



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Neurexina y Neuroligina: Estudio funcional de su
impacto en el Equilibrio entre Excitación e
Inhibición Neuronal en *Caenorhabditis elegans***

ALUMNO/A: Brunella Zarate Cantero

DIRECTOR/A: María José De Rosa

Bahía Blanca, Argentina

Defensa oral:

2025



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Neurexina y Neuroligina: Estudio funcional de su impacto en el Equilibrio entre Excitación e Inhibición Neuronal en *Caenorhabditis elegans*

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Firma del Alumno/a

Firma del Director/a

Título abreviado: Neurexina y Neuroligina en el Equilibrio Neuronal en *C. elegans*



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Neurexin and Neuroligin: Functional study of their impact on the balance between neuronal excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans*

BACHELOR'S THESIS IN BIOLOGICAL SCIENCES

Short title: Neurexin and Neuroligin in the Neuronal Balance in *C. elegans*

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, María José De Rosa, por acompañarme durante todo este proceso con compromiso, paciencia y dedicación. Gracias por tu guía constante, por estar presente en cada etapa del trabajo y por brindarme siempre el espacio y la confianza para aprender y crecer dentro del laboratorio.

También a todo el grupo del Laboratorio de Neurobiología de Invertebrados, gracias por acompañarme en este camino, por las charlas, los mates y el apoyo constante. Fue un placer haber compartido con ustedes.

A mi profesora consejera, María Constanza Díaz Andrade, por su compromiso y dedicación a lo largo de este recorrido.

Por otro lado, quiero agradecer profundamente a mi familia.

Mamá, gracias por inculcarme desde chica el amor por los animales y la vida, motivo que me llevó a estudiar biología.

Papá, gracias por acompañarme y bancarme durante todos estos años de carrera.

A mis hermanas, gracias por ser un gran soporte para mí: por aconsejarme, ayudarme y alentarme a no bajar los brazos.

A mis abuelas, gracias por su amor incondicional y por estar siempre para mí. Y gracias, también, por todas esas velitas antes de rendir.

A mis peluditos, por alegrar mis horas interminables de estudio: Barú, Matilda, Sasha y Tomy.

A mis amigos de la carrera —Ana, Uri y Naza— gracias por acompañarme durante todos estos años. Sin duda, nada de esto habría sido posible sin ustedes.

Finalmente, a la Universidad Nacional del Sur por darme la oportunidad de formarme como profesional.

RESUMEN

Las neurexinas (NRX) y neuroliginas (NLG) son proteínas de adhesión sináptica cuya interacción transináptica es esencial para el ensamblaje de sinapsis excitatorias e inhibitorias. Mutaciones en estos genes se han vinculado a trastornos del neurodesarrollo como los Trastornos del Espectro Autista (TEA), posiblemente por generar un desequilibrio en la señalización excitatoria/inhibitoria (E/I). En este trabajo se utilizó el nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental para estudiar el impacto funcional y estructural de la pérdida de función de los ortólogos *nlg-1* y *nrx-1*.

Se realizaron ensayos conductuales (respuesta de escape y giros omega), de sensibilidad farmacológica a levamisol y análisis de morfología neuronal mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron que mutantes *nlg-1* presentaron una reducción significativa en la proporción de giros omega completos, sin cambios en la sensibilidad farmacológica. Los defectos en comisuras neuronales fueron poco frecuentes y estadísticamente no significativos. En contraste, los mutantes *nrx-1* presentaron hipersensibilidad a levamisol y disminución en los giros omega, sugiriendo alteraciones funcionales en el circuito motor.

Estos resultados sugieren un rol de *nlg-1* y *nrx-1* en el mantenimiento del equilibrio sináptico, y refuerzan el valor de *C. elegans* como modelo para estudiar genes asociados a TEA.

Palabras clave: Sinapsis-Neurodesarrollo-Modelos invertebrados

ABSTRACT

Neurexins (NRX) and neuroligins (NLG) are synaptic adhesion proteins whose transsynaptic interaction is essential for the assembly of excitatory and inhibitory synapses. Mutations in these genes have been linked to neurodevelopmental disorders such as Autism Spectrum Disorders (ASD), possibly by generating an imbalance in excitatory/inhibitory (E/I) signaling. In this study, the nematode *Caenorhabditis elegans* was used as an experimental model to study the functional and structural impact of the loss of function of the *nlg-1* and *nrx-1* orthologs.

Behavioral assays (escape response and omega turns), pharmacological sensitivity to levamisole, and neuronal morphology analysis using fluorescence microscopy were performed. The results showed that *nlg-1* mutants exhibited a significant reduction in the proportion of complete omega turns, without changes in pharmacological sensitivity. Defects in neuronal commissures were rare and not statistically significant. In contrast, *nrx-1* mutants displayed hypersensitivity to levamisole and a reduction in omega turns, suggesting functional alterations in the motor circuit.

These results suggest a role for *nlg-1* and *nrx-1* in maintaining synaptic balance and reinforce the value of *C. elegans* as a model for studying genes associated with ASD.

Keywords: Synapses-Neurodevelopment-Invertebrate models

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN	8
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
➤ Cultivo y manipulación de <i>Caenorhabditis elegans</i>	15
➤ Ensayos de parálisis.....	16
➤ Respuesta de escape.....	16
➤ Cruzas genéticas	17
➤ PCR de punto final.....	18
➤ Técnicas de microscopía.....	19
➤ Análisis estadísticos	20
ANEXO DE PROTOCOLOS GENERALES.....	21
RESULTADOS.....	23
➤ Impacto de las mutantes en <i>nlg-1</i> y <i>nrx-1</i> en el balance E/I.....	23
➤ Efectos de las mutantes <i>nlg-1</i> y <i>nrx-1</i> en la morfología neuronal.....	25
DISCUSIÓN.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	32

INTRODUCCIÓN

El Sistema Nervioso y su rol en la regulación de funciones biológicas

El sistema nervioso (SN) es el principal sistema de control, regulación y comunicación de los animales. Es una red compleja que permite monitorear, regular y responder a los cambios tanto en el ambiente interno como externo. Es responsable de la percepción, el comportamiento, la memoria y el movimiento (1,2). Su desarrollo requiere la coordinación precisa de diversos procesos, como la proliferación y diferenciación celular, la migración neuronal y la formación de sinapsis. Alteraciones en estos procesos pueden dar lugar a desórdenes del neurodesarrollo (DND), los cuales afectan significativamente la calidad de vida de los individuos afectados (3).

Desórdenes del neurodesarrollo y su relación con los Trastornos del Espectro Autista

Los DND incluyen un grupo heterogéneo de patologías caracterizadas por alteraciones en el desarrollo del SN. Entre ellos se encuentran la epilepsia, la discapacidad intelectual, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) y los Trastornos del Espectro Autista (TEA). Estos trastornos afectan aproximadamente al 3% de los niños en el mundo y tienen un impacto significativo en la cognición, la comunicación y el comportamiento adaptativo (4).

Los TEA son de los DND más prevalentes y se caracterizan por dificultades en la comunicación e interacción social, junto con la presencia de conductas repetitivas o restringidas (5). Su etiología es multifactorial e involucra factores genéticos, epigenéticos y ambientales (3). A nivel neuronal, un hallazgo frecuente en los TEA es el desbalance entre las señales excitatorias e inhibitorias (E/I), lo que sugiere que la homeostasis sináptica desempeña un papel crucial en la manifestación de estos trastornos (6-8). Se ha planteado la hipótesis de que al menos algunos de los desórdenes incluidos en los TEA podrían ser causadas por un desequilibrio de la excitación/inhibición neuronal (5).

Mutaciones vinculadas con el TEA y su impacto en la sinaptogénesis

El estudio genético de los DND ha identificado numerosos genes asociados con estas patologías, muchos de los cuales están implicados en la formación y mantenimiento de sinapsis. En particular, mutaciones en genes que codifican para las neurexinas (NRX) y neuroliginas (NLG) han sido vinculadas con los TEA (5, 9, 10). Las NRX son proteínas transmembrana ubicadas en la membrana presináptica que interactúan con las NLG (Fig. 1), situadas en la membrana postsináptica, facilitando la diferenciación y estabilidad sináptica (5, 11). *Caenorhabditis elegans* presenta un único ortólogo de *NLG*, *nlg-1*. La mutante

nula *nlg-1* tiene un fenotipo fácilmente identificable en cuanto a la incapacidad para detectar estímulos aversivos (por ej. ambiente hiperosmótico) debido a déficits en la formación de las neuronas sensoriales (12). A su vez, este fenotipo es “rescatado” por la expresión de proteínas de mamíferos, lo que demuestra la conservación de su función molecular entre nematodos y mamíferos (13). En el TEA, se han detectado mutaciones en la proteína NLG que afectan la citoarquitectura funcional de la sinapsis con implicaciones en la actividad de las conexiones neuronales (10). En humanos, existen 4 isoformas de *NLG* y 3 de *NRX*, y específicamente, mutaciones en los genes de *NLGN1*, *NLGN3*, *NLGN4* y *NRXN1-3* se han asociado con el desarrollo de estos trastornos (14, 15).

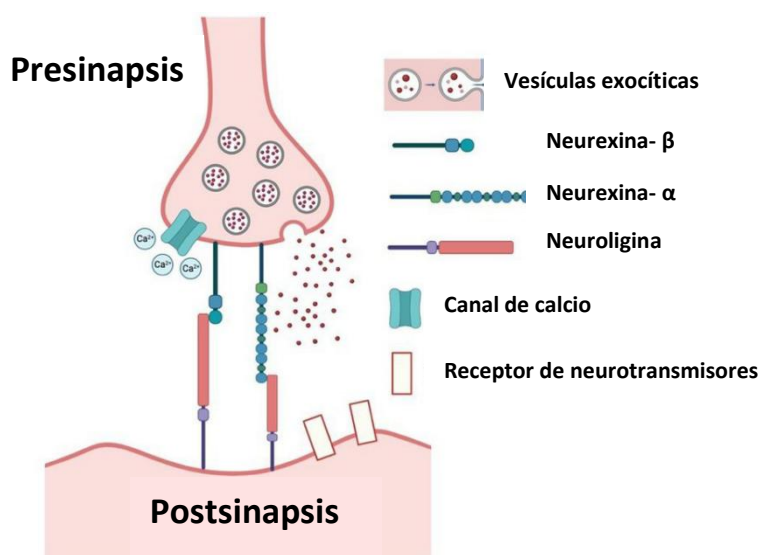


Figura 1. Representación esquemática de la interacción neurexina-neuroligina en la sinapsis. Las proteínas neurexina-α y neurexina-β, localizadas en la membrana presináptica, interactúan con las neuroliginas en la membrana postsináptica, estabilizando la sinapsis y facilitando la comunicación entre neuronas. Imagen tomada de: Neurexin dysfunction in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders: a PRISMA-based systematic review through iPSC and animal models. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/378313750>

***Caenorhabditis elegans* como modelo para el estudio de los DND**

Dado que muchos genes implicados en los TEA están altamente conservados evolutivamente, se ha recurrido a modelos animales para su estudio. En los últimos 50 años el nematodo *C. elegans* se ha establecido como uno de los modelos experimentales más relevantes en biología. Su simplicidad anatómica, el mapeo completo de la conectividad sináptica de su sistema nervioso, la alta conservación evolutiva de numerosos genes homólogos a los de mamíferos, y la facilidad para aplicar técnicas genéticas, de microscopía y ensayos farmacológicos, lo han convertido en una herramienta fundamental para diversos campos de la ciencia. (16-18).

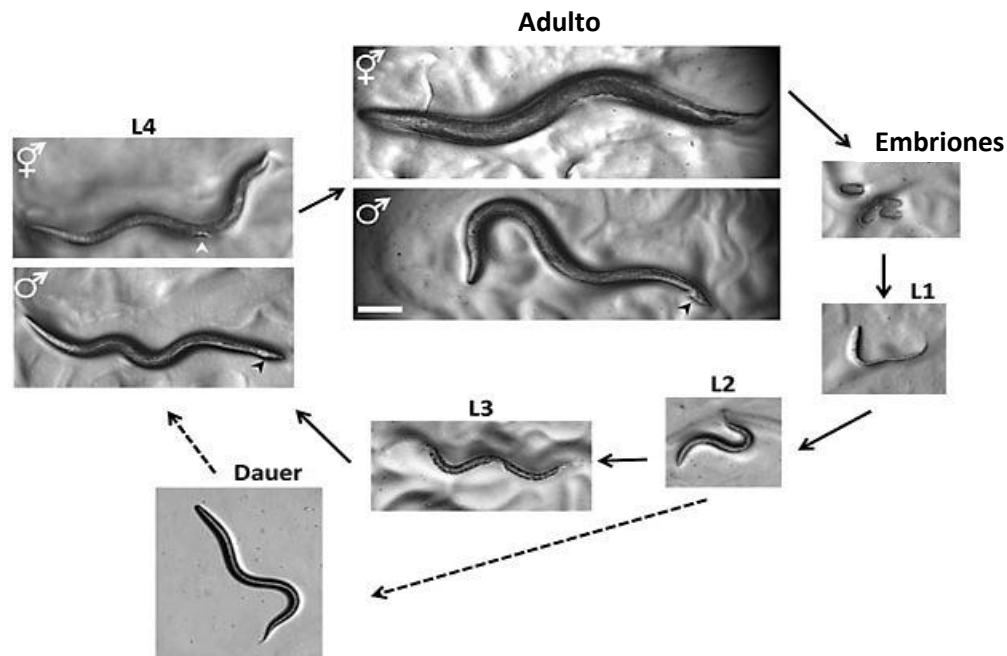
Caenorhabditis elegans presenta numerosas ventajas que lo convierten en un modelo experimental eficaz. Entre sus características destacadas se incluyen su pequeño tamaño, su corto ciclo de vida, y la facilidad y el bajo costo de mantenimiento en laboratorio. Una ventaja adicional es la posibilidad de conservar cepas mediante congelación, lo que permite almacenar cientos o miles de líneas durante años en espacios reducidos utilizando nitrógeno líquido o ultrafreezers. Además, al no representar un riesgo biológico, puede ser manipulado sin necesidad de instalaciones de bioseguridad complejas. A pesar de la distancia evolutiva con los mamíferos, *C. elegans* comparte homología con más del 50% de los genes humanos, y cuenta con un amplio repertorio de herramientas genéticas que permiten silenciar, editar o sobreexpresar genes, e incluso introducir genes humanos funcionales (19, 20). *C. elegans* cumple todos los criterios para ser un modelo animal prometedor en el estudio de los DND, ya que permite la visualización de neuronas *in vivo* mediante marcadores fluorescentes (16).

Generalidades de *C. elegans*

Caenorhabditis elegans es un nematodo de aproximadamente 1 mm de longitud, presenta un ciclo de vida directo e involucra las etapas de huevo, cuatro estadios juveniles comúnmente denominados larva (L1, L2, L3, L4) y adulto (Fig. 2). El final de cada etapa juvenil está caracterizado por una muda, durante la cual se sintetiza una nueva cutícula y se desprende la anterior (17, 18). El tiempo requerido para completar el ciclo de vida es de alrededor de 3 días a 20°C. En condiciones de laboratorio, la vida promedio de un individuo es de aproximadamente 2-3 semanas. En entornos adversos como puede ser la falta de alimento, una forma especializada de resistencia denominada *dauer* (del alemán, “duración”), se desarrolla a partir del estadio de larva 1. Durante este estado, la alimentación se suspende, y aumenta enormemente su capacidad para resistir con más eficiencia las condiciones desfavorables. Una vez restablecida una situación más propicia, el animal retoma su desarrollo normal desde *dauer* al cuarto estadio larval. Pasado dicho estadio, no puede volver a la forma de resistencia (21).

La distribución de sexos en esta especie es peculiar, ya que, en condiciones de laboratorio, aproximadamente el 99,9 % de los individuos son hermafroditas. Estos poseen una gónada que primero produce espermatozoides durante la etapa L4 y luego ovocitos en la adultez, lo que les permite reproducirse por autofecundación. Sin embargo, también pueden reproducirse sexualmente a través de la fecundación cruzada con machos. Los machos de *C. elegans* son menos comunes en la población y surgen con una frecuencia de <0,2%. Estos últimos son más pequeños que las hermafroditas y tienen una morfología y anatomía distintiva. Los machos presentan la región copulatoria en la zona posterior del cuerpo, con una forma macroscópica similar a una “media flecha”, mientras que en hermafroditas se evidencia la presencia de huevos en estadios adultos (22, 23). Durante todo el período fértil, cada hermafrodita puede poner

La determinación sexual en hermafroditas es dada por una combinación cromosómica XX, lo que significa que poseen dos cromosomas sexuales X, mientras que los machos tienen una combinación cromosómica XO (tienen un solo cromosoma sexual X) (17). *C. elegans* es una especie eutélica, lo que significa que cada animal posee un número invariable de células somáticas. Mientras que en hermafroditas se contabilizan 959 células, los machos poseen 1033 células. (18)



Sistema Nervioso, neuromuscular y locomoción en *C. elegans*

11

muscular (27). Para que el movimiento sea efectivo, un lado del cuerpo en un mismo segmento debe contraerse mientras el lado opuesto debe relajarse. Esto se logra porque, en cada segmento, las motoneuronas colinérgicas estimulan la contracción de las células musculares de un lado, al tiempo que estimulan a las motoneuronas GABAérgicas que relajan a las células musculares del lado opuesto (Fig. 3). Este patrón de activación alternada genera el movimiento sinusoidal característico del gusano (28, 29). La locomoción de *C. elegans* permite evaluar alteraciones en el balance E/I, ya que mutaciones en genes clave pueden afectar esta coordinación y provocar fenotipos locomotores anómalos.

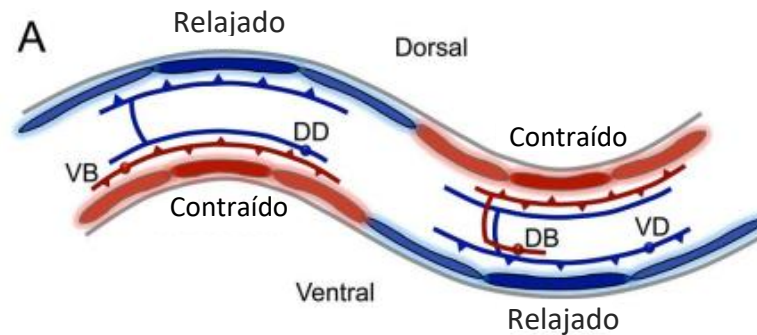


Figura 3. Representación esquemática del circuito motor de *C. elegans* durante la locomoción. Las motoneuronas dorsales (DB y DD) y ventrales (VB y VD) controlan la contracción alternada de los músculos dorsales y ventrales, generando la ondulación característica del movimiento. Las motoneuronas colinérgicas (de tipo A y B: VA, VB, DA, DB y AS) son excitatorias, liberan acetilcolina (ACh) y estimulan la contracción muscular del lado correspondiente. Las motoneuronas GABAérgicas (de tipo D: VD y DD) son inhibitorias, liberan GABA y actúan exclusivamente como postsinápticas a otras motoneuronas, promoviendo la relajación muscular del lado opuesto. Este patrón de activación coordinada permite el movimiento ondulatorio del gusano. Imagen tomada de Donnelly et al. (2013).

Un aspecto clave de la locomoción de *C. elegans* es su respuesta de escape ante estímulos amenazantes. En la naturaleza, este gusano exhibe un comportamiento característico que le permite reorientarse y evitar peligros potenciales (30, 31). Esta respuesta motora, además de ser crucial para su supervivencia, ha sido ampliamente estudiada en el laboratorio para evaluar la funcionalidad de los circuitos neuronales y musculares implicados en la locomoción.

La respuesta de escape puede inducirse fácilmente mediante un toque suave en la región anterior del gusano con un pelo fino, lo que desencadena una locomoción en reversa seguida de un giro brusco en forma de omega (giro en omega). Durante este giro, el cuerpo del animal se arquea hasta que la cabeza toca la cola, permitiéndole cambiar de dirección y continuar su desplazamiento en sentido opuesto a la amenaza (Fig. 4). Este proceso involucra la coordinación precisa entre neuronas comando, interneuronas,

motoneuronas y células musculares, lo que convierte a *C. elegans* en un modelo poderoso para el estudio de la señalización neuromuscular.

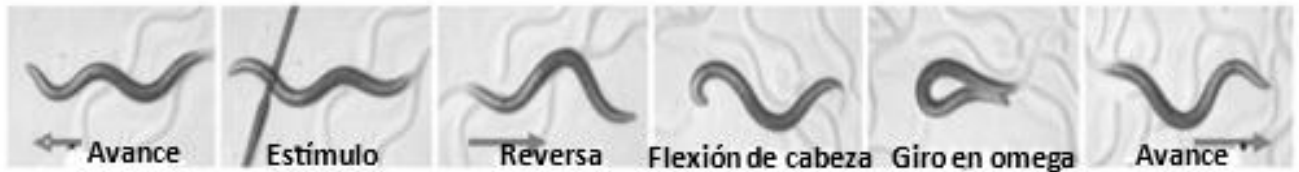


Figura 4. Secuencia conductual característica de *Caenorhabditis elegans* frente a un estímulo mecánico aplicado en la región anterior del cuerpo. Imagen tomada de: *Alkema Lab, UMass Medical School*

<https://www.umassmed.edu/AlkemaLab/>

A nivel celular, la contracción de los músculos ventrales es activada por las neuronas motoras colinérgicas (VA y VB), que hacen sinapsis con los músculos ventrales. Paralelamente, estas motoneuronas estimulan a las neuronas GABAérgicas (DD), responsables de la relajación de los músculos dorsales (30, 32). Esta interacción asegura la alternancia entre contracción y relajación muscular, permitiendo un movimiento coordinado y eficiente. Alteraciones en este equilibrio pueden comprometer el giro en omega, dando lugar a movimientos incompletos en los que la cabeza del animal no logra tocar su cola (giro en omega incompleto).

Además del estudio de la locomoción, ciertos fármacos han sido utilizados en *C. elegans* para evaluar la funcionalidad del sistema neuromuscular. Entre ellos, el levamisol es uno de los compuestos más empleados, ya que actúa como agonista de receptores colinérgicos, induciendo hipercontracción y parálisis muscular. La respuesta de los gusanos a este fármaco permite evaluar la eficacia de la transmisión sináptica: aquellos individuos que tardan más en paralizarse que un *wild-type* (o que no se paralizan) presentan cierto grado de resistencia, indicando un déficit en la señalización, mientras que aquellos que se paralizan más rápidamente que el *wild-type* muestran hipersensibilidad, indicando una señalización exacerbada (27).

Dado que la funcionalidad de NLG y NRX está relacionada con la formación de la sinapsis, y que mutaciones en estos genes se vinculan con los TEA, nos proponemos determinar su rol en el mantenimiento del equilibrio E/I. Evaluaremos mediante estudios comportamentales, farmacológicos y de microscopía el impacto de mutantes nulos de estas moléculas en los sistemas GABAérgicos y colinérgicos de la unión neuromuscular de *C. elegans*. Esperamos que nuestros resultados contribuyan a dilucidar mecanismos moleculares involucrados en diversos trastornos del neurodesarrollo, entre los que se encuentran los TEA.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Las proteínas codificadas por los genes *nlg-1* y *nrx-1* son necesarias para mantener el equilibrio entre la señalización excitatoria e inhibitoria (E/I) en *Caenorhabditis elegans*, y su ausencia altera la funcionalidad del sistema neuromuscular.

Objetivos

1. Determinar el impacto de las mutantes en *nlg-1* y *nrx-1* en el balance E/I

Se postuló que muchas variantes del TEA podrían estar caracterizados por un desbalance E/I en el SN (33). Múltiples evidencias reportaron deficiencias en el sistema GABAérgico en pacientes con TEA y en modelos murinos (6-8). Por lo tanto, evaluar el balance E/I mediante ensayos farmacológicos y de comportamiento en mutantes de proteínas vinculadas a la sinapsis resulta muy interesante.

2. Determinar los efectos de las mutantes *nlg-1* y *nrx-1* en la morfología neuronal

El desbalance E/I puede ser consecuencia de deficiencias en la morfología y/o fisiología de las neuronas. En *Caenorhabditis elegans* existen cepas con reporteros fluorescentes expresados bajo promotores específicos que permiten evaluar mediante microscopía de fluorescencia la morfología de una clase particular de neuronas. Por lo tanto, realizaremos cruza genéticas entre mutantes en proteínas de la sinapsis y cepas fluorescentes para evaluar el impacto de estas mutaciones en la morfología neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo y manipulación de *Caenorhabditis elegans*

Todas las cepas de *C. elegans* se cultivaron en laboratorio a temperatura ambiente (20 °C) en placas de agar tipo microbiológico llamado *Nematode Growth Media* (NGM), cuya preparación se detalla en el Anexo I, suplementadas con bacterias de la cepa *E. coli* OP50, mantenidas en medio líquido Luria-Bertani (LB; Anexo I), para su alimentación. Las placas se sembraron con 200–300 µL de la fase estacionaria del cultivo de *E. coli*.

Los experimentos se llevaron a cabo con animales sincronizados en edad. Para ello, se aislaron nematodos grávidos en placas con OP50 durante 5 horas. Después de este período, se retiraron los adultos, y se conservaron los huevos depositados hasta su eclosión. En 60-72 horas, los individuos alcanzaron el estadio L4 o adulto joven.

Para la manipulación de los animales se utilizaron elementos tales como lupas binoculares, mecheros de alcohol, y un *worm picker*, que consiste en un alambre de platino unido a una pipeta Pasteur de vidrio que funciona como mango. Las propiedades del alambre de platino permiten que el mismo pueda enfriarse rápidamente luego de ser esterilizado en la llama del mechero, propiedad ventajosa para la correcta manipulación de los animales

Las cepas utilizadas fueron:

- Cepa salvaje: N2.
- Mutante nula en *nlg-1*(ok259) (VC228): deleción de aproximadamente 2.300 pb que afecta regiones codificantes del gen *nlg-1*, generando un alelo nulo.
- Mutante nula en *nrx-1*(ok1649) (VC1416): deleción de aproximadamente 860 pb que afecta regiones codificantes del gen *nrx-1*, generando un alelo nulo.
- Cepa LX929 vsIs48 (*Punc-17::GFP*), que marca neuronas colinérgicas con la proteína verde fluorescente GFP (del inglés, Green Fluorescent Protein).
- Cepa IZ829 ufls34 (*Punc-47::mCherry*), que marca neuronas GABAérgicas con la proteína roja fluorescente mCherry.

Todas las cepas mencionadas provienen del CGC (*Caenorhabditis Genetic Center*) y están disponibles en el laboratorio. *Caenorhabditis Genetic Center* es un centro de recursos ubicado en la Universidad de Minnesota (EE.UU.) que se encarga de conservar, mantener y distribuir cepas de *C. elegans* (y especies relacionadas) para la comunidad científica. Fue creado para facilitar la investigación genética y del desarrollo usando *C. elegans* como modelo.

2. Ensayos de parálisis

Los ensayos de parálisis se llevaron a cabo en placas NGM estándar conteniendo 0,5 mM de levamisol (agonista colinérgico). Este fármaco induce la parálisis en animales salvajes, mientras que en aquellos con señalización GABAérgica disminuida o colinérgica aumentada, se observa hipersensibilidad. Se transfirieron entre 22 y 30 gusanos en el estadio L4 a estas placas y se evaluó la parálisis cada 30 minutos. Un animal se consideró paralizado cuando no respondió después de tocarlo tres veces con una pestaña en la región anterior. Se realizaron al menos cuatro ensayos independientes para cada condición. Posteriormente se realizaron curvas dosis/respuestas (% de parálisis vs tiempo) para animales *wild-type*, y mutantes nulas en *nlg-1* y *nrx-1*.

3. Respuesta de escape

Como fue descripto en detalle en la introducción, los animales salvajes presentan una respuesta coordinada de escape cuando son tocados en la región posterior de su cabeza. Esta respuesta consiste en un movimiento hacia atrás, una vuelta sobre su eje (giro en omega) y luego la recuperación de su trayectoria (Fig. 5). El giro en omega puede realizarse de manera completa, cuando el animal pliega su cuerpo hasta tocar su cabeza con la cola, produciendo un cambio de dirección cercano a los 180°. Esta forma también se conoce como giro “cerrado” y depende de la correcta señalización GABAérgica. Alternativamente, algunos animales realizan un giro “abierto”, en el que la curvatura del cuerpo es menos pronunciada y el ángulo de escape es menor (Fig. 5). Por lo tanto, cuantificar el porcentaje de giros completos (cerrados) e incompletos (abiertos o ausentes) permite identificar deficiencias en la transmisión inhibitoria.

Para realizar este ensayo se transfirieron gusanos adultos jóvenes a una placa de agar NGM sembrada con una fina capa bacteriana de *E. coli* OP50, y luego de una adaptación (10 minutos de reposo) se indujo la respuesta de escape mediante un toque suave con una pestaña en la región anterior. Luego, se analizó el comportamiento clasificando los giros en omega como cerrados o abiertos. Se realizaron 5 ensayos independientes con 20 animales para cada condición. Se evaluó la respuesta en los mutantes *nlg-1* y *nrx-1*.

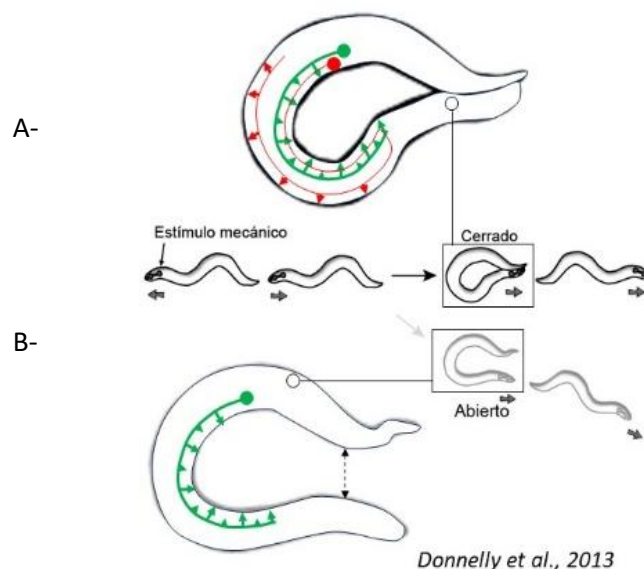


Figura 5. Respuesta locomotora de *C. elegans* ante un estímulo táctil aplicado en la parte anterior del cuerpo. (A)

Representación esquemática de la respuesta normal de escape, que incluye una reversa seguida de un giro tipo omega cerrado, el cual permite un cambio de dirección cercano a los 180°. En rojo se representan las neuronas GABAérgicas, innervando la pared dorsal, y en verde, las colinérgicas, innervando la pared ventral.

(B) Esquema de la respuesta observada en animales con ablación de neuronas GABAérgicas, en los cuales el giro tipo omega no se completa adecuadamente. En este caso, las neuronas GABAérgicas no están representadas, y se observa una flexión reducida del cuerpo, lo que disminuye el ángulo de escape final. Imagen tomada de la tesis doctoral de Sebastián Giunti: "Búsqueda de potenciales agentes quimioterápicos para los trastornos del espectro autista (TEA) utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio", Universidad Nacional del Sur, 2025.

Cabe señalar que *C. elegans* se observa en placa apoyado lateralmente sobre uno de sus costados. Por esta razón, los cordones dorsal y ventral suelen representarse a izquierda y derecha del cuerpo, aunque anatómicamente correspondan a las regiones superior e inferior, respectivamente.

4. Cruzas genéticas

Caenorhabditis elegans presenta hermafroditas y machos, lo que permite realizar cruzas entre diferentes cepas para combinar modificaciones genéticas. Se realizaron cruzas genéticas entre animales deficientes en la sinapsis (*nlg-1* o *nrx-1*) y animales con reporteros fluorescentes (LX929 *vsIs48* (*Punc-17::GFP*) marcador de neuronas colinérgicas e IZ829 *ufIs34* (*Punc-47::mCherry*) marcador de neuronas GABAérgicas), para generar animales mutantes con neuronas marcadas con reporteros fluorescentes.

Naturalmente, los machos son generados en un 0,1-0,2%. La búsqueda de machos resulta muy compleja en estas condiciones, por lo que es necesario crear un *stock* de machos antes de la crua. Para esto se somete a hermafroditas L4 a un estrés térmico o *heat shock* (30° C durante 4 horas o 37° C durante 1 hora), lo cual interfiere con la normal disyunción del par X durante la meiosis de la línea germinal en una

frecuencia mayor a la que naturalmente ocurre por azar. Esto aumenta sensiblemente la cantidad de machos en la progenie, aproximadamente hasta un 2% a 5%.

Para realizar la crua se colocaron 8 machos de una de las cepas deseadas (*Punc-47::mCherry* o *Punc-17::GFP*) junto con 2 hermafroditas de la otra cepa (*nlg-1* o *nrx-1*) en una caja de Petri pequeña. Luego se asilaron machos de la F1 y se volvieron a cruzar con hermafroditas iguales a las de la primera crua. Finalmente, se aislaron gusanos L4 provenientes de esta segunda crua y se seleccionaron únicamente aquellos cuya descendencia era 100% roja o verde, según la crua realizada, para genotipar las cepas por PCR (Fig. 6).

Las nuevas cepas dobles mutantes generadas en esta tesis luego se incorporaron a la biblioteca de cepas del Laboratorio de Neurobiología de Invertebrados.

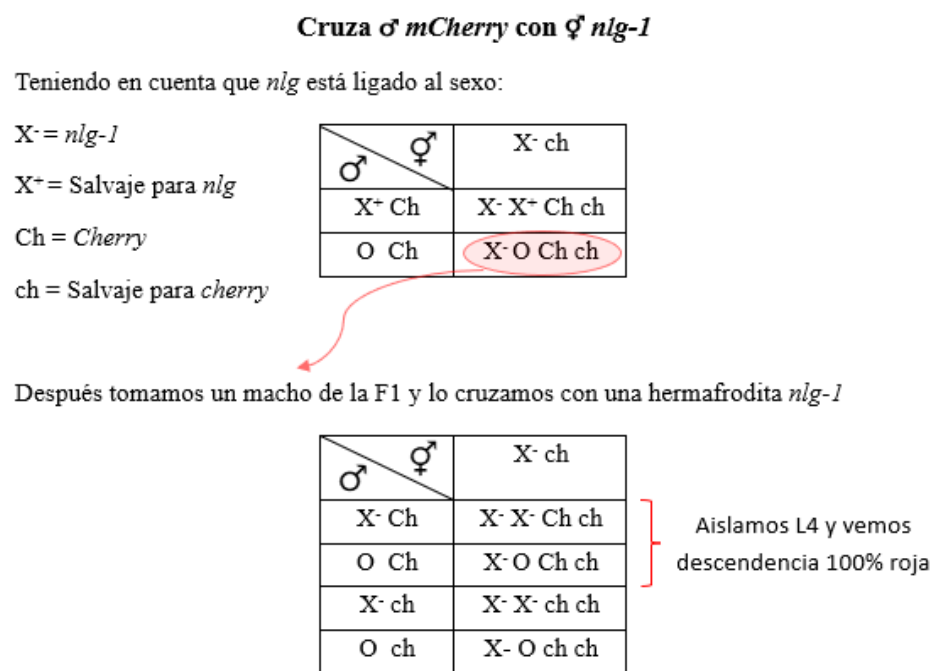


Figura 6. Ejemplificación de una crua genética en *C. elegans*. Se muestra el esquema realizado en la crua entre machos *mCherry* y hermafroditas *nlg-1*. Se muestran los gametos que cada cepa puede generar y las combinaciones genéticas esperadas en F1 y F2 para los loci *nlg-1* (ligado al cromosoma X) y *mCherry* (autosómico). Finalmente se corrobora el genotipo por PCR.

5. PCR de punto final

Esta técnica se utilizó para el genotipado de cruas genéticas. Para la extracción de ADN, se realizó una lisis de aproximadamente 20 animales adultos, para esto se utilizó un buffer de lisis con proteinasa K (Anexo I) durante 75 minutos a 65°C. Luego, se amplificaron los genes mediante PCR haciendo uso de

primers adquiridos a través de proveedores comerciales, diseñados mediante el programa Ape de la Universidad de Utah, USA (<http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>). Para ello se utilizaron los siguientes reactivos, expuestos en una reacción modelo (Volumen Final 20 µl):

Agua.....	13 µL
Buffer 10X.....	2 µL
MIX dNTPS 2,5 mM (desoxirribonucleótidos).....	1 µL
Primer 1 sentido 10 pmoles.....	1 µL
Primer 2 antisentido 10 pmoles.....	1 µL
ADN polimerasa termoestable (Taq) 1 unidad.....	1 µL
Lisado.....	1 µL

Programa estándar de PCR para termociclador utilizado:

- 1) 93° C (desnaturalización inicial) 5'
- 2) 93° C (desnaturalización) 20''
- 3) 57° C (hibridación de primers) 30-45'' La temperatura depende de cada primer, utilizándose 4 grados menos que la Tm calculada por el proveedor.
- 4) 72° C (polimerización) 1'
- 5) Repetir desde el paso 2 unas 35 veces.
- 6) 72° C (polimerización final) 5' como paso final
- 7) 4° (opcional, durante el tiempo que se necesite conservar a esa temperatura)

Para revelar las bandas, se sembró el producto de amplificación en geles de agarosa al 1% y se corrió en un buffer de TAE (Anexo I) a 65-70 V durante 15-20 minutos.

6. Técnicas de microscopía

Se montaron gusanos en el estadio L4 que portaban los reporteros fluorescentes *vsIs48* (*Punc-17::GFP*, neuronas colinérgicas) o *ufIs34* (*Punc-47::mCherry*, neuronas GABAérgicas), en láminas de agarosa para microscopía (Anexo I) y se inmovilizaron con azida sódica (0,25M), un inhibidor del transporte de electrones que causa parálisis. Los gusanos fueron observados bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE 2000) para identificar defectos morfológicos en las neuronas, como comisuras en puentes o truncamientos.

Se analizaron entre 10 y 15 gusanos por ensayo, con un total de al menos cuatro ensayos independientes. Para el análisis, se clasificó cada animal como “normal” o “defectuoso” según la presencia

de cualquier alteración morfológica observable en las comisuras. No se realizó una diferenciación por tipo de defecto ni se contabilizó la cantidad de estructuras alteradas por individuo.

7. Análisis estadísticos

Se empleó el software *SigmaPlot 14.0* para el procesamiento y análisis estadístico de los datos, mientras que para el diseño de los gráficos se utilizó el software *GraphPad Prism* versión 8.0.1.

Los valores de p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Anexo de protocolos generales: Medios y Soluciones

Nematode Growth Medium (NGM)

- NaCl 3 g
- Bacto-Agar 20 g
- Peptona (Trypteína Bacteriológica) 2,5 g
- ddH₂O c.s.p. 1 L

A continuación, se debe autoclavar y luego enfriar a 60° C para agregar:

- 1M CaCl₂ 1 mL
- 5 mg/ml Colesterol en etanol 1 mL
- 1M MgSO₄ 1 mL
- 1M KPO₄ pH 6.0 25 mL

Medio LB (1 L de solución)

- Extracto de levadura 5 g
- Peptona (Trypteína Bacteriológica) 10 g
- NaCl 10 g
- ddH₂O c.s.p. 1L
- Ajustar a pH 7,0 con NaOH

Buffer de lisis 2x (60 mL de solución)

- KCl 1M 6 mL
- Tris (pH 8,3) 1,2 mL
- MgCl₂ 1M 300 uL
- IGEPAL 100% (o NP40) 540 uL
- Tween-20 100% 540 uL
- Gelatina 1% 1,2 mL
- Proteinasa K 20 mg/mL 600 uL
- ddH₂O 49,6 mL

Gel de agarosa para electroforesis al 1% (25 mL)

- Agarosa 0,25 g
- TAE 1X 25 mL
- Bromuro de etidio 1 uL

50 x TAE (1L de solución)

- Tris Base 242 g
- Ácido acético glacial 57,1 g
- Na₂EDTA-2H₂O 37,2 g
- ddH₂O c.s.p. 1L
- Verificar que el pH sea 8.5

Agarosa al 2% para Pads de microscopía (30 mL)

- Agarosa 0,6 g
- M9 30 mL

M9 (1 L de solución)

- Na₂HPO₄ 5,8 g
- KH₂PO₄ 3,0 g
- NaCl 0,5 g
- NH₄Cl 1,0 g
- ddH₂O c.s.p. 1L
- Autoclave (121 °C, 15 min)

RESULTADOS

Impacto de las mutantes en *nlg-1* y *nrx-1* en el balance E/I

Para dar respuesta al primer objetivo de este trabajo evaluamos diferentes comportamientos en los cuales impacta el balance E/I.

Primeramente, nos centramos en determinar la sensibilidad a drogas colinérgicas en la unión neuromuscular. En *C. elegans* la unión neuromuscular recibe señales excitatorias (colinérgicas) e inhibitorias (GABAérgicas) para controlar la contracción y relajación muscular, lo que hace que sea un sistema simple y accesible para el estudio del desbalance E/I. Para esto evaluaremos el tiempo en que tarda en inducirse la parálisis en mutantes nulos en *nlg-1* y *nrx-1* al ser expuestos al levamisol. El levamisol al ser un agonista de receptores Colinérgicos produce una hipercontracción y parálisis muscular. Al entrar en contacto con esta droga la parálisis se da con el transcurso del tiempo, y es dependiente de la concentración. Se considera que aquellos animales que tardan más en paralizarse que un *wild-type* (o directamente no se paralizan) presentan cierto grado de resistencia, y en caso contrario, hipersensibilidad.

Otro comportamiento relacionado con el balance E/I es la respuesta de escape, que puede ser evaluada para analizar la función neuromuscular. Esta consiste en una locomoción en reversa seguida de un giro en omega, que permite al animal cambiar bruscamente de dirección, alejándose del estímulo aversivo. Durante este giro, se produce una contracción pronunciada de los músculos ventrales, junto con una relajación coordinada de los músculos dorsales. La contracción ventral es mediada por neuronas motoras colinérgicas, mientras que la relajación dorsal depende críticamente de la inhibición ejercida por neuronas motoras GABAérgicas. Si esta inhibición es deficiente, como puede ocurrir ante un desbalance E/I, el giro en omega se ve comprometido. Aprovechando esta característica, evaluamos la eficacia del giro en omega en mutantes *nlg-1* y *nrx-1*, para analizar el impacto de estas mutaciones en la señalización neuromuscular.

Mutantes *nrx-1* afectan la parálisis inducida por levamisol

Para evaluar posibles alteraciones en la neurotransmisión colinérgica a nivel de la unión neuromuscular, se empleó un ensayo de parálisis inducida por levamisol. El tiempo que tarda cada gusano en paralizarse puede utilizarse como indicador indirecto de la sensibilidad a la estimulación colinérgica.

Como se muestra en la Figura 7, los mutantes *nlg-1* no presentan diferencias significativas en la cinética de parálisis respecto de los animales *wild-type*.

En el caso de los mutantes *nrx-1*, se encontró que estos presentaron un cambio en la sensibilidad al levamisol, presentando una parálisis más rápida en comparación con los animales *wild-type*. Si bien la tendencia de mayor sensibilidad se ve en toda la curva, llegando rápidamente a la saturación del efecto, solamente en los primeros tiempos de evaluación (30 y 60 minutos), pudimos determinar diferencias significativas ($p < 0,05$).

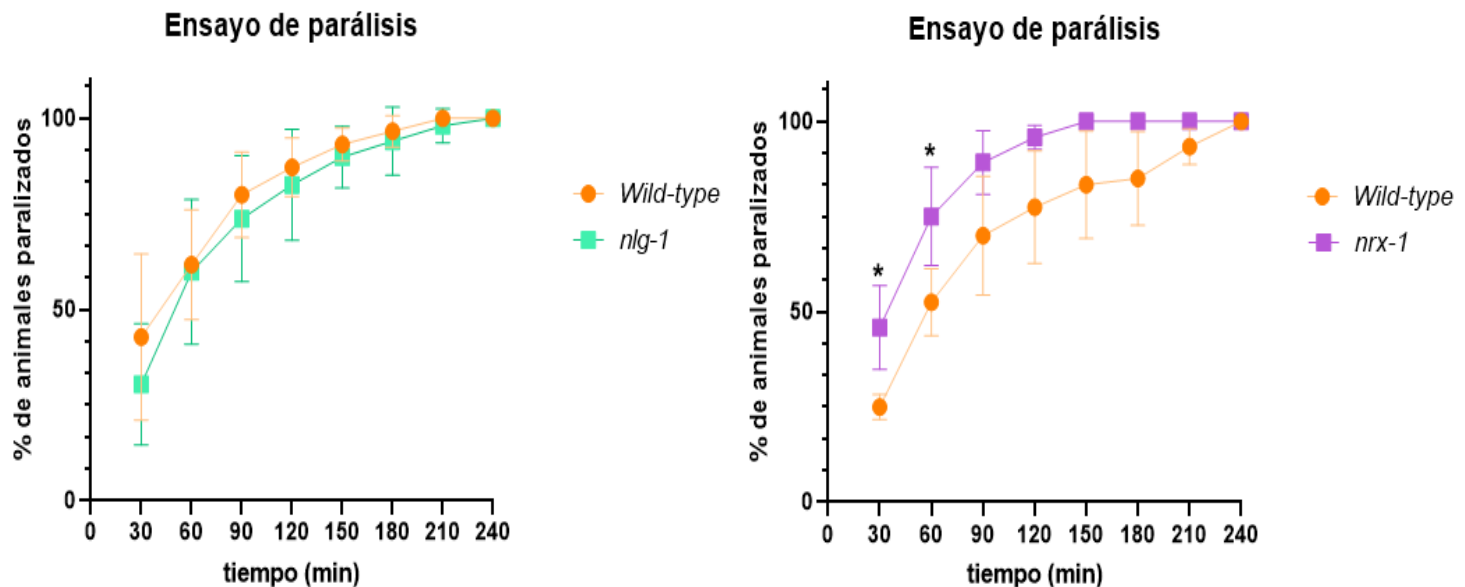


Figura 7. Sensibilidad a levamisol en *C. elegans*: Comparación entre animales *wild-type* y mutantes nulos en neurexina y neuroligina

Los gráficos representan el porcentaje de animales paralizados en función del tiempo tras el contacto inicial con levamisol 0,5 mM. Los animales fueron evaluados a intervalos de 30 minutos y se cuantificó la cantidad de animales que no responden al estímulo. Se realizaron al menos cuatro ensayos independientes por condición, utilizando entre 22 y 30 animales en cada ensayo. Los datos se representan como media $\pm$ desvío estándar. Se utilizó la prueba t de Student para comparar las medias en cada tiempo.

:

Mutantes *nrx-1* y *nlg-1* presentan una respuesta de escape deficiente frente a estímulos mecánicos

El giro en omega es un componente fundamental de la respuesta de escape en *C. elegans*, la ejecución adecuada de este giro depende de una contracción y relajación coordinada de la musculatura corporal, un proceso que requiere de una neurotransmisión GABAérgica funcional. Cuando esta señal está comprometida, el gusano no logra realizar el giro de manera completa, resultando en una trayectoria de escape menos efectiva. Por este motivo, este ensayo se utiliza como un indicador indirecto del funcionamiento de la señal inhibitoria.

En este contexto, se analizó la frecuencia de giros en omega completos en animales mutantes nulos para *nlg-1* y *nrx-1*. Como se muestra en la Figura 8, los animales *wild-type* presentaron un alto porcentaje de giros completos tras la estimulación ($89\% \pm 7,4$). En cambio, los mutantes *nlg-1* mostraron una reducción significativa ($75\% \pm 8,9$; $p < 0,05$), lo que sugiere una afectación moderada de la señal GABAérgica.

En los mutantes *nrx-1*, el defecto fue más severo, con solo un $40\% \pm 11,5$ de giros completos, en comparación con el $77,5\% \pm 8,6$ de sus respectivos controles ($p < 0,01$).

Estos resultados indican una menor eficiencia en la ejecución del giro en omega en ambos mutantes en comparación con el grupo control.

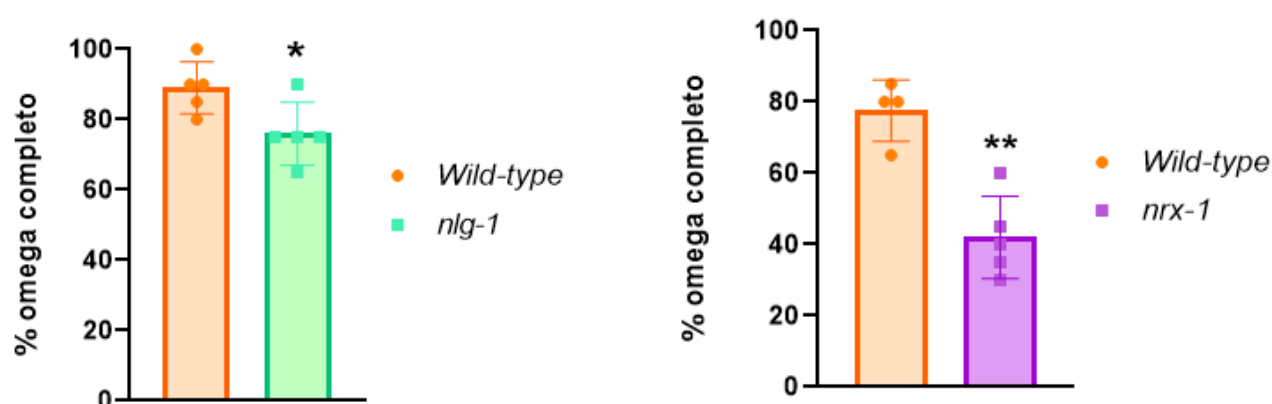


Figura 8. Efecto de la pérdida de neuroligina y neurexina en la ejecución del giro en omega en *C. elegans*

El grafico representa el porcentaje de animales que realizan un giro en omega completo o cerrado tras estimulación mecánica de la región anterior (ver sección Materiales y Métodos). Se realizaron 5 ensayos independientes con 20 animales para cada condición. Los datos se representan como media $\pm$ desvío estándar. Se utilizó la prueba t de Student para comparar las medias.

Efectos de las mutantes *nlg-1* y *nrx-1* en la morfología neuronal

Para dar respuesta al segundo objetivo de este trabajo observamos la morfología de las neuronas involucradas en el balance E/I. Los cuerpos celulares de las neuronas motoras colinérgicas (excitatorias) y GABAérgicas (inhibitorias) que inervan los músculos de la pared corporal se encuentran en el cordón nervioso ventral, y un subconjunto extiende comisuras de proceso único al cordón nervioso dorsal (Fig. 9). Las comisuras han demostrado ser útiles para estudiar defectos en el desarrollo o mantenimiento de las neuronas motoras. Esta estructura es conservada en todos los animales.

Para evaluar posibles alteraciones morfológicas, utilizamos líneas reporteras que expresan proteínas fluorescentes específicas de cada tipo neuronal, lo cual permitió visualizar mediante microscopía de fluorescencia la organización y estructura de estas neuronas.

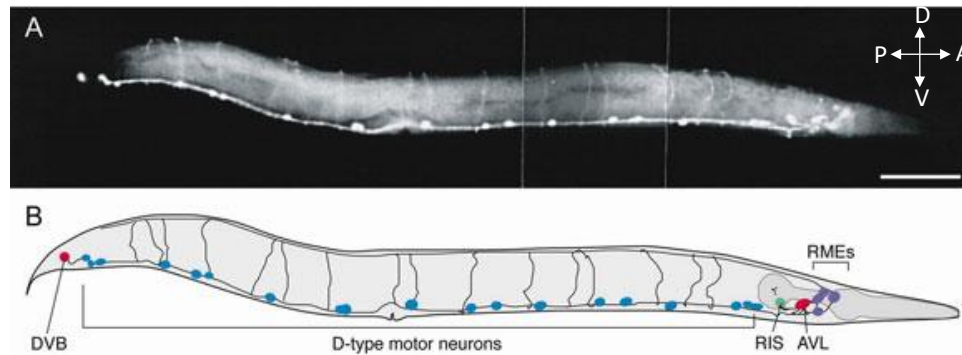


Figura 9. Distribución de neuronas GABAérgicas en *C. elegans*. (A) Micrografía fluorescente de un hermafrodita adulto de *C. elegans* teñido con un antisuero anti-GABA. Hay 26 neuronas que se tiñen para GABA. La parte anterior está a la derecha y se muestra el lado derecho del cuerpo. Barra de escala = 0,10 mm. (B) Dibujo esquemático de las posiciones de las 26 neuronas que contienen GABA. Imagen tomada de McIntire SL. GABA, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, 2006. Disponible en: http://www.wormbook.org/chapters/www_gaba/gaba.html

Mutantes nulas en neurologina no presentan diferencias significativas en defectos en las comisuras de las motoneuronas

Mediante ensayos de microscopía de fluorescencia, analizamos la morfología de las neuronas motoras colinérgicas y GABAérgicas en animales en el estadio L4, tanto *wild-type* como mutantes *nlg-1*. Para esto utilizamos líneas transgénicas que expresan GFP bajo el promotor *unc-17* y *mCherry* bajo el promotor *unc-47*, en *background* genético salvaje y en las cruas obtenidas en esta tesina (*background* nulo en *nlg-1*). En animales *wild-type* no pudimos detectar errores en las comisuras de neuronas colinérgicas ni GABAérgicas. Al analizar los errores en los animales *nlg-1*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de defectos en las comisuras, en comparación con los animales *wild-type*. Cabe destacar que en este análisis se registró únicamente si cada individuo presentaba o no defectos morfológicos en las comisuras, sin discriminar el tipo de alteración ni la cantidad de estructuras afectadas. Esta estrategia binaria permitió evaluar de forma general la incidencia de errores en cada cepa.

En nuestro análisis, un $7,5\% \pm 4,2\%$ de los mutantes presentó defectos en las comisuras de neuronas GABAérgicas (Fig. 10), mientras que un $6\% \pm 3,3\%$ mostró defectos en neuronas colinérgicas (Fig. 11). En

el grupo *wild-type*, no se detectaron errores en ninguno de los individuos analizados (0/40 animales). Estos resultados se resumen en la Figura 12, donde se observa que el porcentaje de animales con comisuras defectuosas fue bajo en todos los grupos analizados, sin diferencias estadísticamente significativas entre los mutantes *nlg-1* y los animales *wild-type*.

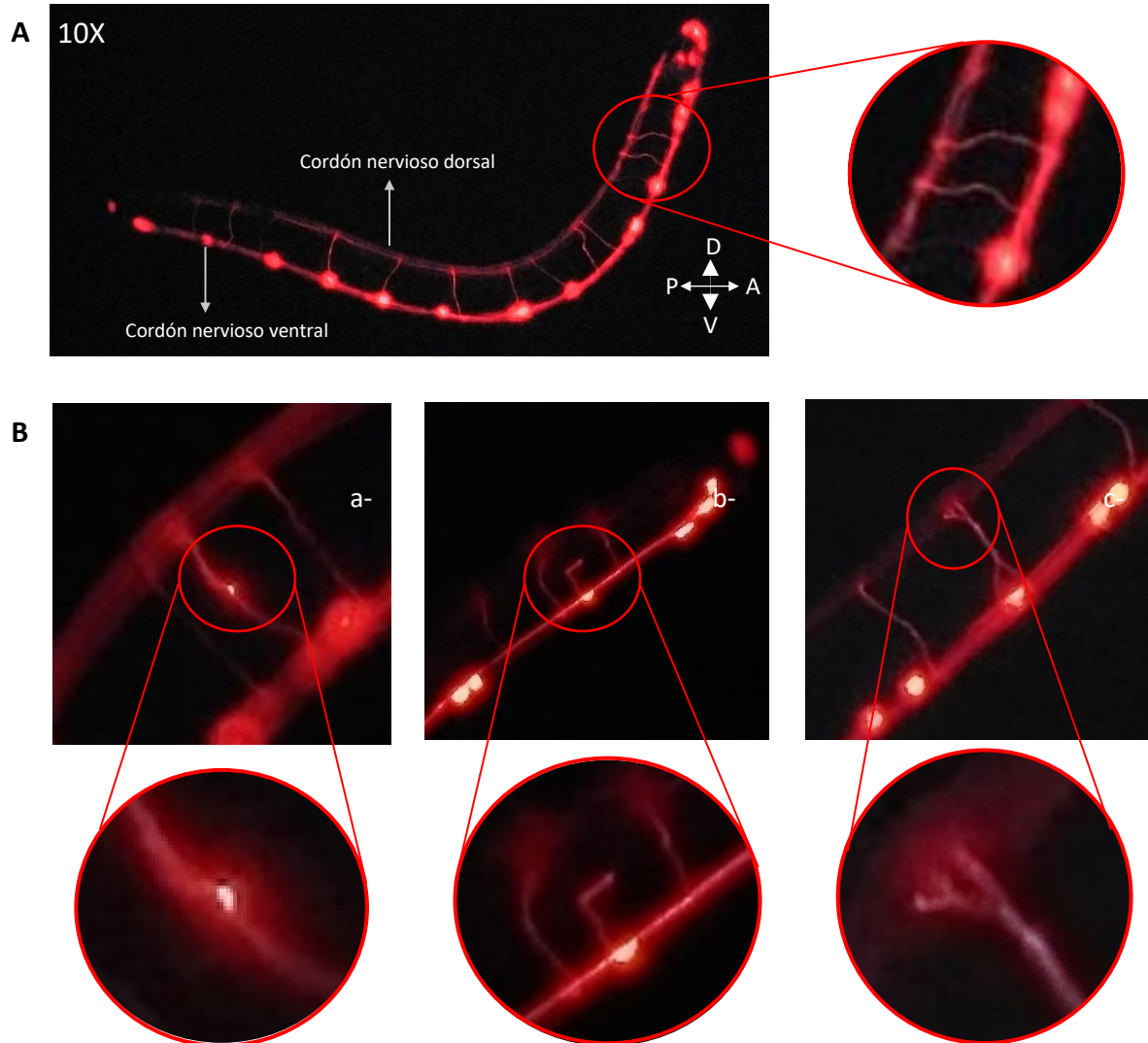


Figura 10. Disposición de las motoneuronas GABAérgicas observadas bajo microscopía de fluorescencia. (A) Imagen en vista lateral de un animal *wild-type* que expresa *mCherry* bajo el promotor *unc-47*, marcando neuronas GABAérgicas. Se observa la disposición típica de las comisuras entre los cordones dorsales y ventrales. **(B)** Imagen representativa de un animal mutante nulo en neurologina (*nlg-1*) que presenta defectos morfológicos en las comisuras. a. defectos en migración, b. defectos de guiado y c. defecto de ramificación.

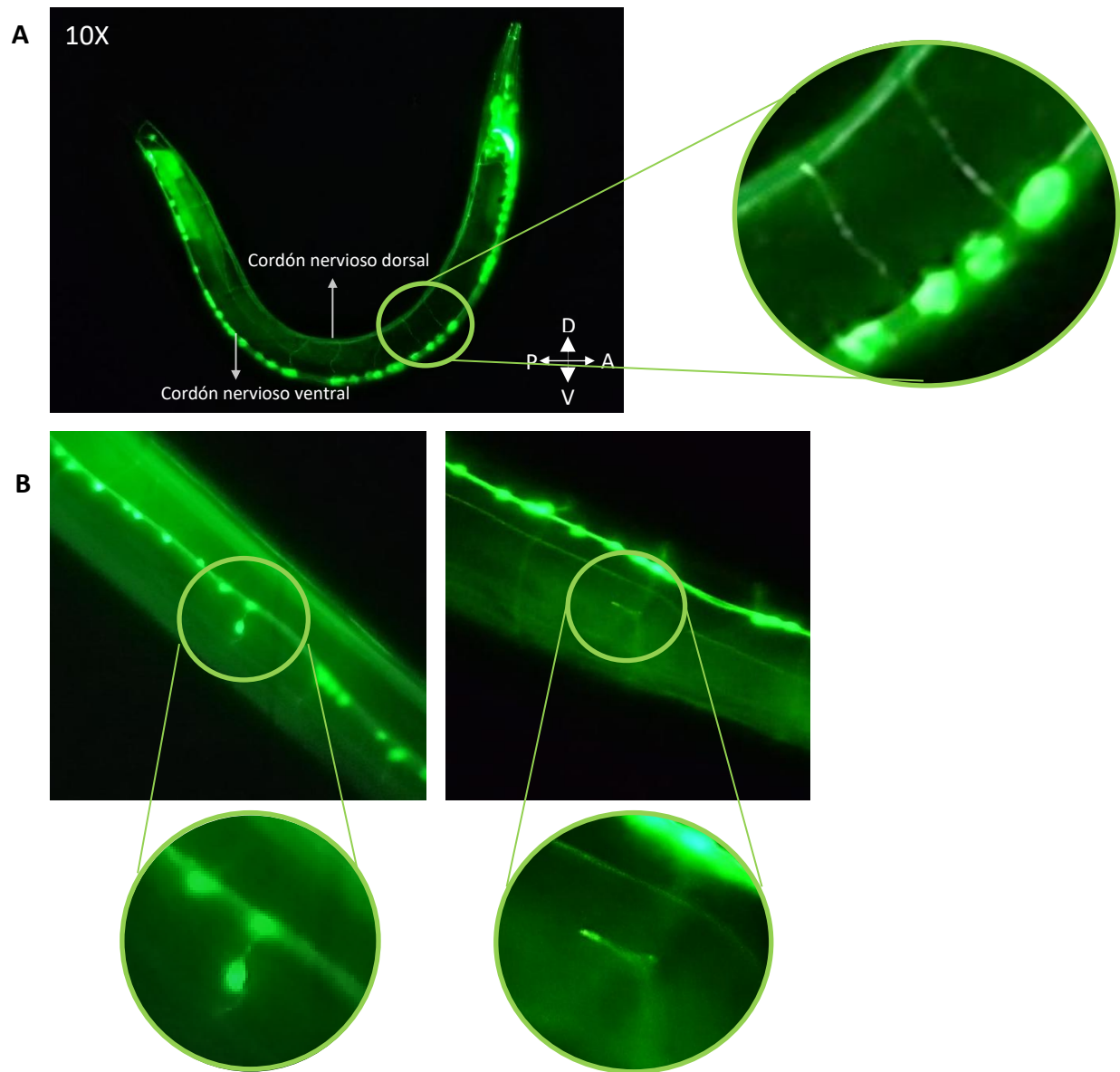


Figura 11. Disposición de las motoneuronas colinérgicas observadas bajo microscopía de fluorescencia. (A) Imagen en vista lateral de un animal *wild-type* que expresa GFP bajo el promotor *unc-17*, marcando neuronas motoras colinérgicas. Se observa la disposición típica de las comisuras entre los cordones dorsales y ventrales. **(B)** Imagen de mutantes nulas en *neurologina* que presentan mutaciones en las neuronas motoras colinérgicas. a. defectos de migración y b. defectos de guiado.

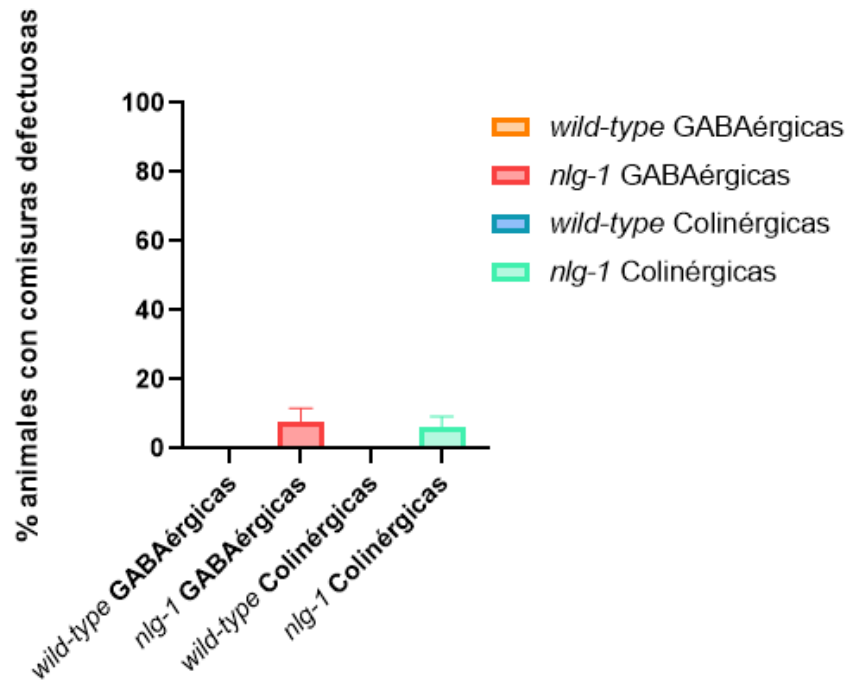


Figura 12. Porcentaje de animales con defectos morfológicos en las comisuras de motoneuronas colinérgicas y GABAérgicas. Se muestra el porcentaje de animales que presentan defectos morfológicos en las comisuras de motoneuronas colinérgicas (*unc-117p::GFP*) y GABAérgicas (*unc-47p::mCherry*) en animales *C. elegans* con background genético *wild-type* o mutantes nulos para *nlg-1*. Se analizaron al menos 40 animales por condición en múltiples réplicas independientes. Los datos se expresan como media $\pm$ desvío estándar. No se observaron diferencias significativas entre grupos.

Discusión

Los trastornos del neurodesarrollo, incluyendo los trastornos del espectro autista (TEA), se han asociado fuertemente con alteraciones en el equilibrio entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria (E/I) en el sistema nervioso central. Este delicado balance es esencial para el procesamiento sensorial, la ejecución motora y la función cognitiva, y su disrupción puede tener consecuencias funcionales profundas. A nivel molecular, este equilibrio está mediado por múltiples componentes sinápticos, entre ellos las proteínas de adhesión transináptica neurexina y neuroligina, cuya interacción regula la formación, maduración y especificidad de las sinapsis excitatorias e inhibitorias.

En este trabajo se exploró el impacto de la pérdida de función de *nlg-1* (neuroligina) y *nrx-1* (neurexina) en *Caenorhabditis elegans*, un modelo genético ampliamente validado para el estudio de mecanismos sinápticos conservados. A pesar de que el sistema nervioso de *C. elegans* es relativamente simple, los principios básicos de organización sináptica y neurotransmisión están altamente conservados con los de vertebrados, incluyendo la expresión y función de ortólogos de genes humanos implicados en TEA.

Los resultados obtenidos sugieren que la pérdida de función de neuroligina no provoca defectos morfológicos significativos, ya que no se observaron diferencias en la frecuencia de errores en las comisuras en neuronas GABAérgicas y colinérgicas, entre animales *nlg-1* y los controles *wild-type*. Si bien se registraron comisuras defectuosas en un pequeño número de animales mutantes, estos hallazgos no permiten concluir un efecto estructural consistente de *nlg-1* en este contexto, y deberán ser interpretados con cautela hasta contar con un mayor número de réplicas. A pesar de ello, estos mutantes presentaron una disminución significativa en la frecuencia de giros omega durante la respuesta de escape, lo que sugiere un efecto funcional relevante y amerita un estudio más profundo.

A nivel funcional, los mutantes *nrx-1* mostraron una hipersensibilidad a levamisol, un agonista de los receptores colinérgicos de la unión neuromuscular, lo cual sugiere una posible desregulación de la inhibición GABAérgica o una alteración en la homeostasis sináptica que afecta el tono muscular. Por otro lado, estos mutantes también presentaron una disminución en la frecuencia de giros omega completos durante la respuesta de escape, una conducta que depende críticamente de la coordinación precisa entre señales excitatorias colinérgicas e inhibitorias GABAérgicas. Esta alteración sugiere un desbalance funcional en los circuitos motores, y es congruente con hallazgos previos que vinculan mutaciones en genes sinápticos con fallas en la ejecución motora y en la plasticidad de respuesta.

Cabe destacar que, si bien se observaron algunas variaciones interexperimentales en los controles *wild-type*, especialmente en los ensayos de parálisis por levamisol, las diferencias entre mutantes y controles fueron consistentes en su dirección y tendencia a lo largo de múltiples réplicas independientes. Estas

variaciones pueden atribuirse a factores técnicos comunes en este tipo de ensayos, como la variabilidad en la absorción del fármaco o condiciones ambientales durante la prueba (temperatura, grosor de la capa bacteriana, etc.). A pesar de ello, la reproducibilidad relativa de los resultados en los mutantes permite sostener con solidez las conclusiones funcionales.

Es importante destacar que los efectos funcionales observados fueron más marcados en los mutantes *nrx-1* que en los mutantes *nlg-1*. Mientras que *nlg-1* mostró alteraciones estructurales leves y una reducción moderada en la respuesta de escape, *nrx-1* presentó fenotipos funcionales más evidentes, incluyendo una hipersensibilidad pronunciada a levamisol. Esta diferencia podría deberse a la localización y al rol que cada proteína cumple en la sinapsis: las neuroliginas actúan principalmente del lado postsináptico, donde modulan la estabilización de receptores y la maduración sináptica, mientras que las neurexinas se localizan en la membrana presináptica, participando en la organización de los sitios de liberación, el anclaje vesicular y la regulación de la maquinaria de exocitosis. Al estar directamente involucradas en los procesos que controlan la liberación de neurotransmisores, la pérdida de *nrx-1* podría afectar de forma más directa y global la eficacia de la transmisión sináptica. Esta diferencia funcional entre ambas proteínas podría contribuir a explicar por qué los fenotipos en *nrx-1* resultan más notorios que los observados en *nlg-1*.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan el papel funcional de *nlg-1* y *nrx-1* como moduladores claves del equilibrio E/I en *C. elegans*. Aunque se trata de un sistema nervioso simple, este modelo permitió identificar alteraciones estructurales y funcionales asociadas a la pérdida de estas proteínas, lo que refuerza su relevancia en la organización y funcionamiento de los circuitos neuronales. Estos hallazgos aportan evidencia sobre mecanismos conservados en la evolución y destacan el valor de *C. elegans* para estudiar genes implicados en trastornos del neurodesarrollo.

Además, durante el desarrollo de esta tesina obtuve el entrenamiento básico necesario para trabajar con el modelo *C. elegans*. Me capacité en el cultivo, la realización de ensayos comportamentales y de microscopía, más allá de adquirir las herramientas necesarias para diseñar un experimento y analizar los datos obtenidos con rigurosidad científica. Los resultados de esta tesina son prometedores en cuanto al establecimiento de relaciones entre mutaciones reportadas en ciertos pacientes con TEA y sus repercusiones en el sistema nervioso y sientan las bases para la proyección de futuros experimentos. Más allá de que no llegamos a analizar los cambios morfológicos ocasionados en las neuronas GABAérgicas y colinérgicas en las mutante nulas *nrx-1*, ya hemos obtenido las mutantes dobles, entre los reporteros fluorescentes y la mutante, por lo que próximamente se avanzará con los estudios de microscopía en estas mutantes.

En un futuro, se espera poder reproducir en estos modelos, las mutaciones reportadas en los pacientes con TEA, para generar modelos más precisos.

Bibliografia

1. Ludwig PE, Reddy V, Varacallo MA. Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS) [Updated 2022 Oct 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442010/>
2. Farley, A., Johnstone, C., Hendry, C. & McLafferty, E. Nervous system: part 1. Nurs Stand 28, 46-51, doi:10.7748/ns2014.04.28.31.46.e7004 (2014)
3. Hyman, S. L., Levy, S. E., Myers, S. M., & COUNCIL ON CHILDREN WITH DISABILITIES, SECTION ON DEVELOPMENTAL AND BEHAVIORAL PEDIATRICS (2020). Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. Pediatrics, 145(1), e20193447. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-3447>
4. Parenti, I., Rabaneda, L. G., Schoen, H. & Novarino, G. Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. Trends Neurosci 43, 608-621, doi:10.1016/j.tins.2020.05.004 (2020).
5. Ylisaukko-oja, T. et al. Analysis of four neuroligin genes as candidates for autism. Eur J Hum Genet 13, 1285-1292, doi:10.1038/sj.ejhg.5201474 (2005).
6. Bozzi, Y., Provenzano, G., & Casarosa, S. (2018). Neurobiological bases of autism-epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. The European journal of neuroscience, 47(6), 534–548. <https://doi.org/10.1111/ejn.13595>
7. Coghlan, S., Horder, J., Inkster, B., Mendez, M. A., Murphy, D. G., & Nutt, D. J. (2012). GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms. Neuroscience and biobehavioral reviews, 36(9), 2044–2055. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.07.005>
8. Oblak, A., Gibbs, T. T., & Blatt, G. J. (2009). Decreased GABAA receptors and benzodiazepine binding sites in the anterior cingulate cortex in autism. Autism research: official journal of the International Society for Autism Research, 2(4), 205–219. <https://doi.org/10.1002/aur.88>
9. Kim, H.-G. et al. Disruption of Neurexin 1 Associated with Autism Spectrum Disorder. The American Journal of Human Genetics 82, 199-207, doi:10.1016/j.ajhg.2007.09.011 (2008).
10. Gilbert, J., & Man, H. Y. (2017). Fundamental Elements in Autism: From Neurogenesis and Neurite Growth to Synaptic Plasticity. Frontiers in cellular neuroscience, 11, 359. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00359>
11. Craig, A. M., & Kang, Y. (2007). Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. Current opinion in neurobiology, 17(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.01.011>

12. Rawsthorne, H., Calahorro, F., Feist, E., Holden-Dye, L., O'Connor, V., & Dillon, J. (2021). Neuroligin dependence of social behaviour in *Caenorhabditis elegans* provides a model to investigate an autism-associated gene. *Human molecular genetics*, 29(21), 3546–3553. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa232>
13. Rawsthorne, H., Calahorro, F., Holden-Dye, L., O' Connor, V., & Dillon, J. (2021). Investigating autism associated genes in *C. elegans* reveals candidates with a role in social behaviour. *PloS one*, 16(5), e0243121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243121>
14. Chen, J., Yu, S., Fu, Y., & Li, X. (2014). Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 276. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00276>
15. Banerjee, S., Riordan, M., & Bhat, M. A. (2014). Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 58. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00058>
16. Schmeisser, K. & Parker, J. A. Worms on the spectrum - *C. elegans* models in autism research. *Exp Neurol* 299, 199-206, doi:10.1016/j.expneurol.2017.04.007 (2018).
17. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94, doi:10.1093/genetics/77.1.71 (1974).
18. Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56, 110-156, doi:10.1016/0012-1606(77)90158-0 (1977).
19. Kaletta, T. & Hengartner, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* 5, 387-398, doi:10.1038/nrd2031 (2006).
20. Meneely, P. M., Dahlberg, C. L. & Rose, J. K. Working with Worms: *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 19, e35, doi:https://doi.org/10.1002/cpet.35 (2019).
21. Cassada, R. C. & Russell, R. L. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 46, 326-342, doi:10.1016/0012-1606(75)90109-8 (1975).
22. WormBook. (2005). Introduction to *C. elegans*. The *C. elegans* Research Community. http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html
23. WormAtlas. (2023). Male anatomy. The *C. elegans* Research Community. <https://www.wormatlas.org/male/introduction/mainframe.htm>
24. Hodgkin, J. & Barnes, T. M. More is not better: brood size and population growth in a self-fertilizing nematode. *Proc Biol Sci* 246, 19-24, doi:10.1098/rspb.1991.0119 (1991).
25. Rapti, G. A perspective on *C. elegans* neurodevelopment: from early visionaries to a booming neuroscience research. *J Neurogenet* 34, 259-272, doi:10.1080/01677063.2020.1837799 (2020)

26. Thapliyal, S. & Babu, K. in Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules (eds Kausik Chattopadhyay & Subhash C. Basu) 185-196 (Springer Singapore, 2018).
27. Mahoney, T. R., Luo, S. & Nonet, M. L. Analysis of synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans* using an aldicarb-sensitivity assay. *Nat Protoc* 1, 1772-1777, doi:10.1038/nprot.2006.281 (2006).
28. Gjorgjieva, J., Biron, D. & Haspel, G. Neurobiology of *Caenorhabditis elegans* Locomotion: Where Do We Stand? *BioScience* 64, 476-486, doi:10.1093/biosci/biu058 (2014).
29. Tolstenkov, O. et al. Functionally asymmetric motor neurons contribute to coordinating locomotion of *Caenorhabditis elegans*. *eLife* 7, e34997, doi:10.7554/eLife.34997 (2018).
30. Pirri, J. K. & Alkema, M. J. The neuroethology of *C. elegans* escape. *Curr Opin Neurobiol* 22, 187-193, doi:10.1016/j.conb.2011.12.007 (2012).
31. Donnelly, J. L. et al. Monoaminergic orchestration of motor programs in a complex *C.elegans* behavior. *PLoS Biol* 11, e1001529, doi:10.1371/journal.pbio.1001529 (2013)
32. McIntire, S. L., Jorgensen, E., Kaplan, J. & Horvitz, H. R. The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364, 337-341, doi:10.1038/364337a0 (1993)
33. Tao, H. W., Li, Y. T., & Zhang, L. I. (2014). Formation of excitation-inhibition balance: inhibition listens and changes its tune. *Trends in neurosciences*, 37(10), 528–530. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.09.001>