbh-1*, deficiente únicamente de OA (Fig. 18). Esto demuestra que la TA, pero no la OA, inhibe la activación de la neurona serotoninérgica NSM. Por otro lado, la neurona ADF presenta mayor cambio de fluorescencia en mutantes *tdc-1* que en gusanos salvajes al perfundir la comida; mientras que *tbh-1* exhibe un valor intermedio inmediatamente después de la perfusión del alimento y luego declina a los mismos valores que la cepa salvaje (Fig. 18). Este resultado sugiere que tanto la TA como la OA podrían inhibir la actividad de la neurona serotoninérgica ADF. Sin embargo, aparentemente la TA podría tener una mayor participación en esta inhibición, dado que el mutante *tbh-1* presenta un mayor cambio de fluorescencia al principio y luego disminuye al valor de la fluorescencia de la cepa salvaje.

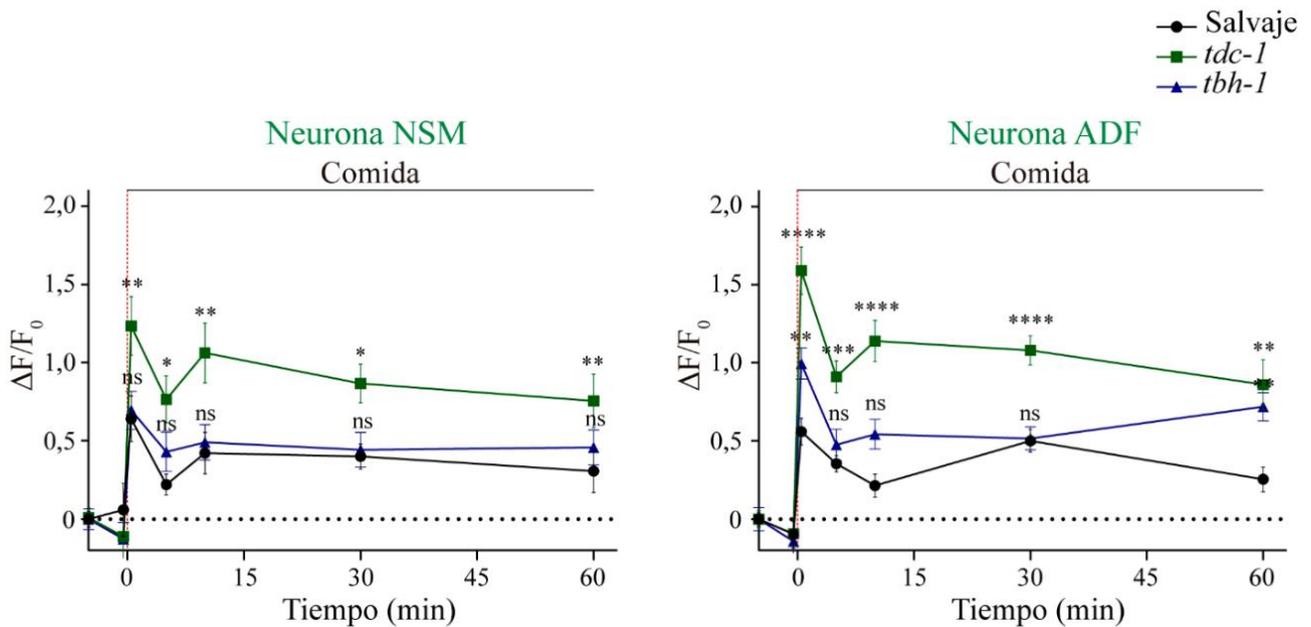


Fig 18. Actividad de las neuronas serotoninérgicas en animales salvajes y deficientes de la síntesis de TA/OA en la realimentación. Luego de dos horas en ausencia de alimento, se midió el cambio de fluorescencia de las neuronas serotoninérgicas, NSM y ADF, en animales salvajes, mutantes *tdc-1* y *tbh-1*, al perfundir S-basal con comida dentro de la cámara. Los datos se presentan como la media del cambio de fluorescencia relativo al valor de fluorescencia inicial ($(F_t - F_0) / F_0$, siendo F_t la fluorescencia en cada tiempo y F_0 la fluorescencia en el tiempo inicial, $t = -5$ minutos) \pm ES. La significancia estadística comparada con la fluorescencia del animal salvaje en cada tiempo es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Dunn) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$, $p^{****} < 0,0001$; $n = 4$, cada experimento se llevó a cabo con ~ 15 animales).

Si bien no existen conexiones sinápticas entre las neuronas serotoninérgicas y tiraminérgicas (*C. elegans* Neural Network, Nikhil Bhatla, última actualización octubre 2016), hay reportes de que dos de los cuatro receptores tiraminérgicos, SER-2 (Rex *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012) y TYRA-2 (Rex *et al.*, 2005) se expresan en la neurona serotoninérgica NSM. Esto sugiere que la TA podría actuar de manera neuro-humoral para inhibir la actividad de NSM. Por otro lado, hasta el momento no se conoce si algún receptor tiraminérgico se expresa en la neurona serotoninérgica ADF. A pesar de esto, no se puede descartar que la TA podría actuar a través de un mecanismo indirecto o de un receptor tiraminérgico aún no detectado en ADF para modular su actividad.

El hecho de que la TA sea capaz de disminuir la actividad de las neuronas serotoninérgicas NSM y ADF, apoya nuestra hipótesis de que la importancia fisiológica de este antagonismo es que la supresión de la señal tiraminérgica durante el ayuno desinhibe las neuronas serotoninérgicas. De esta manera, el animal estará “preparado”

para liberar 5-HT frente al estímulo de comida, lo cual le permitirá adoptar las conductas apropiadas para aprovechar al máximo la nueva fuente de nutrientes luego de un período de escasez de alimentos.

Antagonismo fisiológico de los efectos ejercidos por 5-HT y TA

Pudimos determinar que al menos uno de los circuitos implicados en el antagonismo entre la señal serotoninérgica y tiraminérgica se debe a la inhibición de la actividad de las neuronas ADF y NSM por parte de la TA. Existe la posibilidad, también, que la TA actúe río abajo modulando la locomoción de *C. elegans*, mediante alguna vía paralela cuya acción se oponga a los efectos ejercidos por la 5-HT. Como explicamos en la introducción de este capítulo, se conoce que la OA es capaz de aumentar la locomoción (efecto opuesto a 5-HT) a través de dos de sus receptores, SER-3 y SER-6, los cuales están acoplados a la proteína $G\alpha_{s/q}$ (Churgin *et al.*, 2017). Sin embargo, los efectos generados por la TA en la locomoción aún no son del todo claros. Por esta razón, decidimos investigar si la TA es capaz de modular la locomoción a través de una vía paralela a la vía serotoninérgica, y en caso de ser así, identificar los posibles receptores tiraminérgicos implicados en esa vía.

Optamos por realizar un ensayo, adaptado de un trabajo de Gürel y colaboradores (2012), que nos permite cuantificar el fenotipo de sensibilidad a la 5-HT exógena en medio líquido. Cuando se coloca a *C. elegans* en medio líquido, nada flexionando su cuerpo continuamente. La adición de 5-HT exógena reduce estos movimientos de una manera dependiente de la dosis consiguiendo la parálisis total a altas concentraciones (Gürel *et al.*, 2012). Esto se debe a la capacidad que tiene la serotonina de actuar a través de sus receptores SER-4 y MOD-1 para disminuir la locomoción (Gürel *et al.*, 2012; Iwanir *et al.*, 2016). Lo primero que hicimos fue examinar la sensibilidad a la parálisis generada por 5-HT exógena del mutante nulo *tdc-1* en comparación a los animales salvajes y al mutante nulo *tbh-1* como cepa control de presencia de TA y ausencia de OA. Para ello, transferimos 12 gusanos a pocillos (de una placa de 96 pocillos) conteniendo 100 μ l de medio líquido M9 (ver Materiales y Métodos, Anexo 3) con 5-HT (10 mM) y cuantificamos el número de animales paralizados cada 3 minutos durante 30 minutos. Consideramos paralizados a aquellos animales que no exhibían el movimiento de nado en el cuerpo entero. Luego, graficamos las curvas del porcentaje del número de animales paralizados en el tiempo y calculamos las diferencias de las áreas bajo la curva (ABC) de

cada cepa (Fig. 19). Observamos que el mutante nulo *tdc-1* es más sensible a la parálisis generada por 5-HT que gusanos salvajes (Fig. 19). Como era de esperar, los mutantes *tbh-1* también son más sensibles a la 5-HT que la cepa salvaje (Fig. 19), debido a que, como ya describimos anteriormente, la OA aumenta la locomoción a través de sus receptores SER-3 y SER-6 expresados en la inter-motoneurona colinérgica SIA (vía paralela a la vía serotoninérgica) (Churgin *et al.*, 2017). Sin embargo, la parálisis de los animales *tdc-1* es mayor que la de *tbh-1* (Fig. 19), lo cual sugiere que no solamente OA actúa aumentando la locomoción, sino que la TA también lo hace.

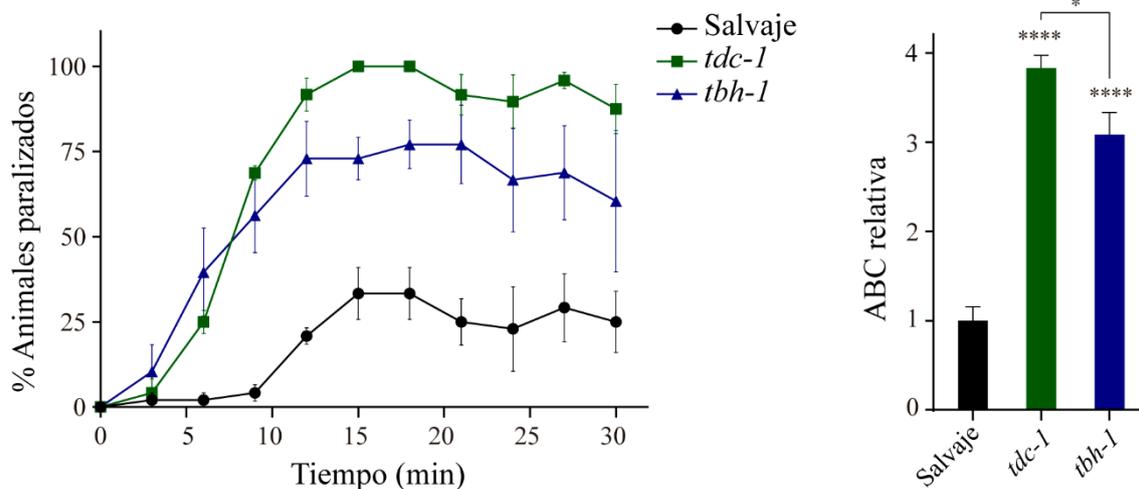


Fig. 19. Sensibilidad a la parálisis dependiente de 5-HT en medio líquido de mutantes deficientes de TA/OA. Izquierda: porcentaje de animales salvajes (control), *tdc-1* y *tbh-1* paralizados en función del tiempo en presencia de una solución de 5-HT (10 mM) en medio líquido M9. Los datos están presentados como la media del porcentaje de animales paralizados cada 3 minutos durante 30 minutos \pm ES. Derecha: área bajo la curva (ABC) relativa de cada curva del panel de la izquierda. Los mutantes *tdc-1* y *tbh-1* son significativamente más sensibles a la parálisis mediada por 5-HT que los animales salvajes y, a su vez, *tdc-1* es aún más sensible que *tbh-1*. Los datos están presentados como la media del ABC relativa al control \pm ES. La significancia estadística es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Tukey) ($p^* < 0,05$, $p^{****} < 0,0001$; $n = 3$, cada experimento se llevó a cabo con 12 animales)

Una vez que determinamos que los animales deficientes de TA son hipersensibles a la 5-HT exógena, nos propusimos identificar los receptores tiraminérgicos responsables del efecto antagónico a la 5-HT. Con este objetivo, realizamos el ensayo de sensibilidad a la 5-HT (10 mM) en medio líquido con mutantes nulos de los cuatro receptores tiraminérgicos conocidos, tres GPCRs, SER-2, TYRA-2 y TYRA-3, y un canal de cloruro, LGC-55 (Rex *et al.*, 2004; Rex *et al.*, 2005; Hapiak *et al.*, 2013; Pirri *et al.*, 2009). Llamativamente, individualmente ninguna de las cepas mutantes nulas de los cuatro

receptores de TA exhibió hipersensibilidad a la parálisis dependiente de 5-HT (Fig. 20). No obstante, esto no significa que ninguno de los receptores esté implicado en este antagonismo, debido a la posibilidad de que exista redundancia funcional entre distintos receptores tiraminérgicos. A su vez, puede que la ausencia de un receptor no produzca cambios suficientemente significativos para ser notados, y que se necesiten silenciar más de un receptor para recapitular el fenotipo de hipersensibilidad de *tdc-1*. Gracias a la fácil manipulación genética de *C. elegans*, evaluamos la sensibilidad a la 5-HT (10 mM) de doble, triple e incluso de la cuádruple cruza de los mutantes nulos de receptores tiraminérgicos. Comenzamos analizando las dobles mutantes de *tyra-3* con los otros tres receptores: *tyra-3; tyra-2*, *tyra-3; lgc-55* y *tyra-3; ser-2*, debido a que existen evidencias que el receptor TYRA-3 podría estar implicado en conductas de forrajeo (Bendesky *et al.*, 2011). Observamos que la cruza *tyra-3; tyra-2*, pero no *tyra-3; lgc-55* y *tyra-3; ser-2*; es hipersensible a la parálisis ocasionada por 5-HT (Fig. 21). Esto sugiere que la activación de TYRA-2 y TYRA-3 se oponen a los efectos de la 5-HT. Sin embargo, la cuádruple mutante nula de los receptores tiraminérgicos tiene una sensibilidad a 5-HT similar a los gusanos salvajes (Fig. 21), de manera que alguno de los otros dos receptores, LGC-55 o SER-2, podría ejercer efectos antagónicos a aquellos ejercidos por TYRA-3 y TYRA-2. El antagonismo entre receptores que responden al mismo ligando es algo habitual, como sucede, por ejemplo, con los receptores dopaminérgicos DOP-1 y DOP-3, receptores similares a D1 y D2 en mamíferos, que se antagonizan para controlar la locomoción de *C. elegans* (Chase, Pepper y Koelle, 2004). De esta manera, evaluamos la sensibilidad a la 5-HT de las triples cruzas *tyra-3; tyra-2; lgc-55* y *tyra-3; tyra-2; ser-2*. Observamos que la sensibilidad de la mutante *tyra-3; tyra-2; lgc-55* es similar a la doble cruza *tyra-3; tyra-2* (Fig. 17), demostrando que el receptor LGC-55 no tiene ninguna implicancia en los efectos opuestos a 5-HT. Sin embargo, la triple cruza *tyra-3; tyra-2; ser-2* rescata la hipersensibilidad a 5-HT de la mutante *tyra-3; tyra-2* (Fig. 21), sugiriendo que SER-2 ejerce efectos antagónicos a TYRA-3 y TYRA-2.

Todos estos resultados demuestran que la TA ejerce efectos antagónicos a 5-HT no solamente mediante la inhibición de la activación de las neuronas serotoninérgicas, ADF y NSM, sino también activando receptores tiraminérgicos (TYRA-2 y TYRA-3) río abajo. Además, demostramos que al igual a como sucede en otros sistemas (Chase, Pepper y Koelle, 2004), distintos receptores que responden a tiramina pueden generar efectos antagónicos entre sí. Consideramos necesario, ahora, poder identificar las células en las cuales estos receptores de TA inducen su acción sobre la locomoción.

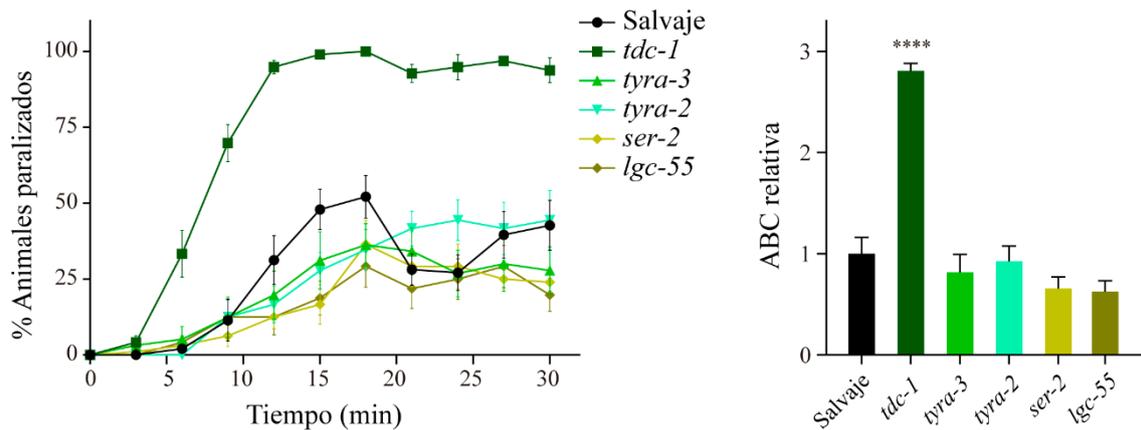


Fig 20. Sensibilidad a la parálisis dependiente de 5-HT en medio líquido de mutantes simples deficientes de receptores tiraminérgicos. Izquierda: porcentaje de animales salvajes (control), *tdc-1* y mutantes deficientes de los receptores de TA paralizados en función del tiempo en presencia de una solución de 5-HT (10 mM) en medio líquido M9. Los datos están presentados como la media del porcentaje de animales paralizados cada 3 minutos durante 30 minutos \pm ES. Derecha: área bajo la curva (ABC) relativa de cada curva del panel de la izquierda. Ninguno de los mutantes deficientes de los receptores de TA es hipersensible a la parálisis mediada por 5-HT. Los datos están presentados como la media del ABC relativa al control \pm ES. La significancia estadística comparada con los animales salvajes es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Dunnett) ($p^{****} < 0,0001$; $n = 8$, cada experimento se llevó a cabo con 12 animales)

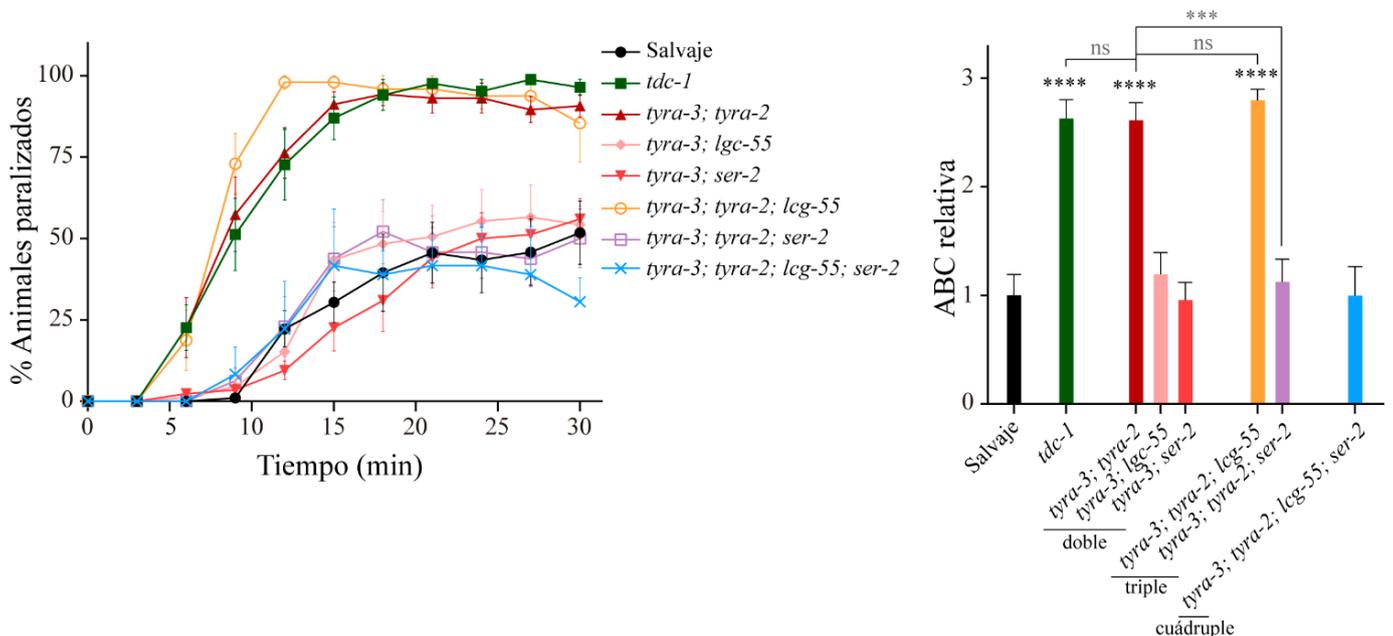


Fig 21. Sensibilidad a la parálisis dependiente de 5-HT en medio líquido de mutantes nulos dobles, triples y cuádruple de receptores tiraminérgicos. Izquierda: porcentaje de animales salvajes (control), *tdc-1* y cruza doble, triple y cuádruple de mutantes deficientes de los receptores de TA paralizados en función del tiempo en presencia de una solución de 5-HT (10 mM) en medio líquido M9. Los datos están presentados como la media del porcentaje de animales paralizados cada 3 minutos durante 30 minutos \pm

ES. Derecha: área bajo la curva (ABC) relativa de cada curva del panel de la izquierda. El mutante doble *tyra-3; tyra-2* es hipersensible a la parálisis dependiente de 5-HT. Los datos están presentados como la media del ABC relativa al control \pm ES. La significancia estadística es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Tukey) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, $p^{***} < 0,001$, $p^{****} < 0,0001$; $n = 7$, cada experimento se llevó a cabo con 12 animales)

En conclusión, mediante este trabajo pudimos demostrar que la 5-HT y la TA ejercen un efecto antagónico durante la SDR. Nuestros resultados sugieren que la actividad de la neurona tiraminérgica RIM disminuye durante el ayuno y que esa disminución es necesaria para la desinhibición de la actividad serotoninérgica, favoreciendo la liberación de 5-HT en el encuentro con una nueva fuente de alimentos. Al exacerbarse la señal serotoninérgica en la vuelta al alimento, el animal adopta conductas, como la abrupta disminución de la locomoción, que le permiten aprovechar al máximo la nueva fuente de nutrientes luego de un período de hambre. Además, identificamos que los receptores tiraminérgicos TYRA-2 y TYRA-3 ejercen efectos antagónicos a 5-HT mediante una vía paralela a la vía serotoninérgica y que aparentemente, el receptor tiraminérgico SER-2 se opone a las acciones ejercidas por TYRA-2 y TYRA-3.

Discusión

Los animales ajustan sus conductas de acuerdo a las condiciones ambientales que los rodean y las señales del medio interno. El sistema nervioso controla comportamientos complejos en respuesta a las necesidades básicas del animal, como es la alimentación. Es muy común en todo el reino animal que los individuos modulen comportamientos tácticos, tales como la locomoción, cuando existe una restricción de alimento. Algunos animales, como los hámsteres o ratas, aumentan el nivel de actividad o migran con el objetivo de incrementar la oportunidad de encontrar una nueva fuente de alimento, mientras que otros animales, como las ardillas, mantienen baja la actividad para conservar las reservas energéticas (Gutman *et al.*, 2007; Zhao y Cao, 2009). Una vez que animales hambreados por un largo período encuentran comida, cambian la conducta de búsqueda por una que le permite explotar al máximo la nueva fuente de alimentos (Zhao y Cao, 2009). En animales invertebrados, como *Caenorhabditis elegans*, la coordinación de la locomoción en respuesta a alteraciones en el ambiente, tales como cambios en la disponibilidad de comida, depende de neuronas bien conocidas (Flavell *et al.*, 2013; Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000; Oranth *et al.*, 2018; Churgin *et al.*, 2017; Iwanir *et al.*, 2016). Cuando *C. elegans* retorna a la comida luego de un período de ayuno prolongado, reduce drásticamente la velocidad y permanece en una pequeña área de bacteria favoreciendo la ingesta de alimentos. Ha sido bien establecido que este comportamiento es dependiente de la liberación neuronal de 5-HT (Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000; Iwanir *et al.*, 2016). Es interesante, que la 5-HT también ha sido implicada en comportamientos que favorecen la ingesta en la sanguijuela *H. medicinalis* y el molusco *A. californica* (Groome, Clark y Lent, 1993; Rosen *et al.*, 1989). Con respecto a mamíferos, los niveles hipotalámicos de 5-HT en ratones aumentan frente al estímulo de alimento (Schwartz *et al.*, 1989; Schwartz, Hernandez y Hoebel, 1990) y a su vez, se ha demostrado que la activación optogenética de las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe en ratones suprimen la velocidad de locomoción (Correia *et al.*, 2017). Esto sugiere que las acciones dependientes de la 5-HT en la alimentación y la locomoción podrían estar conservadas en la naturaleza.

Por otro lado, existen trabajos que no sólo relacionan a la 5-HT en la modulación de la alimentación, sino también a las catecolaminas (CA) (Hainer *et al.*, 2006; Mandic y Volkoff, 2018; Nelson y Gehlert, 2006). Hace ya más de 4 décadas que las CA han sido implicadas en el control del apetito. Lesiones en el sistema noradrenérgico central de ratas aumentan significativamente su peso. Estas lesiones atenúan los efectos anorexígenos y locomotores de las anfetaminas, sugiriendo que la noradrenalina está involucrada en la

disminución de la ingesta y en la actividad motora (Carey, 1976). Además, estos investigadores demostraron que la lesión del sistema serotoninérgico exacerba el aumento de la actividad locomotora producida por las anfetaminas. Estos resultados sugieren que existe una intermodulación entre los sistemas catecolaminérgicos y serotoninérgicos. La interacción recíproca entre estas vías también ha sido relacionada con desordenes de ansiedad y depresión, proponiendo que la administración de fármacos inhibidores de la recaptación de 5-HT en trastornos depresivos, podrían afectar el sistema noradrenérgico (Blier, 2001). Con respecto a *C. elegans*, existe una abundante cantidad de reportes sobre las conductas reguladas por el sistema catecolaminérgico (TA y OA), especialmente por aquellas controladas por la OA, las cuales resultan ser opuestas a las acciones moduladas por 5-HT (Churgin *et al.*, 2017; Horvitz *et al.*, 1982; Liu *et al.*, 2019; Niacaris y Avery, 2003; Segalat, Elkes y Kaplan, 1995; Alkema *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2018; Rex *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012; Collins *et al.*, 2016). Sin embargo, los mecanismos y significancia de la interacción serotoninérgica/tiraminérgica aún no son del todo claros.

En este trabajo, analizamos los circuitos y moléculas de señalización que controlan la locomoción en respuesta a la disponibilidad de alimento. Los comportamientos que estudiamos, fundamentales en la realimentación luego de un período de ayuno, son más agudos que otros estados de comportamiento de larga duración en los cuales los animales modifican su locomoción de estadios de quiescencia a exploratorios. Estudiamos cómo el sistema nervioso modula el comportamiento en respuesta a las señales externas de comida y cómo interaccionan las vías serotoninérgicas y tiraminérgicas a nivel celular y molecular para modular dicha conducta. La SDR (*Slowing Down Response*: disminución de la locomoción en el encuentro con la comida) dependiente de 5-HT es más pronunciada en animales hambreados que en animales bien alimentados. Por esta razón, nos interesamos en indagar los mecanismos responsables de la intensificación de la señal serotoninérgica en la realimentación de animales privados de alimento. Así es que, establecimos que las vías serotoninérgica y tiraminérgica se oponen para modular la locomoción y que esa oposición es esencial durante el encuentro con la comida. Considerando que los comportamientos relacionados con la alimentación y que las moléculas involucradas en su modulación a nivel del sistema nervioso están conservadas en la naturaleza, los resultados obtenidos en esta tesis podrían proporcionar información valiosa para comprender las conductas motivadas por señales de comida en animales más complejos.

La disminución de la locomoción en el encuentro con la comida depende del tiempo de ayuno

Hace ya 20 años que se ha determinado que la disminución de la velocidad de locomoción en el encuentro con el alimento, después de un período de ayuno, depende de 5-HT (Sawin, Ranganathan y Horvitz, 2000). A diferencia de lo que había sido previamente reportado, lo cual establecía que la SDR no varía si el animal se hambrea por 5 o 120 minutos (Iwanir *et al.*, 2016), determinamos que la magnitud de la SDR dependería del tiempo en que el animal permanece en ausencia de comida. Para que la disminución de la locomoción en la llegada a la bacteria sea significativamente mayor que en los animales saciados, el animal debe estar privado de comida por al menos 20 minutos. Esto sugiere que la actividad de la vía serotoninérgica se incrementa para exacerbar la SDR y frenar abruptamente la velocidad de locomoción luego de un período de ayuno superior a 20 minutos. Es probable que, durante ese tiempo de ayuno, señales nutricionales internas modulen la transmisión sináptica exacerbando la señal serotoninérgica en la realimentación. Existe la posibilidad que el ácido quinurénico, derivado del metabolismo del triptófano (un aminoácido esencial) y el cual está relacionado con el estado nutricional, esté implicado en este circuito (Lemieux *et al.*, 2015). En *C. elegans*, el ácido quinurénico disminuye en el ayuno prolongado llevando a la activación de neuronas que expresan el receptor ionotrópico de glutamato NMDA (el ácido quinurénico es un antagonista de receptores NMDA (Perkins y Stone, 1982)). La activación de estas neuronas aumenta la señalización del neuropéptido FLP-18 que estimula a ADF para la exacerbada secreción de 5-HT en cuanto censa la presencia de comida (Lemieux *et al.*, 2015). Ha sido postulado que FLP-18 podría tener una actividad similar al neuropéptido Y (Cohen *et al.*, 2009). Es probable que un corto tiempo de ayuno no sea suficiente para poner en marcha la vía de FLP-18.

Observamos, además, que los mutantes *tph-1* (deficientes de la síntesis de 5-HT) bien alimentados exhiben una SDR defectuosa (Fig. 11C). Estos resultados advierten que la vía serotoninérgica también podría estar involucrada en la ligera disminución de la actividad motora cuando animales saciados hallan el borde de la bacteria. Si bien la dopamina es una molécula crucial para disminuir la locomoción en respuesta al contacto mecánico con el césped de bacteria independientemente de la experiencia previa del animal (Chase, Pepper y Koelle, 2004; Oranth *et al.*, 2018), existen reportes que demuestran que la 5-HT también es capaz de disminuir la locomoción en animales que

han permanecido siempre en presencia de bacteria (Flavell *et al.*, 2013; Churgin *et al.*, 2017). Estos autores demuestran que, en animales dentro de la comida, la 5-HT está implicada en la transición de una conducta exploratoria a un estadio de quiescencia, en el cual se reduce la velocidad. Esto podría explicar cómo es que animales deficientes de 5-HT exhiben una menor disminución de la locomoción en el encuentro con la comida a pesar de estar bien alimentados. No obstante, está claro que la magnitud de la SDR depende del nivel de saciedad del animal, siendo mayor en animales hambreados.

En conclusión, nuestros primeros resultados nos permitieron caracterizar cómo el estado de saciedad modula el comportamiento durante el encuentro con el alimento. Que los animales hambreados presenten una SDR más abrupta que los animales saciados y que esta conducta dependa principalmente de 5-HT (Iwanir *et al.*, 2016), sugiere que la actividad de la vía serotoninérgica es más intensa luego del ayuno. Resultados similares han sido obtenidos recientemente, los cuales demuestran que la respuesta de la neurona serotoninérgica NSM, estimulada por metabolitos bacterianos, está incrementada en animales hambreados con respecto a saciados (Rhoades *et al.*, 2019). Esta actividad serotoninérgica exacerbada podría asegurar que el animal adopte conductas necesarias para maximizar la ingesta en la nueva fuente de nutrientes encontrada luego de un período de escasez de alimento.

La acción de la TA se opone a los efectos dependientes de 5-HT en la realimentación

Teniendo en cuenta que la señal serotoninérgica se exagera en el hallazgo de la comida en animales hambreados y que varios reportes sugieren la existencia de un antagonismo entre TA y 5-HT en diversas conductas (Fu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2012; Rex *et al.*, 2004; Wragg *et al.*, 2007) consideramos la posibilidad de que la TA podrían estar involucrada en este comportamiento. Determinamos que la TA se opone a los efectos ejercidos por la 5-HT en la disminución de la locomoción en el encuentro con la comida. Los mutantes *tdc-1*, deficientes de la síntesis de TA y OA, son más sensibles que los gusanos salvajes a la abrupta reducción de la actividad motora cuando el animal alcanza el borde de la bacteria (Fig. 14). Si bien esperábamos que el mutante *tbh-1* (deficiente de OA pero no de TA), podría presentar una SDR más abrupta que el animal salvaje, debido a que ha sido establecido que la OA aumenta la locomoción en *C. elegans* (Churgin *et al.*, 2017) y en *D. melanogaster* (Yang *et al.*, 2015), creíamos que esa velocidad tendría un

valor intermedio entre *tdc-1* y los animales salvajes. No obstante, *tbh-1* presentó una velocidad aún más lenta que el mutante nulo *tdc-1*, que es deficiente de ambas aminas, TA y OA (Fig. 14). Es importante destacar que el fenotipo de *tbh-1* comprende no solamente la deficiencia de OA sino también el aumento de los niveles de su precursor TA (Alkema *et al.*, 2005). Mediante la técnica de cromatografía en capa fina, se determinó que *tbh-1* contiene aproximadamente 20 veces más TA que los animales salvajes, por no ser capaz de convertir la TA en OA (Alkema *et al.*, 2005). Esto mismo ha sido observado en mutantes nulos *Tβh* de moscas *D. melanogaster* incapaces de sintetizar OA a partir de TA (Brembs *et al.*, 2007). La acumulación de TA podría afectar la locomoción de los gusanos independientemente del estado de saciedad del animal. Es por esta razón que es probable que *tbh-1* exhiba una locomoción lenta tanto antes de alcanzar la bacteria (en el inicio del ensayo) como una vez que se encuentra con la misma (Fig. 14). Para abordar adecuadamente este problema, evaluamos el comportamiento de un animal *tdc-1* rescatado genéticamente en la neurona octopaminérgica RIC. Este animal productor de OA, pero no de TA, es hipersensible a la reducción de la locomoción ejercida por 5-HT (Fig. 15). Este experimento nos permite confirmar que la TA se opone a los efectos ejercidos por la 5-HT en el retorno al alimento. Con respecto a estos resultados, a primera vista, podría parecer contradictorio que el exceso de TA en los mutantes *tbh-1* disminuyera la velocidad debido a que, en el rescate genético parcial, la deficiencia de TA reduce la locomoción en el encuentro con la comida. A pesar de esto, ha sido propuesto que en *D. melanogaster*, la TA podría actuar antagonizando a OA dependiendo de su concentración y de sus diferentes sitios de acción. Observaron que la TA inhibe el vuelo en las moscas únicamente a concentraciones anormalmente altas (Brembs *et al.*, 2007). Algo similar podría estar ocurriendo con la modulación de la locomoción en *C. elegans*: posiblemente el exceso anormal de TA y la deficiencia de OA en mutantes nulos *tbh-1* puedan provocar una disminución de la locomoción independientemente de las conductas relacionadas con la alimentación. Además, debemos considerar que identificamos dos receptores tiraminérgicos (TYRA-2 y TYRA-3) capaces de incrementar la locomoción y uno (SER-2) que se opone a ese comportamiento, disminuyendo la locomoción (Fig. 21). Incluso, concentraciones altas de TA (30 mM) son capaces de inducir una parálisis completa del cuerpo del animal en un período de 5 minutos de exposición (Pirri *et al.*, 2009). Es así que, no podemos descartar que la TA presente una dualidad en sus efectos y que estos podrían depender de su concentración.

En resumen, los animales saciados deficientes de TA muestran una acentuada SDR en comparación con gusanos salvajes. Esto sugiere que la ausencia de TA generaría un efecto similar al que se observa en animales hambreados (independientemente de que los gusanos estén saciados). Dado que la SDR depende de 5HT, estos resultados sugieren un antagonismo entre la señal serotoninérgica y tiraminérgica. Esto fijó las bases para ahondar en los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en la intermodulación entre estas señales en el complejo comportamiento de la realimentación.

La actividad tiraminérgica disminuye en el ayuno

Nuestros resultados que muestran que la TA está involucrada en la modulación de la conducta de realimentación enfatizan el rol de esta amina como un neurotransmisor independiente en invertebrados. No obstante, la cantidad de información que existe en bibliografía sobre los efectos de la OA en la actividad física y en las conductas relacionadas con la alimentación es más abundante y comprensible que los de la TA (Roeder, 2020). La síntesis de OA se incrementa durante el ayuno (Tao *et al.*, 2016) estimulando la locomoción para permitir la búsqueda de una nueva fuente de nutrientes (Churgin *et al.*, 2017). Por otro lado, las neuronas serotoninérgicas permanecen inactivas durante el ayuno (Rhoades *et al.*, 2019) y responden de manera abrupta cuando los animales se encuentran con comida (Iwanir *et al.*, 2016).

En nuestro trabajo determinamos que, en ausencia de alimento, la neurona tiraminérgica RIM presenta una dinámica de actividad diferente a la actividad octopaminérgica indicada en bibliografía, sugiriendo que la TA y OA cumplen roles diferentes en la conducta de la alimentación. Observamos que la actividad tiraminérgica disminuye en el período de ayuno y se incrementa en la realimentación de manera paulatina (Fig. 16). Cabe destacar que la actividad serotoninérgica en la realimentación aumenta de manera abrupta. Se sabe que las neuronas serotoninérgicas responden rápidamente a estímulos sensoriales (Rhoades *et al.*, 2019; Bargmann y Horvitz, 1991). Mientras que la actividad tiraminérgica no es aguda: aumenta en la realimentación o disminuye en ayuno de manera paulatina. Es probable que la señal tiraminérgica sea modulada por el estado nutricional del animal (por eso los cambios en su actividad son graduales cuando deja el alimento y llega al mismo).

Si bien hasta el momento ningún otro grupo había medido la actividad de la neurona tiraminérgica RIM en el ayuno, mediante el modelado computacional, un trabajo

propone que la privación de comida aumenta la tolerancia al peligro mediante la inhibición de RIM (Ghosh *et al.*, 2016). De esta manera, el animal se enfrenta a mayores riesgos para obtener alimento. RIM proporciona sinapsis inhibitorias a interneuronas que modulan el avance hacia adelante del animal (*forward command interneurons*) y excitatorias a aquellas que controlan el movimiento hacia atrás (*backward command interneurons*) (Pirri *et al.*, 2009; Kawano *et al.*, 2011). Mediante este circuito dispara la respuesta de escape de *C. elegans* (Pirri *et al.*, 2009). Conociendo esto, Ghosh y colaboradores (2016) proponen que en la ausencia de alimento RIM disminuiría su actividad desinhibiendo las *forward command interneurons* y reduciendo la activación en las *backward command interneurons*. Esto le permite al animal hambreado aumentar la tolerancia al peligro y atravesar una barrera hiperosmótica, que representa una amenaza a la desecación, para alcanzar una fuente de alimento (Ghosh *et al.*, 2016). El hecho de que ellos proponen, mediante un modelo computacional, que el ayuno suprime la actividad tiraminérgica, concuerda con nuestros resultados experimentales de imágenes de calcio en RIM.

Si bien aún no están claros los circuitos que modulan la supresión de RIM durante el ayuno, cabe la posibilidad que la actividad tiraminérgica dependa de señales nutricionales del medio interno. Se ha demostrado que la respuesta al ayuno prolongado, que incluye una inducción controlada de los niveles de autofagia en distintos tejidos de *C. elegans*, puede ser regulada sistémicamente por las interneuronas anfidas AIB y AIY (Kang y Avery, 2009b, 2009a). Kang y Avery propusieron (sin medirlo) que en condiciones de abundancia de comida, aminoácidos esenciales actúan a través de los receptores MGL-1 y MGL-2 (homólogos de receptores metabotrópicos glutamatérgicos (Dillon *et al.*, 2006)) activando a la neurona AIY e inhibiendo a la neurona AIB, respectivamente. Estos autores proponen que, en un ayuno prolongado, los bajos niveles de estos aminoácidos inhiben a la neurona AIY y activan a AIB, desencadenando de esta forma la respuesta del organismo a esta condición desfavorable. En estas condiciones se produce una inducción controlada de los procesos autofágicos permitiéndole al animal resistir al ayuno (Kang y Avery, 2009a, 2009b). Por lejos, la neurona postsináptica más importante de AIB (de acuerdo a la cantidad de contactos entre los axones) es la neurona tiraminérgica RIM (Gray, Hill y Bargmann, 2005b; White *et al.*, 1986). Se ha demostrado que la activación de la neurona AIB hiperpolariza a RIM a través de la activación del canal aniónico glutamatérgico AVR-14 (Piggott *et al.*, 2011). A su vez existen uniones eléctricas entre las neuronas AIY y RIM (*C. elegans* Neural Network, Nikhil Bhatla,

última actualización octubre 2016). A pesar de que hasta el momento no conocemos las señales metabólicas que modulan la actividad de RIM, a partir de este análisis podríamos hipotetizar que, ante condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, la neurona AIB hiperpolarizaría a RIM disminuyendo, de esta forma, los niveles de TA en el animal (Fig. 22). Sería entonces importante medir la actividad neuronal en AIY y AIB en el ayuno y analizar la SDR en mutantes nulos en los receptores *mgl-1* y *mgl-2* para dilucidar la modulación metabólica del sistema nervioso. Es interesante que, además de lo que proponen Kang y Avery (2009) en cuanto a las neuronas AIY y AIB, la neurona tiraminérgica RIM por sí misma

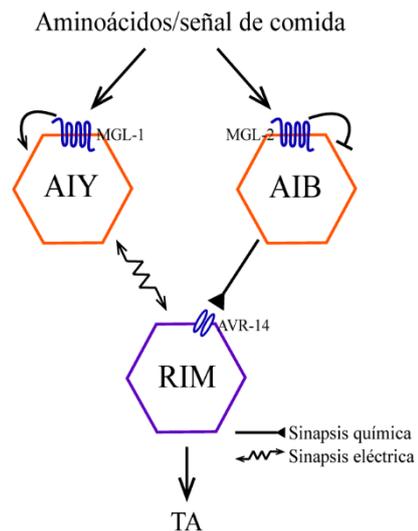


Fig 22. Esquema del circuito hipotetizado que podría modular a RIM mediante señales metabólicas.

es capaz de generar una señal metabólica de saciedad, como lo es la síntesis de ácido quinurénico a partir del aminoácido triptófano (Lemieux *et al.*, 2015). Si bien se ha reportado que el ácido quinurénico actúa como una señal metabólica de saciedad sobre otras neuronas y no queda claro si tiene un rol autocrino sobre RIM, es evidente que esta neurona juega un rol clave en la percepción nerviosa del estado metabólico.

Teniendo en cuenta que los gusanos deficientes de TA son más sensibles a la SDR mediada por 5-HT y los resultados obtenidos en la medición de la actividad de RIM, nuestra hipótesis consiste en que la supresión de la actividad tiraminérgica en ausencia de comida favorece a la exacerbación de la señal serotoninérgica en la realimentación. Además, el agregado exógeno de TA durante la privación de alimento, pero no en animales saciados, reduce la SDR (Fig. 17). Este resultado sugiere que la disminución de los niveles de TA durante el ayuno potencia la señal serotoninérgica en la llegada al alimento.

Con el objetivo de apoyar aún más nuestra hipótesis de trabajo, pretendemos en un futuro cercano, realizar los ensayos de locomoción luego de manipular la actividad neuronal de RIM. Activaremos a RIM por optogenética durante el ayuno y la silenciaremos en presencia de alimento mediante el uso de una cepa que exprese el canal de cloruro sensible a histamina de *Drosophila melanogaster* (HisCl) (De Rosa *et al.*, 2019). Esperamos que al activar a RIM durante el ayuno, la SDR no sea igual de abrupta que en el control y que al silenciarla en animales bien alimentados, se exacerbe la

disminución de la velocidad en el momento del encuentro con comida (es decir que el animal se comporte de manera similar a un animal hambreado, incluso habiendo estado siempre en presencia de comida). En combinación con los ensayos farmacológicos realizados, los resultados obtenidos de estos otros dos experimentos, nos permitirán apoyar con mayor seguridad nuestra hipótesis de que la inhibición de RIM contribuye a la exacerbación de los efectos inducidos por 5-HT en el encuentro con la comida.

La TA inhibe la señal serotoninérgica

Dado el hallazgo de que la TA se opone a los efectos de la 5-HT en la realimentación, examinamos los mecanismos moleculares que intervienen en esta interacción. Mediante microscopía de imágenes de calcio evaluamos la actividad de las neuronas serotoninérgicas, NSM y ADF, en mutantes deficientes de TA/OA y animales salvajes en el encuentro con la bacteria. Como fue mencionado en la introducción, NSM y ADF ocasionan la abrupta disminución de la velocidad en el regreso a la comida mediante la liberación de 5-HT (Iwanir *et al.*, 2016). Se requiere de la activación combinada de los receptores serotoninérgicos MOD-1 (canal de cloruro) y SER-4 (GPCR) para la SDR en el descubrimiento de la nueva fuente de nutrientes (Iwanir *et al.*, 2016). Si bien Iwanir y colaboradores, demostraron que la neurona ADF se activa antes de que el animal alcance el borde de la bacteria, y NSM durante el encuentro con la bacteria, mediante nuestro ensayo de medición de actividad neuronal en medio líquido no somos capaces de observar la previa activación de ADF en el encuentro con comida. Esto podría deberse a la incapacidad de los animales de censar la comida antes de perfundir la bacteria *E. coli* dentro de la cámara microfluídica. A pesar de esto, nuestro ensayo es útil para observar los cambios de fluorescencia en las dos neuronas serotoninérgicas, NSM y ADF en las distintas cepas evaluadas.

Mediante el uso de animales transgénicos que expresan GCaMP7 en las neuronas serotoninérgicas, determinamos que la falta de TA aumenta la actividad de NSM y ADF en el regreso a la comida (Fig. 18). Estos resultados sugieren que la vía tiraminérgica es capaz de inhibir a la serotoninérgica. Esto apoya nuestra teoría de que la supresión de la actividad tiraminérgica en el ayuno, exagera la liberación de 5-HT una vez que el animal encuentra comida, lo que le permite potenciar la ingesta de alimentos.

Como se mencionó en los resultados, dos de los cuatro receptores tiraminérgicos, SER-2 (Rex *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012) y TYRA-2 (Rex *et al.*, 2005), acoplados a $G\alpha_o$ (Komuniecki, Harris, *et al.*, 2012), se expresan en la neurona NSM. A pesar de que no hay conexiones sinápticas o uniones estrechas entre RIM y las neuronas serotoninérgicas (*C. elegans* Neural Network, Nikhil Bhatla, última actualización octubre 2016), el hecho de que NSM exprese receptores tiraminérgicos sugiere que la TA podría modular su actividad de forma extrasináptica. Esto sucede, por ejemplo, cuando la TA a través de SER-2 inhibe a la neurona NSM en respuesta a olores repelentes para disminuir el bombeo faríngeo (Li *et al.*, 2012). Con respecto a la neurona ADF, no hay reportes de que algún receptor tiraminérgico se exprese en la misma. No obstante, no podría descartarse que aún no se haya identificado la expresión de algún receptor de TA en ADF. Una de nuestras perspectivas futuras es, mediante técnicas de biología molecular, generar animales transgénicos que expresen proteínas fluorescentes bajo promotores específicos con el fin de identificar si algún receptor tiraminérgico se expresa en ADF y si tanto TYRA-3 y/o LGC-55, además de SER-2 y TYRA-2, se expresan también en NSM. Hasta el momento, logramos generar una cruce que expresa GFP bajo el promotor de *tph-1* y mCherry bajo el promotor de *tyra-3*. Observamos que *tyra-3* no se expresa en ninguna de las dos neuronas serotoninérgicas NSM y ADF (Fig. 23). Realizaremos el mismo protocolo con animales transgénicos de los demás receptores tiraminérgicos. En caso de que no identifiquemos un receptor tiraminérgico expresado en ADF, podríamos considerar que esté expresando algún receptor de TA aún no identificado o que la vía tiraminérgica podría modular la actividad de ADF de manera indirecta. Por ejemplo, la neurona tiraminérgica RIM presenta conexiones con las interneuronas AIY y ADA, las cuales ambas se conectan con la neurona serotoninérgica ADF (*C. elegans* Neural Network, Nikhil Bhatla, última actualización octubre 2016).

ptyra-3::mCherry; tph-1::GFP

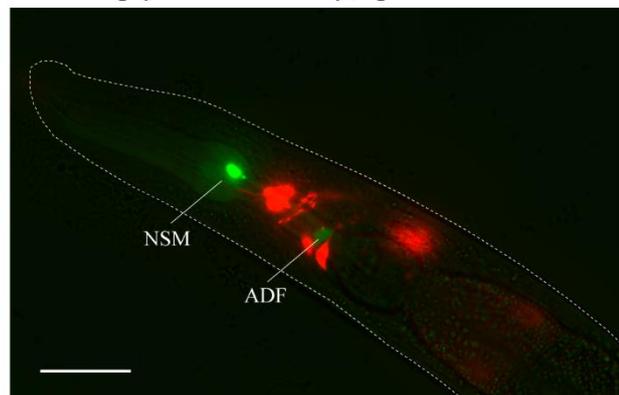


Fig 23. Patrones de expresión de *tyra-3* y *tph-1*. El receptor tiraminérgico TYRA-3 (rojo) no está expresado en las neuronas serotoninérgicas NSM y ADF (verde). Escala de barra: 20 μ m.

A pesar de todo esto, que un receptor tiraminérgico esté expresado en NSM y/o ADF no asegura que esté modulando la actividad serotoninérgica en el comportamiento de la SDR. Para identificar los posibles receptores tiraminérgicos involucrados en esta inhibición, planeamos en un futuro medir la actividad de las neuronas serotoninérgicas en la realimentación en animales mutantes que no expresen los receptores tiraminérgicos. Aquella cepa deficiente de un receptor de TA en la que se observe una actividad neuronal de NSM/ADF similar a la de *tdc-1* o mayor a la de los animales salvajes, nos revelará cuál o cuáles son los receptores de TA implicados en este mecanismo.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la TA suprime la activación de ambas neuronas serotoninérgicas NSM y ADF. Dado que la actividad de RIM declina durante el ayuno, creemos que esta inactivación tiraminérgica es crucial para la desinhibición de la señal serotoninérgica en la realimentación.

La TA aumenta la locomoción a través de TYRA-2 y TYRA-3 y la disminuye activando a SER-2

Cuando los animales se exponen a 5-HT exógena en medio líquido tienden a quedarse paralizados debido a la activación de los receptores serotoninérgicos MOD-1 y SER-4 (Ranganathan, Cannon y Horvitz, 2000; Gürel *et al.*, 2012). Este fenotipo permite identificar de manera rápida y sencilla aquellos animales que sean sensibles a la parálisis mediada por 5-HT. Es así que, mediante este ensayo, determinamos que el mutante nulo *tdc-1* es hipersensible a la parálisis mediada por 5-HT (Fig. 19). Esto sugiere que la TA no solo modula la actividad de las neuronas NSM y ADF, sino que también actúa a través de un circuito diferente y paralelo para oponerse a los efectos de la 5-HT.

Mediante cruza genéticas determinamos que dos receptores GPCRs, TYRA-3 y TYRA-2, se oponen a la disminución de la locomoción mediada por 5-HT. Aparentemente, estos dos receptores actúan de manera redundante para incrementar la locomoción, debido a que los mutantes simples de ambos exhibieron un fenotipo similar al de los animales salvajes. Contrariamente, los efectos generados por otro receptor tiraminérgico, SER-2, antagoniza las acciones de TYRA-3 y TYRA-2. Si bien el mutante simple *ser-2* también presenta un comportamiento similar a los animales salvajes en presencia de 5-HT exógena, el mutante triple *tyra-3; tyra-2; ser-2* rescata el fenotipo de hipersensibilidad a la parálisis del doble mutante *tyra-3; tyra-2* (Fig. 21). Un trabajo que se centra en estudiar los efectos opuestos de 5-HT y OA en la locomoción, demuestra que

el agregado exógeno de TA en mutantes *tdc-1* disminuye la locomoción en animales bien alimentados (Churgin *et al.*, 2017), sin identificar los posibles receptores implicados en este comportamiento. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la TA podría activar vías antagónicas a través de diferentes mecanismos para modular la locomoción. De manera que los resultados obtenidos por Churgin y colaboradores (2017) podrían explicarse considerando que la TA podría afectar distintos blancos moleculares de manera concentración-dependiente. Algo similar sucede en *Drosophila*, en la cual bajos niveles de TA son necesarios para la iniciación y mantenimiento del vuelo, pero altas concentraciones de TA inhiben el vuelo (Brembs *et al.*, 2007). Además, como ya mencionamos previamente, que el mismo ligando ejerza efectos opuestos sobre distintos receptores sucede también en otros sistemas como, por ejemplo, en el dopaminérgico. Mutantes deficientes del receptor dopaminérgico DOP-3 exhiben los mismos defectos en la locomoción que animales que no sintetizan DA, los cuales son rescatados al mutar el receptor DOP-1 (Chase, Pepper y Koelle, 2004). Esto demuestra que la DA inhibe o estimula la locomoción a través de DOP-3 y DOP-1, respectivamente.

En resumen, nuestros resultados proveen evidencia que la TA no actúa simplemente antagonizando los efectos de 5-HT, sino que también es probable que la TA tenga un efecto dual en la locomoción afectando distintos receptores blancos. El siguiente paso para comprender mejor la función de la TA en el comportamiento motor es determinar las células donde TYRA-2, TYRA-3 y SER-2 ejercen su efecto en esta conducta. Una posibilidad para abordar esta cuestión es evaluar la sensibilidad a la parálisis mediada por 5-HT de rescates genéticos de los receptores en las distintas células donde se expresan. Además, para aclarar las funciones de estos receptores deberíamos evaluar si están implicados en la conducta de la realimentación mediante la medición de la velocidad de locomoción en la llegada al borde de bacteria. Existe la posibilidad de que TYRA-3, TYRA-2 y SER-2 influyan en la actividad locomotora tanto en ausencia como en presencia de alimento modulando comportamientos de larga duración.

Teniendo en cuenta que estos receptores aminérgicos interfieren en el circuito regulador de la locomoción y que parecerían estar conservados en nematodos parásitos (Komuniecki, Law, *et al.*, 2012), podrían representar blancos útiles para el descubrimiento de nuevas drogas antihelmínticas. Los principales antihelmínticos del mercado actúan ocasionando parálisis espástica o flácida en los nematodos (Holden-Dye y Walker, 2007). Si bien los receptores aminérgicos aún no han sido utilizados como blancos nematicidas, se ha demostrado que altas concentraciones de 5-HT y TA son

capaces de paralizar a *C. elegans* (Gürel *et al.*, 2012; Pirri *et al.*, 2009). De tal forma que, el conocimiento de los efectos y la farmacología de los receptores implicados en la locomoción, podría colaborar en el desarrollo de un nuevo grupo de nematocidas. 15 de los 16 receptores aminérgicos de *C. elegans* presentan ortólogos en el genoma del parásito *A. suum* (Jex *et al.*, 2011). Por ejemplo, las tres isoformas de *tyra-2* y *tyra-3* han sido detectadas en *A. suum* (Jex *et al.*, 2011) y el canal de cloruro LGC-55 ha sido caracterizado en *Haemonchus contortus* (Rao *et al.*, 2010). Además, la farmacología de TYRA-2 en *C. elegans* parecería ser similar a la del parásito *Brugia malayi* (Smith, Rex y Komuniecki, 2007). Todos estos datos sugieren que la vía de señalización tiraminérgica podría estar conservada entre nematodos. A su vez, ha sido demostrado que los receptores octopaminérgicos son blancos moleculares de insecticidas, como las formamidinas (amitraz), en ácaros y garrapatas (Evans y Gee, 1980; Chen, He y Davey, 2007). También se propone que productos elaborados con aceites esenciales (timol, eucaliptol, mentol) podrían ejercer su efecto terapéutico insecticida/acaricida uniéndose a receptores de TA/OA (Blenau, Rademacher y Baumann, 2012). Todos estos resultados muestran la importancia de caracterizar los efectos de los receptores tiraminérgicos para el futuro desarrollo de alternativas antihelmínticas.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la privación de comida deprime la actividad tiraminérgica, disminuyendo la inhibición que la TA ejerce en las neuronas serotoninérgicas, NSM y ADF. Esto podría favorecer la liberación de 5-HT en el reencuentro con el alimento y permitir la característica reducción abrupta de la locomoción en la vuelta a comida. Además, la TA es capaz de activar receptores tiraminérgicos a través de un circuito lineal paralelo a la vía serotoninérgica para modular la actividad motora (Fig. 24). Considerando el alto grado de conservación de los componentes moleculares presentes en esta vía (Chase y Koelle, 2007) y la semejanza en los comportamientos de alimentación en los animales, la comprensión del rol de estas señales en invertebrados podría resultar significativa para entender mejor esta interacción en mamíferos.

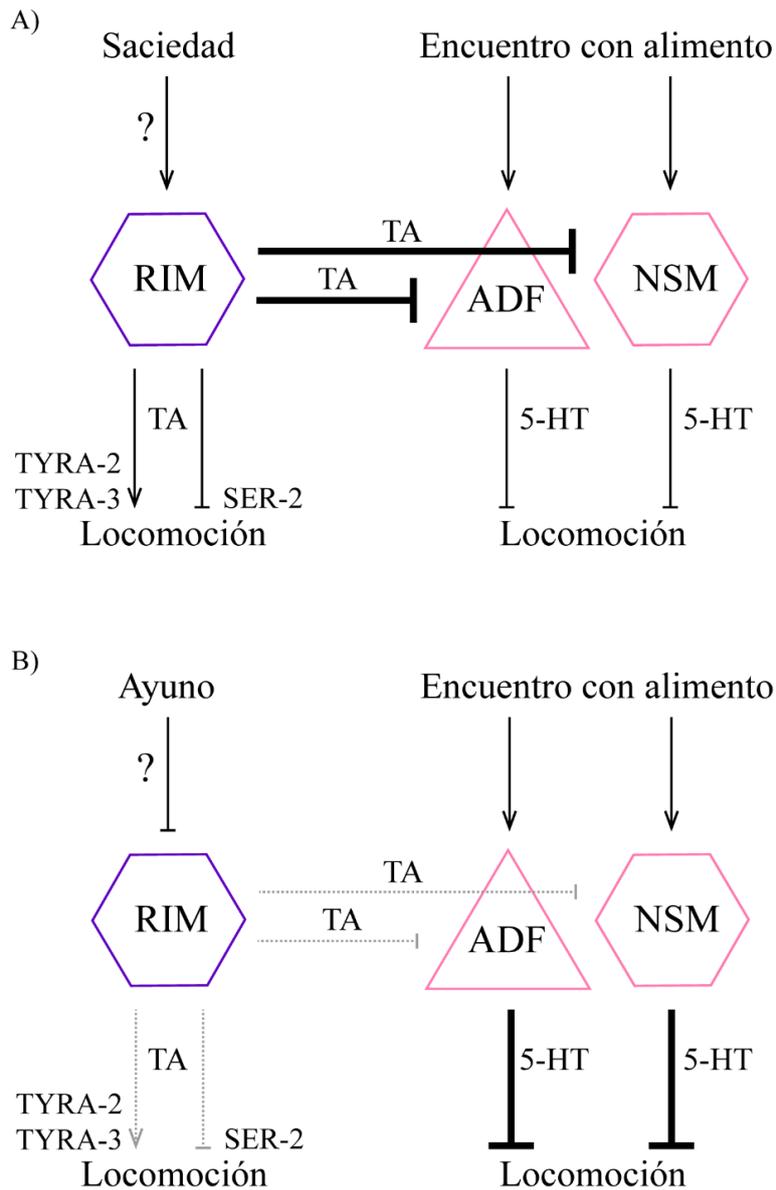


Fig 24. Modelo esquemático del circuito involucrado en la modulación de la realimentación. A) Circuito neuronal propuesto en el encuentro con el alimento en animales saciados. La TA liberada desde el par de neuronas tiraminérgicas RIM inhibe la actividad de ADF y NSM, las cuales regularán una modesta disminución de la locomoción en el encuentro con el alimento. La TA actúa de manera paralela a través de TYRA-2 y TYRA-3 estimulando la locomoción y SER-2 inhibiéndola. B) Circuito neuronal propuesto en el encuentro con el alimento luego de un ayuno. La falta de comida suprime la actividad de RIM desinhibiendo a las neuronas serotoninérgicas, ADF y NSM, y favoreciendo la abrupta disminución de la locomoción en el encuentro con el alimento.

Conclusión

La comida es un estímulo complejo. El sistema nervioso es capaz de modular los comportamientos de los animales en función de la disponibilidad de alimento y del estado de su medio interno. Mediante el uso de herramientas genéticas, técnicas de microscopía, ensayos comportamentales y farmacológicos, comenzamos a dilucidar un circuito neuronal involucrado en la modulación del comportamiento de alimentación en *C. elegans*. Determinamos que las aminas biogénicas 5-HT y TA ejercen efectos opuestos que se ponen de manifiesto en el hallazgo del alimento. Los descubrimientos que nos permitieron plantear esta intermodulación son los siguientes:

- i. La disminución de la locomoción en el encuentro con el alimento, la cual depende de 5-HT, se ve exacerbada luego de ~ 20 minutos de ayuno;
- ii. Animales deficientes de la síntesis de TA saciados exhiben una mayor disminución de la locomoción que animales salvajes en el encuentro con el alimento (asemejándose al comportamiento que muestran los animales hambreados);
- iii. La actividad del par de neuronas tiraminérgicas RIM disminuye paulatinamente cuando se retira a los animales del alimento;
- iv. La exposición a TA exógena durante el ayuno rescata parcialmente la gran desaceleración de la locomoción de animales hambreadas en el encuentro con el alimento;
- v. Animales mutantes que no sintetizan TA presentan una mayor actividad neuronal serotoninérgica que animales salvajes en la vuelta al alimento.

En conjunto estos resultados obtenidos en la tesis, nos permiten proponer que la inhibición de la neurona tiraminérgica durante el ayuno es clave para el comportamiento dependiente de 5-HT en la realimentación. A pesar de no conocer aún el sitio de acción, también determinamos que la TA es capaz de modular la actividad locomotora del animal de manera dual: a través de los receptores TYRA-2 y TYRA-3 estimula la locomoción y activando SER-2 la disminuye.

La TA, análogo de la noradrenalina en mamíferos, y la 5-HT son aminas importantes no sólo en *C. elegans*, sino también en insectos (Roeder, 2020; Groome, Clark y Lent, 1993; Yang *et al.*, 2015; Brembs *et al.*, 2007) y están presentes en trazas en humanos (Branchek y Blackburn, 2003). Estas aminas cumplen un rol fundamental en las conductas relacionadas con la alimentación en todo el reino animal (Blundell y Halford, 1998; Bresch *et al.*, 2017; Hainer *et al.*, 2006; Schwartz, Hernandez y Hoebel, 1990; Yang *et al.*, 2015). Incluso, existen otros comportamientos complejos que reflejan interacciones

entre estos neurotransmisores. Un ejemplo son las interacciones inhibitorias entre las señales serotoninérgicas y catecolaminérgicas implicadas en la depresión y ansiedad en el ser humano (Blier, 2001). Por esta razón, creemos que nuestros resultados aportan información valiosa para la comprensión de esta intermodulación, que podría resultar crucial en un futuro para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de desórdenes asociados a una señalización aminérgica aberrante.

CAPÍTULO II

**Búsqueda de compuestos con potencial terapéutico utilizando
el nematodo modelo *Caenorhabditis elegans***

Introducción

Parasitosis por nematodos

Los antihelmínticos son drogas utilizadas para el tratamiento de infecciones causadas por gusanos parásitos. Estos incluyen los platelmintos (gusanos planos) y los nematodos (gusanos cilíndricos). Los nematodos parásitos infectan al humano a través del contacto con sus huevos o larvas que crecen en el suelo cálido y húmedo. Existen nematodos que al alcanzar el estadio adulto son capaces de vivir durante años en el tracto gastrointestinal del hospedador. Las infecciones generadas por gusanos son consideradas enfermedades tropicales desatendidas, puesto que proliferan en entornos de pobreza extrema especialmente en ambientes calurosos y húmedos de países tropicales. En amplias partes del mundo han desaparecido gradualmente, en paralelo a la mejora de la calidad de vida e higiene. No obstante, hoy en día se concentran en regiones empobrecidas por efecto de la contaminación, de las malas condiciones de vida e higiene y por las deficientes políticas de salud pública (https://www.who.int/topics/tropical_diseases/qa/faq).

Existen tres helmintiasis causadas por nematodos intestinales consideradas dentro de las principales enfermedades tropicales desatendidas: ascariasis (causada por *Ascaris lumbricoides*), tricuriasis (causada por *Trichuris trichiura*), y anquilostomiasis (causada por *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*) (Bethony *et al.*, 2006a). Actualmente, se estima que estos nematodos parásitos infectan a un cuarto de la población mundial (http://www.who.int/intestinal_worms/more/en/) especialmente en regiones tropicales de Asia, África y América. Es común que un individuo, viviendo en un país empobrecido sea infectado alguna vez en su vida por nematodos. Debido a sus hábitos higiénicos, los niños suelen ser más vulnerables a las parasitosis y al infectarse presentarán síntomas más severos tales como malnutrición, retraso en el crecimiento, problemas en su desarrollo intelectual y cognitivo (WHO. *Partners for Parasite Control*, 2005). Asimismo, las infecciones generadas por nematodos en agricultura y en animales de ganadería afectan la producción de alimentos ocasionando grandes pérdidas económicas alrededor del mundo (Jones *et al.*, 2013; Rist *et al.*, 2015).

Drogas antihelmínticas

A pesar de que hace muchos años las helmintiasis suscitan significativas preocupaciones económicas y de salud pública, el desarrollo de nuevos antiparasitarios ha sido postergado en las últimas décadas y el repertorio de antihelmínticos disponible hoy en día en el mercado es relativamente limitado (Kaminsky *et al.*, 2008; Holden-Dye y Walker, 2014). Esto se debe a que las naciones que sufren de estas enfermedades no tienen la capacidad financiera para invertir en el desarrollo de drogas o terapias. De manera que no es gran sorpresa que la mayoría de las drogas disponibles para el tratamiento en humanos hayan sido originalmente desarrolladas para uso veterinario en países con mayor inversión en ciencia y tecnología (Holden-Dye y Walker, 2014). El hecho de que una única droga para uso humano, tribendimidina, haya ingresado en ensayos clínicos en los últimos 35 años, es una clara evidencia de la falta de interés de la industria farmacéutica en el desarrollo de drogas antihelmínticas (Hu, Xiao y Aroian, 2009; Xiao *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2013).

Basados en su estructura química, los antihelmínticos disponibles hoy en día incluyen a los benzimidazoles (como el albendazol), imidazotiazoles (como el levamisol), lactonas macrocíclicas (como la ivermectina), octadepsipéptidos cíclicos (como la emodepsida), amino-acetonitrilos (como el monepantel) y tetrahidropirimidinas (como el pirantel) (Burns *et al.*, 2015; Kaminsky, 2008). Muchas de estas drogas presentan amplios espectros de actividad y han sido utilizadas extensivamente durante los últimos 40 años.

De acuerdo a su mecanismo de acción, a los antihelmínticos se los puede clasificar en dos clases principales: aquellos que ejercen un efecto rápido y selectivo sobre la transmisión neuromuscular y aquellos que afectan procesos bioquímicos y actúan más lento (Holden-Dye y Walker, 2014; Martin, 1997; Martin, Robertson y Bjorn, 1997).

Dentro del primer grupo existen el levamisol, pirantel, morantel y befenio, agonistas del receptor ionotrópico de acetilcolina, llamado de tipo L en nematodos (por ser activado por Levamisol). Estos producen una despolarización rápida de la célula muscular y, por consiguiente, la parálisis espástica del parásito (Martin, 1997). Otro de los antihelmínticos que actúa generando contracción muscular es el monepantel, una nueva droga utilizada en el ganado, cuyo mecanismo de acción se ha descrito en la última década. Este actúa como agonista de un receptor colinérgico muscular diferente al de tipo L (Kaminsky, 2008) (Peden *et al.*, 2013). Por otro lado, existen fármacos que actúan como agonistas de

receptores GABA musculares (piperazina) y glutamatérgicos musculares (ivermectina) que producen parálisis del nematodo (Martin, 1997). Los fármacos como el albendazol, mebendazol y tiabendazol, pertenecen al segundo grupo que no genera una parálisis aguda del nematodo. Estas drogas se unen a la β -tubulina del citoplasma celular inhibiendo la polimerización de los microtúbulos del nematodo, generando la muerte del animal (Martin, 1997).

Debido al mal uso en veterinaria y a las campañas masivas quimioterapéuticas para combatir las helmintiasis en países tropicales, se está propagando la resistencia a fármacos antihelmínticos (Horton, 2003). Desafortunadamente, para cada clase de las drogas previamente nombradas ya se han reportado resistencias (Wolstenholme *et al.*, 2004; Osei-Atweneboana *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2014; Fuller, Lilley y Urwin, 2008; Dey *et al.*, 2020). Incluso en ovinos, ya se reportaron parásitos resistentes al monepantel, fármaco recientemente introducido en el mercado (Kaminsky, 2008; Kaminsky *et al.*, 2009; Kaminsky *et al.*, 2011; Fru y Puoti, 2014). Dado el número limitado de drogas disponibles, la enorme cantidad de personas que se deben tratar, la diferente variedad de parásitos, y la emergente resistencia a los fármacos antiparasitarios existentes, hay una necesidad urgente de avanzar en la investigación farmacológica de nuevas drogas antiparasitarias.

Actividad biológica de los derivados del Imidazol

La industria farmacéutica se ha centrado históricamente en compuestos heterocíclicos para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas (Kale, Pawar y Kale, 2016). Dentro de la amplia cantidad de compuestos heterocíclicos, el imidazol y sus derivados son de los compuestos más versátiles utilizados como fármacos (Sharma *et al.*, 2016; Shalmali, Ali y Bawa, 2018). La molécula de imidazol es un anillo heterocíclico plano de cinco átomos, tres de carbono y dos de nitrógeno (Fig. 25). El anillo imidazol es un constituyente de una abundante cantidad de biomoléculas naturales, incluyendo las purinas, la histamina y la histidina. (Shalini, Sharma y Kumar, 2010). Debido a su capacidad de unirse a una gran cantidad de blancos biológicos, la incorporación del núcleo de imidazol es una importante estrategia sintética en el descubrimiento de nuevas drogas. Las extensas propiedades terapéuticas de los derivados del imidazol han alentado a la síntesis de una extraordinaria cantidad de agentes farmacológicos. Dentro de esos

compuestos medicinales se encuentran, analgésicos, antiinflamatorios, anticonvulsivantes, antivirales, antifúngicos, antibacteriales, antidiabéticos y antiparasitarios (Dutta, 2010; Gaba, Singh y Mohan, 2014; Kale, Pawar y Kale, 2016; Sharma *et al.*, 2016; Shalmali, Ali y Bawa, 2018; Adeyemi *et al.*, 2020).

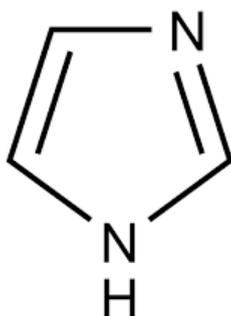


Fig 25. Anillo imidazol. En un heterociclo con tres átomos de carbono y dos átomos de nitrógeno. Es un compuesto anfótero, en el cual el protón ácido se ubica en uno de los átomos de nitrógeno, mientras que el segundo nitrógeno se comporta como base.

Algunos de los antiparasitarios ya mencionados son derivados del imidazol (Fig. 26) (Holden-Dye y Walker, 2007; Geary *et al.*, 2010). Los mecanismos moleculares responsables del efecto antihelmíntico de los derivados imidazólicos son diversos. Los imidazotiazoles (levamisol) pertenecen al grupo de drogas que producen una parálisis espástica del nematodo mediante la activación potente de un receptor ionotrópico activado por acetilcolina (AChR) involucrado en la contracción muscular (Atchison *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 2005). Mientras que los benzimidazoles (albendazol, mebendazol, tiabendazol) forman parte del otro grupo de fármacos que se unen a la β -tubulina del citoplasma celular (Driscoll *et al.*, 1989b). Cabe destacar que el efecto terapéutico de los imidazotiazoles no se basa en ocasionar la muerte de los nematodos, sino que depende de su capacidad para generar la parálisis del gusano y facilitar su expulsión a través del tracto gastrointestinal; mientras que los benzimidazoles son nematicidas, es decir, que producen la muerte de los parásitos. Esto demuestra que a pesar de que el anillo imidazólico es sustancial para presentar actividad biológica, no restringe los blancos moleculares sobre los cuales los compuestos conteniendo el núcleo de imidazol ejercen su efecto.

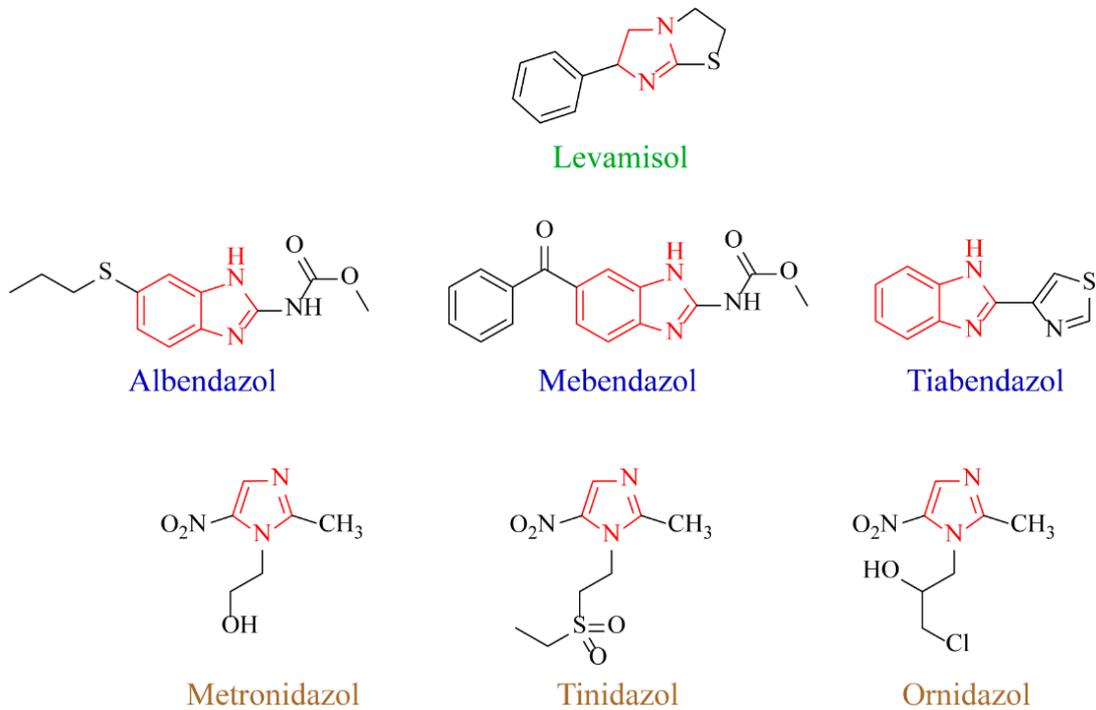


Fig 26. Estructura de drogas antiparasitarias presentes en el mercado. El levamisol es un derivado del imidazotiazol (verde); el albendazol, mebendazol y tiabendazol son derivados del benzimidazol (azul); y el metronidazol, tinidazol y ornidazol, los cuales poseen actividad antiprotozoaria pero no antihelmíntica, son derivados del nitroimidazol (marrón). En cada molécula, los núcleos imidazol o benzimidazol están resaltados en rojo.

Uso de *Caenorhabditis elegans* para la búsqueda de drogas antihelmínticas

Una de las razones por las cuales existe un número limitado de antihelmínticos disponibles podría deberse a la dificultad de identificar compuestos activos mediante un cribado efectivo de extensas cantidades de moléculas candidatas.

El ensayo ideal para la investigación de drogas antihelmínticas, constaría en enfrentar a los parásitos a las drogas candidatas dentro de su hospedador natural. Sin embargo, esto requeriría enormes cantidades de compuestos químicos e instalaciones para la cría de animales hospedadores, lo cual generaría costos desmedidos. Más allá de las limitaciones éticas y el tiempo requerido para la aprobación de protocolos en el uso de animales, el complejo ciclo de vida del parásito hace que sea prácticamente inviable su crecimiento y mantenimiento fuera del hospedador en condiciones estándar de laboratorio. El ciclo de vida de los principales nematodos intestinales es similar. La

mayoría de estos parásitos requieren de un período de desarrollo en el suelo y luego necesitan de la transmisión a un hospedador para completar su ciclo y alcanzar la vida fértil. Los huevos depositados en el intestino del animal infectado son transportados al exterior por medio de las heces y luego se desarrollan a través de cuatro estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4), pre-adultos y adultos grávidos. Para alcanzar el estadio L4 deben estar dentro del hospedador (algunas especies desde huevos y otras desde L3) (Epe, 2009; Stepek *et al.*, 2006). Además, el cultivo de algunos de los nematodos parásitos específicos de humanos (*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis* y *Strongyloides stercoralis*) es dificultoso dado que no logran completar su ciclo de vida en un hospedador diferente (Stepek *et al.*, 2006). Otra gran desventaja en la búsqueda de antihelmínticos es el limitado repertorio de técnicas de ingeniería genética disponibles para los nematodos parásitos, lo que dificultaría el estudio de mecanismos moleculares de acción de las drogas (Ward, 2015).

Por todos estos motivos, el gusano no parásito *Caenorhabditis elegans* ha surgido como un sistema modelo alternativo conveniente para el estudio de nuevos compuestos que matan específicamente a nematodos (Simpkin y Coles, 1981; Holden-Dye y Walker, 2007; Katiki *et al.*, 2011; Kumarasingha *et al.*, 2014). Como hemos mencionado previamente, *C. elegans* es un nematodo de vida libre (no requiere de un hospedador para su crecimiento), que mide ~1mm de largo en su estadio adulto y que puede ser cultivado fácilmente en el laboratorio. Su ciclo de vida corto (aproximadamente 3 días a 20°C), permite cuantificar procesos fisiológicos en distintos momentos de su desarrollo, desde huevos hasta adultos (Kwok *et al.*, 2006; Lemieux *et al.*, 2011; Leung *et al.*, 2013). Es posible, entonces, poder detectar en un lapso breve de tiempo un cambio significativo e idealmente cuantificable en el crecimiento, desarrollo, metabolismo, comportamiento (deposición de huevos, movilidad, defecación, bombeo faríngeo, etc.) o incluso la muerte inducida por los compuestos evaluados (Petrascheck, Ye y Buck, 2007).

A pesar del distinto hábitat y “estilo de vida” del nematodo de vida libre *C. elegans* con respecto a los parásitos, las especies dentro del filo nematoda comparten similitudes. El grupo de John Parkinson en la Universidad de Toronto realizó un análisis comparativo de transcriptomas del filo nematoda, utilizando 265.494 secuencias derivadas de clones de ADNc seleccionadas al azar de 30 especies de nematodos diferentes (28 parásitos de plantas, animales y humanos y 2 de vida libre incluyendo a *C. elegans*). A partir de este estudio, determinaron que entre el 35% y el 70% de los genes de cada especie tenían similitudes significativas con genes de nuestro modelo *C. elegans*. Por ejemplo, los

parásitos humanos *Ancylostoma* y *Necator* y otros parásitos de animales están ubicados dentro del clado V del filo junto con *C. elegans* (Fig. 27), por lo que representaría un excelente modelo para estos importantes patógenos. A su vez, identificaron 4.228 familias de proteínas específicas de nematodos y conservadas en todo el filo, que podrían representar blancos potenciales de drogas antiparasitarias (Parkinson *et al.*, 2004). Eso hace a *C. elegans* un modelo poderoso para identificar moléculas que sean letales para nematodos parásitos sin ser tóxicas para otras especies. A su vez, estudios recientes han demostrado que es altamente probable que aquellos compuestos que son letales para *C. elegans*, sean capaces de inducir la muerte en nematodos parásitos (Burns *et al.*, 2015). Podríamos concluir que *C. elegans* no es más diferente a los nematodos parásitos que cada especie individual de parásito es a otra (Holden-Dye y Walker, 2014).

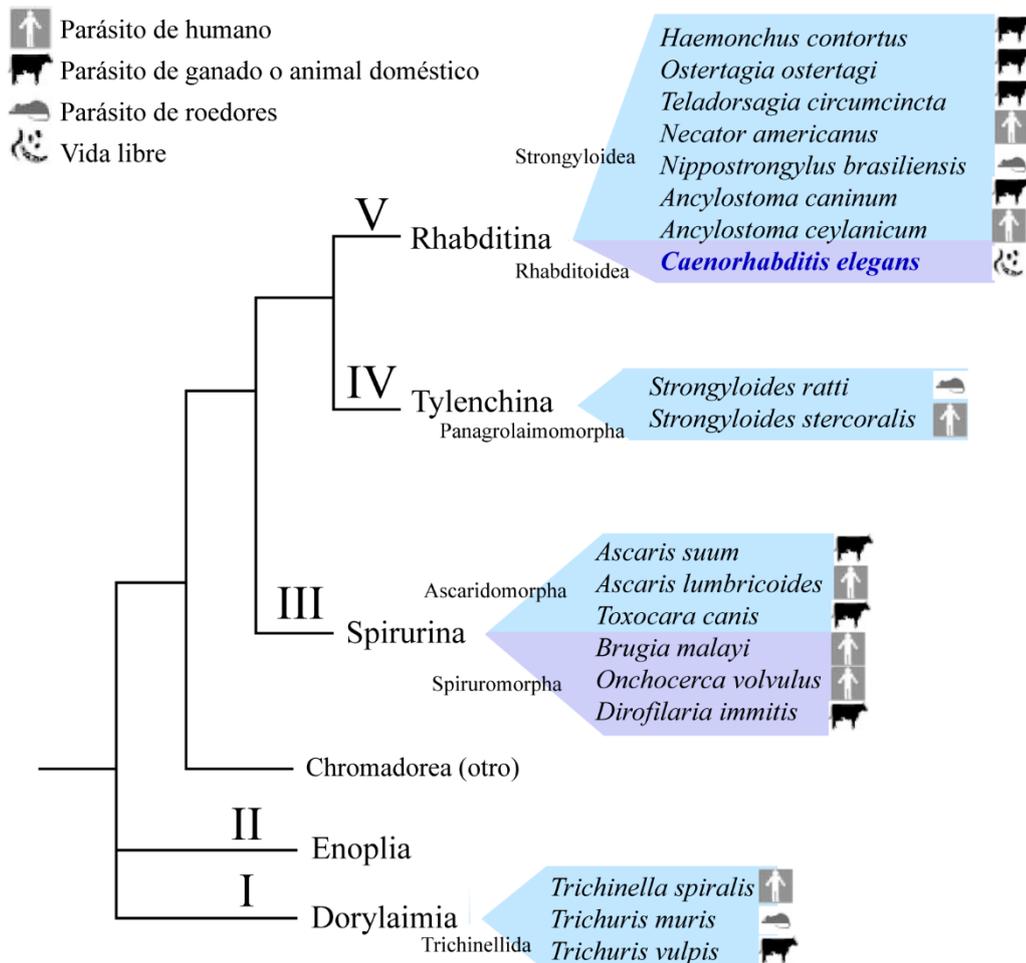


Fig 27. Esquema del análisis filogenético del filo nematoda. Las especies están agrupadas en grupos taxonómicos según la filogenia de la subunidad pequeña del ARNr (SSU rRNA en inglés) (Parkinson *et al.*, 2004; Blaxter, 1998).

La mayoría de los antihelmínticos en el mercado son activos frente a *C. elegans* (Holden-Dye y Walker, 2007). El uso de *C. elegans* ha sido clave para comprender el mecanismo de acción y la resistencia de varios compuestos antihelmínticos, incluyendo el levamisol, derivados del benzimidazol y del amino-acetonitrilo (Lewis, Wu, Berg, *et al.*, 1980; Lewis, Wu, Levine, *et al.*, 1980; Dent *et al.*, 2000a; Driscoll *et al.*, 1989b; Kaminsky, 2008; Hu, Xiao y Aroian, 2009; Williams *et al.*, 2013). Una vez identificada la acción nematicida de un compuesto, se pueden adoptar dos estrategias genéticas para evaluar el mecanismo de acción que le otorga su actividad. En la primera, se busca una alteración en la sensibilidad a la droga de cepas mutadas en genes conocidos. En caso de que una cepa mutante sea más resistente al nematicida que la cepa salvaje, sugerirá que el gen mutado codificaba una proteína que está involucrada en el mecanismo de acción de la droga. La ventaja de implementar esta metodología, es la disponibilidad de una gran variedad de mutantes del banco de cepas CGC. La estrategia alternativa, la cual ha sido ampliamente utilizada para dilucidar el blanco molecular de muchos de los antihelmínticos conocidos, consiste en realizar una mutagénesis y luego identificar individuos que resistan a los efectos de la droga (*forward genetics*) (Jones, Buckingham y Sattelle, 2005). Esta técnica tiene la ventaja de poder identificar nuevos blancos farmacológicos y dilucidar nuevos mecanismos de acción.

Objetivos

Las infecciones generadas por nematodos afectan a un cuarto de la población mundial, a la agricultura, a animales de ganadería y domésticos. La escasa inversión de la industria farmacéutica en la investigación de nuevos antiparasitarios y la propagación de resistencias a los fármacos nematicidas ya existentes, suscitan la urgencia de la búsqueda de moléculas con potencial antihelmíntico. Considerando la cercanía filogenética que existe entre nematodos parásitos y *C. elegans* y todas las ventajas que presenta su uso como modelo, el objetivo general de este capítulo es:

Buscar nuevas moléculas con actividad antihelmíntica utilizando como modelo al nematodo *Caenorhabditis elegans* y evaluar el posible mecanismo de acción que le otorga la actividad nematicida a esas moléculas.

Para cumplir con dicho objetivo final, nos planteamos:

- 1- Realizar un cribado (*screening*) utilizando una minibiblioteca de nuevas moléculas derivadas del imidazol con el objeto de identificar compuestos con actividad antihelmíntica.
- 2- Analizar el efecto del/los compuesto/s con acción antihelmíntica en otras especies fuera del filo nematoda con el fin de evaluar la especificidad nematicida de/l compuesto/s seleccionado/s.
- 3- Evaluar la acción del/los compuesto/s seleccionado/s en la viabilidad, el comportamiento y desarrollo de *C. elegans*, lo cual permite caracterizar el efecto nematicida del compuesto en cuestión.
- 4- Evaluar la sensibilidad a la/s droga/s de cepas mutadas en genes que codifican para blancos moleculares de antihelmínticos conocidos para lograr identificar el/los blanco/s molecular/es del/os compuesto/s elegido/s.

Resultados

El compuesto diisopropilfenil-imidazol presenta actividad antihelmíntica específica

Para contribuir al desarrollo de nuevas drogas antihelmínticas, comenzamos nuestro trabajo evaluando la actividad nematocida, frente a *C. elegans*, de once compuestos derivados del imidazol (Fig. 28A y ver Materiales y Métodos, tabla 4). El diseño estructural y la síntesis de estas moléculas se realizaron en el laboratorio del Dr. Silbestri en el departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur. Estos compuestos difieren en su solubilidad al agua, la cual es crítica para la absorción y el pasaje a través de barreras biológicas, y en su impedimento estérico, el cual es relevante para la interacción con blancos moleculares. Se sintetizaron nueve sales y dos compuestos neutros derivados del imidazol, mediante el agregado de grupos polares y residuos voluminosos compuestos por arilo o bencilo sustituidos por grupos metilo o isopropilo. Todos estos compuestos son sólidos, estables a la humedad y aire y pueden ser almacenados durante largos períodos de tiempo.

Cribado de compuestos imidazólicos con actividad antihelmíntica

El primer paso de este trabajo consistió en realizar una búsqueda rápida y sencilla de la actividad antihelmíntica de los nuevos compuestos imidazólicos sintetizados (Fig. 28A). Para ello, expusimos 100-150 animales adultos jóvenes a los compuestos en medio líquido S-basal (ver Materiales y Métodos, *Anexo 4*) en presencia de bacteria *Escherichia coli* OP50 como fuente de comida. Se los incubó a 20°C durante 72 horas y luego evaluamos la supervivencia (Fig. 28B). Consideramos a un animal como muerto si era incapaz de moverse al tocarlos suavemente con un alambre de platino en la parte anterior del cuerpo. Para este estudio, utilizamos una concentración de 150 µg/ml de cada compuesto, similar a la concentración utilizada en otros estudios de cribado (Dutta, 2010). Realizamos las soluciones madre en agua o en dimetilsulfóxido (DMSO) de acuerdo a la solubilidad de cada compuesto (Fig. 28A). Las correspondientes concentraciones molares utilizadas en el ensayo y el solvente de las soluciones madre de cada compuesto están detallados en el apartado Materiales y Métodos.

Mediante este ensayo de cribado encontramos dos compuestos, el 10, mesitilimidazol (MI) y el 11, diisopropilfenil-imidazol (DII), que producían el 100 % de muerte de los gusanos (Fig. 28B). A diferencia del resto de los compuestos, el MI y el DII son imidazoles neutros con un solo sustituyente en uno de los nitrógenos del anillo imidazol, mientras que el otro nitrógeno conserva propiedades básicas. Una droga puede ingresar al organismo del gusano y alcanzar el tejido blanco a través de dos formas, mediante la ingestión o por difusión a través de la cutícula. Debido a esto, se debe tener en cuenta que la cutícula podría presentar una barrera de permeabilidad significativa para numerosas drogas (Holden-Dye y Walker, 2007). Un trabajo reciente, sugiere que moléculas más pequeñas y con mayor liposolubilidad podrían ser nematicidas más efectivos (Burns *et al.*, 2015). De manera que, la actividad antihelmíntica del MI y DII podría verse favorecida debido a su mayor liposolubilidad con respecto al resto de los compuestos.

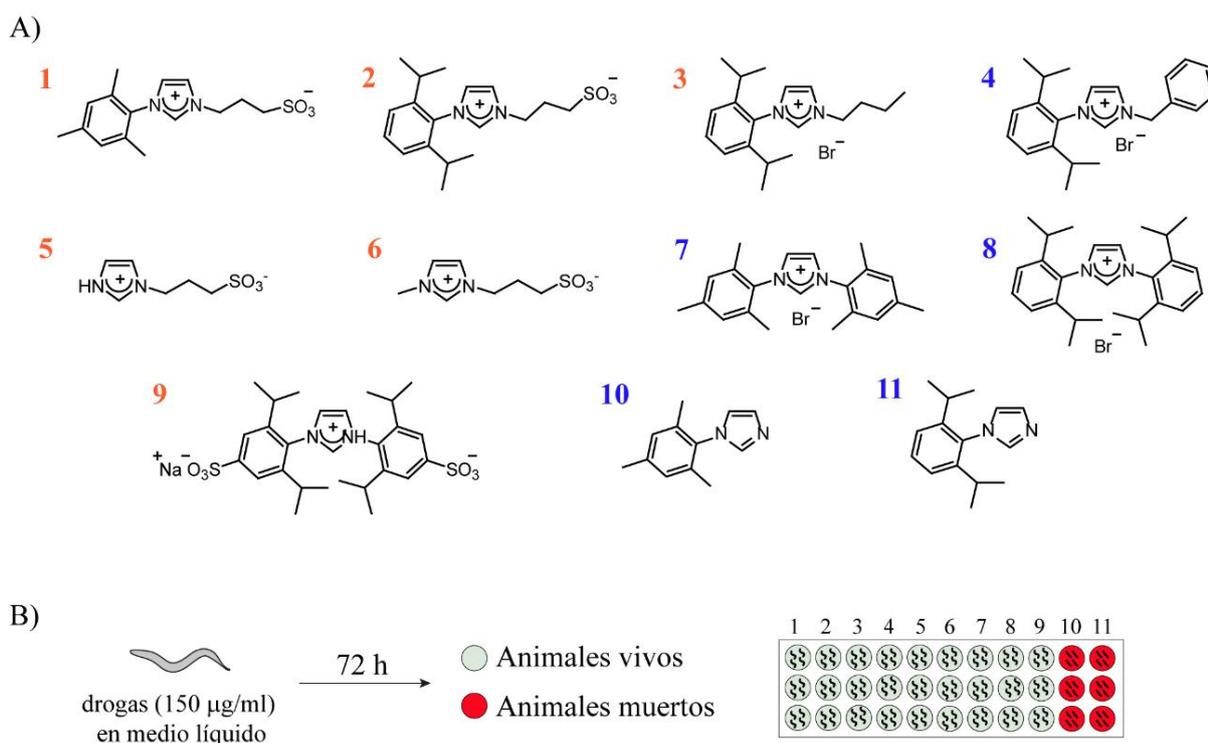


Fig 28. Cribado de actividad antihelmíntica de los nuevos compuestos derivados del imidazol. A) Estructuras de los nuevos compuestos sintetizados derivados del imidazol (compuestos 1-11). Los compuestos 1, 2, 3, 5, 6 y 9 son solubles en agua (naranja) y los compuestos 4, 7, 8, 10 y 11 son solubles en DMSO (azul). B) Para evaluar el efecto nematicida, gusanos en estadio L4/adultos jóvenes se expusieron a las drogas (150 µg/ml) durante 72 horas y luego se evaluó la supervivencia. Solo los compuestos 10 y 11 indujeron la muerte de los animales.

Durante el ensayo de cribado observamos cualitativamente que el crecimiento de la bacteria *E. coli* OP50 en presencia de la droga MI se veía inhibido. Sin embargo, no observamos lo mismo en presencia de droga DII. Para lograr cuantificar esta observación y poder confirmar que el crecimiento de la *E. coli* OP50 estaba afectado, determinamos la concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC) de ambos compuestos en cultivos de *E. coli* OP50 (Fig. 29). Estos ensayos los realizamos en colaboración con la Dra. Vela Gurovic, especialista en microbiología e investigadora del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida - CERZOS (CONICET-UNS). Los valores de MIC obtenidos son 128 µg/ml (0,68 mM) y 256 µg/ml (1,11 mM) para MI y DII respectivamente. También se obtuvieron valores similares cuando repetimos el ensayo con *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram-positiva (Fig. 29). Se utilizó el antibiótico ciprofloxacina como control positivo para comparar las MIC y MBC. Estos resultados indican que a la concentración utilizada en el ensayo de cribado (150 µg/ml), la droga MI no solo afecta a los gusanos, sino que también inhibe el crecimiento de la bacteria. Debido a que la *E. coli* OP50 es la fuente de alimentación de los gusanos, consideramos que no sería conveniente continuar evaluando al MI, ya que los animales podrían verse afectados por la falta de comida. Asimismo, como estábamos buscando la presencia de actividad antihelmíntica específica, restringimos nuestros siguientes análisis al compuesto DII que aparentaba ejercer actividad antihelmíntica sin efectos letales sobre otros organismos.

		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
MI (10)	MIC	128	128
	MBC	>256	>256
DII (11)	MIC	256	256
	MBC	>256	>256
cipro.	MIC	0.25	0.50
	MBC	1	1

Fig 29. Toxicidad del MI y DII en bacterias. El efecto del MI (10) y del DII (11) en bacteria se evaluó en cultivos de *E. coli* (Gram-negativa) y *S. aureus* (Gram-positiva). La concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC), expresadas en µg/ml, se obtuvieron mediante métodos de microdilución. Como control positivo de actividad antibiótica se utilizó ciprofloxacina (cipro.). Ninguna de las dos drogas evaluadas es bactericida. A 128 µg/ml (menor concentración que la utilizada en los ensayos de cribado) el MI (10), pero no el DII (11), inhibe el crecimiento bacteriano

Análisis de la actividad antihelmíntica de DII

Para continuar con el análisis del DII como una potencial droga antihelmíntica, evaluamos si esta droga era capaz de generar la letalidad de los gusanos a menores concentraciones que la utilizada en el ensayo de cribado (657 μM). Para ello, expusimos a gusanos en el estadio larval L4 a distintas concentraciones crecientes de DII (0 – 300 μM) por 96 horas (4 días) en medio sólido (Fig. 30A) y luego graficamos una curva dosis-letalidad cuantil (Fig. 30B). Observamos que el efecto letal es dependiente de la concentración de DII. A una concentración de 100 μM se produjo el 100 % de muerte y la concentración letal 50 (LC50) calculada es de $23,44 \pm 1,06 \mu\text{M}$ (Fig. 30). Esta LC50 es similar o incluso menor a aquellas publicadas para otros antihelmínticos del mercado (Hu *et al.*, 2013; Sant'anna, Vommaro y de Souza, 2013). Por ejemplo, de acuerdo a lo reportado por Sant'anna y colaboradores (2003), el albendazol alcanza una LC50 similar (alrededor de 18 μM) en un período de tiempo de exposición a la droga mucho mayor (7 días) en comparación al que nosotros utilizamos en nuestros ensayos.

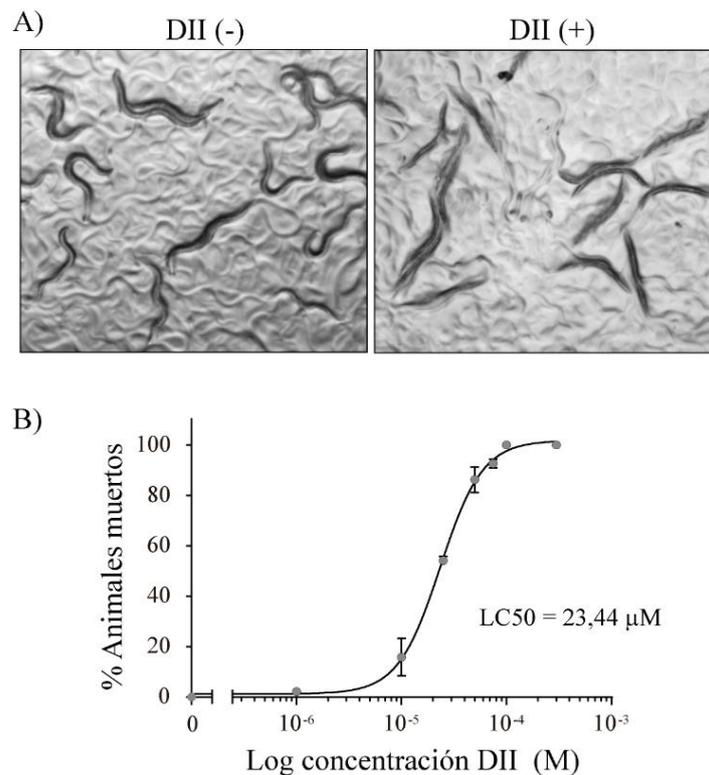


Fig 30. Efecto letal del DII en *C. elegans*. A) Imágenes de gusanos no tratados (izquierda) y gusanos tratados con DII (derecha) en medio sólido NGM sembrado con *E. coli* OP50. Los gusanos no tratados (izquierda) presentan la curvatura característica que denotan los animales móviles y vitales. Los gusanos tratados (derecha) aparecen en forma de “C” o completamente rígidos, ambas formas características de

animales muertos. B) Curva dosis-letalidad del DII a las 96 horas de exposición. Gusanos salvajes en estadio L4 se expusieron a un rango de concentraciones del DII (0 – 300 μM) y se cuantificó la muerte a las 96 horas. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill con 4 grados de libertad. $\text{LC}_{50} = 23,44 \pm 1,06$ μM , pendiente = $2,15 \pm 0,25$, $R^2 = 0,99$. Cada punto de concentración representa la media del porcentaje de animales muertos \pm ES de tres experimentos independientes.

Evaluación de la acción del DII sobre otras especies

La potencialidad de una droga antihelmíntica se basa no solo en su poder letal sobre los nematodos, sino también en la especificidad de ese efecto. Un antihelmíntico ideal no presenta efectos tóxicos sobre otros organismos, principalmente en el hospedador del parásito, a las concentraciones utilizadas como nematicidas. Por esta razón, es que una vez que determinamos que la droga DII es letal para *C. elegans* y que las concentraciones efectivas no difieren de las de otros antihelmínticos, quisimos estudiar con mayor profundidad la especificidad nematicida del DII. Con este fin, evaluamos la toxicidad del DII en cultivos de células humanas HEK-293 y en larvas de la mosca *Drosophila melanogaster*.

Primero, expusimos a las células HEK-293 a una concentración de 100 μM de DII durante 96 horas (misma condición en la que se alcanza aproximadamente el 100 % de letalidad en *C. elegans* (Fig. 30B)). Terminado el tiempo de exposición, utilizamos yoduro de propidio (IP) para cuantificar la viabilidad celular. Este colorante penetra únicamente a través de las membranas de células dañadas y se intercala entre las bases del ADN tiñendo exclusivamente el núcleo de las células muertas de color rojo. Como control positivo de muerte celular utilizamos cloroquina (50 μM), una droga antipalúdica que a concentraciones micromolares es tóxica en células HEK-293 (Fig. 31) (Weyermann, Lochmann y Zimmer, 2005). A pesar de los efectos letales en *C. elegans*, observamos que una concentración de 100 μM de DII después de las 96 horas de exposición no afecta la viabilidad de las células HEK-293 (Fig. 31). Por lo general, los agentes farmacológicos se aplican a mayor concentración en *C. elegans* que en nematodos parásitos para ejercer su efecto, debido a su impermeable cutícula (Ruiz-Lancheros *et al.*, 2011). Considerando esto y que el DII no produce efectos tóxicos en células HEK-293 a la concentración nematicida, podríamos sugerir que el DII presenta una letalidad altamente específica en nematodos.

Células HEK-293

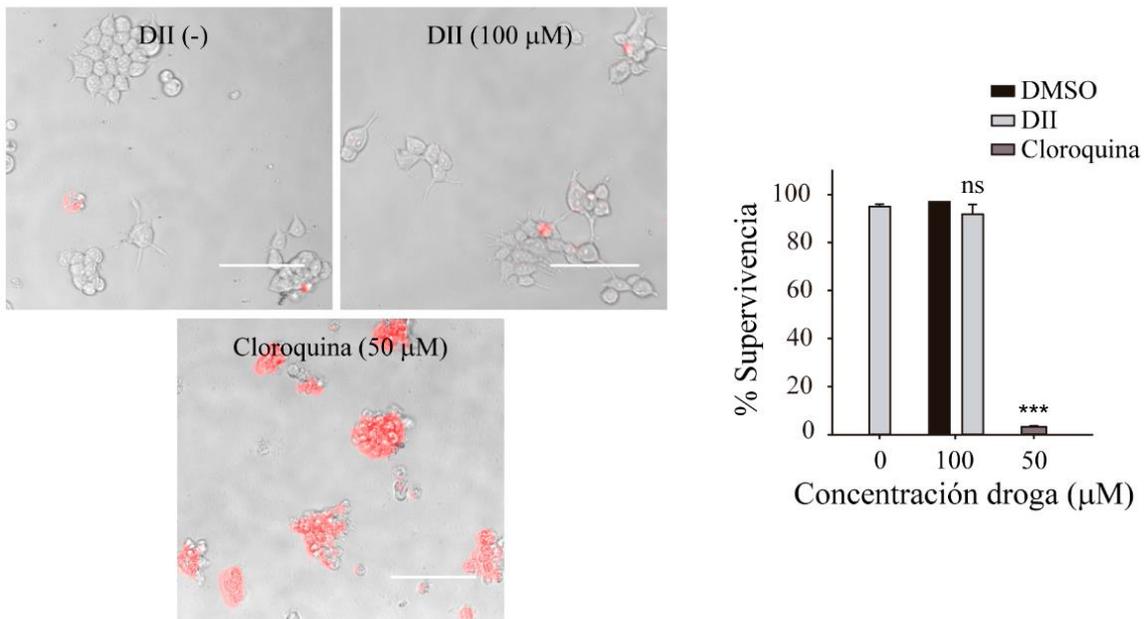


Fig 31. Efecto del DII en células humanas HEK-293. Las células se expusieron al DII (100 µM) y 96 horas después se cuantificó la muerte celular usando yoduro de propidio (IP). Las células teñidas de rojo se consideran muertas (en las tres imágenes de la izquierda). DMSO (0,1%) y cloroquina (50 µM) se utilizaron como control negativo y positivo de muerte celular, respectivamente. Escala de barra: 100 µm. Derecha: cuantificación de la supervivencia celular. Los datos se presentan como la media del porcentaje de células vivas ± ES. Significancia estadística comparada con el control (0 µM de DII) y determinada por prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 3$)

Luego, con el propósito de evaluar la toxicidad del DII en un animal multicelular diferente de *C. elegans*, colaboramos con el Dr. Andrés Garelli, docente de la Universidad Nacional del Sur, investigador del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB-CONICET) y especialista en *D. melanogaster*. Se alimentaron larvas sincronizadas en edad con comida conteniendo DII a concentraciones mayores que las letales para *C. elegans* (300-1200 µM) y se cuantificó el número de animales que alcanzaban el estadio de pupa luego de ~40 horas de exposición. A diferencia de los efectos letales en *C. elegans*, se observó que las concentraciones de DII utilizadas en el ensayo no afectan la viabilidad de las larvas de *D. melanogaster* (Fig. 32).

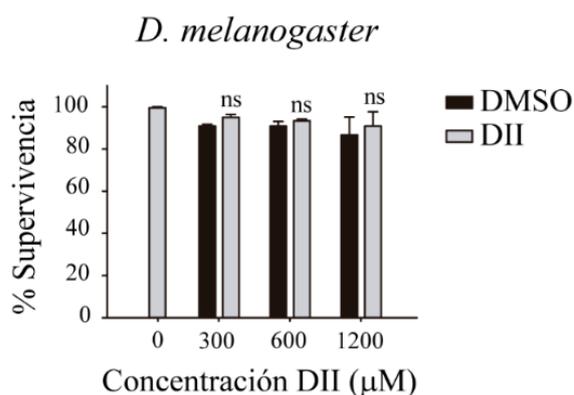


Fig 32. Efecto del DII en *Drosophila melanogaster*. Larvas de mosca se expusieron al DII (300–1200 µM) hasta que abandonaron la comida para pupar. La supervivencia de las larvas se cuantificó como la media del porcentaje de larvas que alcanzaron el estadio de pupa ± ES. Significancia estadística comparada con el control (0 µM de DII) y determinada por prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$; $n = 3$).

En resumen, los resultados hasta el momento, indican que el DII tiene actividad antihelmíntica en *C. elegans* y que concentraciones similares o incluso mayores de DII no afectan la viabilidad de células humanas en cultivo o de larvas de moscas *D. melanogaster*. De igual manera, como ya se ha mencionado previamente, nuestro compuesto tampoco es letal para bacterias. Esta letalidad específica en los nematodos nos incitó a profundizar en el mecanismo molecular del DII ya que podría ser un potencial nuevo antihelmíntico.

Actividad antihelmíntica del DII a menor tiempo de exposición

Previamente a comenzar a evaluar el mecanismo de acción del DII, quisimos investigar si la droga era capaz de producir efectos letales en un período de tiempo menor a las 96 horas. Esta propiedad sería de gran ventaja tanto para acortar los tiempos de la terapia como también para realizar los estudios de búsqueda del blanco molecular ahorrando tiempo de incubación durante los ensayos. Con este propósito, expusimos a gusanos L4 a diferentes concentraciones de la droga (hasta 1 mM). No pudimos evaluar concentraciones superiores a 1mM dado que se comienzan a formar cristales de DII en el NGM. Evaluamos la supervivencia de los gusanos a las 8 y 24 horas de exposición. Graficamos las curvas dosis-respuesta y calculamos las LC50 a cada hora estudiada. Las LC50 fueron $448,5 \pm 1,1$ y $342,3 \pm 1,0$ µM para las 8 y 24 horas, respectivamente (Fig. 33). Como control negativo realizamos el mismo ensayo con el vehículo DMSO al 1 % (concentración de DMSO en la solución de DII a 1 mM). En estas condiciones

observamos un 100% de supervivencia. Esto demuestra que el DMSO no afectó la viabilidad de los gusanos a las concentraciones evaluadas.

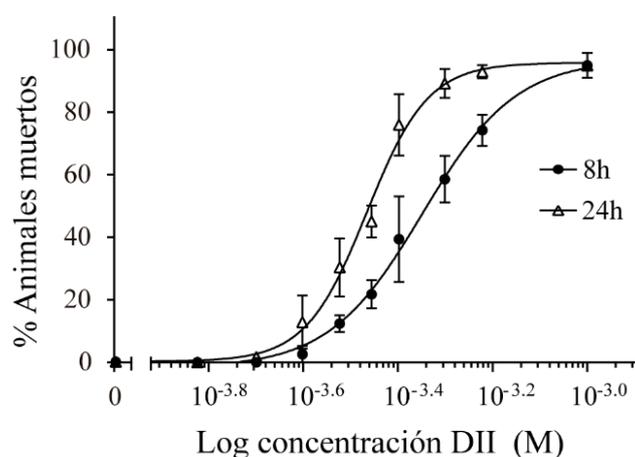


Fig 33. Curvas dosis-letalidad del DII a las 8 (•) y 24 (Δ) horas de exposición. Gusanos salvajes en estadio L4 se expusieron a un rango de concentraciones de DII (0 – 1 mM) y se cuantificaron los animales muertos a las 8 y 24 horas. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill con 4 grados de libertad para construir la curva. 8 h (•) $LC_{50} = 448,5 \pm 1,1 \mu M$, pendiente = $4,4 \pm 0,9$, $R^2 = 0,91$. 24 h (Δ) $LC_{50} = 342,3 \pm 1,0 \mu M$, pendiente = $6,7 \pm 1,3$, $R^2 = 0,95$. Cada punto de concentración representa la media del porcentaje de animales muertos \pm ES de tres experimentos independientes.

Para corroborar la toxicidad de altas concentraciones del compuesto, repetimos el ensayo de citotoxicidad en células HEK-293 en estas condiciones. Expusimos las células a 200 y 600 μM de DII durante 8 horas y nuevamente cuantificamos la viabilidad celular con IP. Como control positivo de muerte celular utilizamos cloroquina (200 μM) (Fig. 34). Como ya habíamos observado para los ensayos de exposición a las 96 horas, las concentraciones de DII que resultaron letales en gusanos en menor tiempo no afectaron la viabilidad de las células HEK-293 (Fig. 34).

Adicionalmente, examinamos la capacidad de recuperación de gusanos tratados con DII (600 μM). Con tal fin, aquellos nematodos que sobrevivieron a la exposición del DII durante 4 y 8 horas, fueron transferidos a cápsula de NGM sin droga. 24 horas luego de la transferencia cuantificamos los animales que aún permanecían vivos. El hecho de que la mayoría de los nematodos tratados con DII y transferidos a otras cápsulas retomaron su crecimiento normal sugiere que el efecto del DII es reversible (Fig. 35).

Células HEK-293

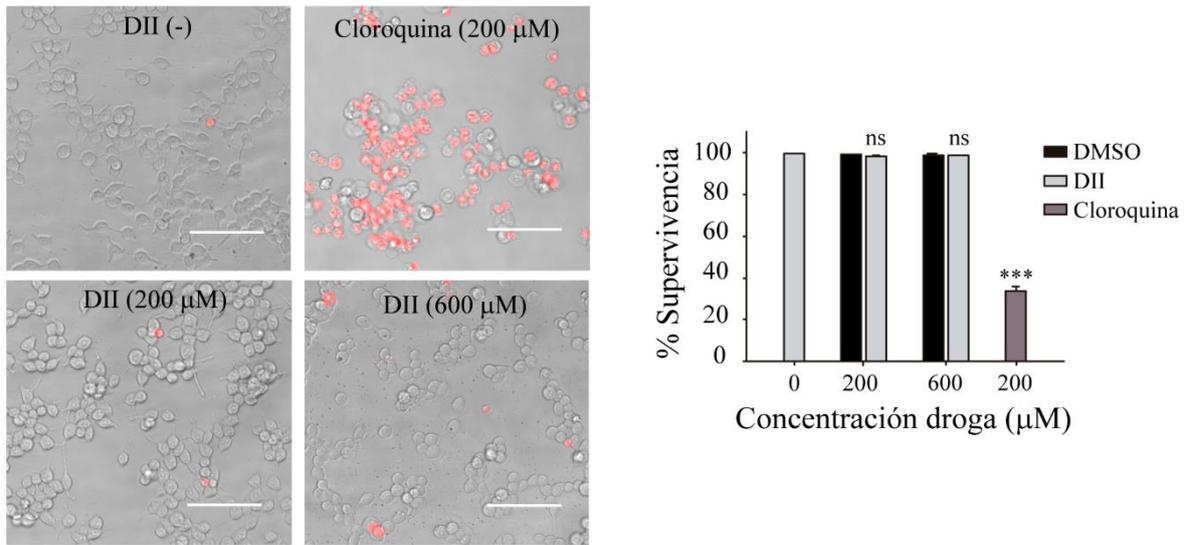


Fig 34. Efecto del DII en células humanas HEK-293. Se expusieron las células al DII (200, 600 μM) y luego de 8 horas de incubación, se cuantificó la muerte celular utilizando yoduro de propidio (IP). Imágenes de la izquierda: células teñidas de rojo se consideran muertas. Escala de barra: 100 μm. Células no tratadas y tratadas con cloroquina (200 μM) se utilizaron como control negativo y positivo, respectivamente. Derecha: cuantificación de la supervivencia celular. Los datos se presentan como la media del porcentaje de células vivas ± ES. Significancia estadística comparada con el control (0 μM de DII) y determinada por prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 3$).

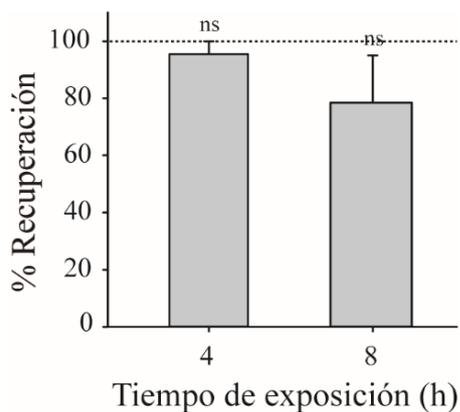


Fig 35. Recuperación luego de la exposición a DII.

Gusanos L4 se expusieron a DII (600 μM). Luego de 4 y 8 horas, los gusanos supervivientes se transfirieron a cápsulas de NGM sin droga. Se cuantificó la viabilidad de los gusanos luego de 24 horas. Gusanos sin tratar se consideraron como el 100 % de viabilidad (línea punteada). Los datos se presentan como la media del porcentaje de gusanos recuperados a las 24 horas ± ES. Las diferencias estadísticas se comparan con los animales sin tratar por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$; $n = 3$).

El DII media sus efectos nematicidas a través de un mecanismo que difiere de los antihelmínticos clásicos

Los resultados presentados hasta el momento nos permitieron demostrar la acción nematicida específica del DII. Por lo tanto, nos propusimos detallar con mayor profundidad los efectos letales del DII y estudiar el mecanismo de acción evaluando su posible blanco molecular. Utilizando herramientas de análisis genético y molecular en *C. elegans* se puede identificar el modo de acción de un compuesto de manera rápida y económica. Optamos como estrategia buscar una alteración en la sensibilidad a DII de cepas mutadas en genes que codifican para blancos moleculares de antihelmínticos actualmente utilizados.

Búsqueda del blanco molecular del DII

Una vez establecidas las condiciones (concentración y tiempo de exposición) del DII que utilizaríamos para investigar su blanco molecular, analizamos la letalidad de varias cepas de *C. elegans* que habían sido previamente reportadas como resistentes a antihelmínticos de uso habitual (Driscoll *et al.*, 1989a; Dent *et al.*, 2000b; Lewis, Wu, Berg, *et al.*, 1980; Miltsch *et al.*, 2012). Utilizamos cepas mutadas en el blanco molecular de los benzimidazoles (β -tubulina), ivermectina (receptor glutamatérgico), de piperazina y emodepsida (receptor GABA), y de los clásicos agonistas de receptores ionotrópicos activados por acetilcolina (AChR) expresados en la unión neuromuscular (levamisol, pirantel, morantel y bfenio) (Martin, 1997). Hasta el momento hay reportados tres tipos mayoritarios de receptores nicotínicos en la unión neuromuscular de *C. elegans*, el tipo N, tipo L y ACR-23 (Fig. 36). Estos receptores pentámericos pertenecen a una superfamilia de canales iónicos activados por ligando. Cuando la acetilcolina (ACh) se une al receptor, el poro del canal se abre y permite el influjo de iones de sodio provocando la despolarización de la célula. El AChR de tipo N es activado principalmente por el agonista Nicotina. Es un receptor homomérico formado por la subunidad α ACR-16 (Fig. 36) (Touroutine *et al.*, 2005). Si bien ningún antihelmíntico presenta afinidad por este receptor, decidimos incluir el mutante nulo *acr-16* en el ensayo, dado a que podría ser un potencial blanco molecular de un fármaco nematicida. Por otro lado, el AChR ACR-23 es un receptor homomérico formado por cinco repeticiones de la subunidad α ACR-23.

Es activado por los ligandos acetilcolina y betaína en *C. elegans* y es el blanco molecular del nuevo antihelmíntico monepantel (Fig. 36) (Kaminsky, 2008). Por último, el receptor AChR de tipo L, activado por Levamisol, está formado por las subunidades UNC-29, UNC-38, UNC-63, LEV-1 y LEV-8 (Fig. 36) (Rayes *et al.*, 2007; Fleming *et al.*, 1997; Culetto *et al.*, 2004; Qian *et al.*, 2008; Boulin *et al.*, 2008). En el ensayo, decidimos utilizar el mutante nulo de la subunidad UNC-29, dado a que es esencial para la funcionalidad del canal (Lewis, Wu, Berg, *et al.*, 1980; Fleming *et al.*, 1997). Las cepas utilizadas, sus genes mutados y sus perfiles de resistencia están detallados en la Tabla 5.

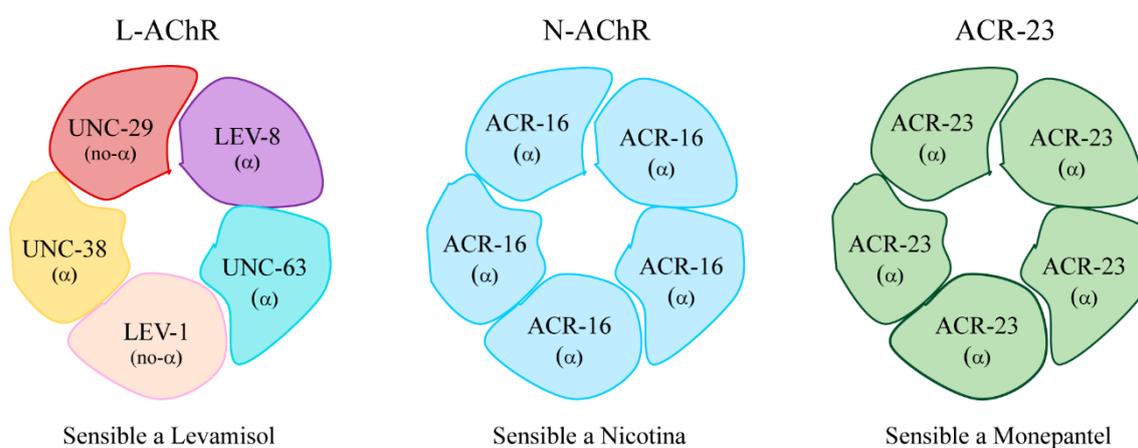


Fig 36. Receptores ionotrópicos activados por ACh descritos en la unión neuromuscular en *C. elegans*. El receptor L-AChR, sensible a levamisol, es heteropentamérico formado por las subunidades α UNC-38, LEV-8 y UNC-63 y las subunidades no- α LEV-1 y UNC-29. El receptor N-AChR, sensible a nicotina, es homopentamérico formado por cinco repeticiones de la subunidad α ACR-16. El receptor ACR-23, sensible a monepantel y betaína, es homopentamérico formado por cinco repeticiones de la subunidad α ACR-23.

Cepa	Genotipo (alelo)	Producto del Gen	Fenotipo
CB3474	<i>ben-1 (e1880)</i> III	β -tubulina	Resistencia a Benzimidazoles
DA1316	<i>avr-14 (ad1305)</i> I <i>avr-15 (vu227)</i> V <i>glc-1 (pk54)</i> V	Receptor Glutamatérgico (canal de cloruro)	Resistencia a Ivermectina
CB407	<i>unc-49 (e407)</i> III	Receptor Gabaérgico	Sensibilidad disminuida a Emodepsida
CB1072	<i>unc-29 (e1072)</i> I	Subunidad de Receptor Nicotínico tipo L	Resistencia a Levamisol
OAR114	<i>acr-23 (ok2804)</i> V	Receptor Nicotínico ACR-23	Resistente a Monepantel
RB918	<i>acr-16 (ok789)</i> V	Receptor Nicotínico tipo N	Sensibilidad a Levamisol

Tabla 5. Cepas mutantes nulas utilizadas en la búsqueda del blanco molecular del DII.

Si alguna de estas cepas mutantes resistentes a los clásicos antihelmínticos no es sensible al DII a concentraciones que matan a gusanos salvajes podríamos deducir que el compuesto actúa a través del blanco molecular que se encuentra mutado. De caso contrario, podríamos concluir que actúa sobre otro blanco molecular o a través de un nuevo mecanismo de acción. Para realizar el ensayo, expusimos gusanos L4 de cada una de estas cepas a 600 μM de DII (concentración a la cual se produce $\sim 90\%$ de muerte de gusanos salvajes en 24 horas) y cuantificamos la supervivencia en las primeras 24 horas de exposición (Fig. 37). Encontramos únicamente que la cepa CB1072 *unc-29* (*e1072*) I es extremadamente resistente a los efectos nematocidas del DII (Fig. 37), lo que sugiere que el DII podría actuar sobre el receptor AChR de tipo L.

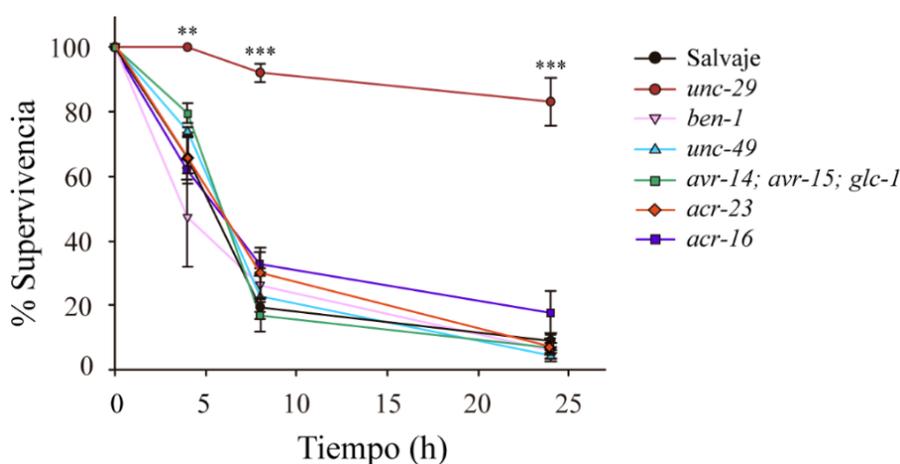


Fig 37. Efecto del DII en cepas mutantes de *C. elegans* que han sido reportadas como resistentes a drogas antihelmínticas. Gusanos salvajes en estadio L4 se expusieron al DII (600 μM) y se cuantificó la supervivencia a las 4, 8 y 24 horas de exposición. Sólo la cepa CB1072 *unc-29* (*e1072*) resultó ser resistente a la actividad nematocida del DII. Los resultados se presentan como la media del porcentaje de supervivencia \pm ES. Las diferencias estadísticas se comparan con la cepa salvaje (\bullet) en cada tiempo. Prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis) (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 3$).

Receptor ionotrópico colinérgico de tipo L

Como mencionamos anteriormente, la subunidad no- α UNC-29 se ensambla con tres subunidades α UNC-38, UNC-63, LEV-8 y una no- α LEV-1 para formar el L-AChR funcional, sensible a levamisol (Fig. 36). El ligando natural ACh se une en la interfase entre una subunidad α y no- α o entre dos subunidades α del receptor. Es decir que las subunidades α son necesarias para la unión del ligando.

Por otro lado, UNC-29, UNC-38 y UNC-63 son esenciales para la funcionalidad del canal, de modo que una mutación en cualquiera de estas subunidades induce una intensa resistencia a levamisol (Lewis, Wu, Berg, *et al.*, 1980; Fleming *et al.*, 1997). Sin embargo, las subunidades LEV-1 y LEV-8 son no esenciales para la respuesta a levamisol o están presentes solo en un subconjunto de receptores, de tal manera que mutaciones en estos dos genes conllevan a una leve resistencia al levamisol (Fleming *et al.*, 1997; Towers *et al.*, 2005).

La subunidad UNC-29 está altamente conservada en otros nematodos parásitos, como *H. contortus*, que pertenece al mismo clado que *C. elegans*, y *A. suum*, del clado III del filo nematoda (Holden-Dye *et al.*, 2013). Esta característica le otorgaría al DII la ventaja de ser un nematicida de amplio espectro.

Con el objetivo de confirmar que el DII actúa como agonista del AChR de tipo L que contiene UNC-29, estudiamos más detalladamente si es capaz de generar efectos farmacológicos similares al levamisol.

El DII y levamisol actúan a través de diferentes mecanismos

Para corroborar que nuestra droga DII actúa sobre el AChR de tipo L clásico de manera similar al levamisol, evaluamos los efectos de ambas drogas. Comparamos cambios anatómicos y de comportamiento que ya han sido atribuidos a la acción del levamisol en el gusano. El levamisol es un potente agonista del AChR muscular que permea iones Na⁺ (Martin *et al.*, 2005). Luego de una exposición breve, el levamisol genera una despolarización sustancial de la membrana celular muscular del nematodo ocasionando una hipercontracción y parálisis (Atchison *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1987; Robertson, Bjorn y Martin, 1999). De igual forma, el levamisol activa los AChRs de los músculos de la vulva del nematodo estimulando la puesta de huevos (Kim *et al.*, 2001). Conociendo estos mecanismos decidimos comparar el efecto de las dos drogas en la locomoción, la longitud del cuerpo y la frecuencia de puesta de huevos de *C. elegans*.

Comenzamos comparando el efecto del levamisol y DII, evaluando la capacidad de ambas drogas de generar una parálisis aguda en la locomoción de *C. elegans*. Para tal fin, cuantificamos el número de gusanos inmóviles luego de 10 minutos de exposición a un amplio rango de concentraciones de droga (0 – 800 µM) disuelta en medio líquido M9 (ver Materiales y Métodos, *Anexo 3*). Con estos datos construimos las curvas dosis-respuesta como el porcentaje de animales paralizados en función del logaritmo de la

concentración de la droga (Fig. 38A). Como ya ha sido previamente publicado, observamos que el levamisol generó una parálisis espástica dependiente de la concentración (Qian *et al.*, 2008), siendo la concentración efectiva 50 (EC50) $63,64 \mu\text{M} \pm 1,1 \mu\text{M}$ (Fig. 38A). El 100 % de los animales se paralizaron a una concentración de $600 \mu\text{M}$ de levamisol. De manera contraria, el DII no indujo una parálisis significativa. Incluso a las concentraciones más altas ($800 \mu\text{M}$) únicamente un 25 % de los animales tratados con DII se encontraron inmovilizados (Fig. 38A). Desafortunadamente, no pudimos evaluar concentraciones más altas de DII, debido a que el DII comenzaba a precipitar en el medio líquido M9.

Dado que la cutícula de *C. elegans* es una importante barrera física que dificulta la absorción de xenobióticos, empleamos un ensayo en el cual se corta la cola en el extremo posterior del gusano para que las drogas alcancen con mayor facilidad los tejidos internos. De esta manera, los efectos de los compuestos farmacológicos se consiguen a menores concentraciones que en gusanos intactos (Ruiz-Lancheros *et al.*, 2011). Como ha sido previamente reportado, en gusanos cortados se alcanzó la parálisis a concentraciones muy bajas de levamisol ($10 \mu\text{M}$) (Fig. 38B). Sin embargo, altas concentraciones de DII ($600 \mu\text{M}$) fallaron en producir una parálisis significativa incluso en gusanos cortados (Fig. 38B). Analizamos también la parálisis inducida por las drogas en la cepa CB407, la cual posee una mutación nula en el gen codificante para el receptor de GABA muscular, UNC-49 (Tabla 5). A diferencia de vertebrados, en los cuales GABA actúa en el sistema nervioso central, en nematodos, GABA actúa principalmente en sinapsis neuromusculares. GABA inhibe la contracción de los músculos ventrales y dorsales del animal durante su locomoción. La curvatura generada durante la locomoción se debe a la contracción de los músculos de un lado del cuerpo generada por ACh y la relajación producida por GABA del lado opuesto, dándole la postura sinusoidal característica a *C. elegans* (Fig. 38C) (Jorgensen, 2005). El mutante nulo *unc-49*, es hipersensible a los efectos paralizantes de los agonistas del L-AChR, como levamisol y pirantel, debido a que no puede contrarrestar la contracción (Vashlishan *et al.*, 2008). Encontramos que, incluso en este mutante hipersensible a la parálisis, nuestra droga DII es incapaz de inmovilizar a los animales (Fig. 38D).

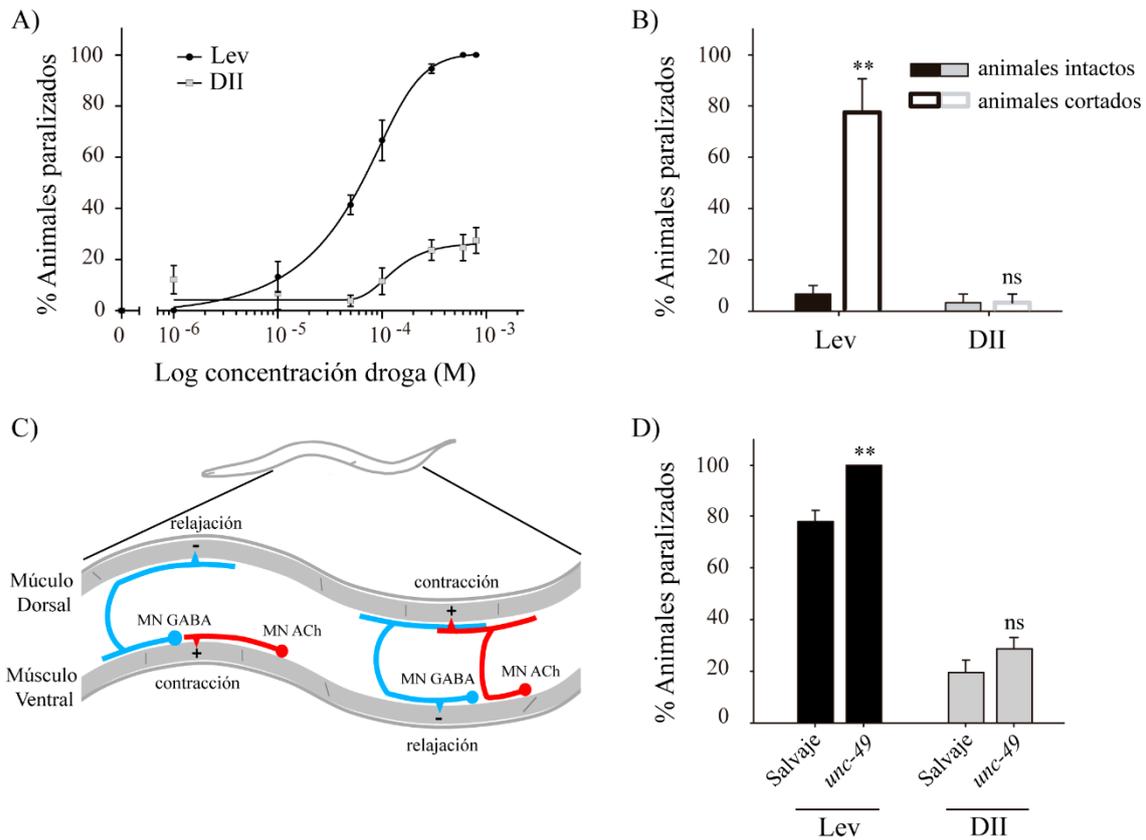


Fig 38. Ensayos de parálisis aguda en medio líquido comparando los efectos del levamisol y el DII.

A) Curva dosis-respuesta de parálisis de levamisol (• Lev) y DII (□). Se expusieron animales en estadio L4 a concentraciones crecientes de levamisol y de DII (0 – 800 μ M) y 10 minutos después se cuantificaron los animales paralizados. La respuesta de parálisis de levamisol alcanza la eficacia máxima, mientras que el DII genera una respuesta máxima del 25% a la concentración más alta. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill con 5 grados de libertad para construir la curva dosis-respuesta. Lev (•) $EC_{50} = 63,6 \pm 1,1 \mu$ M, pendiente = $2,39 \pm 1,37$, $R^2 = 0,97$. DII (□) pendiente = $1,96 \pm 2,31$, $R^2 = 0,49$ (no se calculó la EC_{50} al no haber alcanzado la eficacia máxima). Cada punto de concentración representa la media del porcentaje de animales paralizados \pm ES de tres experimentos independientes. B) Ensayo de parálisis aguda con gusanos cortados. Se expusieron gusanos adultos jóvenes intactos y cortados (ver Materiales y Métodos) a levamisol (10 μ M) o DII (600 μ M) y a los 10 minutos se cuantificó la parálisis. El DII es incapaz de inducir parálisis incluso en gusanos cortados. Los datos se presentan como la media del porcentaje de animales paralizados \pm ES. La significancia estadística comparada con los gusanos intactos es determinada por la prueba *t-student* (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 3$). C) Esquema de la conectividad de las motoneuronas gabaérgicas (MN GABA) y las motoneuronas colinérgicas (MN ACh). Los cuerpos neuronales se hallan en el cordón ventral. La liberación de ACh induce la contracción de un lado de la pared muscular, mientras que GABA produce relajación muscular del lado opuesto. La estimulación y la inhibición contralateral permite que el cuerpo del animal se curve y genere una locomoción coordinada. D) Ensayo de parálisis aguda con la cepa mutante CB407 *unc-49* (*e407*). Se expusieron gusanos L4 a levamisol y DII (100 μ M) y a los 10 minutos se cuantificó la parálisis. La cepa CB407 es hipersensible a levamisol. No hay diferencias significativas entre animales salvajes y mutantes CB407 tratados con DII. Los datos se

presentan como la media del porcentaje de las animales paralizados \pm ES. La significancia estadística comparada con gusanos salvajes es determinada por la prueba *t-student* (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, $^{**}p < 0,01$; $n = 4$).

Dado que los agonistas de AChRs generan contracción muscular, la exposición a levamisol produce un encogimiento del cuerpo del gusano (Glenn *et al.*, 2004). A pesar de que el DII no genera una parálisis aguda potente, quisimos determinar si era capaz de inducir algún grado de contracción muscular como el levamisol. Con tal fin, medimos la longitud del cuerpo de los animales luego de 2 horas de exposición a las drogas (600 μ M). Utilizamos este tiempo debido a que en este lapso de exposición se comienza a ejercer el efecto del DII (~ 10 % de muerte a 600 μ M) (Fig. 39). Este ensayo lo realizamos en medio sólido NGM con OP50 como fuente de comida y utilizamos DMSO (vehículo) como control negativo. A diferencia del encogimiento del gusano generado por la contracción muscular masiva producida por el levamisol, el DII no fue capaz de generar cambios significativos en la longitud del animal (Fig. 39).

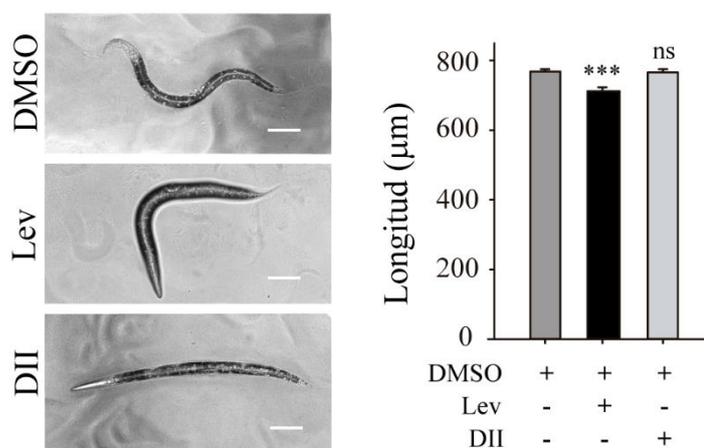


Fig 39. Longitud del cuerpo después de 2 horas de tratamiento con levamisol (Lev) o DII (600 μ M). Escala de barra: 100 μ m. El tratamiento con levamisol disminuye la longitud de los animales con respecto al control DMSO. El DII no modifica la longitud de los gusanos. Los resultados se presentan como la media de la longitud (μ m) \pm ES. La significancia estadística con respecto al control con DMSO es determinada con la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, $^{***}p < 0,001$; $n = 20$)

El ultimo parámetro de comparación entre la acción de levamisol y DII fue la puesta de huevos. Como ya se mencionó previamente, el levamisol es un potente agonista del L-AChR y que, de la misma manera que induce la contracción muscular a lo largo del

gusano, aumenta la contracción de los músculos de la vulva estimulando la deposición de huevos. A pesar de que el DII no generó una contracción muscular aguda, quisimos determinar si era capaz de modificar la frecuencia de la puesta de huevos actuando sobre los receptores L-AChR de la vulva. Para comparar los efectos sobre la puesta de huevos del levamisol y DII, expusimos a animales grávidos a 100 y 300 μM de ambas drogas durante 1 hora y luego cuantificamos los huevos depositados sobre el NGM (Fig. 40). Dado que el levamisol y el DII no afectaron la viabilidad de los gusanos a estas concentraciones en 1 hora, podemos descartar que en nuestras condiciones experimentales, la letalidad de los gusanos afectaran la puesta de huevos. Como era de esperar el tratamiento con levamisol aumenta significativamente la puesta de huevos. Ésta se incrementó 3,8 y 3,2 veces con respecto al control para 100 y 300 μM de levamisol, respectivamente (Fig. 40). Por el contrario, el DII no aumentó el número de huevos depositados a una concentración de 100 μM . Incluso, observamos una reducción de 3,6 veces en la cantidad de huevos depositados a 300 μM de DII (Fig. 40). En conjunto, los resultados obtenidos demuestran claramente que el DII no es un agonista clásico de L-AChRs, como lo son el levamisol y el pirantel.

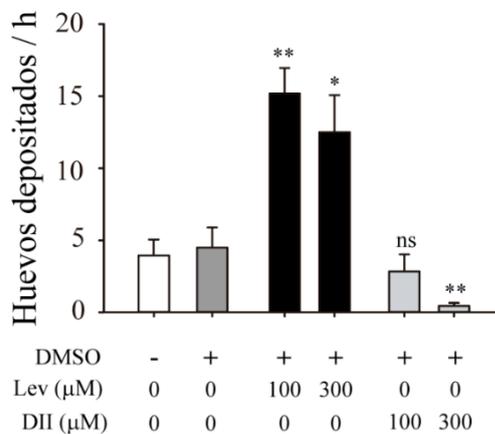


Fig 40. Tasa de deposición de huevos de animales tratados con levamisol (Lev) o DII. Se expusieron adultos grávidos a las drogas durante una hora y se cuantificaron los huevos depositados en el NGM. El levamisol aumenta la deposición de huevos, mientras que el DII genera el efecto contrario a 300 μM . Los datos se expresan como la media del número de huevos depositados por animal en una hora \pm ES. La significancia estadística comparada con el control de DMSO es determinada con la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 4$).

Sabiendo que el DII actúa sobre un AChR conteniendo la subunidad UNC-29 sin ejercer su efecto como los agonistas que están en el mercado, consideramos la posibilidad que el DII se comporte como un antagonista del L-AChR. . Para evaluar esto, analizamos la capacidad del DII de antagonizar el efecto del agonista levamisol y expusimos animales a concentraciones crecientes de levamisol (1 – 600 μM) y a dos concentraciones constantes de DII (100 y 200 μM). Luego de 10 minutos de exposición cuantificamos los animales paralizados. Construimos las curvas dosis-respuesta de la misma manera que se mencionó previamente. La presencia del DII no logró desplazar la curva dosis-respuesta del levamisol en animales intactos (Fig. 41A). De igual modo, el DII no afectó la respuesta del levamisol en gusanos cortados en la cola (Fig. 41B). Para descartar la posibilidad de que el DII no pudiese antagonizar el efecto del levamisol debido a una diferencia de afinidades por el receptor, evaluamos si una exposición previa y más larga de DII afectaba la respuesta del levamisol. Con esta finalidad, repetimos las curvas dosis-respuesta al levamisol en animales que habían sido preincubados con DII 100 μM durante 24 horas. No observamos ninguna diferencia en la sensibilidad al levamisol entre animales preincubados con DII y no tratados (Fig. 41C). Estos resultados sugieren que el DII tampoco actúa como una droga antagonista en el receptor L-AChR clásico.

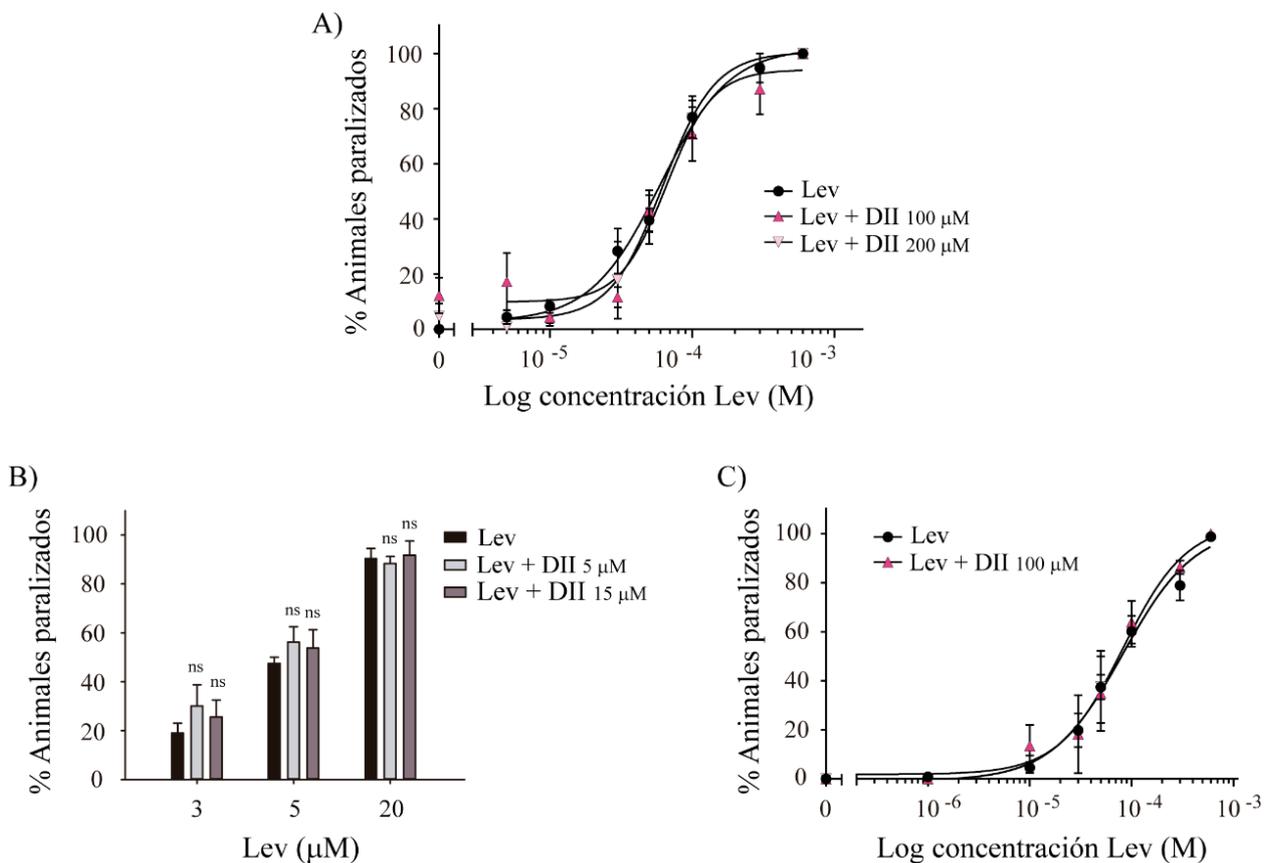


Fig 41. Ensayos de parálisis aguda de levamisol en presencia de DII. A) Curvas dosis-respuesta de levamisol en presencia de DII. Se expusieron gusanos L4 a un rango de concentraciones crecientes de levamisol (Lev) (0 – 600 μ M) solo y en presencia de dos concentraciones constantes de DII (100 y 200 μ M). Se cuantificó la parálisis a los 10 minutos de incubación. No detectamos diferencias significativas entre las tres curvas dosis-respuesta. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill con 4 grados de libertad para construir la curva dosis-respuesta. (●) $EC_{50} = 60,00 \pm 1,12 \mu$ M, pendiente = $1,78 \pm 0,36$, $R^2 = 0,91$, (▲) $EC_{50} = 66,03 \pm 1,15 \mu$ M, pendiente = $2,65 \pm 0,81$, $R^2 = 0,90$, (♣) $EC_{50} = 62,25 \pm 1,14 \mu$ M, pendiente = $2,36 \pm 0,61$, $R^2 = 0,93$. Cada punto de concentración representa la media del porcentaje de animales paralizados \pm ES de tres experimentos independientes. B) Ensayo de parálisis aguda de levamisol en presencia de DII en gusanos cortados. Se expusieron gusanos adultos jóvenes cortados a levamisol (3, 5, 20 μ M) solo y en presencia de dos concentraciones constantes de DII (5 y 15 μ M). Similar a las observaciones con gusanos intactos, la presencia de DII no disminuye la parálisis inducida por levamisol en gusanos cortados. Los datos se presentan como la media del porcentaje de animales paralizados \pm ES. La significancia estadística comparada con gusanos tratados con levamisol (Lev) solo es determinada por la prueba ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$; $n = 3$). C) Curvas dosis-respuesta de levamisol en animales preincubados con DII. Se expusieron animales L4 a DII (100 μ M) por 24 horas. Luego de este tratamiento, se expusieron a un rango de concentraciones de levamisol (0 – 600 μ M) en presencia de DII (100 μ M). Las curvas control se llevaron a cabo de manera similar, sin la adición de DII en la preincubación y en el ensayo de parálisis. No se observan diferencias entre los gusanos preincubados y el control. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill con 4 grados de libertad para construir la curva dosis-respuesta. (●) $EC_{50} = 82,43 \pm 1,23 \mu$ M, pendiente = $1,23 \pm 0,26$, $R^2 = 0,95$. (▲) $EC_{50} = 82,22 \pm 1,39 \mu$ M, pendiente = $1,38 \pm 0,54$, $R^2 = 0,88$. Cada punto de concentración representa la media del porcentaje de animales paralizados \pm ES de tres experimentos independientes.

Dado que los resultados previos indican que el DII no induce los mismos efectos que el levamisol y tampoco los antagoniza, quisimos corroborar que nuestra droga DII realmente actuara sobre el AChR de tipo L clásico que contiene la subunidad UNC-29. Con este objetivo, evaluamos la sensibilidad al DII de los mutantes nulos en todas las demás subunidades de este receptor. En la tabla 6 se resume la información básica de cada cepa mutada en estas cinco subunidades que utilizamos en el ensayo.

Cepa	Subunidad AChR mutada	Tipo de subunidad	Fenotipo del mutante a levamisol
CB1072	UNC-29	No α	Fuerte resistencia a levamisol
ZZ26	UNC-63	α	Fuerte resistencia a levamisol
CB904	UNC-38	α	Fuerte resistencia a levamisol
OAR60	LEV-1	No α	Leve resistencia a levamisol
OAR59	LEV-8	α	Leve resistencia a levamisol

Tabla 6. Cepas mutantes nulas de cada subunidad del receptor L-AChR. Se detallan las subunidades del tipo α y no- α , y la resistencia a levamisol del mutante nulo de cada subunidad.

Expusimos los mutantes nulos *unc-38* (*e264*), *unc-63* (*x26*), *lev-8* (*ok1519*) y *lev-1* (*ok3201*) a DII (600 μ M) en NGM sólido sembrado con *E. coli* OP50 como fuente de comida. Utilizamos gusanos salvajes y mutantes nulos *unc-29* como controles positivo y negativo, respectivamente. A diferencia de los ensayos de letalidad anteriores realizados en 24 horas, decidimos extender este ensayo hasta las 72 horas para corroborar con mayor seguridad la resistencia o sensibilidad de las distintas cepas. Cuantificamos la supervivencia de los animales a las 24, 48 y 72 horas de exposición al DII (Fig. 42). Inesperadamente, los mutantes nulos *unc-63* y *lev-8* son tan sensibles al DII como los gusanos salvajes. Asimismo, los mutantes nulos *unc-38* y *lev-1* que parecen ser levemente resistentes al DII a tiempos cortos de exposición, no exhiben diferencias significativas con respecto a los gusanos salvajes luego de 48 horas de exposición (Fig. 42). Estos resultados confirman que el mecanismo de acción del DII difiere de aquel reportado por antihelmínticos clásicos que actúan sobre receptores colinérgicos nicotínicos de tipo L.

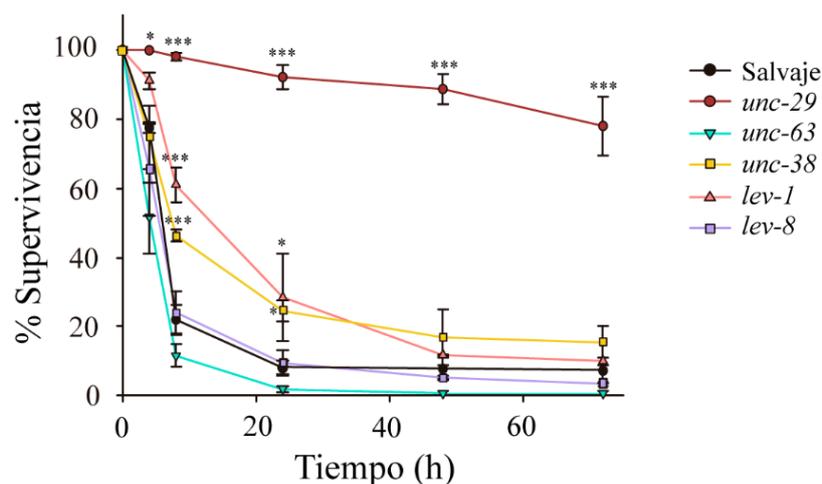


Fig 42. Efecto nematocida del DII en mutantes nulos de las subunidades del L-AChR. Se expusieron gusanos L4 a DII (600 μ M) y se cuantificó la supervivencia a las 4, 8, 24, 48 y 72 horas. Únicamente el

mutante nulo *unc-29* es más resistente a los gusanos salvajes a las 72 horas de exposición. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de supervivencia \pm ES. La significancia estadística comparada con gusanos salvajes en cada tiempo es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis) (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 3$).

Identificación del tejido donde actúa el DII

Si bien UNC-29 se expresa principalmente en músculo, también se expresa en otros tipos celulares, como neuronas (Fleming *et al.*, 1997; Jones y Sattelle, 2004). Según nuestros resultados anteriores, podríamos hipotetizar que el efecto del DII depende de un receptor que contiene UNC-29, diferente del clásico receptor nicotínico muscular, dado que no genera la hipercontracción muscular característica generada por los fármacos agonistas colinérgicos. Con el objeto de testear esta posibilidad analizamos la letalidad producida por DII en la cepa transgénica OAR61 (*pmyo-3::unc-29; unc-29 (e1072) I*). La cepa OAR61 se generó mediante la microinyección de un plásmido formado por el gen *unc-29* bajo el control del promotor *myo-3* (el cual regula los genes de la cadena pesada de miosina que se expresan en músculo de la pared corporal) en las gónadas de un mutante nulo *unc-29* hermafrodita (ver Materiales y Métodos). De esta manera, la subunidad UNC-29 será expresada únicamente en el músculo del cuerpo del animal. Observamos que la expresión muscular de *unc-29* rescata completamente los efectos letales generados por la exposición a DII durante 24 horas hasta niveles de gusanos salvajes (Fig. 43A). Asimismo, observamos los mismos resultados al exponer a esta cepa OAR61 a menores concentraciones de DII (50 μ M) durante 96 horas (Fig. 43B). Por lo tanto, podemos concluir que el DII actúa a través de un AChR expresado en músculo que contiene la subunidad UNC-29, el cual es diferente al L-AChR muscular clásico.

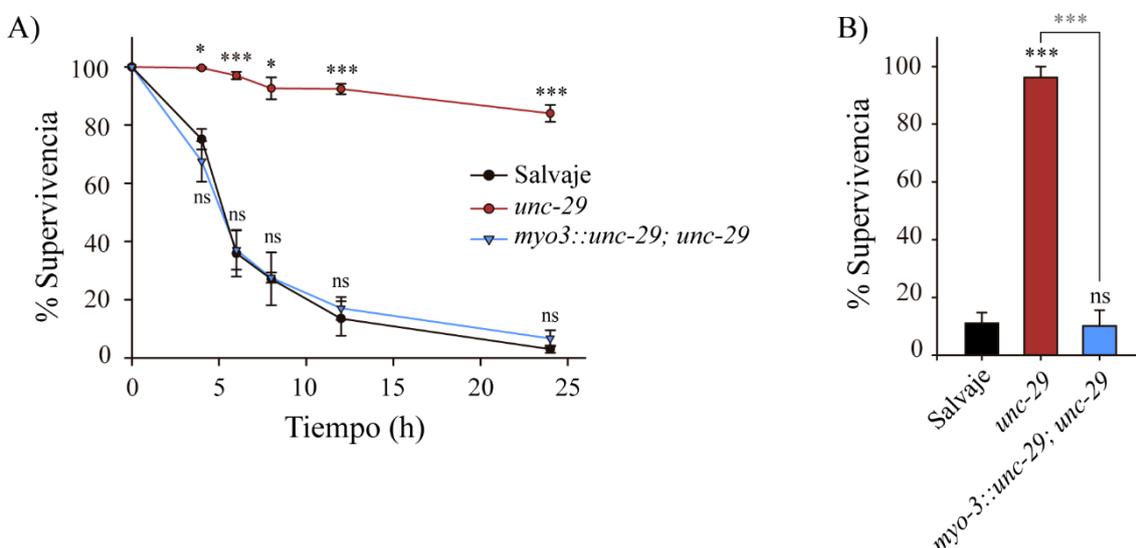


Fig 43. La expresión muscular de UNC-29 restaura la sensibilidad al DII. A) Gusanos salvajes, mutantes nulos *unc-29* y *myo-3::unc-29;unc-29* se expusieron a DII (600 μ M) y se cuantificó su supervivencia a las 4, 6, 8, 12 y 24 horas. Los gusanos *myo-3::unc-29; unc-29* son tan sensibles al DII como los gusanos salvajes. Los datos se presentan como la media del porcentaje de supervivencia \pm ES. La significancia estadística comparada con gusanos salvajes es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 3$). B) La exposición hasta 96 horas se llevó a cabo de manera similar pero a una concentración de DII de 50 μ M. Los datos se presentan como la media del porcentaje de supervivencia \pm ES. La significancia estadística es determinada por la prueba de ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 3$).

Efectos adicionales del DII en nematodos

Si bien publicaciones previas (Avery y Horvitz, 1990) demuestran que UNC-29 no está involucrado en el bombeo faríngeo, quisimos estudiar si el DII era capaz de generar un efecto adicional y afectar la contracción de la faringe. Cuando drogas antiinfecciosas son capaces de actuar sobre más de un blanco molecular del patógeno, suelen ejercer tratamientos más efectivos y disminuir el desarrollo de resistencias.

Para evaluar los bombeos de la faringe, expusimos gusanos adultos a distintas concentraciones de DII (100, 300 y 600 μ M) en medio sólido y luego de 1 hora cuantificamos las contracciones del bulbo terminal de la faringe (Fig. 44A). Observamos que la frecuencia del bombeo faríngeo de gusanos salvajes disminuye en presencia del DII (Fig. 44B). Para corroborar que UNC-29 no está involucrado en los bombeos del músculo faríngeo y que el DII afecta las contracciones de la faringe a través de otro mecanismo, repetimos el ensayo en mutantes nulos *unc-29*. Observamos que al igual que en gusanos salvajes, el DII disminuye el número de bombeos faríngeos en *unc-29* (Fig. 44B).

A pesar de que estos resultados demuestran que el DII puede actuar a través de diferentes blancos moleculares para afectar el bombeo faríngeo, el hecho de que los mutantes nulos *unc-29* puedan sobrevivir a la exposición de DII sugiere que la reducción de la frecuencia de bombeo no media los efectos letales del DII.

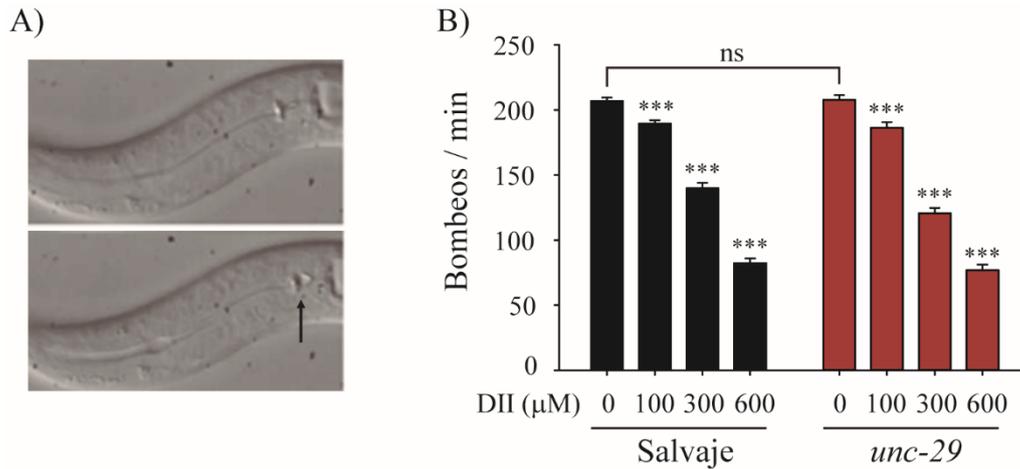


Fig 44. Efectos del DII en el bombeo faríngeo. A) Imagen de una contracción del bulbo terminal de la faringe (señalado con la flecha negra). En la imagen superior, la faringe está cerrada y en la inferior se abre para permitir el pasaje de la comida. Extraído del *Wormbook* (Raizen *et al.*, 2012). B) Gusanos adultos jóvenes (24 horas después de L4) salvajes y mutantes nulos *unc-29* se transfirieron a cápsulas de NGM con DII (100, 300 y 600 μ M), sembradas con *E. coli* OP50. Luego de una hora de exposición se cuantificaron las contracciones del bulbo terminal de la faringe (bombeos faríngeos). DII disminuye el bombeo faríngeo de ambas cepas. Los datos se expresan como la media de los bombeos faríngeos por minuto \pm ES. Significancia estadística comparada con la condición no tratada (0 μ M de DII) dentro de la misma cepa (prueba ANOVA simple, análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak; *** $p < 0,001$; $n = 20$) y entre las condiciones no tratadas de cada cepa (*t-student*; ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$)

Hasta aquí nuestros resultados demuestran que el DII induce letalidad en *C. elegans* a través de un AChR muscular que contiene UNC-29, diferente al L-AChR hasta ahora conocido. Demostramos también que es capaz de disminuir el bombeo faríngeo y la deposición de huevos, lo cual serían mecanismos beneficiosos para evitar el incremento de la progenie del parásito. En conclusión, podemos afirmar con evidencias claras, que encontramos una droga que actúa a través de un blanco molecular nuevo: un AChR distinto al de los antihelmínticos colinérgicos clásicos, cuya estequiometría es aún desconocida. Adicionalmente, podríamos inferir que es capaz de actuar a través de más de un mecanismo.

El DII es activo en estadios inmaduros de *C. elegans*

Unos de los principales objetivos de la terapia antihelmíntica es eliminar a los parásitos independientemente de su estadio de desarrollo. En general, los estadios inmaduros son más resistentes a los nematicidas clásicos como el levamisol (Martin *et al.*, 2005). Para evaluar los efectos de DII en etapas tempranas del desarrollo del nematodo, expusimos huevos a diferentes concentraciones de DII (100, 300 y 600 μM). Primero, obtuvimos los huevos lisando gusanos grávidos con una solución de hipoclorito de sodio (ver Materiales y Métodos) y luego los expusimos a la droga en cápsulas de NGM sólido sembradas con *E. coli* OP50. Encontramos que luego de 48 horas de exposición al DII (600 μM), el número de animales vivos con respecto al número de huevos que habían sido sembrados en las cápsulas, se había reducido significativamente (Fig. 45A). Asimismo, mientras la mayoría de los huevos no tratados alcanzaron el estadio adulto luego de 72 horas, menos del 5 % de los animales que sobrevivieron la exposición al DII eran adultos (Fig. 45B). Por lo tanto, podemos concluir que el tratamiento con DII afecta los estadios inmaduros y retrasa el desarrollo de los nematodos.

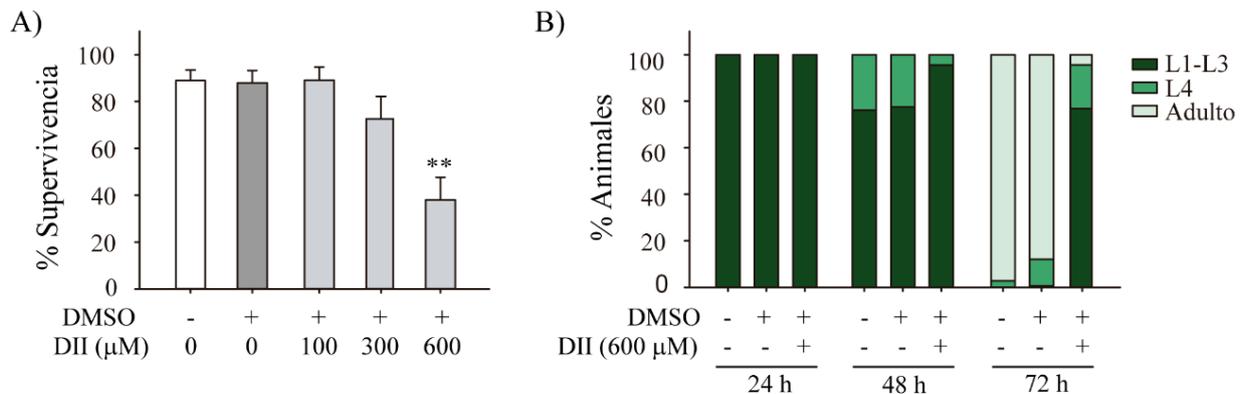


Fig 45. Efecto del DII desde huevos. A) Actividad antihelmíntica del DII desde huevos. Huevos aislados se expusieron al DII (0 - 600 μM) y 48 horas después se cuantificaron los animales vivos. Los datos se expresan como la media del porcentaje de supervivencia en función del número inicial de huevos \pm ES. La significancia estadística comparada con el control de DMSO es determinada por la prueba ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) (** $p < 0,01$; $n = 3$). B) Efecto del DII en la tasa de desarrollo. Los huevos se expusieron al DII (600 μM) y se clasificaron los estadios de los animales a las 24, 48 y 72 horas. L1-L3: estadios larval tempranos. L4: último estadio larval. El porcentaje de animales en cada estadio es relativo al número de animales vivos a esa hora indicada ($n = 3$).

Dado que en el experimento anterior expusimos a los animales al DII durante todo el ensayo, no fuimos capaces de discriminar si la disminución de los animales vivos se debió a la acción de la droga en los huevos, en los estadios larvarios o en ambos. Para evaluar de manera inequívoca el potencial ovicida del DII, aislamos huevos nuevamente y los filmamos mientras eclosionaban en presencia o ausencia de la droga. De manera similar a las condiciones control, ~100% de los huevos expuestos a DII lograron eclosionar en un período de tiempo de 12 horas (video 3: eclosión de huevos no tratados, <https://youtu.be/H5HeJGWP-K8>, y video 4: eclosión de huevos tratados con DII 600 μ M, <https://youtu.be/IU8aQWvO6kE>). Esto sugiere que el efecto letal observado en estadios inmaduros se debe a una actividad larvicida de la droga DII.

Para confirmar el efecto larvicida observado, aislamos larvas en el estadio L1 de gusanos salvajes (ver Materiales y Métodos) y cuantificamos su supervivencia luego de 24, 48 y 72 horas de exposición al DII. Encontramos una significativa disminución en el número de larvas viables de los animales tratados con DII (Fig. 46A). Estos resultados demuestran que además de ser letal en estadios maduros, el DII también afecta a estadios larvarios.

Luego de demostrar que el DII es activo en estadios inmaduros, nos preguntamos si esa actividad larvicida estaba mediada también por UNC-29. Con esa finalidad, analizamos el efecto del DII en estadios larvarios de mutantes nulos *unc-29*. Inesperadamente, los gusanos mutantes nulos *unc-29* fueron tan sensibles a los efectos larvicidas del DII, como la cepa salvaje (Fig. 46B). De la misma manera, observamos que el desarrollo de los gusanos mutantes nulos *unc-29* estaba retrasado en presencia del DII (Fig. 46C). Estos resultados demuestran que a diferencia de los efectos en gusanos adultos, UNC-29 no está involucrado en el efecto larvicida del DII. Al igual que los gusanos mutantes nulos *unc-29*, larvas *unc-38*, *unc-63*, *lev-8* y *lev-1* son sensibles al DII (Fig. 47). Podemos concluir entonces, que el efecto larvicida no involucra a ninguna de las cinco subunidades del L-AChR clásico. Otro AChR aún no identificado u otro tipo de diana molecular podría estar mediando la letalidad en estadios inmaduros.

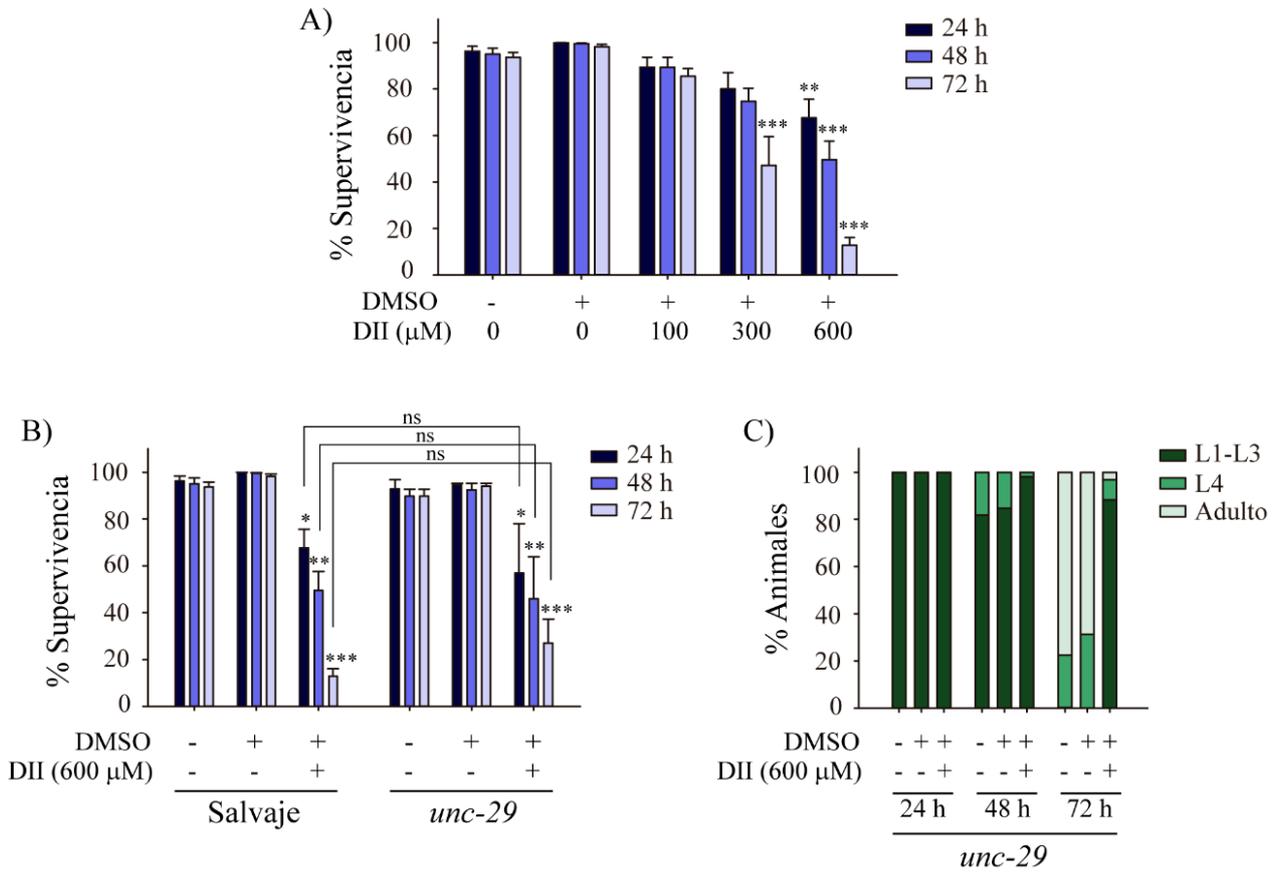


Fig 46. Efectos del DII en larvas. A) Larvas L1 se expusieron al DII (100, 300 y 600 μM) y se cuantificaron los animales vivos a las 24, 48 y 72 horas. B) Se llevó a cabo el mismo ensayo evaluando también la supervivencia de la cepa mutante nula *unc-29* desde L1 en presencia del DII (600 μM). Los datos están presentados como la media del porcentaje de supervivencia ± ES. La significancia estadística comparada con el control (0 μM de DII) a la misma hora es determinada por la prueba ANOVA simple (análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) y comparada entre ambas cepas a cada hora es determinada por la prueba *t-student* (ns: estadísticamente no significativo $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 3$). C) Desarrollo de larvas mutantes *unc-29*. Huevos aislados se expusieron al DII (600 μM) y se clasificaron los estadios de los animales a las 24, 48 y 72 horas. L1-L3: estadios larval tempranos. L4: último estadio larval. Similar a los gusanos salvajes (Fig 45B) el DII retrasa el desarrollo de gusanos mutantes nulos *unc-29* desde larvas L1. El porcentaje de animales en cada estadio es relativo al número de animales vivos a esa hora indicada ($n = 3$).

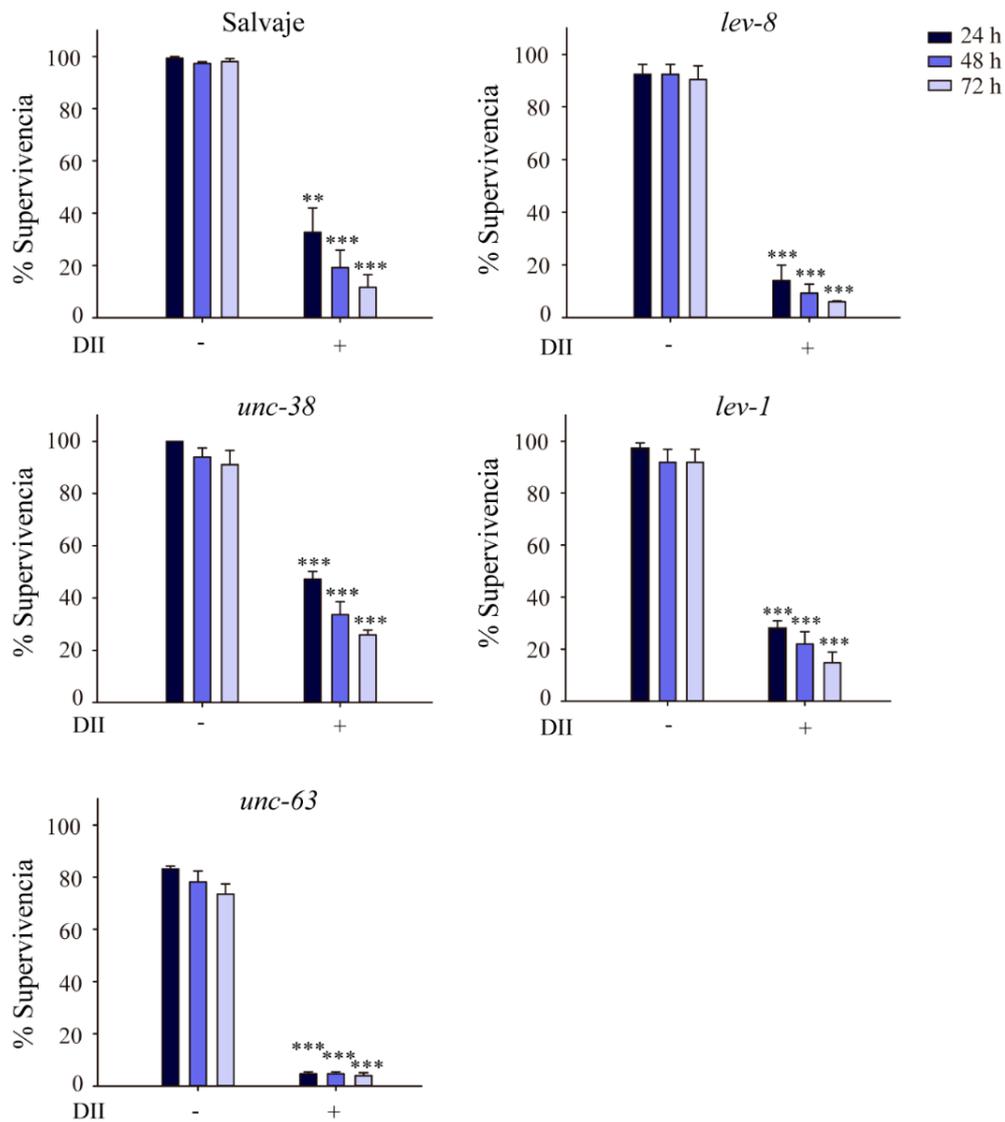


Fig 47. Efecto larvicida del DII en cepas mutantes de subunidades del receptor L-AChR. Larvas L1 de gusanos salvajes, y mutantes nulos de *unc-38*, *unc-63*, *lev-1* y *lev-8* se expusieron al DII (600 μ M) y se cuantificaron los animales vivos a las 24, 48 y 72 horas. Los datos están presentados como la media del porcentaje de supervivencia \pm ES. La significancia estadística comparada con el control (DII (-)) a la misma hora es determinada por la prueba *t*-student (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 3$).

Teniendo en cuenta todos nuestros resultados, en este trabajo encontramos una nueva droga con actividad antihelmíntica específica utilizando como modelo al nematodo *C. elegans*. El mecanismo de acción del DII varía según el estadio de desarrollo del gusano: mientras que el efecto nematicida depende de la subunidad UNC-29 de un AChR muscular no identificado en gusanos maduros, la actividad larvicida involucra un mecanismo diferente que requiere de mayor estudio para poder ser identificado.

Discusión

En las últimas décadas, en los países más desarrollados, las infecciones generadas por gusanos parásitos han ido desapareciendo gradualmente gracias a la mejora en las condiciones sanitarias. Sin embargo, aún hoy en día prevalecen en regiones empobrecidas, con contaminación en el ambiente y falta de higiene (https://www.who.int/topics/tropical_diseases/qa/faq). Es preocupante que estas enfermedades estén desatendidas debido a la ausencia de rentabilidad que presenta el desarrollo de fármacos para el uso en zonas de gran pobreza. Tanto el escaso desarrollo de antihelmínticos en los últimos años (Kaminsky, 2008; Holden-Dye y Walker, 2014) como la expansión de parásitos resistentes a los antihelmínticos del mercado (Horton, 2003), hace inminente la necesidad de incentivar la investigación de moléculas con potencial antiparasitario. La dificultad de realizar estudios con nematodos parásitos a gran escala en el laboratorio hace que *C. elegans* sea una opción atractiva para efectuar cribados de moléculas con potencial antihelmíntico. En este capítulo de la tesis realizamos un cribado de derivados imidazólicos en *C. elegans* con el objetivo de identificar nuevos compuestos con efectos antihelmínticos. Encontramos que un compuesto, el diisopropilfenil-imidazol (DII) ejerce efectos nematocidas en estadios maduros e inmaduros de *C. elegans*. A pesar de que los efectos nematocidas del DII en animales adultos dependen de la subunidad UNC-29 de tipo no- α del receptor nicotínico, aparentemente el receptor no es el clásico AChR sensible a levamisol. Asimismo, encontramos que el efecto larvicida no depende de la subunidad UNC-29.

El compuesto DII presenta actividad nematocida específica

Entre los once compuestos evaluados, únicamente el mesitil-imidazol (MI, compuesto 10) y el diisopropilfenil-imidazol (DII, compuesto 11) causaron letalidad en *C. elegans*. A diferencia del resto de los compuestos, el MI y DII son imidazoles neutros y ambos tienen un átomo de nitrógeno libre de sustituyentes que puede interactuar con el ambiente como una base débil. Esta claro que el anillo neutro de ambos compuestos favorece la actividad nematocida. Esto podría deberse a que las moléculas neutras y lipofílicas que pueden atravesar con mayor facilidad la cutícula del gusano representan antihelmínticos más efectivos (Burns *et al.*, 2015). Otras rutas de transporte alternativas y tal vez de mayor importancia también han sido identificadas. Una de ellas consiste en el transporte de pequeñas moléculas hidrofóbicas a través de los órganos anfidios sensoriales anteriores, como lo hace la droga ivermectina (Page, 2018). Otra posibilidad

es que ingresen a través de la faringe del animal. El colesterol se acumula en las células marginales de la parte anterior de la faringe como reserva energética y este sistema de reserva de colesterol facilita la acumulación de xenobióticos hidrofóbicos en la faringe (Kamal *et al.*, 2019). Por esta razón, es posible que los compuestos lipofílicos, DII y MI, ingresen a través de los órganos anfidios o las células marginales de la faringe al organismo y que su propiedad lipofílica favorezca el transporte.

La alta especificidad es crucial para fármacos utilizados en el tratamiento de infecciones patógenas dado que reduce la posibilidad de provocar efectos adversos en el hospedador. Encontramos que el DII no afecta la viabilidad de bacterias, moscas *D. melanogaster* y células de mamífero en cultivo a concentraciones similares e incluso mayores que las tóxicas para gusanos (Fig. 29, 31, 32 y 34). Estos resultados demuestran que el DII no afecta biomoléculas vitales conservadas en el reino animal. Dado que la droga MI no solo presentó actividad nematicida sino que también detuvo el crecimiento bacteriano, decidimos descartarla del estudio.

Es extremadamente probable que drogas capaces de inducir la muerte en *C. elegans* también produzcan la muerte de gusanos parásitos (Burns *et al.*, 2015; Mathew *et al.*, 2016). Recientemente, un ensayo de cribado de compuestos con potencial nematicida reveló que la probabilidad de que moléculas que presentan actividad nematicida en *C. elegans* sean también letales para especies parásitas es 15 veces mayor que moléculas escogidas al azar (Burns *et al.*, 2015). Estos resultados y el alto nivel de conservación dentro del filo nematoda (Parkinson *et al.*, 2004) apoyan el potencial de DII como un agente antihelmíntico prometedor para el tratamiento de parasitosis.

C. elegans es relativamente resistente a la perturbación farmacológica generada por moléculas activas, dado que muchas drogas no logran alcanzar concentraciones efectivas en tejidos internos (Burns *et al.*, 2010). Este nematodo de vida libre está más adaptado para confrontar xenobióticos comunes del ambiente del suelo que parásitos adultos que están adaptados para sobrevivir dentro de un hospedador. Por esta razón, es que en uno de sus trabajos, Ruiz-Lancheros (2011) propone que *C. elegans* podría estar mejor equipado para resistir a drogas gracias a su adaptación para lidiar con xenobióticos presentes en su ambiente. Estos autores describen el ejemplo del derquantel, el cual es un potente antihelmíntico de varias especies de nematodos parásitos, pero presenta una débil actividad en *C. elegans*. Sin embargo, en dicho trabajo logran incrementar la actividad del fármaco al retirarle la cola al gusano y favorecer la entrada de la droga a los tejidos internos (Ruiz-Lancheros *et al.*, 2011). Esto demuestra que es probable que la

disminución de actividad de drogas en el gusano de vida libre *C. elegans* se deba a la propiedad de barrera que presenta su cutícula (Ruiz-Lancheros *et al.*, 2011; Rand y Johnson, 1995; Choy y Thomas, 1999). En nuestro trabajo, a pesar de haber reproducido el ensayo con animales cortados para evaluar si incrementaba la potencia del DII y generar una parálisis del animal, al igual que lo hacen las drogas colinérgicas, no observamos dicho efecto. Esto sugiere que si bien el DII actúa sobre un AChR que contiene UNC-29, la falta de parálisis en sus efectos no se debe a la impermeabilidad de la cutícula. Debido a esta impermeabilidad es que en general, se requiere mayor concentración de droga para inducir letalidad en *C. elegans* que en nematodos parásitos (Hu *et al.*, 2013). Se ha reportado que mientras que la exposición a concentraciones micromolares de albendazol durante 4 días son suficientes para matar distintas especies de nematodos parásitos, sólo produce la muerte del 25% de la población de *C. elegans* (Hu *et al.*, 2013). En nuestro trabajo encontramos que 24 horas de exposición a concentraciones micromolares de DII provocaron el ~100 % de muerte del “impermeable” nematodo *C. elegans*. De modo que, al comparar la potencia con el albendazol para generar la muerte del gusano, el DII parece ser un agente nematicida altamente potente.

Modo de acción del DII en estadios maduros

El DII ejerce su efecto nematicida en ambos estadios, maduros e inmaduros, de *C. elegans*. Con respecto a su efecto en nematodos adultos, encontramos que la letalidad depende de la expresión muscular de UNC-29, una subunidad de tipo no- α de un receptor nicotínico. Al igual que UNC-38 y UNC-63, UNC-29 es un constituyente esencial del AChR muscular sensible a levamisol (L-AChR), un blanco clásico de compuestos antihelmínticos como el levamisol y pirantel (Rayes *et al.*, 2007; Fleming *et al.*, 1997; Culetto *et al.*, 2004; Qian *et al.*, 2008). Estas drogas activan al L-AChR favoreciendo la entrada de cationes al interior de la célula y produciendo una parálisis espástica muscular (Martin *et al.*, 2005). Mutaciones en los genes *unc-29*, *unc-38* y *unc-63* conllevan a una fuerte resistencia al levamisol (Lewis, Wu, Berg, *et al.*, 1980). Contrariamente, animales mutantes de *lev-1* y *lev-8*, que expresan dos subunidades no esenciales del L-AChR, son solo parcialmente resistentes a levamisol (Lewis, Wu, Berg, *et al.*, 1980). A pesar de que la actividad del DII depende de UNC-29, compilamos suficiente evidencia que nos

permitió concluir que actúa a través de un mecanismo diferente al de los antihelmínticos colinérgicos clásicos:

- i. A pesar de ser fuertemente resistente a levamisol (Lewis, Wu, Berg, *et al.*, 1980; Culetto *et al.*, 2004), la cepa mutada en *unc-63* es tan sensible a DII como gusanos salvajes. Asimismo, mutantes *lev-8*, que son levemente resistentes a levamisol (Lewis, Wu, Berg, *et al.*, 1980), son altamente sensibles a DII (Fig. 42).
- ii. La cepa mutada en *unc-38*, extremadamente resistente a levamisol (Fleming *et al.*, 1997; Lewis, Wu, Berg, *et al.*, 1980), es completamente sensible a DII luego de 24 horas de exposición y sólo es levemente resistente en tiempos de exposición más cortos (Fig. 42).
- iii. A diferencia del levamisol y otros agonistas del L-AChR como el morantel y pirantel, el DII no induce parálisis aguda, acortamiento de la longitud del gusano ni aumento en la deposición de huevos.
- iv. La presencia de DII no produce el desplazamiento de las curvas dosis-respuesta (de parálisis aguda) del levamisol (Fig. 41).
- v. La cepa mutada en *unc-49*, que es hipersensible a levamisol (Vashlishan *et al.*, 2008), no presenta alteraciones significativas de la sensibilidad al DII (Fig. 38D).

Estas observaciones sugieren la posibilidad de que UNC-29 podría ser un constituyente de un receptor colinérgico muscular aún no identificado en *C. elegans*, diferente al AChR sensible a levamisol clásico.

C. elegans es la especie con la familia más amplia de genes codificantes de subunidades de AChR que se conoce hasta el momento (al menos 27 miembros) (Jones, Elgar y Sattelle, 2003). Estudios electrofisiológicos sobre la pared muscular ventral de *C. elegans* reveló que la perfusión de acetilcolina (ACh) genera una actividad detectable de dos tipos de AChRs musculares: el L-AChR formado por las subunidades UNC-29, UNC-38, UNC-63, LEV-1 y LEV-8 y un AChR homopentamérico sensible a nicotina (N-AChR) constituido por la subunidad ACR-16 de tipo α (Richmond y Jorgensen, 1999; Touroutine *et al.*, 2005). No se detectó actividad sináptica colinérgica en la pared muscular ventral de mutantes dobles *unc-63; acr-16*, sugiriendo que sólo existen los L-AChR y N-AChR en el músculo de *C. elegans*. Sin embargo, estos dobles mutantes nulos exhiben movimiento residual en ensayos de locomoción, lo que indica que aún persiste algo de contracción muscular (Touroutine *et al.*, 2005). No fue hasta el año 2013 que se

detectó que la subunidad nicotínica ACR-23, que forma un receptor homopentamérico sensible a monepantel, también se expresa en músculo (Rufener *et al.*, 2013). Dado que en general los registros electrofisiológicos *in vivo* se realizan en la región ventro-medial del músculo de *C. elegans* (Richmond, 2006), es posible que distintos AChRs expresados en otras regiones no se hayan registrado. Incluso, mediante corrientes electrofisiológicas en músculo del parásito *Oesophagostomum dentatum* se detectaron regiones sensibles y otras resistentes a levamisol, revelando una distribución heterogénea de AChRs. (Robertson, Bjorn y Martin, 1999).

Además, mediante el método de purificación por afinidad en tándem (TAP), empleado para aislar complejos proteicos, se hallaron dos nuevas subunidades (ACR-8 muscular y neuronal y ACR-12 neuronal) que también podrían integrar el L-AChR reemplazando a alguna de las otras cinco subunidades (Gottschalk *et al.*, 2005). Si bien las subunidades UNC-38 y LEV-8 están presentes en los músculos de la pared ventral y dorsal en la porción anterior de *C. elegans*, LEV-8 no se detecta en el resto del cuerpo. Por esta razón el mutante nulo *lev-8* es resistente a levamisol únicamente en la cabeza (Almedom *et al.*, 2009; Fleming *et al.*, 1997). Esto sugiere que LEV-8 debería estar reemplazado por alguna otra subunidad en los músculos de la porción posterior a la cabeza. Más tarde se demostró mediante registros electrofisiológicos de L-AChRs expresados en ovocitos de *Xenopus*, que se pueden formar L-AChR funcionales reemplazando la subunidad LEV-8 por ACR-8 (Blanchard *et al.*, 2018).

En conjunto, todos estos trabajos sugieren que existen múltiples clases de AChRs musculares con composiciones de subunidades diferentes que podrían estar distribuidos de manera heterogénea en el cuerpo del animal (Gottschalk *et al.*, 2005; Blanchard *et al.*, 2018; Almedom *et al.*, 2009). Evidencias de la expresión muscular de subunidades que no forman los L-AChRs y N-AChRs clásicos y el descubrimiento de al menos 20 “subunidades huérfanas” en *C. elegans* que aún no han sido caracterizadas, apoyan la hipótesis sobre la probable existencia de AChRs no identificados (Holden-Dye *et al.*, 2013; Jones y Sattelle, 2004). Es posible que UNC-29 se ensamble con algunas de estas subunidades para formar un AChR muscular funcional, diferente al L-AChR “tradicional”.

Observamos que los mutantes nulos *unc-38* y *lev-1* son levemente resistentes a DII en las primeras horas de exposición, lo que podría deberse a que estas subunidades también formen parte del AChR sin identificar. En un *background* mutante, otras subunidades podrían reemplazarlas con un mínimo impedimento a la sensibilidad a DII.

El reemplazo de subunidades ha sido descrito como un mecanismo común en diferentes AChRs en animales *knock-out* (Almedom *et al.*, 2009; Hernando *et al.*, 2012). De manera alternativa, podría ser que estas dos subunidades estén formando una población minoritaria de AChR sensible a DII diferente a la que contiene UNC-29. UNC-38 es una subunidad α , mientras que LEV-1 es una subunidad no- α , de manera que podrían formar un AChR funcional con sitios de unión para la ACh en su interfase. Además, ha sido demostrado que UNC-38 y LEV-1 colocalizan en su totalidad en los músculos del cuerpo de *C. elegans* (Gottschalk *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha reportado que las proteínas homólogas de UNC-29 y UNC-38 del parásito *A. suum* co-expresadas en ovocitos de *Xenopus* forman un AChR funcional (Williamson *et al.*, 2009). Esto apoya la hipótesis de que no sería necesaria la presencia de todas las subunidades del receptor L-AChR clásico para formar un AChR que responda a ACh, siempre y cuando se generan sitios de unión para el ligando. Sería extremadamente interesante poder confirmar la existencia de algún/os AChR/s sin identificar con estas características y determinar su posible estequiometría y función.

En base a la respuesta a drogas antihelmínticas, múltiples subtipos de AChRs musculares han sido identificados en especies de nematodos parásitos (Holden-Dye *et al.*, 2013; Abongwa *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2017; Qian, Martin y Robertson, 2006). Consistente con nuestra hipótesis con respecto a *C. elegans*, UNC-29 parece ser parte de múltiples AChRs musculares en especies parásitas como *Oesophagostomum dentatum* perteneciente al mismo clado que *C. elegans* (clado V), y *Brugia malayi* y *Ascaris suum*, pertenecientes al clado III (Robertson, Bjorn y Martin, 1999; Holden-Dye *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2017). Nuestros resultados sugieren que la gran variedad de subtipos de AChRs musculares podría ser una cualidad compartida entre nematodos parásitos y *C. elegans*.

En conclusión, demostramos que en estadios maduros, el DII actúa a través de la subunidad UNC-29 que forma parte de un receptor AChR muscular, aparentemente diferente al L-AChR clásico. Evidencias suficientes apoyan la hipótesis de que UNC-29 podría formar un AChR aún no identificado, formado por subunidades “huérfanas” o por las subunidades conocidas ensambladas de distintas maneras.

Acción del DII sobre la subunidad UNC-29 en estadios maduros

Nuestros experimentos no permiten dilucidar si DII actúa activando o inhibiendo al receptor que contiene UNC-29. Dado que los mutantes nulos *unc-29* son viables, la hipótesis de que DII activa a este receptor más que inhibirlo podría ser considerada más probable. No obstante, pese a que el paraherquamide ejerce sus efectos nematocidas antagonizando receptores sensibles a levamisol y nicotina (Robertson *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2005), los mutantes nulos de subunidades de L-AChR y N-AChR son viables. Es posible que mutaciones genéticas, pero no una inhibición farmacológica de AChRs, desencadene mecanismos compensatorios para atenuar las consecuencias desventajosas para el gusano. A pesar de que el DII ejercería sus efectos sobre un AChR muscular, inesperadamente no produce defectos agudos en la movilidad. Esto es similar al efecto descrito del derquantel, un antagonista de distintos subtipos de AChRs, que induce menos del 30 % de parálisis a altas concentraciones en el parásito *Brugia malayi* (Verma *et al.*, 2017). Dado que los agonistas colinérgicos (independientemente del subtipo de AChR muscular que activen) causan parálisis espástica (Holden-Dye y Walker, 2014), podríamos especular que similar a derquantel, el DII podría actuar como un antagonista de un AChR muscular aún no identificado. Otra posibilidad es que el DII ejerza sus efectos a través de una modulación alostérica positiva o negativa sobre el receptor que contiene UNC-29 o que altere las proteínas encargadas del ensamblaje y/o transporte hacia la superficie celular de la subunidad UNC-29. Por ejemplo, el complejo transmembranal del retículo endoplasmático NRA-2/NRA-4 controla la composición de las subunidades que forman el L-AChR y se observó que la deficiencia de NRA-4, aumenta la expresión de UNC-29 y disminuye la de UNC-38 (Almedom *et al.*, 2009). De acuerdo a nuestros resultados no podemos descartar que el DII podría actuar modulando alguna proteína asociada a la expresión, maduración, tráfico, ensamblaje o localización de las subunidades del AChR. Esta hipótesis explicaría la razón de que el DII no ejerza un efecto agudo sobre el animal como lo hacen los fármacos colinérgicos clásicos, y que actúe más lento.

Modo de acción del DII en estadios inmaduros

Tras evaluar la actividad del DII en estadios inmaduros, demostramos que es efectivo en larvas de *C. elegans*. El DII induce la muerte de larvas y retrasa el desarrollo arrojando a los animales en sus estadios larvarios iniciales (Fig. 46). Ha sido reportado que algunos agonistas colinérgicos (levamisol, pirantel y morantel) son ineficaces en

estadios larvarios (Lewis, Wu, Berg, *et al.*, 1980; Lecova *et al.*, 2014), debido probablemente al cambio en el patrón de expresión de las subunidades de AChR en nematodos durante el desarrollo, al igual que ocurre en mamíferos (Hall y Sanes, 1993; Saito *et al.*, 2002). Al ser activo en estadios inmaduros el DII presenta una gran ventaja con respecto a otros antihelmínticos clásicos, dado a que los animales no alcanzarán la etapa reproductiva y morirán antes de originar progenie. Sorprendentemente, las larvas de mutantes nulos de *unc-29* son tan sensibles al DII como larvas de la cepa salvaje. El hecho de que UNC-29 se exprese en el músculo de *C. elegans* desde larva L1 hasta el estadio adulto (Fleming *et al.*, 1997; Rayes *et al.*, 2007), sugeriría que un blanco de DII diferente se expresa únicamente en estadios de desarrollo tempranos. De todas maneras, no podríamos descartar que el efecto larvicida se deba a la actividad del DII sobre ambos blancos moleculares: un blanco desconocido específico de estadios larvarios y también un AChR que contenga UNC-29. La letalidad observada en estadios inmaduros de mutantes nulos *unc-29* podría deberse a que la acción del DII sobre el blanco específico de larvas es suficiente para inducir la muerte de los gusanos. Otra posibilidad es que, considerando que el DII disminuye el bombeo faríngeo y es letal en las larvas de mutantes nulos *unc-29*, la disminución del bombeo faríngeo esté relacionada con la muerte de larvas y el retraso en el desarrollo. Será extremadamente interesante poder identificar el blanco molecular de DII específico de estadios inmaduros. Conociendo que el DII afecta el bombeo faríngeo, planeamos en el futuro, realizar un cribado de larvas mutantes de genes que afectan el bombeo buscando un fenotipo resistente al efecto letal. Por ejemplo, el receptor nicotínico EAT-2, el canal de calcio de tipo T CCA-1 y de tipo L EGL-19, que modulan el bombeo faríngeo podrían ser algunos de los candidatos a evaluar (Avery y You, 2012). A pesar de esto, aún no sabemos si la disminución del bombeo faríngeo es responsable del efecto letal en larvas. En el capítulo I mencionamos que los receptores de aminas biogénicas implicados en la modulación de la locomoción en *C. elegans* podrían ser prometedores blancos terapéuticos para el tratamiento de parasitosis. Intervenir en los circuitos aminérgicos reguladores de la actividad motora del animal pueden afectar el movimiento y generar parálisis (Komuniecki, Law, *et al.*, 2012). Es así que, pretendemos prontamente evaluar la resistencia a DII de larvas deficientes de los receptores de 5-HT, TA, OA y DA. Hay que destacar, además, que las aminas 5-HT y TA/OA están involucradas en la modulación del bombeo faríngeo (Chase y Koelle, 2007) y que, si estuvieran implicadas en la acción del DII, esto explicaría la disrupción del bombeo en animales expuestos a DII.

El DII actúa a través de más de un blanco molecular

La combinación de drogas terapéuticas son consideradas el tratamiento ideal para enfermedades infecciosas. Hoy en día la combinación de antihelmínticos que actúan a través de distintos mecanismos de acción se administran frecuentemente, ya que otorgan una terapia más efectiva. Algunas de las combinaciones terapéuticas que se comercializan en América Latina, África y Australia incluyen el levamisol + una lactona macrocíclica (ivermectina o abamectina) o levamisol + un benzimidazol (albendazol o mebendazol) o combinaciones triples (Hu *et al.*, 2010). Los objetivos de la administración de tales asociaciones consisten en mantener el control de los nematodos incluso en presencia de gusanos resistentes a alguna de las drogas y retrasar el desarrollo de resistencias a distintas clases de antihelmínticos (Beech *et al.*, 2011; Bartram *et al.*, 2012; Keiser *et al.*, 2012). En nuestro trabajo demostramos que el DII actúa a través de al menos dos blancos moleculares con distintos mecanismos de acción, lo cual contribuiría a retardar el desarrollo de resistencias. Esta característica provee una ventaja significativa incluso en comparación a antiparasitarios relativamente nuevos, como la tribendimidina y el monepantel, cuyos efectos nematicidas parecerían depender de un único blanco molecular (Rufener *et al.*, 2013; Hu, Xiao y Aroian, 2009). Adicionalmente, al actuar a través de un nuevo blanco molecular, el DII podría representar una alternativa terapéutica viable donde ya existan resistencias a los demás antihelmínticos del mercado.

Tomados en conjunto, nuestros resultados demuestran que el DII cumple con los criterios necesarios para ser desarrollado como un nuevo antihelmíntico: presenta especificidad filogenética y un nuevo mecanismo de acción. El DII actuaría a través de un AChR muscular que contiene la subunidad UNC-29, pero distinto al L-AChR clásico, y sobre otro blanco molecular diferente en estadios inmaduros. A diferencia de los fármacos antihelmínticos clásicos que actúan sobre AChRs musculares provocando una parálisis aguda y facilitando la expulsión del parásito del hospedador, el DII ejerce su efecto de forma más lenta ocasionando la muerte del nematodo. El novedoso mecanismo de acción podría contribuir al desarrollo de una nueva clase de antihelmínticos.

Conclusión

En este capítulo enfatizamos la utilidad del nematodo de vida libre *C. elegans* para realizar cribados de moléculas con potencial antihelmíntico. Las escasas herramientas genéticas desarrolladas en parásitos y su difícil mantenimiento en el laboratorio hace que *C. elegans* sea un nematodo apropiado para la búsqueda de moléculas con potencial antihelmíntico. Encontramos que la molécula diisopropilfenil-imidazol (DII) induce letalidad en *C. elegans* con especificidad filogenética. Asimismo, la fácil manipulación genética de *C. elegans* nos permitió identificar un blanco molecular implicado en su mecanismo de acción. Encontramos que DII actúa a través de un AChR muscular que contiene la subunidad UNC-29 de tipo no- α . Determinamos que este receptor es distinto al AChR sensible a levamisol, que además de la subunidad UNC-29, también está conformado por UNC-38, UNC-63, LEV-1 y LEV-8. Sin embargo, aún no hay identificado otro receptor en *C. elegans* que contenga la subunidad UNC-29. No obstante, hay suficientes evidencias de que existen distintos subtipos de AChR distribuidos de manera heterogénea, integrados por diferentes composiciones de las subunidades previamente mencionadas o subunidades que aún hoy permanecen “huérfanas”. Además, encontramos que los animales mutantes nulos de las subunidades UNC-38 y LEV-1 son levemente resistentes al DII, sugiriendo que también podrían formar parte del blanco molecular.

Los efectos generados por el DII resultaron ser diferentes que los producidos por las drogas que actúan como agonistas o antagonistas de AChRs musculares. A diferencia de estas, el DII no genera parálisis del movimiento y reduce la deposición de huevos. Esto confirma claramente, que su mecanismo de acción es diferente al de los clásicos antiparasitarios colinérgicos. Esta característica presenta una gran ventaja dado que podría ser una alternativa terapéutica para parásitos que presentan resistencia a estos fármacos comercializados.

Adicionalmente, evaluamos si el DII además de ser activo en gusanos maduros, también lo es en estadios inmaduros. Encontramos que las mismas concentraciones letales de DII en gusanos L4 y adultos matan a larvas en estadios tempranos. Esta propiedad otorga otro beneficio con respecto a drogas como el levamisol o pirantel que resultan ser ineficaces en larvas. Además, observamos que el DII es capaz de actuar sobre un blanco molecular diferente a UNC-29 en estadios inmaduros. Lo más probable es que actúe a través de dos (o más) mecanismos de acción, pero que el blanco específico de larvas cobra menor importancia en gusanos maduros. El presentar más de un blanco molecular

permitiría un control más efectivo de nematodos resistentes y retrasaría el desarrollo de resistencia.

En conclusión, este capítulo de la tesis aporta un estudio exhaustivo de una nueva molécula con potencial nematocida específico que actúa a través de un blanco distinto al de los demás antihelmínticos conocidos. El novedoso mecanismo de acción y el hecho de que la mayoría de las moléculas que matan a *C. elegans* han demostrado ser letales en nematodos parásitos, hacen que este compuesto derivado del imidazol sea un candidato antihelmíntico prometedor que merece aún más investigación en nematodos parásitos *in vitro* y en sus hospedadores naturales.

Conclusión general

En este trabajo de tesis, utilizamos las herramientas que proporciona el nematodo *C. elegans* para aportar información a dos campos de investigación diferentes. Por un lado, definimos que la intermodulación de señales aminérgicas modulan conductas que favorecen la alimentación luego de un período de escasez de comida. Determinamos que la supresión de la liberación de TA, análogo de noradrenalina en invertebrados, durante el ayuno es necesaria para que el animal adopte conductas que favorecen la alimentación en el encuentro con una nueva fuente de nutrientes. Mientras que, por otro lado, con una visión más aplicada, encontramos que el compuesto DII presenta actividad antihelmíntica específica, aparentemente, a través de un nuevo modo de acción. Creemos que este compuesto podría contribuir a la identificación de un nuevo blanco molecular para el tratamiento de las helmintiasis.

Bibliografía

- Abongwa, M., S. K. Buxton, E. Courtot, C. L. Charvet, C. Neveu, C. J. McCoy, S. Verma, A. P. Robertson, and R. J. Martin. 2016. 'Pharmacological profile of *Ascaris suum* ACR-16, a new homomeric nicotinic acetylcholine receptor widely distributed in *Ascaris* tissues', *Br J Pharmacol*, 173: 2463-77.
- Adeyemi, O. S., A. O. Eseola, W. Plass, O. Atolani, T. Sugi, Y. Han, G. E. Batiha, K. Kato, O. J. Awakan, T. D. Olaolu, C. O. Nwonuma, O. Alejlowo, A. Owolabi, D. Rotimi, and O. T. Kayode. 2020. 'Imidazole derivatives as antiparasitic agents and use of molecular modeling to investigate the structure-activity relationship', *Parasitol Res*.
- Ahlskog, J. E. 1974. 'Food intake and amphetamine anorexia after selective forebrain norepinephrine loss', *Brain Res*, 82: 211-40.
- Alkema, M.J., M. Hunter-Ensor, N. Ringstad, and H.R. Horvitz. 2005. 'Tyramine Functions independently of octopamine in the *Caenorhabditis elegans* nervous system', *Neuron*, 46: 247-60.
- Almedom, R.B., J.F. Liewald, G. Hernando, C. Schultheis, D. Rayes, J. Pan, T. Schedletzky, H. Hutter, C. Bouzat, and A. Gottschalk. 2009. 'An ER-resident membrane protein complex regulates nicotinic acetylcholine receptor subunit composition at the synapse', *EMBO J*, 28: 2636-49.
- Andrews, P. W., A. Bharwani, K. R. Lee, M. Fox, and J. A. Thomson, Jr. 2015. 'Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response', *Neurosci Biobehav Rev*, 51: 164-88.
- Atchison, W. D., T. G. Geary, B. Manning, E. A. VandeWaa, and D. P. Thompson. 1992. 'Comparative neuromuscular blocking actions of levamisole and pyrantel-type anthelmintics on rat and gastrointestinal nematode somatic muscle', *Toxicol Appl Pharmacol*, 112: 133-43.
- Avery, L., and H.R. Horvitz. 1989. 'Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*', *Neuron*, 3: 473-85.
- Avery, L., and H.R. Horvitz. 1990. 'Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*', *J. Exp. Zool*, 253: 263-70.
- Avery, L., and Y.J. You. 2012. '*C. elegans* feeding', *WormBook*: 1-23.
- Bacque-Cazenave, J., R. Bharatiya, G. Barriere, J. P. Delbecque, N. Bouguiyou, G. Di Giovanni, D. Cattaert, and P. De Deurwaerdere. 2020. 'Serotonin in Animal Cognition and Behavior', *Int J Mol Sci*, 21.
- Bargmann, C.I. 1998. 'Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome', *Science*, 282: 2028-33.
- Bargmann, C.I., and H.R. Horvitz. 1991. 'Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*', *Neuron*, 7: 729-42.
- Bargmann, C.I., and I. Mori. 1997. 'Chemotaxis and Thermotaxis'.
- Bartram, D. J., D. M. Leathwick, M. A. Taylor, T. Geurden, and S. J. Maeder. 2012. 'The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes', *Vet Parasitol*, 186: 151-8.

- Beech, R. N., P. Skuce, D. J. Bartley, R. J. Martin, R. K. Prichard, and J. S. Gilleard. 2011. 'Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility?', *Parasitology*, 138: 160-74.
- Ben Arous, J., S. Laffont, and D. Chatenay. 2009. 'Molecular and sensory basis of a food related two-state behavior in *C. elegans*', *PLoS One*, 4: e7584.
- Bendesky, A., M. Tsunozaki, M.V. Rockman, L. Kruglyak, and C.I. Bargmann. 2011. 'Catecholamine receptor polymorphisms affect decision-making in *C. elegans*', *Nature*, 472: 313-18.
- Benedix, J.H. 1993. 'Area-restricted search by plains pocket gopher (*Geomys bursarius*) in tallgrass prairie habitat', *Behavioral Ecology*, 4: 318 -24.
- Bethony, J., S. Brooker, M. Albonico, S. M. Geiger, A. Loukas, D. Diemert, and P. J. Hotez. 2006a. 'Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm', *Lancet*, 367: 1521-32.
- Bethony, J., S. Brooker, M. Albonico, S.M. Geiger, A. Loukas, D. Diemert, and P.J. Hotez. 2006b. 'Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm', *Lancet*, 367: 1521-32.
- Blanco, M. G., M. S. Vela Gurovic, G. F. Silbestri, A. Garelli, S. Giunti, D. Rayes, and M. J. De Rosa. 2018. 'Diisopropylphenyl-imidazole (DII): A new compound that exerts anthelmintic activity through novel molecular mechanisms', *PLoS Negl Trop Dis*, 12: e0007021.
- Blanchard, A., F. Guegnard, C. L. Charvet, A. Crisford, E. Courtot, C. Sauve, A. Harmache, T. Duguet, V. O'Connor, P. Castagnone-Sereno, B. Reaves, A. J. Wolstenholme, R. N. Beech, L. Holden-Dye, and C. Neveu. 2018. 'Deciphering the molecular determinants of cholinergic anthelmintic sensitivity in nematodes: When novel functional validation approaches highlight major differences between the model *Caenorhabditis elegans* and parasitic species', *PLoS Pathog*, 14: e1006996.
- Blaxter, M. 1998. '*Caenorhabditis elegans* is a nematode', *Science*, 282: 2041-6.
- Blaxter, M., and D. R. Denver. 2012. 'The worm in the world and the world in the worm', *BMC Biol*, 10: 57.
- Blenau, Wolfgang, Eva Rademacher, and Arnd Baumann. 2012. 'Plant essential oils and formamidines as insecticides/acaricides: what are the molecular targets?', *Apidologie*, 43: 334-47.
- Blier, P. 2001. 'Crosstalk between the norepinephrine and serotonin systems and its role in the antidepressant response', *J Psychiatry Neurosci*, 26 Suppl: S3-10.
- Blumenthal, T. 2012. 'Trans-splicing and operons in *C. elegans*', *WormBook*: 1-11.
- Blundell, J. E., and A. J. Hill. 1987. 'Nutrition, serotonin and appetite: case study in the evolution of a scientific idea', *Appetite*, 8: 183-94.
- Blundell, J., and J. Halford. 1998. 'Serotonin and Appetite Regulation: Implications for the Pharmacological Treatment of Obesity', *CNS Drugs*, 9: 473-95.

- Boulin, T., M. Gielen, J.E. Richmond, D.C. Williams, P. Paoletti, and J.L. Bessereau. 2008. 'Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105: 18590-95.
- Boutin, S. 2018. 'Hunger makes apex predators do risky things', *J Anim Ecol*, 87: 530-32.
- Branchek, Theresa A., and Thomas P. Blackburn. 2003. 'Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact', *Current opinion in pharmacology*, 3: 90-97.
- Bray, G. A., and D. A. York. 1972. 'Studies on food intake of genetically obese rats', *Am J Physiol*, 223: 176-9.
- Brembs, B., F. Christiansen, H. J. Pfluger, and C. Duch. 2007. 'Flight initiation and maintenance deficits in flies with genetically altered biogenic amine levels', *J Neurosci*, 27: 11122-31.
- Brenner, S. 1974. 'The genetics of *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 77: 71-94.
- Bresch, A., M. Rullmann, J. Luthardt, G. A. Becker, M. Patt, Y. S. Ding, A. Hilbert, O. Sabri, and S. Hesse. 2017. 'Hunger and disinhibition but not cognitive restraint are associated with central norepinephrine transporter availability', *Appetite*, 117: 270-74.
- Brewer, J. C., A. C. Olson, K. M. Collins, and M. R. Koelle. 2019. 'Serotonin and neuropeptides are both released by the HSN command neuron to initiate *Caenorhabditis elegans* egg laying', *PLoS Genet*, 15: e1007896.
- Burns, A. R., G. M. Luciani, G. Musso, R. Bagg, M. Yeo, Y. Zhang, L. Rajendran, J. Glavin, R. Hunter, E. Redman, S. Stasiuk, M. Schertzberg, G. Angus McQuibban, C. R. Caffrey, S. R. Cutler, M. Tyers, G. Giaever, C. Nislow, A. G. Fraser, C. A. MacRae, J. Gilleard, and P. J. Roy. 2015. '*Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery', *Nat Commun*, 6: 7485.
- Burns, A. R., I. M. Wallace, J. Wildenhain, M. Tyers, G. Giaever, G. D. Bader, C. Nislow, S. R. Cutler, and P. J. Roy. 2010. 'A predictive model for drug bioaccumulation and bioactivity in *Caenorhabditis elegans*', *Nat Chem Biol*, 6: 549-57.
- Carey, R. J. 1976. 'Effects of selective forebrain depletions of norepinephrine and serotonin on the activity and food intake effects of amphetamine and fenfluramine', *Pharmacol Biochem Behav*, 5: 519-23.
- Carnell, L., J. Illi, S.W. Hong, and S.L. McIntire. 2005. 'The G-protein-coupled serotonin receptor SER-1 regulates egg laying and male mating behaviors in *Caenorhabditis elegans*', *J. Neurosci*, 25: 10671-81.
- Cohen, M., V. Reale, B. Olofsson, A. Knights, P. Evans, and Bono M. de. 2009. 'Coordinated regulation of foraging and metabolism in *C. elegans* by RFamide neuropeptide signaling', *Cell Metab*, 9: 375-85.
- Collins, K. M., A. Bode, R. W. Fernandez, J. E. Tanis, J. C. Brewer, M. S. Creamer, and M. R. Koelle. 2016. 'Activity of the *C. elegans* egg-laying behavior circuit is controlled by competing activation and feedback inhibition', *Elife*, 5.
- Consortium, The *C. elegans* Sequencing. 1998. 'Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology', *Science*, 282: 2012-8.
- Cook, S. J., T. A. Jarrell, C. A. Brittin, Y. Wang, A. E. Bloniarz, M. A. Yakovlev, K. C. Q. Nguyen, L. T. Tang, E. A. Bayer, J. S. Duerr, H. E. Bulow, O. Hobert, D. H. Hall, and S.

- W. Emmons. 2019. 'Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes', *Nature*, 571: 63-71.
- Cooper, Jack R., Floyd E. Bloom, and Robert H. Roth. 2003. *The biochemical basis of neuropharmacology* (Oxford University Press: Oxford).
- Correia, P. A., E. Lottem, D. Banerjee, A. S. Machado, M. R. Carey, and Z. F. Mainen. 2017. 'Transient inhibition and long-term facilitation of locomotion by phasic optogenetic activation of serotonin neurons', *Elife*, 6.
- Corsi, A. K., B. Wightman, and M. Chalfie. 2015. 'A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 200: 387-407.
- Culetto, E., H.A. Baylis, J.E. Richmond, A.K. Jones, J.T. Fleming, M.D. Squire, J.A. Lewis, and D.B. Sattelle. 2004. 'The *Caenorhabditis elegans* unc-63 gene encodes a levamisole-sensitive nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit', *J. Biol. Chem*, 279: 42476-83.
- Cunningham, K. A., Z. Hua, S. Srinivasan, J. Liu, B. H. Lee, R. H. Edwards, and K. Ashrafi. 2012. 'AMP-activated kinase links serotonergic signaling to glutamate release for regulation of feeding behavior in *C. elegans*', *Cell Metab*, 16: 113-21.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, and D.C. Prasher. 1994. 'Green fluorescent protein as a marker for gene expression', *Science*, 263: 802-05.
- Chamberlain, J. S., and G. M. Benian. 2000. 'Muscular dystrophy: the worm turns to genetic disease', *Curr Biol*, 10: R795-7.
- Chase, D.L., and M.R. Koelle. 2007. 'Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*', *WormBook*: 1-15.
- Chase, D.L., J.S. Pepper, and M.R. Koelle. 2004. 'Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*', *Nat. Neurosci*, 7: 1096-103.
- Chen, A. C., H. He, and R. B. Davey. 2007. 'Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks', *Vet Parasitol*, 148: 379-83.
- Chen, T. W., T. J. Wardill, Y. Sun, S. R. Pulver, S. L. Renninger, A. Baohan, E. R. Schreiter, R. A. Kerr, M. B. Orger, V. Jayaraman, L. L. Looger, K. Svoboda, and D. S. Kim. 2013. 'Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity', *Nature*, 499: 295-300.
- Chisholm, A. D., and J. Hardin. 2005. 'Epidermal morphogenesis', *WormBook*: 1-22.
- Chisholm, A. D., H. Hutter, Y. Jin, and W. G. Wadsworth. 2016. 'The Genetics of Axon Guidance and Axon Regeneration in *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 204: 849-82.
- Choy, R. K., and J. H. Thomas. 1999. 'Fluoxetine-resistant mutants in *C. elegans* define a novel family of transmembrane proteins', *Mol Cell*, 4: 143-52.
- Christensen, M., A. Estevez, X. Yin, R. Fox, R. Morrison, M. McDonnell, C. Gleason, D.M. Miller, III, and K. Strange. 2002. 'A primary culture system for functional analysis of *C. elegans* neurons and muscle cells', *Neuron*, 33: 503-14.
- Chronis, N. 2010. 'Worm chips: microtools for *C. elegans* biology', *Lab Chip*, 10: 432-7.
- Chung, S. H., L. Sun, and C. V. Gabel. 2013. 'In vivo neuronal calcium imaging in *C. elegans*', *J Vis Exp*.

- Churgin, M. A., R. J. McCloskey, E. Peters, and C. Fang-Yen. 2017. 'Antagonistic Serotonergic and Octopaminergic Neural Circuits Mediate Food-Dependent Locomotory Behavior in *Caenorhabditis elegans*', *J Neurosci*, 37: 7811-23.
- Das, D., and S. Arur. 2017. 'Conserved insulin signaling in the regulation of oocyte growth, development, and maturation', *Mol Reprod Dev*, 84: 444-59.
- De Rosa, M. J., T. Veuthey, J. Florman, J. Grant, M. G. Blanco, N. Andersen, J. Donnelly, D. Rayes, and M. J. Alkema. 2019. 'The flight response impairs cytoprotective mechanisms by activating the insulin pathway', *Nature*, 573: 135-38.
- Dent, J. A., M. M. Smith, D. K. Vassilatis, and L. Avery. 2000a. 'The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 2674-79.
- Dent, J.A., M.M. Smith, D.K. Vassilatis, and L. Avery. 2000b. 'The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 97: 2674-79.
- Dey, A. R., N. Begum, Anisuzzaman, M. A. Alim, and M. Z. Alam. 2020. 'Multiple anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants in Bangladesh', *Parasitol Int*, 77: 102105.
- Dias, Maria P., José P. Granadeiro, and Jorge M. Palmeirim. 2009. 'Searching behaviour of foraging waders: does feeding success influence their walking?', *Animal Behaviour*, 77: 1203-09.
- Dillon, J., N. A. Hopper, L. Holden-Dye, and V. O'Connor. 2006. 'Molecular characterization of the metabotropic glutamate receptor family in *Caenorhabditis elegans*', *Biochem Soc Trans*, 34: 942-8.
- Donnelly, J.L., C.M. Clark, A.M. Leifer, J.K. Pirri, M. Haburcak, M.M. Francis, A.D. Samuel, and M.J. Alkema. 2013. 'Monoaminergic orchestration of motor programs in a complex *C. elegans* behavior', *PLoS. Biol*, 11: e1001529.
- Dougherty, E.C., E.L. Hansen, W.L. Nicholas, J.H. Mollet, and E.A. Yarwood. 1959. 'Axenic cultivation of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: *Rhabditidae*) with supplemented and unsupplemented chemically defined media', *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 77.
- Driscoll, M., E. Dean, E. Reilly, E. Bergholz, and M. Chalfie. 1989a. 'Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity', *J. Cell Biol*, 109: 2993-3003.
- Driscoll, M., E. Dean, E. Reilly, E. Bergholz, and M. Chalfie. 1989b. 'Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity', *J Cell Biol*, 109: 2993-3003.
- Driscoll, M., and J. Kaplan. 1997. 'Mechanotransduction.' in nd, D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess (eds.), *C. elegans II* (Cold Spring Harbor (NY)).
- Dutta, S. 2010. 'Synthesis and anthelmintic activity of some novel 2-substituted-4,5-diphenyl imidazoles', *Acta Pharm.*, 60: 229-35.
- Edelstein, A. D., M. A. Tsuchida, N. Amodaj, H. Pinkard, R. D. Vale, and N. Stuurman. 2014. 'Advanced methods of microscope control using muManager software', *J Biol Methods*, 1.

- Eifler, Douglas A., Karabo Baipidi, Maria A. Eifler, Drew Dittmer, and Luwi Nguluka. 2012. 'Influence of prey encounter and prey identity on area-restricted searching in the lizard *Pedioplanis namaquensis*', *Journal of Ethology*, 30: 197-200.
- Elbroch, L. M., J. Feltner, and H. B. Quigley. 2017. 'Stage-dependent puma predation on dangerous prey', *Journal of Zoology*, 302: 164-70.
- Ellis, H.M., and H.R. Horvitz. 1986. 'Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*', *Cell*, 44: 817-29.
- Epe, C. 2009. 'Intestinal nematodes: biology and control', *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 39: 1091-107, vi-vii.
- Erdag, D., O. Merhan, and B. Yildiz. 2018. 'Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines', *IntechOpen*.
- Evans, P. D., and J. D. Gee. 1980. 'Action of formamidine pesticides on octopamine receptors', *Nature*, 287: 60-2.
- Fauchalda, Per. 2003. 'Using first-passage time in the analysis of area-restricted search and habitat selection', *Ecology*, 84: 282-88.
- Fay, D. 2006. 'Genetic mapping and manipulation: chapter 1--Introduction and basics', *WormBook*: 1-12.
- Félix, M. A., and F. Duveau. 2012. 'Population dynamics and habitat sharing of natural populations of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*', *BMC Biol*, 10: 59.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. 'Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 391: 806-11.
- Flavell, S.W., N. Pokala, E.Z. Macosko, D.R. Albrecht, J. Larsch, and C.I. Bargmann. 2013. 'Serotonin and the neuropeptide PDF initiate and extend opposing behavioral states in *C. elegans*', *Cell*, 154: 1023-35.
- Fleming, J.T., M.D. Squire, T.M. Barnes, C. Tornoe, K. Matsuda, J. Ahnn, A. Fire, J.E. Sulston, E.A. Barnard, D.B. Sattelle, and J.A. Lewis. 1997. 'Caenorhabditis elegans levamisole resistance genes lev-1, unc-29, and unc-38 encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits', *J. Neurosci*, 17: 5843-57.
- Fru, M. F., and A. Puoti. 2014. 'Acquired resistance to monepantel in *C. elegans*: What about parasitic nematodes?', *Worm*, 3: e959416.
- Fu, J., H. Zhang, W. Huang, X. Zhu, Y. Sheng, E. Song, and T. Xu. 2018. 'AIM interneurons mediate feeding suppression through the TYRA-2 receptor in *C. elegans*', *Biophys Rep*, 4: 17-24.
- Fuller, V. L., C. J. Lilley, and P. E. Urwin. 2008. 'Nematode resistance', *New Phytol*, 180: 27-44.
- Gaba, M., S. Singh, and C. Mohan. 2014. 'Benzimidazole: an emerging scaffold for analgesic and anti-inflammatory agents', *Eur J Med Chem*, 76: 494-505.
- Gallagher, T., T. Bjorness, R. Greene, Y.J. You, and L. Avery. 2013. 'The geometry of locomotive behavioral states in *C. elegans*', *PLoS. One*, 8: e59865.

- Geary, T. G., K. Woo, J. S. McCarthy, C. D. Mackenzie, J. Horton, R. K. Prichard, N. R. de Silva, P. L. Olliaro, J. K. Lazdins-Helds, D. A. Engels, and D. A. Bundy. 2010. 'Unresolved issues in anthelmintic pharmacology for helminthiasis of humans', *Int J Parasitol*, 40: 1-13.
- Geurden, T., H. Hoste, P. Jacquet, D. Traversa, S. Sotiraki, A. Frangipane di Regalbono, N. Tzanidakis, D. Kostopoulou, C. Gaillac, S. Privat, A. Giangaspero, C. Zanardello, L. Noe, B. Vanimisetti, and D. Bartram. 2014. 'Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy', *Vet Parasitol*, 201: 59-66.
- Ghosh, D. D., T. Sanders, S. Hong, L. Y. McCurdy, D. L. Chase, N. Cohen, M. R. Koelle, and M. N. Nitabach. 2016. 'Neural Architecture of Hunger-Dependent Multisensory Decision Making in *C. elegans*', *Neuron*, 92: 1049-62.
- Glenn, C. F., D. K. Chow, L. David, C. A. Cooke, M. S. Gami, W. B. Iser, K. B. Hanselman, I. G. Goldberg, and C. A. Wolkow. 2004. 'Behavioral deficits during early stages of aging in *Caenorhabditis elegans* result from locomotory deficits possibly linked to muscle frailty', *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 59: 1251-60.
- Gottschalk, A., R.B. Almedom, T. Schedletzky, S.D. Anderson, J.R. Yates, III, and W.R. Schafer. 2005. 'Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans*', *EMBO J*, 24: 2566-78.
- Grant, B. D., and M. Sato. 2006. 'Intracellular trafficking', *WormBook*: 1-9.
- Gray, J. M., J. J. Hill, and C. I. Bargmann. 2005a. 'A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 3184-91.
- Gray, J.M., J.J. Hill, and C.I. Bargmann. 2005b. 'A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 102: 3184-91.
- Grinker, J. A., A. Drewnowski, M. Enns, and H. Kissileff. 1980. 'Effects of d-amphetamine and fenfluramine on feeding patterns and activity of obese and lean Zucker rats', *Pharmacol Biochem Behav*, 12: 265-75.
- Groome, J. R., M. Clark, and C. M. Lent. 1993. 'The behavioural state of satiation in the leech is regulated by body distension and mimicked by serotonin depletion', *J Exp Biol*, 182: 265-70.
- Gürel, G., M. A. Gustafson, J. S. Pepper, H. R. Horvitz, and M. R. Koelle. 2012. 'Receptors and other signaling proteins required for serotonin control of locomotion in *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 192: 1359-71.
- Gutman, R., D. Yosha, I. Choshniak, and N. Kronfeld-Schor. 2007. 'Two strategies for coping with food shortage in desert golden spiny mice', *Physiol Behav*, 90: 95-102.
- Hainer, V., K. Kabrnova, B. Aldhoon, M. Kunesova, and M. Wagenknecht. 2006. 'Serotonin and norepinephrine reuptake inhibition and eating behavior', *Ann N Y Acad Sci*, 1083: 252-69.
- Hall, Z. W., and J. R. Sanes. 1993. 'Synaptic structure and development: the neuromuscular junction', *Cell*, 72 Suppl: 99-121.

- Hamdan, F. F., M. D. Ungrin, M. Abramovitz, and P. Ribeiro. 1999. 'Characterization of a novel serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*: cloning and expression of two splice variants', *J Neurochem*, 72: 1372-83.
- Hapiak, V., P. Summers, A. Ortega, W. J. Law, A. Stein, and R. Komuniecki. 2013. 'Neuropeptides amplify and focus the monoaminergic inhibition of nociception in *Caenorhabditis elegans*', *J Neurosci*, 33: 14107-16.
- Hapiak, V.M., R.J. Hobson, L. Hughes, K. Smith, G. Harris, C. Condon, P. Komuniecki, and R.W. Komuniecki. 2009. 'Dual excitatory and inhibitory serotonergic inputs modulate egg laying in *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 181: 153-63.
- Haskell, David G. 1997. 'Experiments and a model examining learning in the area-restricted search behavior of ferrets (*Mustela putorius furo*)', *Behavioral Ecology*, 8: 448-49.
- Hengartner, M.O., and H.R. Horvitz. 1994. 'Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*', *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4: 581-86.
- Hernando, G., I. Berge, D. Rayes, and C. Bouzat. 2012. 'Contribution of subunits to *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive nicotinic receptor function', *Mol. Pharmacol*, 82: 550-60.
- Hobson, R.J., J. Geng, A.D. Gray, and R.W. Komuniecki. 2003. 'SER-7b, a constitutively active Galphas coupled 5-HT7-like receptor expressed in the *Caenorhabditis elegans* M4 pharyngeal motorneuron', *J. Neurochem*, 87: 22-29.
- Hobson, R.J., V.M. Hapiak, H. Xiao, K.L. Buehrer, P.R. Komuniecki, and R.W. Komuniecki. 2006. 'SER-7, a *Caenorhabditis elegans* 5-HT7-like receptor, is essential for the 5-HT stimulation of pharyngeal pumping and egg laying', *Genetics*, 172: 159-69.
- Holden-Dye, L., M. Joyner, V. O'Connor, and R. J. Walker. 2013. 'Nicotinic acetylcholine receptors: a comparison of the nAChRs of *Caenorhabditis elegans* and parasitic nematodes', *Parasitol Int*, 62: 606-15.
- Holden-Dye, L., and R. J. Walker. 2007. 'Anthelmintic drugs', *WormBook*: 1-13.
- Holden-Dye, L., and R. J. Walker. 2014. 'Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*', *WormBook*: 1-29.
- Horton, J. 2003. 'Human gastrointestinal helminth infections: are they now neglected diseases?', *Trends Parasitol*, 19: 527-31.
- Horvitz, H.R., M. Chalfie, C. Trent, J.E. Sulston, and P.D. Evans. 1982. 'Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Science*, 216: 1012-14.
- Hosono, R., T. Sassa, and S. Kuno. 1987. 'Mutations affecting acetylcholine levels in the nematode *Caenorhabditis elegans*', *J Neurochem*, 49: 1820-3.
- Hoyer, D., J. P. Hannon, and G. R. Martin. 2002. 'Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors', *Pharmacol Biochem Behav*, 71: 533-54.
- Hu, P. J. 2007. 'Dauer', *WormBook*: 1-19.
- Hu, Y., B. L. Ellis, Y. Y. Yiu, M. M. Miller, J. F. Urban, L. Z. Shi, and R. V. Aroian. 2013. 'An extensive comparison of the effect of anthelmintic classes on diverse nematodes', *PLoS One*, 8: e70702.

- Hu, Y., E. G. Platzer, A. Bellier, and R. V. Aroian. 2010. 'Discovery of a highly synergistic anthelmintic combination that shows mutual hypersusceptibility', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 5955-60.
- Hu, Y., S. H. Xiao, and R. V. Aroian. 2009. 'The new anthelmintic tribendimidine is an L-type (levamisole and pyrantel) nicotinic acetylcholine receptor agonist', *PLoS Negl Trop Dis*, 3: e499.
- Iwanir, S., A. S. Brown, S. Nagy, D. Najjar, A. Kazakov, K. S. Lee, A. Zaslaver, E. Levine, and D. Biron. 2016. 'Serotonin promotes exploitation in complex environments by accelerating decision-making', *BMC Biol*, 14: 9.
- Jannot, G., S. Bajan, N. J. Giguere, S. Bouasker, I. H. Banville, S. Piquet, G. Hutvagner, and M. J. Simard. 2011. 'The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans', *EMBO Rep*, 12: 581-6.
- Jarrell, T. A., Y. Wang, A. E. Bloniarz, C. A. Brittin, M. Xu, J. N. Thomson, D. G. Albertson, D. H. Hall, and S. W. Emmons. 2012. 'The connectome of a decision-making neural network', *Science*, 337: 437-44.
- Jex, A. R., S. Liu, B. Li, N. D. Young, R. S. Hall, Y. Li, L. Yang, N. Zeng, X. Xu, Z. Xiong, F. Chen, X. Wu, G. Zhang, X. Fang, Y. Kang, G. A. Anderson, T. W. Harris, B. E. Campbell, J. Vlaminc, T. Wang, C. Cantacessi, E. M. Schwarz, S. Ranganathan, P. Geldhof, P. Nejsun, P. W. Sternberg, H. Yang, J. Wang, J. Wang, and R. B. Gasser. 2011. '*Ascaris suum* draft genome', *Nature*, 479: 529-33.
- Jia, K., D. Chen, and D. L. Riddle. 2004. 'The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span', *Development*, 131: 3897-906.
- Jones, A. K., S. D. Buckingham, and D. B. Sattelle. 2005. 'Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans*', *Nat Rev Drug Discov*, 4: 321-30.
- Jones, A.K., G. Elgar, and D.B. Sattelle. 2003. 'The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish, *Fugu rubripes*', *Genomics*, 82: 441-51.
- Jones, A.K., and D.B. Sattelle. 2004. 'Functional genomics of the nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode, *Caenorhabditis elegans*', *Bioessays*, 26: 39-49.
- Jones, J. R., and W. F. Caul. 1992. 'Effects of amphetamine on food intake and weight: timing of injections and food access', *Physiol Behav*, 52: 515-20.
- Jones, J. T., A. Haegeman, E. G. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-Lopez, J. E. Palomares-Rius, W. M. Wesemael, and R. N. Perry. 2013. 'Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology', *Mol Plant Pathol*, 14: 946-61.
- Jorgensen, E. M. 2005. 'Gaba', *WormBook*: 1-13.
- Kahn-Kirby, A.H., J.L. Dantzer, A.J. Apicella, W.R. Schafer, J. Browse, C.I. Bargmann, and J.L. Watts. 2004. 'Specific polyunsaturated fatty acids drive TRPV-dependent sensory signaling in vivo', *Cell*, 119: 889-900.
- Kale, SS, RR Pawar, and AS Kale. 2016. 'Imidazole, its derivatives & their importance: a review', *International Journal of Current Advanced Research*, 5: 906-11.

- Kaletta, T., and M. O. Hengartner. 2006. 'Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism', *Nat Rev Drug Discov*, 5: 387-98.
- Kamal, M., H. Moshiri, L. Magomedova, D. Han, K. C. Q. Nguyen, M. Yeo, J. Knox, R. Bagg, A. M. Won, K. Szlapa, C. M. Yip, C. L. Cummins, D. H. Hall, and P. J. Roy. 2019. 'The marginal cells of the *Caenorhabditis elegans* pharynx scavenge cholesterol and other hydrophobic small molecules', *Nat Commun*, 10: 3938.
- Kaminsky, R. 2008. 'A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes', *Nature*, 452: 176-80.
- Kaminsky, R., B. Bapst, P. A. Stein, G. A. Strehlau, B. A. Allan, B. C. Hosking, P. F. Rolfe, and H. Sager. 2011. 'Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep', *Parasitol Res*, 109: 19-23.
- Kaminsky, R., D. Mosimann, H. Sager, P. Stein, and B. Hosking. 2009. 'Determination of the effective dose rate for monepantel (AAD 1566) against adult gastro-intestinal nematodes in sheep', *Int J Parasitol*, 39: 443-6.
- Kaminsky, Ronald, Pierre Ducray, Martin Jung, Ralph Clover, Lucien Rufener, Jacques Bouvier, Sandra Schorderet Weber, Andre Wenger, Susanne Wieland-Berghausen, Thomas Goebel, Noelle Gauvry, François Pautrat, Thomas Skripsky, Olivier Froelich, Clarisse Komoin-Oka, Bethany Westlund, Ann Sluder, and Pascal Mäser. 2008. 'A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes', *Nature*, 452: 176-80.
- Kang, C., and L. Avery. 2009a. 'Systemic regulation of autophagy in *Caenorhabditis elegans*', *Autophagy*, 5: 565-66.
- Kang, C., and L. Avery. 2009b. 'Systemic regulation of starvation response in *Caenorhabditis elegans*', *Genes Dev*, 23: 12-17.
- Katiki, L. M., J. F. Ferreira, A. M. Zajac, C. Masler, D. S. Lindsay, A. C. Chagas, and A. F. Amarante. 2011. '*Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use', *Vet Parasitol*, 182: 264-8.
- Kawano, T., M.D. Po, S. Gao, G. Leung, W.S. Ryu, and M. Zhen. 2011. 'An imbalancing act: gap junctions reduce the backward motor circuit activity to bias *C. elegans* for forward locomotion', *Neuron*, 72: 572-86.
- Keiser, J., L. Tritten, R. Adelfio, and M. Vargas. 2012. 'Effect of combinations of marketed human anthelmintic drugs against *Trichuris muris* in vitro and in vivo', *Parasit Vectors*, 5: 292.
- Kennedy, Malcolm W. 2013. 'Chapter 3 - *Ascaris* – Antigens, Allergens, Immunogenetics, Protein Structures.' in Celia Holland (ed.), *Ascaris: The Neglected Parasite* (Elsevier: Amsterdam).
- Kerr, R. A. 2006. 'Imaging the activity of neurons and muscles', *WormBook*: 1-13.
- Kim, J., D.S. Poole, L.E. Waggoner, A. Kempf, D.S. Ramirez, P.A. Treschow, and W.R. Schafer. 2001. 'Genes affecting the activity of nicotinic receptors involved in *Caenorhabditis elegans* egg-laying behavior', *Genetics*, 157: 1599-610.
- Kim, W., R. S. Underwood, I. Greenwald, and D. D. Shaye. 2018. 'OrthoList 2: A New Comparative Genomic Analysis of Human and *Caenorhabditis elegans* Genes', *Genetics*, 210: 445-61.

- Kimata, T., H. Sasakura, N. Ohnishi, N. Nishio, and I. Mori. 2012. 'Thermotaxis of *C. elegans* as a model for temperature perception, neural information processing and neural plasticity', *Worm*, 1: 31-41.
- Kimble, J., and D. Hirsh. 1979. 'The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 70: 396-417.
- Komuniecki, R., G. Harris, V. Hapiak, R. Wragg, and B. Bamber. 2012. 'Monoamines activate neuropeptide signaling cascades to modulate nociception in *C. elegans*: a useful model for the modulation of chronic pain?', *Invert Neurosci*, 12: 53-61.
- Komuniecki, R., W. J. Law, A. Jex, P. Geldhof, J. Gray, B. Bamber, and R. B. Gasser. 2012. 'Monoaminergic signaling as a target for anthelmintic drug discovery: receptor conservation among the free-living and parasitic nematodes', *Mol Biochem Parasitol*, 183: 1-7.
- Kullyev, A., C.M. Dempsey, S. Miller, C.J. Kuan, V.M. Hapiak, R.W. Komuniecki, C.T. Griffin, and J.Y. Sze. 2010. 'A genetic survey of fluoxetine action on synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 186: 929-41.
- Kumarasingha, R., E. A. Palombo, M. Bhave, T. C. Yeo, D. S. Lim, C. L. Tu, J. M. Shaw, and P. R. Boag. 2014. 'Enhancing a search for traditional medicinal plants with anthelmintic action by using wild type and stress reporter *Caenorhabditis elegans* strains as screening tools', *Int J Parasitol*, 44: 291-8.
- Kwok, T. C., N. Ricker, R. Fraser, A. W. Chan, A. Burns, E. F. Stanley, P. McCourt, S. R. Cutler, and P. J. Roy. 2006. 'A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist', *Nature*, 441: 91-5.
- Lai, C.H., C.Y. Chou, L.Y. Ch'ang, C.S. Liu, and W. Lin. 2000. 'Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics', *Genome Res*, 10: 703-13.
- Lecova, L., L. Stuchlikova, L. Prchal, and L. Skalova. 2014. 'Monepantel: the most studied new anthelmintic drug of recent years', *Parasitology*, 141: 1686-98.
- Lee, K. S., S. Iwanir, R. B. Kopito, M. Scholz, J. A. Calarco, D. Biron, and E. Levine. 2017. 'Serotonin-dependent kinetics of feeding bursts underlie a graded response to food availability in *C. elegans*', *Nat Commun*, 8: 14221.
- Lee, Raymond Y. N., Elizabeth R. Sawin, Martin Chalfie, H. Robert Horvitz, and Leon Avery. 1999. 'EAT-4, a Homolog of a Mammalian Sodium-Dependent Inorganic Phosphate Cotransporter, Is Necessary for Glutamatergic Neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*', *The Journal of Neuroscience*, 19: 159-67.
- Leifer, A.M., C. Fang-Yen, M. Gershow, M.J. Alkema, and A.D. Samuel. 2011. 'Optogenetic manipulation of neural activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*', *Nat. Methods*, 8: 147-52.
- Lemieux, G. A., J. Liu, N. Mayer, R. J. Bainton, K. Ashrafi, and Z. Werb. 2011. 'A whole-organism screen identifies new regulators of fat storage', *Nat Chem Biol*, 7: 206-13.
- Lemieux, G.A., K.A. Cunningham, L. Lin, F. Mayer, Z. Werb, and K. Ashrafi. 2015. 'Kynurenic acid is a nutritional cue that enables behavioral plasticity', *Cell*, 160: 119-31.

- Lenard, L., and Z. Hahn. 1982. 'Amygdalar noradrenergic and dopaminergic mechanisms in the regulation of hunger and thirst-motivated behavior', *Brain Res*, 233: 115-32.
- Leung, C. K., Y. Wang, S. Malany, A. Deonarine, K. Nguyen, S. Vasile, and K. P. Choe. 2013. 'An ultra high-throughput, whole-animal screen for small molecule modulators of a specific genetic pathway in *Caenorhabditis elegans*', *PLoS One*, 8: e62166.
- Lewis, J. A., J. T. Fleming, S. McLafferty, H. Murphy, and C. Wu. 1987. 'The levamisole receptor, a cholinergic receptor of the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Mol Pharmacol*, 31: 185-93.
- Lewis, J. A., C. H. Wu, H. Berg, and J. H. Levine. 1980. 'The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 95: 905-28.
- Lewis, J. A., C. H. Wu, J. H. Levine, and H. Berg. 1980. 'Levamisole-resistant mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* appear to lack pharmacological acetylcholine receptors', *Neuroscience*, 5: 967-89.
- Li, W., L. Kang, B.J. Piggott, Z. Feng, and X.Z. Xu. 2011. 'The neural circuits and sensory channels mediating harsh touch sensation in *Caenorhabditis elegans*', *Nat. Commun*, 2: 315.
- Li, Z., Y. Li, Y. Yi, W. Huang, S. Yang, W. Niu, L. Zhang, Z. Xu, A. Qu, Z. Wu, and T. Xu. 2012. 'Dissecting a central flip-flop circuit that integrates contradictory sensory cues in *C. elegans* feeding regulation', *Nat Commun*, 3: 776.
- Lin, M. Z., and M. J. Schnitzer. 2016. 'Genetically encoded indicators of neuronal activity', *Nat Neurosci*, 19: 1142-53.
- Liu, H., L. W. Qin, R. Li, C. Zhang, U. Al-Sheikh, and Z. X. Wu. 2019. 'Reciprocal modulation of 5-HT and octopamine regulates pumping via feedforward and feedback circuits in *C. elegans*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 7107-12.
- Mandic, S., and H. Volkoff. 2018. 'The effects of fasting and appetite regulators on catecholamine and serotonin synthesis pathways in goldfish (*Carassius auratus*)', *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 223: 1-9.
- Martin, R. J. 1997. 'Modes of action of anthelmintic drugs', *Vet J*, 154: 11-34.
- Martin, R. J., A. P. Robertson, and H. Bjorn. 1997. 'Target sites of anthelmintics', *Parasitology*, 114 Suppl: S111-24.
- Martin, R. J., S. Verma, M. Levandoski, C. L. Clark, H. Qian, M. Stewart, and A. P. Robertson. 2005. 'Drug resistance and neurotransmitter receptors of nematodes: recent studies on the mode of action of levamisole', *Parasitology*, 131 Suppl: S71-84.
- Mathew, M. D., N. D. Mathew, A. Miller, M. Simpson, V. Au, S. Garland, M. Gestin, M. L. Edgley, S. Flibotte, A. Balgi, J. Chiang, G. Giaever, P. Dean, A. Tung, M. Roberge, C. Roskelley, T. Forge, C. Nislow, and D. Moerman. 2016. 'Using *C. elegans* Forward and Reverse Genetics to Identify New Compounds with Anthelmintic Activity', *PLoS Negl Trop Dis*, 10: e0005058.
- Maupas, E. 1900. 'Modes et formes de reproduction des nématodes', *Arch. Zool. Exp. Gen*, 8: 463-624.

- McGuirk, J., E. Goodall, T. Silverstone, and P. Willner. 1991. 'Differential effects of d-fenfluramine, l-fenfluramine and d-amphetamine on the microstructure of human eating behaviour', *Behav Pharmacol*, 2: 113-19.
- McIntire, S.L., E. Jorgensen, J. Kaplan, and H.R. Horvitz. 1993. 'The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 364: 337-41.
- Meneely, Philip M., Caroline L. Dahlberg, and Jacqueline K. Rose. 2019. 'Working with Worms: *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism', *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 19.
- Miltsch, S. M., J. Krucken, J. Demeler, I. J. Janssen, N. Kruger, A. Harder, and G. von Samson-Himmelstjerna. 2012. 'Decreased emodepside sensitivity in unc-49 gamma-aminobutyric acid (GABA)-receptor-deficient *Caenorhabditis elegans*', *Int J Parasitol*, 42: 761-70.
- Mills, H., R. Wragg, V. Hapiak, M. Castelletto, J. Zahratka, G. Harris, P. Summers, A. Korchnak, W. Law, B. Bamber, and R. Komuniecki. 2012. 'Monoamines and neuropeptides interact to inhibit aversive behaviour in *Caenorhabditis elegans*', *EMBO J*, 31: 667-78.
- Mukherjee, S., and M. R. Heithaus. 2013. 'Dangerous prey and daring predators: a review', *Biol Rev Camb Philos Soc*, 88: 550-63.
- Nelson, D. L., and D. R. Gehlert. 2006. 'Central nervous system biogenic amine targets for control of appetite and energy expenditure', *Endocrine*, 29: 49-60.
- Nelson, T. J., S. Cavallaro, C. L. Yi, D. McPhie, B. G. Schreurs, P. A. Gusev, A. Favit, O. Zohar, J. Kim, S. Beushausen, G. Ascoli, J. Olds, R. Neve, and D. L. Alkon. 1996. 'Calxectin: a signaling protein that binds calcium and GTP, inhibits potassium channels, and enhances membrane excitability', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 13808-13.
- Niacaris, T., and L. Avery. 2003. 'Serotonin regulates repolarization of the *C. elegans* pharyngeal muscle', *J. Exp. Biol*, 206: 223-31.
- Nigon, V., and E. C. Dougherty. 1949. 'Reproductive patterns and attempts at reciprocal crossing of *Rhabditis elegans* Maupas, 1900, and *Rhabditis briggsae* Dougherty and Nigon, 1949 (Nematoda: Rhabditidae)', *J Exp Zool*, 112: 485-503.
- Nigon, VM., and MA. Félix. 2005-2018. "History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms." In *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]*. Pasadena (CA).
- Olde, B., and W. R. McCombie. 1997. 'Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*', *J Mol Neurosci*, 8: 53-62.
- Omura, D. T., D. A. Clark, A. D. Samuel, and H. R. Horvitz. 2012. 'Dopamine signaling is essential for precise rates of locomotion by *C. elegans*', *PLoS One*, 7: e38649.
- Oranath, A., C. Schultheis, O. Tolstenkov, K. Erbguth, J. Nagpal, D. Hain, M. Brauner, S. Wabnig, W. Steuer Costa, R. D. McWhirter, S. Zels, S. Palumbos, D. M. Miller Iii, I. Beets, and A. Gottschalk. 2018. 'Food Sensation Modulates Locomotion by Dopamine and Neuropeptide Signaling in a Distributed Neuronal Network', *Neuron*, 100: 1414-28 e10.
- Osei-Atweneboana, M. Y., J. K. Eng, D. A. Boakye, J. O. Gyapong, and R. K. Prichard. 2007. 'Prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* infection and efficacy of ivermectin in endemic communities in Ghana: a two-phase epidemiological study', *Lancet*, 369: 2021-9.

- Page, A. P. 2018. 'The sensory amphidial structures of *Caenorhabditis elegans* are involved in macrocyclic lactone uptake and anthelmintic resistance', *Int J Parasitol*, 48: 1035-42.
- Page, A.P., and I.L. Johnstone. 2007. 'The Cuticle', *WormBook*.
- Papastamatiou, Y. P., P. A. DeSalles, and D. J. McCauley. 2012. 'Area-restricted searching by manta rays and their response to spatial scale in lagoon habitats', *Marine Ecology Progress Series*, 456: 233-44.
- Parkinson, J., M. Mitreva, C. Whitton, M. Thomson, J. Daub, J. Martin, R. Schmid, N. Hall, B. Barrell, R. H. Waterston, J. P. McCarter, and M. L. Blaxter. 2004. 'A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda', *Nat Genet*, 36: 1259-67.
- Peden, A. S., P. Mac, Y. J. Fei, C. Castro, G. Jiang, K. J. Murfitt, E. A. Miska, J. L. Griffin, V. Ganapathy, and E. M. Jorgensen. 2013. 'Betaine acts on a ligand-gated ion channel in the nervous system of the nematode *C. elegans*', *Nat Neurosci*, 16: 1794-801.
- Perkins, M. N., and T. W. Stone. 1982. 'An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid', *Brain Research*, 247: 184-87.
- Petrascheck, M., X. Ye, and L. B. Buck. 2007. 'An antidepressant that extends lifespan in adult *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 450: 553-6.
- Pierce-Shimomura, J.T., B.L. Chen, J.J. Mun, R. Ho, R. Sarkis, and S.L. McIntire. 2008. 'Genetic analysis of crawling and swimming locomotory patterns in *C. elegans*', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105: 20982-87.
- Piggott, B.J., J. Liu, Z. Feng, S.A. Wescott, and X.Z. Xu. 2011. 'The neural circuits and synaptic mechanisms underlying motor initiation in *C. elegans*', *Cell*, 147: 922-33.
- Pirri, J.K., A.D. McPherson, J.L. Donnelly, M.M. Francis, and M.J. Alkema. 2009. 'A tyramine-gated chloride channel coordinates distinct motor programs of a *Caenorhabditis elegans* escape response', *Neuron*, 62: 526-38.
- Purves, D., G.J. Augustine, and D. Fitzpatrick. 2001. *The Biogenic Amines* (Neuroscience, 2nd edition: Sunderland (MA)).
- Qian, H., R. J. Martin, and A. P. Robertson. 2006. 'Pharmacology of N-, L-, and B-subtypes of nematode nAChR resolved at the single-channel level in *Ascaris suum*', *FASEB J*, 20: 2606-8.
- Qian, H., A. P. Robertson, J. A. Powell-Coffman, and R. J. Martin. 2008. 'Levamisole resistance resolved at the single-channel level in *Caenorhabditis elegans*', *FASEB J*, 22: 3247-54.
- Raizen, D., B.M. Song, N. Trojanowski, and Y.J. You. 2012. 'Methods for measuring pharyngeal behaviors', *WormBook*: 1-13.
- Rand, J. B., and C. D. Johnson. 1995. 'Genetic pharmacology: interactions between drugs and gene products in *Caenorhabditis elegans*', *Methods Cell Biol*, 48: 187-204.
- Ranganathan, R., S.C. Cannon, and H.R. Horvitz. 2000. 'MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*', *Nature*, 408: 470-75.

- Rao, V. T., M. V. Accardi, S. Z. Siddiqui, R. N. Beech, R. K. Prichard, and S. G. Forrester. 2010. 'Characterization of a novel tyramine-gated chloride channel from *Haemonchus contortus*', *Mol Biochem Parasitol*, 173: 64-8.
- Rayes, D., M. Flamini, G. Hernando, and C. Bouzat. 2007. 'Activation of single nicotinic receptor channels from *Caenorhabditis elegans* muscle', *Mol. Pharmacol*, 71: 1407-15.
- Rex, E., V. Hapiak, R. Hobson, K. Smith, H. Xiao, and R. Komuniecki. 2005. 'TYRA-2 (F01E11.5): a *Caenorhabditis elegans* tyramine receptor expressed in the MC and NSM pharyngeal neurons', *J Neurochem*, 94: 181-91.
- Rex, E., S. C. Molitor, V. Hapiak, H. Xiao, M. Henderson, and R. Komuniecki. 2004. 'Tyramine receptor (SER-2) isoforms are involved in the regulation of pharyngeal pumping and foraging behavior in *Caenorhabditis elegans*', *J Neurochem*, 91: 1104-15.
- Rhoades, J. L., J. C. Nelson, I. Nwabudike, S. K. Yu, I. G. McLachlan, G. K. Madan, E. Abebe, J. R. Powers, D. A. Colon-Ramos, and S. W. Flavell. 2019. 'ASICs Mediate Food Responses in an Enteric Serotonergic Neuron that Controls Foraging Behaviors', *Cell*, 176: 85-97 e14.
- Richmond, J.E. 2006. 'Electrophysiological recordings from the neuromuscular junction of *C. elegans*', *WormBook*: 1-8.
- Richmond, J.E., and E.M. Jorgensen. 1999. 'One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction', *Nat. Neurosci*, 2: 791-97.
- Rist, C. L., A. Garchitorena, C. N. Ngonghala, T. R. Gillespie, and M. H. Bonds. 2015. 'The Burden of Livestock Parasites on the Poor', *Trends Parasitol*, 31: 527-30.
- Robertson, A. P., H. E. Bjorn, and R. J. Martin. 1999. 'Resistance to levamisole resolved at the single-channel level', *FASEB J*, 13: 749-60.
- Robertson, A. P., C. L. Clark, T. A. Burns, D. P. Thompson, T. G. Geary, S. M. Trailovic, and R. J. Martin. 2002. 'Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle', *J Pharmacol Exp Ther*, 302: 853-60.
- Robinson, P. W., D. P. Costa, D. E. Crocker, J. P. Gallo-Reynoso, C. D. Champagne, M. A. Fowler, C. Goetsch, K. T. Goetz, J. L. Hassrick, L. A. Huckstadt, C. E. Kuhn, J. L. Maresh, S. M. Maxwell, B. I. McDonald, S. H. Peterson, S. E. Simmons, N. M. Teutschel, S. Villegas-Amtmann, and K. Yoda. 2012. 'Foraging behavior and success of a mesopelagic predator in the northeast Pacific Ocean: insights from a data-rich species, the northern elephant seal', *PLoS One*, 7: e36728.
- Roeder, T. 1999. 'Octopamine in invertebrates', *Prog. Neurobiol*, 59: 533-61.
- Roeder, T. 2005. 'Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism', *Annu Rev Entomol*, 50: 447-77.
- Roeder, T. 2020. 'The control of metabolic traits by octopamine and tyramine in invertebrates', *J Exp Biol*, 223.
- Roeder, T., M. Seifert, C. Kahler, and M. Gewecke. 2003. 'Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism', *Arch. Insect Biochem. Physiol*, 54: 1-13.

- Rosen, S. C., K. R. Weiss, R. S. Goldstein, and I. Kupfermann. 1989. 'The role of a modulatory neuron in feeding and satiation in *Aplysia*: effects of lesioning of the serotonergic metacerebral cells', *J Neurosci*, 9: 1562-78.
- Rufener, L., N. Bedoni, R. Baur, S. Rey, D. A. Glauser, J. Bouvier, R. Beech, E. Sigel, and A. Puoti. 2013. 'acr-23 Encodes a monepantel-sensitive channel in *Caenorhabditis elegans*', *PLoS Pathog*, 9: e1003524.
- Ruiz-Lancheros, E., C. Viau, T. N. Walter, A. Francis, and T. G. Geary. 2011. 'Activity of novel nicotinic anthelmintics in cut preparations of *Caenorhabditis elegans*', *Int J Parasitol*, 41: 455-61.
- Saito, T., Y. Ohnuki, Y. Saeki, Y. Nakagawa, K. Ishibashi, K. Yanagisawa, and A. Yamane. 2002. 'Postnatal changes in the nicotinic acetylcholine receptor subunits in rat masseter muscle', *Arch Oral Biol*, 47: 417-21.
- Sant'anna, V., R. C. Vommaro, and W. de Souza. 2013. '*Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of anthelmintic compounds: ultrastructural study of the effects of albendazole', *Exp Parasitol*, 135: 1-8.
- Sawin, E.R., R. Ranganathan, and H.R. Horvitz. 2000. '*C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway', *Neuron*, 26: 619-31.
- Schafer, W.R. 2005. 'Egg-laying', *WormBook*: 1-7.
- Schwartz, D. H., L. Hernandez, and B. G. Hoebel. 1990. 'Serotonin release in lateral and medial hypothalamus during feeding and its anticipation', *Brain Res Bull*, 25: 797-802.
- Schwartz, D. H., S. McClane, L. Hernandez, and B. G. Hoebel. 1989. 'Feeding increases extracellular serotonin in the lateral hypothalamus of the rat as measured by microdialysis', *Brain Res*, 479: 349-54.
- Segalat, L., D. A. Elkes, and J. M. Kaplan. 1995. 'Modulation of serotonin-controlled behaviors by Go in *Caenorhabditis elegans*', *Science*, 267: 1648-51.
- Shalini, Kumari, Pramod Kumar Sharma, and Nitin Kumar. 2010. 'Imidazole and its biological activities: A review', *Der Chemica Sinica*, 1: 36-47.
- Shalmali, N., M. R. Ali, and S. Bawa. 2018. 'Imidazole: An Essential Edifice for the Identification of New Lead Compounds and Drug Development', *Mini Rev Med Chem*, 18: 142-63.
- Sharma, A., V. Kumar, R. Kharb, S. Kumar, P. C. Sharma, and D. P. Pathak. 2016. 'Imidazole Derivatives as Potential Therapeutic Agents', *Curr Pharm Des*, 22: 3265-301.
- Simpkin, K Graham, and Gerald C Coles. 1981. 'The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 31: 66-69.
- Skora, S., F. Mende, and M. Zimmer. 2018. 'Energy Scarcity Promotes a Brain-wide Sleep State Modulated by Insulin Signaling in *C. elegans*', *Cell Rep*, 22: 953-66.
- Smith, K.A., E.B. Rex, and R.W. Komuniecki. 2007. 'Are *Caenorhabditis elegans* receptors useful targets for drug discovery: pharmacological comparison of tyramine receptors with high identity from *C. elegans* (TYRA-2) and *Brugia malayi* (Bm4)', *Mol. Biochem. Parasitol*, 154: 52-61.

- Song, B.M., S. Faumont, S. Lockery, and L. Avery. 2013. 'Recognition of familiar food activates feeding via an endocrine serotonin signal in *Caenorhabditis elegans*', *Elife*, 2: e00329.
- Steppek, G., D. J. Buttle, I. R. Duce, and J. M. Behnke. 2006. 'Human gastrointestinal nematode infections: are new control methods required?', *Int J Exp Pathol*, 87: 325-41.
- Stiernagle, T. 2006. 'Maintenance of *C. elegans*', *WormBook*: 1-11.
- Sulston, J., M. Dew, and S. Brenner. 1975. 'Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*', *J Comp Neurol*, 163: 215-26.
- Sulston, J. E., D. G. Albertson, and J. N. Thomson. 1980. 'The *Caenorhabditis elegans* male: postembryonic development of nongonadal structures', *Dev Biol*, 78: 542-76.
- Sulston, J. E., and H. R. Horvitz. 1977. 'Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 56: 110-56.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White, and J. N. Thomson. 1983. 'The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 100: 64-119.
- Suo, S., J. G. Culotti, and H. H. Van Tol. 2009. 'Dopamine counteracts octopamine signalling in a neural circuit mediating food response in *C. elegans*', *EMBO J*, 28: 2437-48.
- Suo, S., Y. Kimura, and H. H. M. Van Tol. 2006. 'Starvation Induces cAMP Response Element-Binding Protein-Dependent Gene Expression through Octopamine-Gq Signaling in *Caenorhabditis elegans*', *Journal of Neuroscience*, 26: 10082-90.
- Sweitzer. 1996. 'Predation or starvation: consequences of foraging decisions by porcupines (*Erethizon dorsatum*)', *Journal of Mammalogy*, 77: 1068-77.
- Swierczek, N. A., A. C. Giles, C. H. Rankin, and R. A. Kerr. 2011. 'High-throughput behavioral analysis in *C. elegans*', *Nat Methods*, 8: 592-8.
- Sze, J. Y., M. Victor, C. Loer, Y. Shi, and G. Ruvkun. 2000. 'Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant', *Nature*, 403: 560-4.
- Tao, J., Y. Ma, Z. Yang, C.G. Zou, and K.Q. Zhang. 2016. 'Octopamine connects nutrient cues to lipid metabolism upon nutrient deprivation', *Cell Biology*, 2: e1501372.
- Touroutine, D., R.M. Fox, S.E. Von Stetina, A. Burdina, D.M. Miller, III, and J.E. Richmond. 2005. 'acr-16 encodes an essential subunit of the levamisole-resistant nicotinic receptor at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction', *J. Biol. Chem*, 280: 27013-21.
- Towers, P.R., B. Edwards, J.E. Richmond, and D.B. Sattelle. 2005. 'The *Caenorhabditis elegans* lev-8 gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit', *J. Neurochem*, 93: 1-9.
- Vashlishan, A. B., J. M. Madison, M. Dybbs, J. Bai, D. Sieburth, Q. Ch'ng, M. Tavazoie, and J. M. Kaplan. 2008. 'An RNAi screen identifies genes that regulate GABA synapses', *Neuron*, 58: 346-61.
- Verma, S., S. S. Kashyap, A. P. Robertson, and R. J. Martin. 2017. 'Functional genomics in *Brugia malayi* reveal diverse muscle nAChRs and differences between cholinergic anthelmintics', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 5539-44.

- Waggoner, L.E., G.T. Zhou, R.W. Schafer, and W.R. Schafer. 1998. 'Control of alternative behavioral states by serotonin in *Caenorhabditis elegans*', *Neuron*, 21: 203-14.
- Ward, J. D. 2015. 'Rendering the Intractable More Tractable: Tools from *Caenorhabditis elegans* Ripe for Import into Parasitic Nematodes', *Genetics*, 201: 1279-94.
- Weyermann, J., D. Lochmann, and A. Zimmer. 2005. 'A practical note on the use of cytotoxicity assays', *Int J Pharm*, 288: 369-76.
- White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson, and S. Brenner. 1976. 'The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 275: 327-48.
- White, J.G., E. Southgate, J.N. Thomson, and S. Brenner. 1986. 'The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci*, 314: 1-340.
- WHO. Partners for Parasite Control, Meeting, Development World Health Organization. Strategy, Diseases Monitoring for Parasitic, and Team Vector Control. 2005. "Deworming for health and development : report of the third global meeting of the partners for parasite control." In. Geneva: World Health Organization.
- Williams, David L., Lucien Rufener, Nicola Bedoni, Roland Baur, Samantha Rey, Dominique A. Glauser, Jacques Bouvier, Robin Beech, Erwin Sigel, and Alessandro Puoti. 2013. 'acr-23 Encodes a Monepantel-Sensitive Channel in *Caenorhabditis elegans*', *PLoS Pathogens*, 9: e1003524.
- Williamson, S. M., A. P. Robertson, L. Brown, T. Williams, D. J. Woods, R. J. Martin, D. B. Sattelle, and A. J. Wolstenholme. 2009. 'The nicotinic acetylcholine receptors of the parasitic nematode *Ascaris suum*: formation of two distinct drug targets by varying the relative expression levels of two subunits', *PLoS Pathog*, 5: e1000517.
- Wolstenholme, A. J., I. Fairweather, R. Prichard, G. von Samson-Himmelstjerna, and N. C. Sangster. 2004. 'Drug resistance in veterinary helminths', *Trends Parasitol*, 20: 469-76.
- Wragg, R.T., V. Hapiak, S.B. Miller, G.P. Harris, J. Gray, P.R. Komuniecki, and R.W. Komuniecki. 2007. 'Tyramine and octopamine independently inhibit serotonin-stimulated aversive behaviors in *Caenorhabditis elegans* through two novel amine receptors', *J. Neurosci*, 27: 13402-12.
- Wu, Q., X. Cao, D. Yan, D. Wang, and A. Aballay. 2015. 'Genetic Screen Reveals Link between the Maternal Effect Sterile Gene *mes-1* and *Pseudomonas aeruginosa*-induced Neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*', *J Biol Chem*, 290: 29231-9.
- Wu, YC. , and D. Xue. 2003. *Programmed Cell Death in C. elegans* (Humana Press, Totowa, NJ).
- Xiao, S. H., W. Hui-Ming, M. Tanner, J. Utzinger, and W. Chong. 2005. 'Tribendimidine: a promising, safe and broad-spectrum anthelmintic agent from China', *Acta Trop*, 94: 1-14.
- Xiao, S. H., J. Utzinger, M. Tanner, J. Keiser, and J. Xue. 2013. 'Advances with the Chinese anthelmintic drug tribendimidine in clinical trials and laboratory investigations', *Acta Trop*, 126: 115-26.
- Yadav, V. K., F. Oury, N. Suda, Z. W. Liu, X. B. Gao, C. Confavreux, K. C. Klemenhausen, K. F. Tanaka, J. A. Gingrich, X. E. Guo, L. H. Tecott, J. J. Mann, R. Hen, T. L. Horvath, and

- G. Karsenty. 2009. 'A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure', *Cell*, 138: 976-89.
- Yang, Z., Y. Yu, V. Zhang, Y. Tian, W. Qi, and L. Wang. 2015. 'Octopamine mediates starvation-induced hyperactivity in adult *Drosophila*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 5219-24.
- Yemini, E., R.A. Kerr, and W.R. Schafer. 2011. 'Tracking movement behavior of multiple worms on food', *Cold Spring Harb. Protoc*, 2011: 1483-87.
- Zhao, Z. J., and J. Cao. 2009. 'Plasticity in energy budget and behavior in Swiss mice and striped hamsters under stochastic food deprivation and refeeding', *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 154: 84-91.