

Tesis de Doctorado en Biología

Búsqueda de potenciales agentes quimioterápicos para los trastornos del espectro autista (TEA) utilizando Caenorhabditis elegans como modelo de estudio

Lic. Sebastián Giunti

Director: Dr. Diego Hernán Rayes / Codirectora: Dra. María José de Rosa

Prefacio

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Biología, 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 ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur (UNS); durante el período comprendido entre abril de 2018 y noviembre de 2024, bajo la dirección del Dr. Diego Hernán Rayes la codirección de la Dra. María José De Rosa.

Lic. en Cs. Biológicas Sebastián Giunti

	UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Subsecretaría de Posgrado
La presente tesis ha sido aprobada el 25/04/2025	
mereciendo la calificación de 10 (DIEZ)	

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas y organizaciones que, de diversas maneras, hicieron posible la realización de esta tesis.

A mi familia: Daniel, Alicia y Heli; y a mi novia Gabi, gracias a ustedes por el apoyo incondicional que siempre me brindaron durante todos estos años. Su compañía y confianza fueron fundamentales para alcanzar esta meta.

A mis directores de tesis, Diego y Jo, por haberme guiado en el camino, y por la humildad y generosidad de acompañarme a la par en los experimentos, además de todo lo que me enseñaron. Su compromiso y dedicación han sido una inspiración y un modelo a seguir.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Gabi, Tania, Nati, Stefa, Ailín, a todos los nuevos integrantes que hoy forman parte del equipo, y también a quienes pasaron, aunque fuera por un tiempo, con quienes compartimos tantas horas en el cuartito y el laboratorio de gusanos. Gracias por su apoyo, la amistad y por todos los momentos que pasamos juntos.

A todos mis amigos del INIBIBB, quienes siempre estuvieron ahí; gracias por el tiempo compartido, por tantas charlas y risas en la Milstein, y por los congresos y viajes que vivimos juntos. Gracias por todos los momentos divertidos que vivimos, siempre sin descuidar el trabajo, la responsabilidad y la seriedad que CONICET merece. Un agradecimiento especial a la gente linda de la Peña, ese cable a tierra que espero no se corte nunca.

Al Dr. Andrés Garelli por facilitarnos el script de Python “VimbaPerón”, ayudándonos así con nuestros experimentos de Optogenética (y toda la ayuda en otros aspectos técnicos relacionados con la programación).

A todo el personal de apoyo del INIBIBB, que sin ellos el trabajo de los becarios sería casi imposible.

A toda la cátedra de Biología Celular, especialmente a Edgardo Buzzi, por toda su ayuda con el microscopio durante todos estos años; gracias a ustedes por la amistad y por tantos momentos compartidos. También a la cátedra de Fisiología Humana, por tanta buena onda este último año.

A CONICET, por el respaldo institucional, la beca, el financiamiento al laboratorio y al proyecto IDEA, y todas las instituciones que mediante financiación hicieron posible la realización de este proyecto y muchos otros de nuestro laboratorio.

A la Universidad Nacional del Sur y a todas las personas que, desde el Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, me brindaron su apoyo durante estos años de formación.

Gracias a todos ustedes por ser parte de esto.

Publicaciones en revistas científicas

-**Giunti, S.**, Blanco, M.G, De Rosa, M.J., Rayes, D. (2024). "The ketone body β -hydroxybutyrate rescues neurodevelopmental deficits in the GABAergic system of *daf-18/PTEN Caenorhabditis elegans* mutants" *eLife*, 13:RP94520. doi: 10.7554/eLife.94520.1

-Veuthey, T., **Giunti, S.**, De Rosa, M. J., Alkema, M., Rayes, D. "The neurohormone tyramine stimulates the secretion of an Insulin-Like Peptide from the intestine to modulate the systemic stress response in *C. elegans*" *Plos Biology* (En revisión).

-Romussi, S., **Giunti, S. ***, Andersen, N., De Rosa, M. J. (2024). "*C. elegans*: a prominent platform for modeling and drug screening in neurological disorders" *Expert Opinion on Drug Discovery*, May;19(5):565-585. doi: 10.1080/17460441.2024.2329103

-**Giunti, S.**, Andersen, N., Rayes, D. and De Rosa, M.J. (2021). "Drug discovery: Insights from the invertebrate *Caenorhabditis elegans*". *Pharmacol Res Perspect*, Apr;9(2):e00721. doi: 10.1002/prp2.721.

-Gourgou, E., Willis, A. R., **Giunti, S.**, De Rosa, M. J., Charlesworth, A. G., Lima, M. H., Glater, E., Soo, S., Pereira, B., Akbaş, K., Deb, A., Kamak, M., Moyle, M. W., Traa, A., Singhvi, A., Sural S., & Jennifer Jin, E. (2020). "A journey to 'tame a small metazoan organism', ‡ seen through the artistic eyes of *C. elegans* researchers". *Journal of Neurogenetics*, Sep-Dec;34(3-4):549-560. doi: 10.1080/01677063.2020.1839449

-Blanco MG, Vela Gurovic MS, Silbestri GF, Garelli A, **Giunti S**, et al. (2018). "Diisopropylphenyl-imidazole (DII): A new compound that exerts anthelmintic activity through novel molecular mechanisms". *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Dec 17;12(12):e0007021. doi: 10.1371/journal.pntd.0007021

Índice

Abreviaturas	9
Resumen	11
Summary	16
Introducción	20
<i>El sistema nervioso regula y coordina las funciones del cuerpo</i>	20
<i>El Trastorno del Espectro Autista es un desorden del desarrollo que afecta la comunicación y el comportamiento</i>	20
<i>Las mutaciones vinculadas con el TEA afectan a una variedad de funciones celulares y procesos biológicos</i>	21
<i>Caenorhabditis elegans es un modelo eficaz para el estudio de los DND</i>	22
<i>C. elegans como modelo de laboratorio</i>	23
<i>Generalidades</i>	28
<i>Ciclo de vida y reproducción</i>	29
<i>Hábitat y alimentación</i>	30
<i>Genética</i>	30
<i>Sistema nervioso</i>	30
<i>Sistema muscular</i>	31
<i>Sistema neuromuscular y locomoción</i>	32
<i>Mantenimiento de C. elegans en el laboratorio</i>	34
Objetivos generales	36
Materiales y métodos	37
<i>Protocolos generales</i>	37
<i>Mantenimiento y propagación de animales</i>	37
<i>Cultivo de Escherichia coli OP50</i>	37
<i>Descontaminación</i>	38
<i>Sincronización</i>	38
<i>Congelado y preservación de cepas por largos períodos</i>	39
<i>Cruzas genéticas</i>	39
<i>Generación de machos</i>	39

<i>Protocolo general de cruas</i>	40
<i>Anexo de protocolos generales: medios y soluciones</i>	41
<i>Protocolos específicos de ensayos</i>	44
<i>Ensayos farmacológicos de parálisis con levamisol y aldicarb</i>	44
<i>Medición de longitud corporal (fenotipo “shrinker”)</i>	44
<i>Ensayo de respuesta de escape</i>	44
<i>Optogenética</i>	45
<i>Microscopía: análisis de la expresión de SOD-3</i>	45
<i>Microscopía: análisis de comisuras de neuronas GABAérgicas y colinérgicas</i>	46
<i>Microscopía: análisis de la morfología y migración de las neuronas AIYs y HSNs</i>	46
<i>Ensayos con DL-β-Hidroxibutirato</i>	46
<i>Análisis estadístico</i>	47
<i>PCR punto final</i>	47
<i>Anexo de protocolos específicos: cepas utilizadas</i>	49
<i>Primera Sección – efectos de la mutación de daf-18 en el neurodesarrollo de C. elegans</i>	51
<i>Introducción</i>	52
<i>PTEN es un importante regulador del ciclo celular</i>	52
<i>Actividad y función</i>	52
<i>Estructura y regulación</i>	53
<i>Efectos de la pérdida de función de PTEN</i>	55
<i>daf-18 es el homólogo de PTEN en C. elegans</i>	55
<i>El eje AGE-1/AKT cumple un importante rol en el neurodesarrollo de C. elegans</i>	56
<i>El equilibrio entre los sistemas excitatorios e inhibitorios es clave para el correcto funcionamiento del SN</i>	58
<i>La transmisión sináptica y el SN en C. elegans pueden ser estudiados mediante una amplia gama de técnicas</i>	59
<i>Objetivos</i>	62
<i>Objetivos específicos</i>	62
<i>Resultados</i>	63
<i>La alteración de la vía AGE-1/AKT por mutaciones en daf-18 genera fenotipos compatibles con un desequilibrio E/I</i>	63

<i>La vía de TOR no influye en los fenotipos farmacológicos de daf-18 y daf-16 en C. elegans.....</i>	<i>66</i>
<i>Mutantes daf-18 exhiben fenotipos característicos de deficiencias en la señalización GABAérgica ante estímulos mecanosensoriales.....</i>	<i>68</i>
<i>Mutantes daf-18 y daf-16 exhiben una respuesta de escape deficiente ante estímulos mecanosensoriales.....</i>	<i>69</i>
<i>La estimulación optogenética selectiva en mutantes daf-18 y daf-16 muestra signos de una deficiencia en la señalización GABAérgica inhibitoria.....</i>	<i>72</i>
<i>Mutaciones en daf-18 y daf-16 repercuten en alteraciones morfológicas evidentes sobre procesos neuronales del sistema GABAérgico.....</i>	<i>76</i>
<i>Las aberraciones en motoneuronas GABAérgicas están presentes tanto en las neuronas DD como en las VD.....</i>	<i>80</i>
<i>DAF-18 actúa de forma autónoma para regular el desarrollo de motoneuronas GABAérgicas.....</i>	<i>83</i>
<i>Discusión</i>	<i>85</i>
<i>Conclusiones parciales.....</i>	<i>92</i>
Segunda Sección – Modulación cetogénica del neurodesarrollo GABAérgico	93
<i>Introducción</i>	<i>94</i>
<i>Perspectivas terapéuticas de los TEA.....</i>	<i>94</i>
<i>Tratamientos conductuales</i>	<i>95</i>
<i>Tratamientos farmacológicos.....</i>	<i>95</i>
<i>Dietas y suplementos dietarios como terapias para el TEA.....</i>	<i>96</i>
<i>El rol de los cuerpos cetónicos en la restricción calórica y las DCs.....</i>	<i>97</i>
<i>Metabolismo y funciones energéticas del β-Hidroxibutirato.....</i>	<i>98</i>
<i>El β-Hidroxibutirato es un potente regulador epigenético.....</i>	<i>99</i>
<i>El β-Hidroxibutirato como potencial agente terapéutico.....</i>	<i>100</i>
<i>Objetivos</i>	<i>102</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>102</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>103</i>
<i>El βHB aumenta la expresión de SOD-3 en C. elegans.....</i>	<i>103</i>
<i>El βHB revierte algunos fenotipos asociados a la pérdida de daf-18.....</i>	<i>104</i>
<i>El βHB actúa a través de la modulación positiva de DAF-16.....</i>	<i>106</i>

<i>Animales tratados con 6HB presentan una menor incidencia de defectos morfológicos en motoneuronas GABAérgicas.....</i>	<i>108</i>
<i>El 6HB tiene efectos selectivos sobre las motoneuronas GABAérgicas, actuando a través de mecanismos específicos</i>	<i>109</i>
<i>El 6HB podría prevenir los defectos de daf-18 al actuar en una ventana crítica del desarrollo.....</i>	<i>111</i>
<i>Discusión</i>	<i>114</i>
<i>Conclusiones parciales</i>	<i>121</i>
<i>Discusión general y perspectivas futuras.....</i>	<i>122</i>
<i>Impacto funcional de defectos en motoneuronas GABAérgicas.....</i>	<i>123</i>
<i>Mutantes daf-18 y daf-16 como plataformas para el estudio del equilibrio E/I.....</i>	<i>123</i>
<i>Análisis funcional de las mutaciones humanas de PTEN en C. elegans.....</i>	<i>125</i>
<i>Aspectos distintivos de las motoneuronas colinérgicas.....</i>	<i>125</i>
<i>Mecanismos dependientes de DAF-16.....</i>	<i>127</i>
<i>Aplicaciones terapéuticas del 6HB.....</i>	<i>128</i>
<i>Observaciones finales.....</i>	<i>130</i>
<i>Conclusión general</i>	<i>132</i>
<i>Bibliografía.....</i>	<i>134</i>

Abreviaturas

AJ: Adulto Joven

ABC: Área bajo la curva

ACh: Acetilcolina

CC: Cuerpo cetónico

CGC: Caenorhabditis genetic center

CND: Cordón Nervioso Dorsal

CNV: Cordón Nervioso Ventral

DC: Dieta Cetogénica

DND: Desórdenes del Neurodesarrollo

DSM: Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales

E/I: Referido al balance entre los sistemas Excitatorios/Inhibitorios

GFP: Green Fluorescent Protein (Proteína Fluorescente Verde)

HDAC: Histona Deacetilasa

L1: Primer estadio juvenil

L2: segundo estadio juvenil

L3: tercer estadio juvenil

L4: cuarto estadio juvenil

NGM: Nematode Growth Medium (Medio para el Crecimiento de Nematodos)

PHTS: Síndrome de Tumor Hamartomatoso *PTEN*

RFP: Red Fluorescent Protein (Proteína Fluorescente Roja)

SFARI: Simons Foundation Autism Research Initiative

SN: Sistema Nervioso

TEA: Trastornos del Espectro Autista

TDAH: trastorno por déficit de atención e hiperactividad

β HB: DL- β -Hidroxibutirato

Resumen

Candidato: Sebastián Giunti

Director: Dr. Diego Hernán Rayes

Co-Directora: Dra. María José De Rosa

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca – CONICET

*“Búsqueda de potenciales agentes quimioterápicos para los trastornos del espectro autista (TEA) utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio”*

El sistema nervioso (SN) es el principal centro de coordinación y regulación en los animales, responsable tanto de las funciones voluntarias, como el movimiento y el comportamiento, como de las funciones autónomas, tales como la respiración, la digestión y el control del ritmo cardíaco, además de procesos sofisticados tales como la percepción, la memoria y el aprendizaje. Su desarrollo es un proceso complejo que incluye proliferación celular, diferenciación y sinaptogénesis. Las fallas durante este proceso pueden acarrear consecuencias leves o severas, y pueden conducir a diversos fenotipos neurológicos denominados comúnmente desórdenes del neurodesarrollo (DND). Entre ellos, el Trastorno del Espectro Autista (TEA), es uno de los DND más prevalentes, afectando a más del 2% de la población. Este tipo de trastornos es típicamente de origen multifactorial, entre los que se destacan factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Entre la enorme batería de genes cuyas mutaciones aumentan enormemente la probabilidad de desarrollar TEA se encuentra *PTEN*. Típicamente vinculadas con la aparición de tumores, las mutaciones en *PTEN* han sido vinculadas cada vez más con la aparición de DND, incluyendo TEA, macrocefalia y otros fenotipos neuropsiquiátricos. A pesar de la enorme evidencia que indica la correlación entre estas mutaciones y el desarrollo del TEA, no se conocen con precisión los mecanismos moleculares por los cuales las fallas en este gen terminan comprometiendo los procesos normales del neurodesarrollo. En lo que respecta a tratamientos para el TEA (y en general para varios DND), no existen abordajes terapéuticos que hayan demostrado altos niveles de eficacia en la mejora de los síntomas centrales como dificultades en la comunicación y patrones de comportamiento repetitivos.

Actualmente, las estrategias terapéuticas se enfocan principalmente en intervenciones educativas y conductuales para mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias, y medicamentos para manejar las comorbilidades.

En los últimos años, ha surgido un creciente interés en las dietas cetogénicas (DCs) como una herramienta terapéutica promisorio. Este tipo de regímenes alimentarios, caracterizados por una ingesta baja de carbohidratos, moderada de proteínas y alta de grasas, han sido utilizados con relativo éxito en algunos pacientes con epilepsia refractaria. Existe evidencia, además, que la DC es también capaz de revertir endofenotipos del TEA en humanos y en modelos murinos inducidos por ácido valproico. Al igual que la restricción dietaria, la DC induce un estado de cetosis en la que se producen los metabolitos acetona, acetoacetato y β -Hidroxibutirato (β HB), denominados comúnmente cuerpos cetónicos (CCs). Estos compuestos, además de servir como fuente alternativa de energía a la glucosa, podrían desempeñar un papel crucial en la regulación de procesos celulares alterados en el TEA. Sin embargo, el mecanismo molecular que subyace a los beneficios de la DC y los CCs está aún lejos de ser dilucidado. Resulta evidente entonces, que, para la creación de estrategias terapéuticas eficientes, es imperante avanzar en el conocimiento biológico fundamental que subyace a este tipo de desórdenes.

Una de las mayores barreras que históricamente dificultó las disciplinas que abordan el estudio del SN, es la extrema complejidad que este sistema tiene en los mamíferos. En este contexto, el surgimiento de *Caenorhabditis elegans* como modelo de investigación ha sido fundamental para el avance de diversas disciplinas científicas. La simplicidad de su SN, junto con el rápido ciclo de vida que lo caracteriza y la facilidad para realizar manipulaciones genéticas y ensayos farmacológicos, han permitido lograr avances significativos en los campos de la neurobiología, biología del desarrollo y otras áreas de la biomedicina. Además, su pequeño tamaño y la capacidad de generar un gran número de individuos en poco tiempo facilitan estudios de gran escala, haciéndolo una plataforma versátil y económica para la investigación científica. En la presente tesis, nos propusimos explorar las bases moleculares subyacentes a las disfunciones del neurodesarrollo utilizando *C. elegans* como modelo. Específicamente, se buscó dilucidar los eventos celulares y moleculares asociados a la mutación del gen *daf-18* (homólogo de *PTEN* en *C. elegans*) y evaluar las consecuencias funcionales de estas mutaciones. Adicionalmente, abordamos una estrategia farmacológica que busca revertir los fenotipos alterados, basándonos fundamentalmente en los CCs y las investigaciones previas que reportan el potencial de los mismos en el mejoramiento de numerosas funciones biológicas.

En la primera sección, nos propusimos estudiar la vía PI3K/AKT/FOXO. Esta vía se encuentra altamente conservada y presenta sus respectivos homólogos en *C. elegans*, como *daf-18* (homólogo de *PTEN*) y *daf-16* (homólogo de *FOXO*, una importantísima familia de factores de transcripción), entre otros. Como un abordaje inicial, evaluamos los fenómenos asociados a la pérdida de función de este gen, fundamentalmente sobre el desarrollo del SN y sus consecuencias funcionales.

Se ha postulado que una característica frecuente en individuos con diversos trastornos neurológicos es la presencia de un desequilibrio entre los sistemas de señalización excitatorios e inhibitorios (E/I), hacia una mayor preponderancia del sistema excitatorio. A diferencia de lo que ocurre en humanos, en *C. elegans* existe, a nivel de las uniones neuromusculares, tanto señalización GABAérgica inhibitoria como colinérgica excitatoria, lo que permite el uso de este modelo nematode como una plataforma para el estudio del balance E/I. Alteraciones en este equilibrio pueden desencadenar fenotipos de movimiento, así como diferentes sensibilidades a compuestos moduladores de dichos sistemas. En base a ello, y como una primera aproximación, realizamos ensayos con los fármacos estimulantes del sistema colinérgico excitatorio aldicarb y levamisol, los cuales poseen un poder predictivo validado para la evaluación funcional de dichos sistemas. Los resultados de estos ensayos demostraron que mutantes *daf-18* y *daf-16* presentan una hipersensibilidad a los mismos, sugiriendo un posible desbalance entre los sistemas neuromotores E/I. Adicionalmente, en estos mutantes, encontramos otros fenotipos neuromotores fuertemente vinculados a deficiencias E/I, como un acortamiento excesivo de la longitud corporal luego de la estimulación mecánica en la región anterior, y una menor proporción de giros en omega cerrados durante la respuesta de escape. Más aún, mediante optogenética, observamos que la activación de neuronas GABAérgicas, tanto en animales *daf-18* como *daf-16*, resultó en un alargamiento del cuerpo de menor magnitud a la observada en animales salvajes. Por otro lado, la estimulación neuronal colinérgica en estos mutantes produjo una contracción exagerada del cuerpo. Al analizar el estado morfológico de las motoneuronas mediante reporteros fluorescentes, pudimos comprobar que tanto mutantes *daf-18* como *daf-16* presentan defectos morfológicos en comisuras de neuronas tipo D pertenecientes al sistema GABAérgico, pero no así defectos evidentes en comisuras del sistema colinérgico. Estas aberraciones son visibles ya en el primer estadio larval L1, y son parcialmente rescatadas por la expresión específica de *daf-18* en neuronas GABAérgicas. Estos defectos morfológicos en motoneuronas GABAérgicas, presentes desde estadios muy tempranos del desarrollo, sugieren que mutaciones en estos genes podrían estar comprometiendo el neurodesarrollo y consecuentemente ocasionando fenotipos locomotores como los observados. Dado que *daf-18*

modula negativamente la vía de señalización similar a insulina (es decir, la vía ILPs/AGE-1/AKT, homóloga a la vía insulina/PI3K/AKT en mamíferos), la pérdida de función de *daf-18* afecta la actividad del factor de transcripción DAF-16. Nuestros resultados revelaron que todos los fenotipos observados están también presentes en mutantes *daf-16* en similar magnitud, tanto en mutantes simples como en dobles. Los fenotipos alterados, no fueron observados, en cambio, en mutantes de genes clave para otras vías íntimamente relacionadas con *daf-18*, como la vía de TOR. Esto es indicativo de que la mayoría de los fenotipos alterados podrían deberse a la disminución de la funcionalidad del factor de transcripción DAF-16, producto de la pérdida de función de *daf-18*.

En la segunda sección nos propusimos abordar el estudio de los efectos de los CCs, específicamente el β HB, por su posible valor terapéutico para el tratamiento de ciertos desórdenes que involucran al SN. Resulta destacable que el β HB, el principal CC bajo DC y restricción dietaria, ha demostrado mejorar numerosos indicadores en *C. elegans*, como la resistencia al estrés, termotolerancia, longevidad, así como también disminución de agregados proteotóxicos en modelos de Parkinson y Alzheimer. Más interesante aún, es que entre los mecanismos de acción propuestos para los beneficios del β HB se encuentra su potencial para aumentar la actividad de FOXO, y el consecuente aumento de la expresión de numerosos genes citoprotectores. Este escenario resulta promisorio para el uso de este compuesto en aquellos casos en los que FOXO presenta baja actividad por mutaciones que modulan positivamente la vía PI3K/AKT, vía que regula negativamente la actividad de este factor de transcripción. Observamos que la incubación previa con β HB durante todo el desarrollo mejoró el fenotipo de acortamiento excesivo en la respuesta de escape ante un estímulo mecánico, así como también el de hipersensibilidad a los fármacos estimulantes de la actividad colinérgica aldicarb y levamisol en mutantes *daf-18*. Adicionalmente, pudimos comprobar que el β HB rescata los fenotipos de sobrealargamiento e hipercontracción tras la estimulación optogenética en los sistemas GABAérgico y colinérgico, respectivamente. La exposición a β HB también logró aumentar el porcentaje de giros en omega cerrados durante la respuesta de escape tras la estimulación mecánica en *daf-18*, y de reducir de manera significativa los defectos morfológicos de las motoneuronas GABAérgica.

Dado que ninguna de estas mejoras fueron observadas en mutantes *daf-16* o dobles mutantes *daf-18;daf-16*, nuestros resultados indican que los beneficios obtenidos mediante la exposición a este metabolito podrían explicarse por su capacidad de modular la actividad del factor de transcripción DAF-16. Finalmente, pudimos determinar que existe una etapa crítica para observar los efectos beneficiosos del β HB. Mediante exposiciones en diversas ventanas

temporales comprobamos que una breve exposición al β HB durante el desarrollo temprano fue suficiente para revertir varios de estos fenotipos, mientras que exposiciones tardías no mostraron dichos beneficios.

En conjunto, los resultados de la presente tesis demuestran el enorme potencial del uso del modelo *C. elegans* como una plataforma eficiente para el estudio de aquellas mutaciones que comprometen el neurodesarrollo. Los fenotipos descritos pueden servir como base para la elaboración de flujos de trabajo que apunten a la evaluación de compuestos con potencial terapéutico. Además, los resultados obtenidos constituyen un paso clave hacia la comprensión de los mecanismos de acción de los CCs, fundamentalmente del β HB, y su posible uso en trastornos asociados con mutaciones en genes claves de la vía de PI3K/AKT/FOXO, enormemente implicada en los procesos de neurodesarrollo.

Summary

Ph. D. Candidate: Sebastián Giunti

Director: Dr. Diego Hernán Rayes

Co-Director: Dra. María José De Rosa

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca – CONICET

*"Search for potential chemotherapeutic agents for autism spectrum disorders (ASD) using *Caenorhabditis elegans* as a model"*

The nervous system (NS) is the primary center for coordination and regulation in animals, responsible for both voluntary functions, such as movement and behavior, and autonomic functions, such as breathing, digestion, and heart rate control, as well as sophisticated processes such as perception, memory, and learning. Its development is a complex process that includes cell proliferation, differentiation, and synaptogenesis. Failures during this process can lead to mild or severe consequences and may result in various neurological phenotypes commonly referred to as neurodevelopmental disorders (NDDs). Among these, Autism Spectrum Disorder (ASD) is one of the most prevalent NDDs, affecting over 2% of the population. This type of disorder is typically multifactorial, involving genetic, epigenetic, and environmental factors. Among the vast array of genes whose mutations greatly increase the likelihood of developing ASD is *PTEN*. Typically associated with tumor development, *PTEN* mutations have been increasingly linked to the emergence of NDDs, including ASD, macrocephaly, and other neuropsychiatric phenotypes. Despite the overwhelming evidence indicating a correlation between these mutations and ASD development, the molecular mechanisms through which *PTEN* dysfunction compromises normal neurodevelopment remain unclear.

Regarding treatments for ASD (and many other NDDs), there are no therapeutic approaches that have demonstrated high efficacy in improving core symptoms, such as communication difficulties and repetitive behavior patterns. Current therapeutic strategies primarily focus on educational and behavioral interventions to improve patients' and families' quality of life, as well as medications to manage comorbidities.

In recent years, ketogenic diets (KDs) have garnered growing interest as a promising therapeutic tool. These dietary regimens, characterized by low carbohydrate and high fat and protein intake, have been used with relative success in some patients with refractory epilepsy. Moreover, evidence suggests that KDs can also reverse ASD endophenotypes in humans and valproic acid-induced murine models. Like dietary restriction, KDs induce a state of ketosis in which the metabolites acetone, acetoacetate, and β -hydroxybutyrate (β HB)—commonly known as ketone bodies (KBs)—are produced. These compounds, besides serving as an alternative energy source to glucose, may play a crucial role in regulating cellular processes altered in ASD. However, the molecular mechanisms underlying the benefits of KDs and KBs remain far from elucidated. It is thus evident that advancing fundamental biological knowledge of these disorders is imperative for the development of effective therapeutic strategies.

One of the greatest historical barriers to disciplines addressing the study of the NS is the extreme complexity of this system in mammals. In this context, the emergence of *Caenorhabditis elegans* as a research model has been pivotal for advancements in various scientific disciplines. The simplicity of its NS, combined with its rapid life cycle, and the ease of performing genetic manipulations and pharmacological assays, has enabled significant progress in the fields of neurobiology, developmental biology, and other areas of biomedicine. Furthermore, its small size and the ability to generate a large number of individuals in a short time facilitate large-scale studies, making it a versatile and cost-effective platform for scientific research.

In this thesis, we aimed to explore the molecular bases underlying neurodevelopmental dysfunctions using *C. elegans* as a model. Specifically, we sought to elucidate the cellular and molecular events associated with mutations in the *daf-18* gene (*C. elegans* homolog of *PTEN*) and to evaluate the functional consequences of these mutations. Additionally, we investigated a pharmacological strategy aimed at reversing altered phenotypes, focusing primarily on KBs and prior research reporting their potential to improve numerous biological functions.

In the first section, we studied the PI3K/Akt/FOXO pathway. This pathway is highly conserved and has its respective homologs in *C. elegans*, such as *daf-18* (*PTEN* homolog) and *daf-16* (FOXO homolog, a crucial family of transcription factors), among others. As an initial approach, we evaluated phenomena associated with the loss of function of this gene, focusing on NS development and its functional consequences.

It has been proposed that a common characteristic in individuals with various neurological disorders is an imbalance in excitatory and inhibitory signaling systems (E/I), favoring excitatory signaling. Unlike humans, *C. elegans* exhibits both inhibitory GABAergic and excitatory

cholinergic signaling at the neuromuscular junctions, making this nematode model a platform for studying the E/I balance. Alterations in this balance can trigger locomotion phenotypes and varying sensitivities to compounds modulating these systems. Based on this, and as an initial approach, we conducted assays with excitatory cholinergic system stimulants aldicarb and levamisole, validated predictive tools for functional evaluation of these systems. Results from these assays showed that *daf-18* and *daf-16* mutants exhibit hypersensitivity to these compounds, suggesting a possible imbalance in E/I neuromotor systems. Additionally, in these mutants, we identified other neuromotor phenotypes strongly linked to E/I deficiencies, such as excessive body shortening following anterior mechanical stimulation and a lower proportion of closed omega turns during escape responses. Furthermore, optogenetic activation of GABAergic neurons in *daf-18* and *daf-16* mutants resulted in less pronounced body elongation compared to wild-type animals. Conversely, cholinergic neuronal stimulation in these mutants caused exaggerated body contraction. Morphological analysis of motoneurons using fluorescent reporters revealed defects in commissures of D-type GABAergic neurons in both *daf-18* and *daf-16* mutants, but no evident defects in cholinergic system commissures. These abnormalities are visible as early as the L1 larval stage and are partially rescued by the specific expression of *daf-18* in GABAergic neurons. These morphological defects in GABAergic motoneurons, present from very early developmental stages, suggest that mutations in these genes may compromise neurodevelopment and consequently lead to the observed locomotor phenotypes. Since *daf-18* negatively modulates the insulin-like signaling pathway (i.e., the ILPs/AGE-1/AKT pathway, homologous to the insulin/PI3K/AKT pathway in mammals), the loss of *daf-18* function affects the activity of the transcription factor DAF-16. Our results revealed that all observed phenotypes are also present in *daf-16* mutants to a similar extent, in both single and double mutants. However, the altered phenotypes were not observed in mutants of key genes in other pathways closely related to *daf-18*, such as the TOR pathway. This suggests that most altered phenotypes may be due to reduced functionality of the DAF-16 transcription factor, resulting from the loss of *daf-18* function.

In the second section, we studied the effects of KBs, specifically β HB, due to its potential therapeutic value for treating certain NS-related disorders. Remarkably, β HB—the main KB under KD and dietary restriction—has been shown to improve numerous indicators in *C. elegans*, such as stress resistance, thermotolerance, longevity, and reduction of proteotoxic aggregates in Parkinson's and Alzheimer's models. Even more intriguing is that one proposed mechanism of action for β HB's benefits is its potential to enhance FOXO activity, consequently increasing the expression of numerous cytoprotective genes. This scenario is promising for using

this compound in cases where FOXO activity is reduced due to mutations that positively regulate the PI3K/AKT pathway, which negatively regulates this transcription factor.

We observed that prior incubation with β HB throughout development improved the phenotype of excessive shortening during the escape response to mechanical stimuli, as well as hypersensitivity to the cholinergic activity stimulants aldicarb and levamisole in *daf-18* mutants. Additionally, β HB exposure rescued the overelongation and hypercontraction phenotypes following optogenetic stimulation of GABAergic and cholinergic systems, respectively. β HB also increased the percentage of closed omega turns during the escape response to mechanical stimulation in *daf-18* mutants and significantly reduced morphological defects in GABAergic motoneurons. Since none of these improvements were observed in *daf-16* mutants or *daf-18;daf-16* double mutants, our results suggest that the benefits obtained through exposure to this metabolite may be explained by its ability to modulate DAF-16 transcription factor activity.

Finally, we determined a critical period for observing β HB's beneficial effects. Through exposure during various temporal windows, we found that brief early developmental exposure to β HB was sufficient to reverse several phenotypes, whereas late exposures did not yield such benefits.

Together, the results of this thesis demonstrate the enormous potential of *C. elegans* as an efficient platform for studying mutations that compromise neurodevelopment. The described phenotypes may serve as a foundation for developing workflows aimed at evaluating compounds with therapeutic potential. Furthermore, the findings represent a key step toward understanding the mechanisms of action of KBs, primarily β HB, and their potential use in disorders associated with mutations in key genes of the PI3K/AKT/FOXO pathway, which is heavily implicated in neurodevelopmental processes.

Introducción

El sistema nervioso regula y coordina las funciones del cuerpo

El sistema nervioso (SN) es el principal sistema de control, regulación y comunicación de los animales. Es una intrincada red 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}. El cerebro humano es un sistema complejo en el cual miles de millones de neuronas son capaces de formar billones de conexiones entre sí. Así mismo, estas conexiones -denominadas sinapsis- son acompañadas y estabilizadas por un número también inmenso de células no neuronales³. Como es de esperar, el desarrollo del SN requiere procesos igualmente complejos y finamente coordinados. Los eventos celulares y moleculares que orquestan la formación del SN durante las primeras etapas del desarrollo de los organismos incluyen proliferación, diferenciación celular, muerte celular programada, migración, establecimiento y eliminación de sinapsis, etc. El adecuado desarrollo del SN es crucial para su funcionamiento óptimo, y cualquier desviación podría llevar desde consecuencias funcionales leves hasta la inviabilidad del organismo³⁻⁹. Los desórdenes del neurodesarrollo (DND) son trastornos caracterizados por alteraciones en el desarrollo del SN, y afectan a más del 2% de la población. Entre ellos, se incluyen epilepsia, discapacidad intelectual, trastornos del espectro autista (TEA), dificultades específicas de lectura y escritura, hiperactividad, déficit de atención, entre otros^{10,11}. Incluso la esquizofrenia puede ser considerada un desorden del neurodesarrollo, el cual se manifiesta solamente durante la adultez^{12,13}. Si bien la etiología de estos DND es compleja, existe un consenso de que se originan como consecuencia de factores genéticos, epigenéticos y/o ambientales^{3,4}.

El Trastorno del Espectro Autista es un desorden del desarrollo que afecta la comunicación y el comportamiento

Dentro de los DND, los Trastornos del Espectro Autista (TEA) son los más prevalentes. Si bien las estimaciones varían de acuerdo al criterio de análisis utilizado¹⁴⁻¹⁶, se cree que el TEA afecta aproximadamente al 2.3% de la población en los Estados Unidos¹⁷. Aunque no existen estadísticas nacionales, la Sociedad Argentina de Pediatría estima que más de 500 mil argentinos presentan algún grado de TEA, predominando en varones y sin diferencias entre estratos sociales o raciales (<https://www.sap.org.ar/>). El Manual de Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM, por sus siglas en inglés) es una guía ampliamente utilizada en

Estados Unidos para el diagnóstico de trastornos de salud mental en adultos y niños. En su última edición, el DSM-5, el TEA es definido en base a dos dominios principales: (1) dificultades en la comunicación e interacción social y (2) patrones de comportamiento restringidos, repetitivos y estereotipados. Además, es común que las personas con TEA presenten diversas alteraciones conductuales, cognitivas y emocionales, lo que se asocia con la alta incidencia de condiciones médicas y de salud mental coexistentes, como el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), ansiedad, depresión, fobias, discapacidad intelectual, trastorno del habla/lenguaje, problemas alimentarios restrictivos/evitativos, trastornos del sueño, problemas de procesamiento sensorial y condiciones genéticas¹⁸. La presencia de estas condiciones coexistentes complica aún más el reconocimiento, diagnóstico y manejo clínico del TEA^{17,19-21}. En los últimos años, ha habido un aumento en las tasas de prevalencia, relacionado en gran parte con la evolución de los criterios de diagnóstico²². Existe una amplia variación fenotípica en cuanto a las capacidades de comunicación e interacción social, y la línea divisoria entre esta variación y los TEA a menudo es difusa, lo que hace que tanto el diagnóstico como la identificación de factores causales sean complicados²¹. Si bien se postula que la etiología del TEA es compleja y multifactorial, muchos casos tienen una base genética clara, con un alto grado de heredabilidad, existiendo datos empíricos que indican una correlación entre múltiples mutaciones en diversos loci genéticos y el riesgo de sufrir esta patología^{8,23}.

Las mutaciones vinculadas con el TEA afectan a una variedad de funciones celulares y procesos biológicos

El estudio de la genética de los DND ha experimentado avances significativos en las últimas décadas, con la identificación de más de mil genes que podrían estar relacionados con estas patologías^{24,25}. Algunos de estos genes están involucrados en la sinaptogénesis y la motilidad de los axones. Por ejemplo, Neuroliginas, Neurexinas y las proteínas Shank son contribuyentes clave de la formación, función y mantenimiento de las arquitecturas sinápticas. Las Neuroliginas son proteínas de adhesión celular ubicadas en el lado postsináptico, donde interactúan con las Neurexinas ubicadas en la membrana presináptica²⁶. Las proteínas Shank actúan como proteínas de andamiaje en la densidad postsináptica, facilitando conexiones entre receptores de neurotransmisores y una variedad de proteínas de membrana. Además, enlazan estos componentes tanto con proteínas señalizadoras como con el citoesqueleto de actina²⁷. Mutaciones en estos genes están vinculados con la aparición de fenotipos asociados a los TEA²⁸⁻³³. La aparición de fenotipos de TEA, sin embargo, no se limita a genes vinculados de forma directa con la estructura sináptica. Existen otros genes relacionados con el TEA que cumplen

roles críticos en vías biológicas esenciales como la organización cromosómica, el ciclo celular y el metabolismo^{23,34-36}. Un ejemplo clásico es *PTEN*, un gen relacionado con la regulación del ciclo celular. Históricamente vinculadas a la aparición de tumores, en los últimos 20 años las mutaciones en *PTEN* también se han relacionado fuertemente con la aparición de TEA y macrocefalia, destacando su rol crítico en el neurodesarrollo^{24,37-41}. A pesar de estos avances, sigue siendo un desafío identificar los causales de los DND en cada individuo, ya que la impronta genética de los mismos puede diferir de un paciente a otro. En algunos casos, por ejemplo, una única mutación *de novo* parece ser el origen, mientras que, en otros, la interacción compleja entre variantes raras y polimorfismos de diversos genes puede ser los causales^{19,20}. Se estima que aproximadamente un 50% de los casos de TEA surgen por el efecto acumulativo de alelos comunes que individualmente representan un pequeño grado de riesgo³⁷. Alrededor del 10% de las personas diagnosticadas con TEA tienen variaciones en el número de copias de un gen o mutaciones genéticas específicas como una de las causas subyacentes. Estas variaciones en el número de copias o mutaciones contribuyen a una proporción mayor en los casos denominados "simplex" (individuos que son los únicos en su familia con TEA, sin antecedentes familiares de la condición)³⁷. Este escenario hace que el estudio de las mutaciones y sus implicancias funcionales sobre el desarrollo del SN resulte tan complejo, que se han creado grandes bases de datos especializadas. Algunas bases de datos son específicas para ciertas áreas o trastornos. Por ejemplo, SFARI (Simons Foundation Autism Research Initiative) contiene una base de datos específica para TEA; mientras que existen también otras son más generales para DND o enfermedades genéticas (SysNDD, ClinVar, OMIM, etc)^{20,42,43}. En este contexto, la correcta identificación de genes vinculados con los DND y las consecuencias funcionales específicas de cada mutación representa un pilar fundamental en el estudio de estos desórdenes. Si bien la investigación básica que utiliza modelos animales está proporcionando conocimientos claves sobre las diversas facetas genéticas, todavía es necesaria una mejor comprensión tanto a nivel genético y molecular como también a nivel de circuitos neuronales¹⁹. Sin embargo, el estudio de las consecuencias funcionales de numerosas mutaciones vinculadas con DND representa un verdadero desafío debido a la complejidad del SN de los mamíferos. Ya que una gran cantidad de los genes relacionados con los TEA se encuentran conservados en el reino animal, el estudio de estos procesos biológicos en modelos que presentan un SN más simplificado se ha consolidado como una estrategia clave a lo largo del tiempo⁴⁴.

Caenorhabditis elegans es un modelo eficaz para el estudio de los DND

Como se comentó previamente, el estudio de los DND representa un desafío significativo, especialmente cuando se realiza en mamíferos. Si bien los modelos murinos ofrecen ventajas

obvias, como la posibilidad de estudiar procesos neurobiológicos en un sistema cercano al de los humanos, la extrema complejidad de su SN dificulta la comprensión de las consecuencias funcionales de las mutaciones asociadas con estos trastornos. Además, la generación y utilización de modelos murinos es un proceso complejo, costoso y que demanda mucho tiempo. A partir de estas limitaciones, la comunidad científica ha buscado a lo largo del tiempo diferentes modelos que faciliten el estudio del SN. Entre ellos, varios modelos invertebrados han ganado creciente popularidad, ya que representan un excelente punto de partida para el estudio de sistemas complejos⁴. En particular, el nematode *Caenorhabditis elegans* emergió como uno de los modelos de laboratorio más importantes de los últimos 50 años. La simplicidad y el conocimiento de la conectividad sináptica de su SN, la conservación evolutiva de gran cantidad de genes compartidos con mamíferos, y la facilidad para realizar técnicas genéticas, de microscopía y ensayos farmacológicos, convirtieron a este nematode en una herramienta fundamental para diversos campos de la ciencia⁴⁵⁻⁴⁸. A continuación, se describirán con más nivel de detalle las principales características de este animal que resaltan su versatilidad como modelo de laboratorio.

***C. elegans* como modelo de laboratorio**

El nematode *C. elegans* ha sido propuesto como organismo modelo por primera vez a comienzos de la década del 70 por Sydney Brenner, y desde entonces ha sido considerado uno de los modelos de investigación más valiosos en distintas áreas de la biomedicina^{46,49}. *C. elegans* presenta numerosas ventajas para su uso como modelo en el laboratorio. Entre ellas, se pueden enumerar su pequeño tamaño, rápido ciclo de vida, y la facilidad y el bajo costo de mantenimiento. Otra ventaja clave de estos nematodes es la posibilidad de conservarlos congelados, pudiendo almacenar cientos o miles de cepas durante años en espacios reducidos dentro de termos de nitrógeno líquido o *ultrafreezers*. Además, no representan un peligro biológico, por lo que se puede trabajar con estos animales sin la necesidad de complejos sistemas de bioseguridad. A pesar de las distancias evolutivas, este animal comparte homología en más de un 50% de sus genes con los mamíferos, y hay disponible una enorme batería de técnicas de edición genética que permiten silenciar, editar o sobreexpresar genes, e incluso incorporar directamente genes humanos^{44,47,50,51}. El genoma de *C. elegans* fue secuenciado por completo ya en el año 1998^{52,53}, siendo el primer organismo multicelular (y el segundo eucariota, después de *Saccharomyces cerevisiae*) para el cual un genoma completo fue obtenido⁵³. Además, su cutícula transparente permite la posibilidad de realizar una amplia gama de técnicas de visualización celular *in vivo* utilizando reporteros como proteína fluorescente verde (GFP), proteínas fluorescentes rojas (RFP, mCherry), etc⁵⁴⁻⁵⁶. De igual modo, es posible usar fluoróforos

sensibles al calcio para evaluar actividad neuronal como el GCaMP (indicador de calcio modificado genéticamente) y cameleon (sensor de calcio basado en transferencia de energía por resonancia fluorescente)⁵⁷. Particularmente, para el campo de las neurociencias, *C. elegans* presenta un SN relativamente simple que permite una evaluación funcional y estructural del mismo de manera sencilla comparado con los complejos SN de mamíferos. Además, como se desarrollará más adelante, se conoce con gran nivel de detalle cada una de las células que conforman el mismo, así como su conectoma (mapa de conexiones neuronales)^{58,59}.

De especial relevancia en el campo de la biomedicina, *C. elegans* ha demostrado ser una herramienta valiosa para el descubrimiento de fármacos. Gracias a su pequeño tamaño y rápido ciclo de vida, es posible generar una gran cantidad de individuos en cuestión de días, lo que permite utilizar numerosos ejemplares en cada experimento. Estas características facilitan la ejecución de análisis de compuestos (*screenings*) a gran escala y el estudio de mecanismos de acción mediante técnicas de genética directa o inversa (*forward* y *reverse genetics*) en tiempos considerablemente reducidos⁴⁷. Esto representa una ventaja evidente en comparación con los tiempos requeridos para ensayos similares en modelos mamíferos. Aunque los resultados no pueden extrapolarse de forma directa, los experimentos con *C. elegans* permiten identificar rápidamente compuestos candidatos, que luego pueden validarse en otros modelos.

Numerosos descubrimientos utilizando este nematode han provisto conocimientos fundamentales en diversos campos como neurobiología, biología del desarrollo, cáncer, longevidad, etc.^{48,60-62}. Aplicando metodologías adaptadas, desde el uso de fármacos específicos hasta la generación de mutaciones similares a las observadas en humanos, se han desarrollado cepas modelo que facilitan el estudio de diversas enfermedades y DND. Algunos ejemplos de los modelos más relevantes desarrollados en los últimos años de DND; como TEA, Discapacidad Intelectual (DI) y Epilepsia, se resumen en la tabla 1.

La versatilidad de este modelo radica también, como se mencionó, en la enorme batería de ensayos disponibles, los cuales brindan información clave para la comprensión de distintos procesos biológicos. Entre los ensayos más comunes se encuentran los relacionados con la movilidad, que incluyen mediciones de velocidad, patrones de locomoción y giros en omega, los cuales son indicadores clave del estado neuronal y muscular⁶³. Por otro lado, el bombeo faríngeo, un comportamiento esencial para la alimentación, permite evaluar la función del SN y su regulación por neurotransmisores y señales metabólicas^{47,64,65}.

Modelo	Gen en humanos	Homólogo en <i>C. elegans</i>	Fundamento del modelo	Fenotipos destacados	Transgén/mutación	Referencias
TEA	<i>NLGN3</i> y <i>NLGN4</i>	<i>nlg-1</i>	Mutación nula	Deterioro de Quimiotaxis, termotaxis y aversión osmótica. Hipersensibilidad a agentes oxidativos. Alteración en el comportamiento de abandono del alimento	ok259	23
	<i>NRX1</i> y <i>NRX3</i>	<i>nrx-1</i>	Mutación nula	Alteración en los <i>clusters</i> de receptores colinérgicos y en protrusiones similares a espinas en dendritas GABAérgicas. Afección de transmisión excitatoria hacia las neuronas GABAérgicas. Alteración en el comportamiento de abandono del alimento	ok1649	23,66
	<i>SHANK1</i>	<i>shn-1</i>	Mutación nula	Repolarización del potencial de acción defectuosa en los músculos corporales. Duración de los potenciales de acción alterada.	ok1581	67
	<i>PTEN</i>	<i>daf-18</i>	Mutación nula	Defectos morfológicos neuronales. Quimiotaxis reducida.	ok480 / mg198	68-70
	<i>NBEA</i>	<i>sel-2</i>	Mutación nula	Niveles defectuosos de LIN-12 y/o eventos de tráfico alterados para la activación del receptor	n655	71
	<i>GRIA1</i>	<i>glr-1</i>	Mutación nula	Comportamiento de búsqueda local defectuoso	n2461	72
		<i>glr-2</i>	Mutación nula	Plasticidad gustativa aumentada. Comportamiento de abandono de alimento alterado	tm669	23,72
	<i>GRIN2B</i>	<i>nmr-2</i>	Mutación nula	Reducción en la natación. Alteración en el comportamiento de abandono del alimento	ok3324	23,73
				Comportamiento de aprendizaje alterado. Alteración en el comportamiento de abandono del alimento	tm3785	23,74
	<i>SLC6A1</i>	<i>snf-11</i>	Mutación nula	Alteración en el comportamiento de abandono del alimento	tm625	23
				Resistencia a los inhibidores de la acetilcolinesterasa	ok156	75
	<i>SYNGAP1</i>	<i>gap-2</i>	Mutación nula	Deterioro de la memoria a corto plazo	tm748	76
	<i>CACNA1H</i>	<i>cca-1</i>	Mutación nula	Reducción del bombeo faringeo	ad1650	77
	<i>CNTN4</i>	<i>rig-6</i>	Mutación nula	Elongación defectuosa de los canales excretores posteriores	ok1589	78
			Silenciamiento parcial	Elongación defectuosa de los canales excretores posteriores (menor penetrancia en este alelo hipomórfico)	gk376	78
	<i>DYRK1A</i>	<i>mbk-1</i>	Mutación nula	Esperanza de vida reducida	pk1389	79
	<i>CHD8</i>	<i>chd-7</i>	Variantes humanas y mutación nula	Deterioro del aprendizaje por habituación	gk306 / otros	80
	<i>KMT5B</i>	<i>set-4</i>	Mutación nula	Deficiencia en arresto a estado de Dauer	n4600	81
				Deficiencia en arresto a estado de Dauer	ok1481	81
DI	<i>MBOAT7</i>	<i>mboa-7</i>	Mutación nula	Deficit en la puesta de huevos	gk399	82
				Defectos del desarrollo	tm3536	82
	<i>GNAO1</i>	<i>goa-1</i>	Reemplazo por mutación humana y mutación nula	Aumento en la puesta de huevos. Hipersensibilidad a aldcarb. Aumento en la locomoción, en las ondulaciones corporales y mayor tasa de reversión. Fenotipo descoordinado	sa734 / knu751 / S47G / A221D	83
	<i>hAGO1</i>	<i>alg-1</i>	Reemplazo por mutación humana	Disrupciones específicas del alelo en los perfiles maduros de miARN	F180Δ / G199S / C749Y	84
	<i>NALCN</i>	<i>nca-1</i>	Ganancia de función	Fenotipo de locomoción en espiral	hp102 / gk9 / gk5	85
	<i>MYCBP2</i>	<i>rpm-1</i>	Variantes asociadas a la enfermedad	Anomalías axonales y conductuales. Alteración en la habituación	-	86
	<i>STXBP1</i>	<i>unc-18</i>	Mutación nula	Reducción en el acoplamiento de vesículas. Resistencia a aldcarb	e234 / e81 / md299	87
	<i>ASPM</i>	<i>aspm-1</i>	Silenciamiento parcial por RNAi	No especificado	-	88
	<i>PHF8</i>	<i>jmjd-1.2</i>	Mutación nula y otras estrategias genéticas	Fenotipo descoordinado	tm3713	89
	<i>ARX</i>	<i>alr-1</i>	Mutación nula y otras estrategias genéticas	Déficit en la diferenciación de motoneuronas GABAérgicas	oy42	90
	<i>HUWE1</i>	<i>eel-1</i>	Mutación nula	Hipersensibilidad a aldcarb. Aumento en la sensibilidad a electroshocks	bgg1	91
	<i>OGT</i>	<i>ogt-1</i>	Mutación nula	Hipersensibilidad a aldcarb. Aumento en la sensibilidad a electroshocks	ok430	91
	<i>SETD1A/B</i>	<i>set-2</i>	Mutación nula	Déficit en el guiado del axón PVQ	tm1630 / n4589	92
	<i>CDC42</i>	<i>cdc-42</i>	Reemplazo por mutación humana y Silenciamiento parcial por RNAi	Vulva protruyente y cambios morfológicos leves en las gónadas. Déficit en la eliminación de células apoptóticas en las gónadas	tm9602	93
Epilepsia	<i>NUDC</i>	<i>nud-1</i>	Silenciamiento parcial por RNAi	Convulsiones inducidas por PTZ	-	94
	<i>NDE1</i> y <i>NDEL1</i>	<i>nud-2</i>	Silenciamiento parcial por RNAi	Convulsiones inducidas por PTZ	-	94
	<i>DYNC1H1</i>	<i>dhc-1</i>	Silenciamiento parcial por RNAi	Desequilibrio entre sinapsis excitatorias e inhibitorias	-	94
	<i>CHRFAM7A</i> , <i>FAM7A</i> y <i>CHRNA7</i>	<i>acr-16</i>	Mutación nula	Desequilibrio entre sinapsis excitatorias e inhibitorias	ok789	95
	<i>LIS1</i>	<i>lis-1</i>	Mutación nula	Convulsiones inducidas por PTZ	No especificado	96
	<i>STXBP1</i>	<i>unc-18</i>	Reemplazo por mutación humana y mutación nula	Reducción en el acoplamiento de vesículas. Resistencia a aldcarb	e234 / e81 / md299	87,97
	<i>GAD1</i> y <i>GAD2</i>	<i>unc-25</i>	Mutación nula	Convulsiones inducidas por PTZ	e156	96
	<i>CAMK2D</i>	<i>unc-43</i>	Mutación nula	Convulsiones espontáneas / Convulsiones inducidas por PTZ	n498 / n1186	96
	Sin homólogo definido (<i>unc-46</i> tiene un rol	<i>unc-46</i>	Mutación nula	Convulsiones en la región anterior inducidas por PTZ	e177	96

	crítico en el Sistema GABAérgico de <i>C. elegans</i>)					
	<i>SLC32A1</i>	<i>unc-47</i>	Mutación nula	Convulsiones en la región anterior inducidas por PTZ	e307	96
	Sin homólogo definido (<i>unc-49</i> tiene un rol crítico en el Sistema GABAérgico de <i>C. elegans</i>)	<i>unc-49</i>	Mutación nula	Convulsiones en la región anterior inducidas por PTZ	e407	96
	<i>TRIO</i>	<i>unc-73</i>	Mutación nula	Convulsiones inducidas por PTZ	e936 / ev802 / rh40	98
	<i>RAC-1</i>	<i>ced-10</i>	Mutación nula	Convulsiones inducidas por PTZ	n3246 / n1993	98
	<i>RHOG</i>	<i>mig-2</i>	Mutación nula	Convulsiones inducidas por PTZ	gm103 / mu28	98
	<i>CHRNA3</i> y <i>CHRNA6</i>	<i>acr-2</i>	Ganancia de función	Convulsiones espontáneas	n2420	99
	<i>TRPM1</i> , <i>TRPM3</i> , <i>TRPM7</i>	<i>gtl-2</i>	Mutación nula	Antagoniza el desequilibrio del circuito locomotor causado por <i>acr-2(gf)</i>	n2618	99
	<i>UBR5</i>	<i>ubr-5</i>	Mutación nula	Longitud corporal ligeramente reducida	om2	100
	<i>UBR7</i>	<i>ubr-7</i>	Mutación nula	corporal ligeramente reducida	gk3772	100
	<i>NOTCH1</i> , <i>NOTCH2</i> , <i>NOTCH3</i>	<i>glp-1</i>	Mutación nula	Defectos del desarrollo	ar202	100

Tabla 1. Resumen de algunos de los modelos más relevantes para el Trastorno del Espectro Autista (TEA), Discapacidad Intelectual (DI) y Epilepsia en los últimos años. Se detallan la estrategia genética utilizada en cada modelo, el fenotipo asociado y otros aspectos clave.

Los ensayos de desarrollo, por otra parte, han sido fundamentales para investigar procesos como la diferenciación celular, la organogénesis y la regulación genética a lo largo del ciclo de vida^{101,102}. Asimismo, *C. elegans* es un modelo ampliamente empleado en estudios de longevidad. Gracias a su ciclo de vida breve y bien caracterizado, se pueden realizar ensayos para evaluar los efectos de factores genéticos, ambientales y farmacológicos en el tiempo de vida. Estos estudios han proporcionado conocimientos fundamentales sobre los mecanismos del envejecimiento^{103,104}. La fertilidad, otra área de interés, puede estudiarse mediante evaluaciones de la producción de progenie en condiciones normales y bajo diversas perturbaciones genéticas o ambientales. Este tipo de ensayos tiene implicaciones directas en la comprensión de los procesos reproductivos y el impacto de toxinas o fármacos en ellos^{105,106}. Por otro lado, los ensayos de letalidad permiten determinar la toxicidad de compuestos o identificar genes esenciales mediante estrategias de silenciamiento génico o mutagénesis. Estos estudios son de particular relevancia en investigaciones farmacológicas y toxicológicas. En este sentido, dado que *C. elegans* comparte muchas características fisiológicas y moleculares con parásitos helmintos de interés médico y veterinario, se ha convertido en un modelo ideal para realizar screening de fármacos que puedan actuar sobre parásitos intestinales y otros nematodos parásitos¹⁰⁷. En definitiva, *C. elegans* presenta un enorme abanico de características que lo convierten en un modelo animal versátil y robusto para la investigación en numerosos campos (Fig. 1). A continuación, se desarrollarán con más detalle algunas de las características más importantes de este animal.

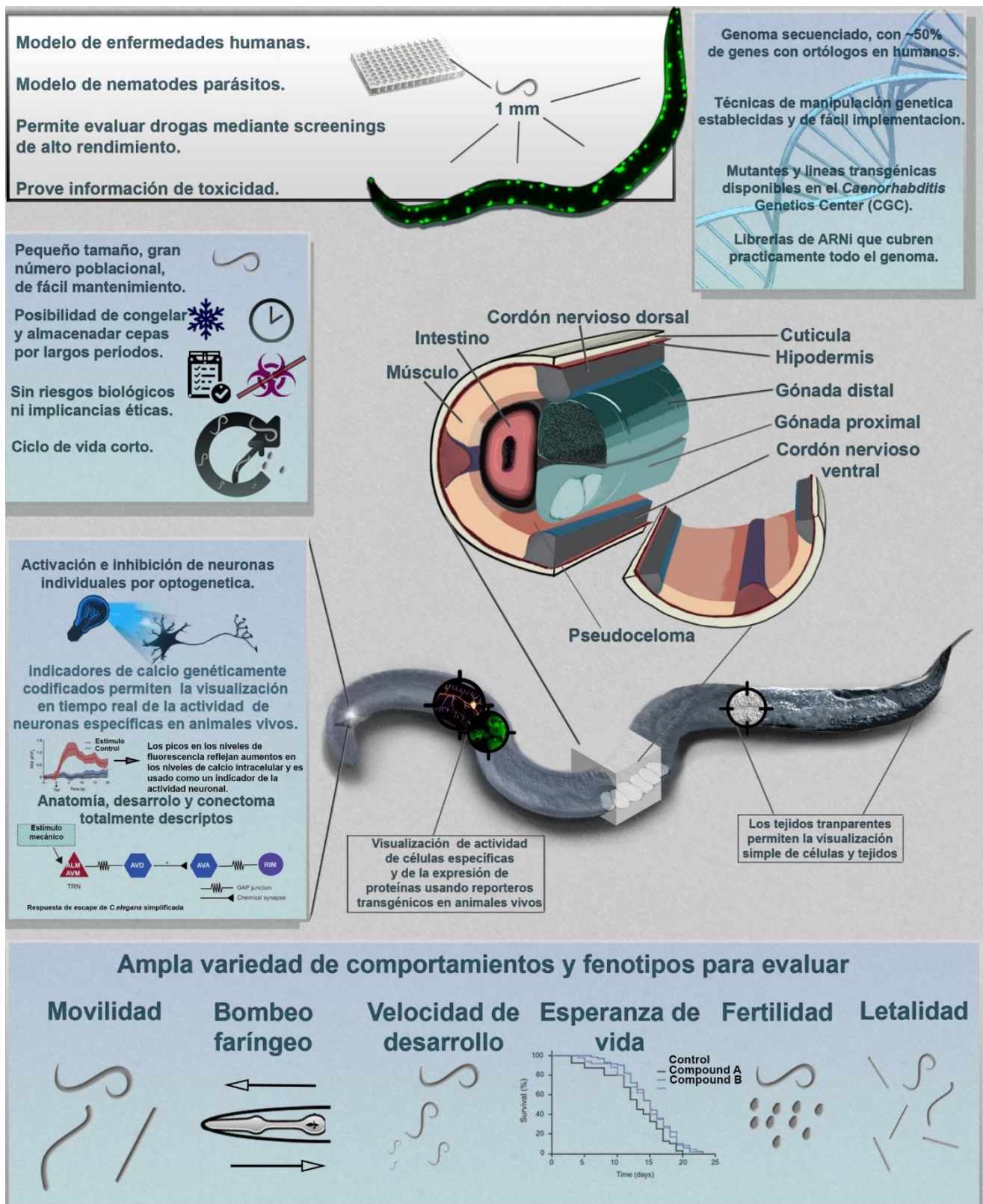


Figura 1. Resumen de las características del nematodo *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo. *C. elegans* es una plataforma eficaz para el descubrimiento de fármacos, siendo posible realizar screenings de compuestos a gran escala y determinar rápidamente mecanismos de acción, lo cual lo posiciona como una alternativa complementaria a los modelos mamíferos.

Generalidades

C. elegans es un nematode perteneciente al filo Nematoda, clase Chromadorea, orden Rhabditida y familia Rhabditidae¹⁰⁸. En estadio adulto su cuerpo es de 1 milímetro de longitud, cilíndrico y alargado. La anatomía general es representativa del plan básico de los nematodes y consta de un tubo externo y uno interno separados por un pseudoceloma. El tubo externo es básicamente la pared del cuerpo, y está formado por la cutícula, hipodermis, sistema excretor,

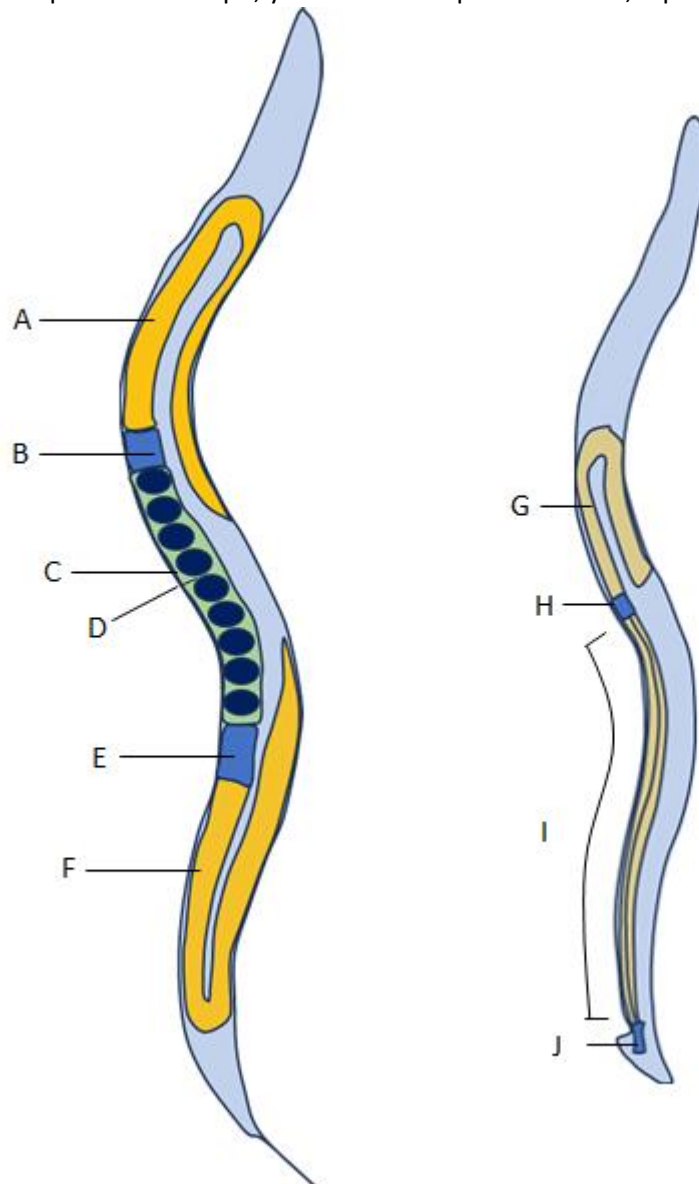


Figura 2. Comparación entre hermafroditas y machos en *C. elegans*. Izquierda: Representación de las características anatómicas de hermafroditas. Estos individuos poseen órganos sexuales tanto femeninos como masculinos, permitiendo la autofecundación y la reproducción cruzada con machos. En el estadio adulto, se observa la presencia de huevos. **A y F.** Gónada. **B. y E:** Espermatecta. **C.** Útero. **D.** Vulva. **Derecha:** Representación de las características anatómicas de machos, los cuales son más pequeños de tamaño y presentan una morfología sexual distintiva. La región copulatoria, en la zona posterior del cuerpo, es visible macroscópicamente y se distingue por su característica apariencia de "media flecha". **G.** Gónada. **H.** Vesícula seminal **I.** Conducto deferente. **J.** Proctodeo.

neuronas y músculos. El tubo interno comprende la faringe, el intestino y las gónadas^{48,109} (Fig.

1). La distribución de sexos en esta especie es peculiar, ya que, en condiciones de laboratorio, aproximadamente el 99,9% de los individuos son hermafroditas, lo que significa que poseen órganos sexuales femeninos y masculinos en un solo individuo y por lo tanto pueden reproducirse mediante 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 representan el 0,1% restante. 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”⁴⁹, mientras que en hermafroditas se evidencia la presencia de huevos en estadios adultos (Fig. 2). 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)⁴⁶. *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, debiéndose esta diferencia principalmente a células y neuronas relacionadas con el aparato copulatorio y la actividad sexual. Esta característica ha permitido hacer un seguimiento del desarrollo individual de cada una de las células de su cuerpo hasta su diferenciación final, creando un esquema completo del linaje celular^{48,110,111}.

Ciclo de vida y reproducción

El ciclo de vida es directo e involucra las etapas de huevo, cuatro estadios juveniles comúnmente denominados larva (L1, L2, L3, L4) y adulto. El final de cada etapa juvenil está caracterizado por una muda, durante la cual se sintetiza una nueva cutícula y se desprende la anterior^{46,48}. 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 a 3 semanas, aunque conservados a bajas temperaturas y en ausencia de alimento pueden sobrevivir varios meses^{112,113}. Durante todo el período fértil, cada hermafrodita puede poner aproximadamente unos 300 huevos si los mismos se produjeron por autofecundación, y más de 1000 cuando son producto de reproducción cruzada¹¹⁴. Los espermatozoides son ameboides, y existe una clara ventaja competitiva por parte de los espermatozoides de los machos sobre los propios de un hermafrodita una vez que ingresan en la espermateca¹¹⁵. En condiciones adversas como puede ser la falta de alimento, una forma especializada de resistencia denominada *dauer* 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 restablecidas las condiciones ambientales más propicias, el animal retoma su desarrollo

normal desde *dauer* al cuarto estadio larval. Pasado dicho estadio, no puede volver a la forma de resistencia *dauer*¹¹⁶.

Hábitat y alimentación

C. elegans se encuentra en una amplia gama de hábitats terrestres, desde jardines y bosques hasta áreas urbanas, y es de distribución prácticamente mundial¹¹⁷. Estos nematodos prosperan en ambientes con altos niveles de materia orgánica en descomposición. La alimentación es de tipo bacteriófaga, lo que significa que se alimentan de bacterias del suelo¹¹⁸. La misma depende fundamentalmente del accionar de la faringe, la cual rompe la mayoría de las bacterias, mediante bombeos de la misma y movimientos peristálticos del istmo subyacente¹¹⁹. El sistema digestivo básico de *C. elegans* incluye una boca rodeada por láminas bucales, una faringe tubular que se extiende desde la boca hasta el intestino, y un intestino tubular compuesto por una sola capa de células epiteliales que se extiende desde la faringe hasta el ano ¹²⁰ (Fig. 3).

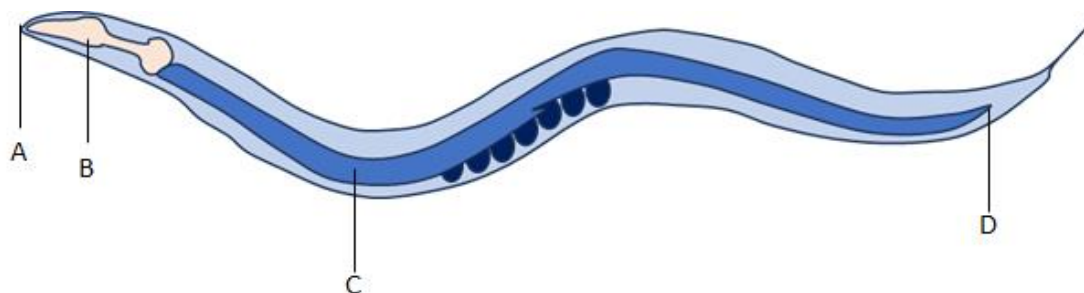


Figura 3. Sistema digestivo de *C. elegans*. Representación esquemática simplificada de la anatomía del sistema digestivo en un animal hermafrodita. **A.** Boca **B.** Faringe. **C.** Intestino. **D.** Ano.

Genética

C. elegans tiene una dotación cromosómica diploide. La especie tiene un total de seis pares de cromosomas: cinco pares de autosomas (usualmente numerados del I al V), y como fue mencionado anteriormente, cromosomas sexuales llamados X (dos en hermafroditas, y uno solo en machos)⁴⁶. Se estima que contienen alrededor de 20.000 genes codificantes de proteínas⁵³. Al menos un 38% de los genes que codifican para proteínas tienen ortólogos en humanos¹²¹, mientras que un 60-80% de los genes humanos tienen ortólogos en *C. elegans*⁵¹. Es de especial utilidad, además, que aproximadamente un 40% de los genes relacionados con enfermedades en humanos tienen sus respectivos ortólogos en *C. elegans*¹²².

Sistema nervioso

El SN de *C. elegans* es relativamente simple pero altamente organizado. Mientras que individuos hermafroditas cuentan con 302 neuronas, los machos cuentan con 387¹²³, diferencia

principalmente debida a la presencia de neuronas sensoriales adicionales en la región copulatoria de los machos. Este dimorfismo es el responsable de la detección y respuesta a las señales emitidas por hermafroditas durante el apareamiento, así como también de otros comportamientos distintivos¹²⁴. Mediante micrografías electrónicas sobre cortes seriados, se han reconstruido al detalle la forma y las conexiones de cada una de las 302 neuronas de los hermafroditas⁵⁸, así como también del circuito nervioso del aparato copulatorio de los machos¹²⁵. Estos diagramas representan el conectoma más completo de cualquier SN a la fecha. La organización del SN de estos nematodos se divide en un sistema somático y un sistema faríngeo, este último de unas 20 neuronas. Ambos sistemas se comunican a través de un par único de interneuronas denominadas RIP^{48,58,111,126}. Entre los neurotransmisores que orquestan el funcionamiento del SN se encuentran GABA, Acetilcolina (ACh), aminas biogénicas (Serotonina, Dopamina, Tiramina y Octopamina), glutamato y muchos neuropéptidos¹²⁷.

Sistema muscular

C. elegans posee un sistema muscular somático compuesto por aproximadamente 95 células musculares distribuidas en cuatro cuadrantes a lo largo del cuerpo (Fig. 4). Estas células conforman los músculos denominados estriados oblicuos o de múltiples sarcómeros, diferenciándose del músculo no estriado (también llamado de sarcómero único) formado por aproximadamente unas 40 células en hermafroditas. Por otro lado, en machos, existen unas 40 células musculares especializadas para el apareamiento¹²⁸. A diferencia de otros organismos

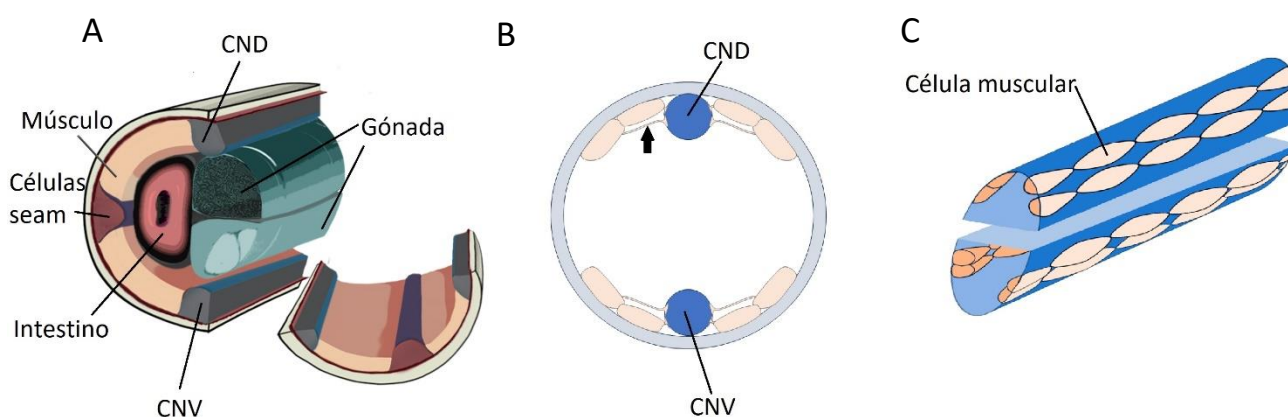


Figura 4. Anatomía y disposición del sistema muscular somático de *C. elegans*. Este sistema está compuesto por 95 células musculares distribuidas en cuatro cuadrantes a lo largo del cuerpo. **A.** Esquema representativo de la anatomía interna mediante un corte transversal y longitudinal de un segmento del cuerpo, mostrando la ubicación del sistema muscular en relación con otros sistemas (CND: Cordón Nervioso Dorsal; CNV: Cordón Nervioso Ventral). **B.** Representación esquemática de la disposición de las células musculares en corte transversal. Como es característico de muchos nematodos, en *C. elegans* las uniones neuromusculares se forman a partir de brazos que crecen desde las células musculares hacia las neuronas motoras, con estructuras simples compuestas por un tallo y un *terminus* bifurcado que contacta con la neurona (señalizado con una flecha negra). **C.** Representación esquemática de la disposición de las células musculares en corte transversal y frontal, mostrando su distribución. Se observan dos cuadrantes en la región dorsal (arriba) y dos en la región ventral (abajo).

donde las neuronas envían procesos hacia las células musculares para formar sinapsis, en *C. elegans* las uniones neuromusculares se forman a partir de brazos que crecen desde las células musculares hacia las neuronas motoras. Los brazos musculares tienen estructuras simples compuestas por un tallo y un *terminus* bifurcado que contacta con la neurona¹²⁹ (Fig. 4B).

Sistema neuromuscular y locomoción

En medio sólido, la locomoción de *C. elegans* es de tipo sinusoidal, en la cual el desplazamiento se produce mediante ondas corporales generadas por la contracción y relajación secuencial de los músculos dorsoventrales y oblicuos a lo largo del cuerpo. Esto resulta en un movimiento característico en forma de 'S'. En el agua u otros medios líquidos, *C. elegans* exhibe un movimiento diferente que se caracteriza por una gran curvatura hacia cada lado, a modo de “latigazo” en lugar de varias ondas alternadas. El tipo de movimiento entonces depende de la longitud de onda de los movimientos ondulatorios, la cual a su vez depende del nivel de viscosidad del medio en el que se desplaza. Al aumentar la densidad, por ejemplo, en medio sólido, la longitud de onda disminuye por debajo de la longitud total de su cuerpo, lo que lleva al animal a adoptar la típica forma se “S”. De esta manera, el programa motor se forma mediante las interacciones físicas entre el cuerpo y su entorno a través de la retroalimentación propioceptiva¹³⁰. En hermafroditas, las 95 células musculares de la pared del cuerpo están inervadas por 75 motoneuronas pertenecientes a 8 clases diferentes. De ellas, 4 clases inervan los músculos ventrales (VA, VB, VD y VC) y otras 4 los músculos dorsales (DA, DB, DD y AS). En estadios tempranos larvarios, únicamente están presentes los grupos DA, DB y DD, que se desarrollan durante la fase embrionaria. En contraste, las restantes motoneuronas surgen en diferentes momentos del desarrollo postembrionario¹³¹. Mediante estudios de ablación neuronal en estos estadios, se determinó que las motoneuronas DB están involucradas en la locomoción hacia adelante, mientras que las DA están implicadas en la locomoción en reversa. Por otro lado, las DD están comprometidas en ambos tipos de movimiento. A diferencia de las motoneuronas, no hay células musculares dedicadas exclusivamente a un tipo de locomoción¹³²⁻¹³⁴. En el sistema muscular de *C. elegans*, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, existe tanto inervación de tipo colinérgica excitatoria como GABAérgica inhibitoria. De las motoneuronas mencionadas previamente, las de tipo D son GABAérgicas, mientras que las de tipo A, B, y C son colinérgicas^{135,136}. Los somas de todas estas motoneuronas se encuentran ubicados en el cordón nervioso ventral (CNV), y desde allí, estimulan a los paquetes musculares ventrales y, mediante comisuras, a los paquetes musculares dorsales¹³⁷. Para clarificar el lado donde cada neurona ejerce su estímulo es el dorsal o el ventral, se las nombra utilizando las

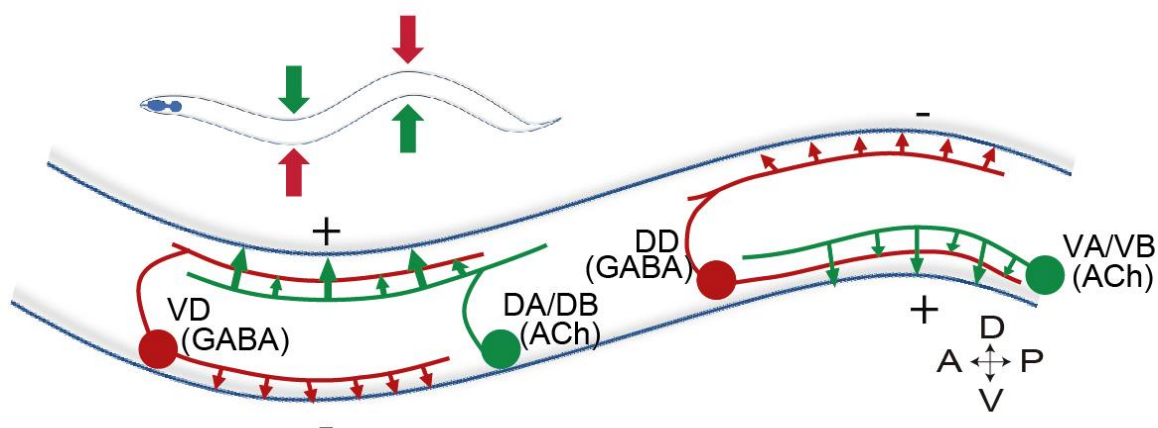


Figura 5. Motoneuronas colinérgicas y GABAérgicas en *C. elegans*. Representación de la inervación colinérgica y GABAérgica en las paredes musculares de *C. elegans*. En cada segmento, las motoneuronas colinérgicas estimulan la contracción de las células musculares de un lado, mientras que, simultáneamente, estimulan a las motoneuronas GABAérgicas que relajan las células musculares del lado opuesto.

letras D y V respectivamente. Por ejemplo, las DD son motoneuronas GABAérgicas inhibitorias que relajan los músculos de la pared dorsal, las VB son motoneuronas colinérgicas que producen la contracción de los músculos ventrales, etc.

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. Este proceso se da de forma inversa entre segmentos contiguos, y se invierte en cada segmento luego de cada movimiento, logrando así el desplazamiento efectivo^{130,138} (Fig. 5). En la Tabla 2 se detallan las principales características de estas motoneuronas.

Motoneurona	Neurotransmisor	Músculo que inerva	Movimiento que gobierna	Período de nacimiento
DD	GABA	Dorsal	Ambos movimientos	Desarrollo embrionario
VD	GABA	Ventral	Ambos movimientos	Desarrollo postembrionario
VA	ACh	Ventral	Movimiento hacia atrás	Desarrollo embrionario
VB	ACh	Ventral	Movimiento hacia adelante	Desarrollo postembrionario
DA	ACh	Dorsal	Movimiento hacia atrás	Desarrollo embrionario
DB	ACh	Dorsal	Movimiento hacia adelante	Desarrollo postembrionario
AS	ACh	Dorsal y Ventral	Ambos movimientos	Desarrollo postembrionario

Tabla 2. Motoneuronas colinérgicas y GABAérgicas en *C. elegans*.

Mantenimiento de C. elegans en el laboratorio

C. elegans crece y se reproduce perfectamente en una plataforma de agar suplementada con peptona, sales y colesterol, en un medio que es conocido como *Nematode Growth Medium* (NMG, medio para el crecimiento de nematodos, ver materiales y métodos) dentro de cajas de Petri. A modo de alimento, si bien es posible utilizar una amplia gama de bacterias, la especie más utilizada a nivel mundial es *Escherichia coli*, puntualmente la cepa OP50. Las bacterias se siembran sobre el centro de la placa conteniendo NGM y se dejan reposar un par de días a temperatura ambiente hasta que forman una lámina delgada que sirve de alimento a los gusanos. Para la manipulación, cruzamiento y mantenimiento diario, así como también para experimentos comportamentales, se utiliza un simple instrumento comúnmente denominado *worm picker* (ver materiales y métodos) y un mechero, visualizando a los animales mediante lupas de disección. Para una observación con mayor magnificación también se utilizan microscopios de contraste o confocales. Para una fácil observación a gran magnificación, así como para otros propósitos, los animales pueden ser paralizados con antihelmínticos o anestésicos. La dinámica de trabajo en los laboratorios que utilizan este animal como modelo resulta ventajosa, entre otros motivos, por el gran número de individuos que es posible utilizar, y los cortos tiempos que se requieren para generarlos. Los animales pueden ser mantenidos a temperaturas entre 12° a 25° C, variando enormemente los tiempos de desarrollo. Las instalaciones necesarias para el manejo de *C. elegans* no son complejas, y el pequeño tamaño de los animales permite la generación y mantenimiento de enormes cantidades de individuos en espacios reducidos. El mantenimiento es simple, ya que estos animales pueden sobrevivir durante largos periodos. En ausencia de alimento, las larvas recién nacidas detienen su desarrollo en el estadio L1. Como ya vimos, si la falta de alimento continúa, entran en el estadio *dauer*, una fase en la que pueden sobrevivir durante varios meses. Al reintroducirlos en un medio con alimento, pueden retomar su desarrollo sin problemas. Como también fue mencionado anteriormente, es muy sencillo almacenar cepas que no están activamente en uso, las cuales pueden ser congeladas por años^{46,112}.

Un procedimiento habitual en el uso de *C. elegans* en el laboratorio, es la realización de cruza genéticas. Si bien la baja proporción de machos en las poblaciones (0,1%) dificulta la realización de cruzamientos, un golpe térmico (1-2 horas a 37°C o 3-4 horas a 30°-34°C) puede interferir con la normal disyunción del par de cromosomas 'X' en hermafroditas, lo que resulta en un mayor número de machos en la siguiente generación^{139,140}.

La simplicidad de mantenimiento y bajos costos, sumado a todas las características anteriormente mencionadas, convierten a *C. elegans* en un modelo animal conveniente y versátil para su uso en laboratorios orientado a la investigación en biomedicina.

Objetivos generales

En este plan de tesis, decidimos explotar las ventajas de *C. elegans* como modelo para contribuir al entendimiento de las bases moleculares subyacentes a disfunciones del neurodesarrollo, así como para evaluar potenciales estrategias terapéuticas. Como fue mencionado anteriormente, existen muchos genes que están vinculados con la aparición de DND. En ese sentido, nos centramos en el estudio del gen *PTEN* en el contexto de la aparición de fenotipos relacionados con los TEA. Si bien las mutaciones de un único gen implicado en la aparición de TEA representan solo una pequeña fracción de los casos, proporcionan un punto de partida útil para desentrañar la etiología de los mismos, ya que las funciones biológicas relevantes para la etiología del TEA pueden estar igualmente alteradas tanto en los casos idiopáticos como en los sindrómicos³⁷. Nos planteamos como objetivos:

- Dilucidar la cadena de eventos celulares y moleculares subyacentes a la mutación del gen *daf-18* (homólogo de *PTEN* en *C. elegans*) y determinar consecuencias funcionales en el SN mediante la identificación de fenotipos alterados.
- Explorar estrategias terapéuticas capaces de revertir estos fenotipos.

Materiales y métodos

Protocolos generales

Mantenimiento y propagación de animales

Las cepas utilizadas fueron cultivadas y mantenidas en cajas de Petri con NGM como medio nutritivo (Anexo I), sembradas con la bacteria *E. coli* OP50 como fuente de alimento. Los animales para experimentación fueron incubados a 20° C durante varias generaciones, mientras que fueron mantenidos entre 12° y 15° durante el tiempo que no fueron utilizados. Para ventanas de tiempo mayores, los animales fueron congelados en *ultrafreezer* a -80° C. Para evitar condensación sobre la superficie del medio, las cápsulas fueron almacenadas de forma invertida. El mantenimiento de los animales se realizó mediante el repique, pasando a los animales a una nueva caja de Petri de forma regular cada 48-72 hs. Esto ayudó a evitar que los mismos se queden sin alimento y para mantener una densidad poblacional relativamente baja. Entre los elementos utilizados para la manipulación de los animales se incluyen lupas binoculares, mecheros de alcohol, y un *worm picker*, el cual consiste en un alambre de platino unido a una pipeta Pasteur de vidrio 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. La punta del alambre del *worm picker* se utilizó como soporte para el traslado de los gusanos, de forma directa o bien utilizando una película de la misma bacteria de la placa de Petri como ayuda, ya que la misma posee una consistencia que permite la adhesión de los animales. Otra técnica utilizada para el repique es el *chunk*, que consiste en cortar una porción de NGM con animales y desplazarla hacia una nueva placa con alimento, logrando así el traslado de un gran número de animales de forma sencilla. El descarte de estas cajas de Petri se realizó sumergiendo las mismas en una solución de hipoclorito de sodio para su limpieza y descontaminación.

Cultivo de *Escherichia coli* OP50

Como fue mencionado anteriormente, la bacteria utilizada en todos los casos como fuente de alimento fue *E. coli* OP50, la cual fue obtenida del *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), una institución que se encarga de mantener y distribuir cepas de *C. elegans* y otros recursos relacionados. La bacteria se almacenó congelada en una solución diluida de glicerol a -80° C en *ultrafreezer* y fue descongelada periódicamente. Para aislar colonias, se utilizó el medio LB Agar (Anexo I), plaqueado en cajas de Petri. Sobre la superficie del mismo, se esparcieron las bacterias

descongeladas mediante un ansa bacteriológica previamente esterilizada, en proximidad a un mechero Bunsen. Se dejaron crecer las colonias durante 24 horas a 37° C, y luego las cápsulas con dichas colonias fueron almacenadas en heladera a 4° C para evitar un crecimiento excesivo, por un máximo de 30 días. Semanalmente (o puntualmente para cada experimento) se creció bacteria en el medio LB (Luria-Bertani), el cual es un medio de cultivo líquido nutritivo utilizado para el crecimiento de bacterias (Anexo I). El crecimiento se realizó a 37° C con agitación durante toda la noche. A la mañana siguiente, los tubos fueron guardados en heladera a 4° C hasta su utilización. Para la siembra, se utilizaron aproximadamente 50 µL de bacterias en placas de Petri pequeñas (de 35 mm de diámetro, con 4 mL de NGM) y 100 µL en placas medianas (de 60 mm de diámetro, con 11 mL de NGM). La misma se realizó mediante pipetas Pasteur dentro del radio de seguridad de un mechero Bunsen para evitar contaminación.

Descontaminación

Las dos fuentes de contaminación más comunes se deben a la presencia de hongos y bacterias. Ante la presencia de estos contaminantes, se utilizó una solución de *bleaching* a base de hipoclorito de sodio (Anexo I), colocando aproximadamente unos 20 µL de esta solución en la superficie periférica de una caja de Petri nueva, con NGM y bacteria. En esta solución, se colocaron adultos grávidos procedentes de la placa contaminada. Tanto los adultos como también los contaminantes mueren en este procedimiento, mientras que la cutícula resistente de los huevos permite a los embriones sobrevivir hasta que la solución es absorbida por el NGM. Para garantizar una descontaminación efectiva y minimizar la exposición a los restos de la solución, se repicaron rápidamente las larvas una vez que eclosionaron los huevos. Las cepas descontaminadas no fueron utilizadas para experimentos hasta luego de dos generaciones. Otra técnica menos invasiva que se utilizó para la descontaminación, fue el repique serial de animales. Dos o tres animales fueron seleccionados y repicados varias veces a una nueva placa cada vez. Esta técnica se utilizó principalmente en contaminaciones leves con hongos, ya que este método suele ser poco efectivo para descontaminar bacterias.

Sincronización

La sincronización etaria de los animales es crucial para garantizar un diseño experimental adecuado y la reproducibilidad de los resultados. Para lograr una sincronización precisa, se seleccionaron entre 8 y 30 hermafroditas grávidos, dependiendo de los requerimientos del experimento, y se los colocó en placas durante un periodo de 60 a 120 minutos. Al finalizar este tiempo, se retiraron los adultos, dejando únicamente los huevos de la F1 en las placas. Este procedimiento permite obtener individuos con una mínima variación en la edad, lo que los hace ideales para su uso en experimentos posteriores.

Para los ensayos en los que fueron necesarios animales en el estadio L4, estos animales fueron seleccionados directamente de las placas de sincronización debido a que son fácilmente reconocibles por su morfología característica.

Para aquellos experimentos en los que se utilizaron adultos jóvenes (adultos no grávidos), por otro lado, se procedió de similar manera: se seleccionaron L4 de las placas de sincronización, un día antes del experimento. Estos animales fueron transferidos a una nueva placa, para su utilización al día siguiente.

Congelado y preservación de cepas por largos períodos

Las cepas que se obtienen del CGC muchas veces fueron generadas mediante mutagénesis químicas. Más allá de la mutación de interés, existe el riesgo de que estas cepas tengan otras mutaciones. Por lo tanto, para la limpieza del *background* genético, estas cepas fueron retrocruzadas con la cepa N2 (*wild type*) manteniendo la mutación específica o la característica genética propia de cada cepa mediante verificación por PCR o selección fenotípica. Luego, las mismas fueron congeladas a -80° C en *ultrafreezer* en varios viales, utilizando una solución de M9 con *Freezing Solution* (Anexo I). Para experimentación, los animales son descongelados y repicados por al menos 3 generaciones antes de su uso. Para evitar la acumulación de mutaciones, las cepas fueron descartadas luego de 6 meses de uso, y descongeladas nuevamente.

Cruzas genéticas

Las cruas genéticas entre mutantes de interés se realizaron siguiendo simples principios de herencia mendeliana. Como fue mencionado previamente, las hermafroditas tienen la capacidad de autofertilización, pero para realizar una crua entre distintas cepas, es necesaria la fertilización cruzada entre un macho de una de las cepas de interés con una hermafrodita de la otra. 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.

Generación de machos

Para la generación de machos, se sometió 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%. Entre 5 y 6 placas con NGM sembradas con *E. coli* fueron utilizadas, colocando 6-8 L4 en cada una para realizar el *heat shock*. Una vez obtenidos algunos

machos, se generó un *stock* para aumentar la cantidad de los mismos. Para ello, se colocaron 6-8 machos junto a dos hermafroditas L4 en una nueva placa. En cruza exitosas, se espera que entre la progenie haya hasta un 50% de machos debido a que los espermatozoides de los machos parentales tienen ventaja competitiva por sobre los propios de hermafroditas.

Protocolo general de cruza

Para la crua deseada, una vez generados los machos, se colocan de 6 a 8 machos de una de las cepas deseadas junto con 2 hermafroditas de la otra cepa en una caja de Petri pequeña. La F1 estará formada por animales que son tanto del producto de la crua (heterocigotas para cada una de las características) como también por animales que provienen de la autofecundación de las hermafroditas. Es necesario poder identificar de alguna manera a aquellos animales que provienen de la crua. En la mayoría de los casos, esto es posible mediante una simple visualización. Un ejemplo es cuando una característica que proviene del macho es evidente en estado heterocigota en hermafroditas de la F1. Otro ejemplo, es cuando una característica fenotípica de la hermafrodita parental deja de ser evidente en el estado de heterocigosis en hermafroditas de la F1, lo cual permite la certera identificación de aquellos individuos que provienen de la crua. Los animales de la F1 que provienen de la crua son aislados en una nueva placa, y por autofecundación (en el caso de que la estrategia planteada requiera la selección de hermafroditas), se generarán individuos *wild type* (que no heredaron ningún alelo de la mutante), heterocigotas (un solo alelo mutante), y homocigotas mutantes (ambos alelos mutantes) para la característica deseada. La detección del homocigota deseado puede ser mediante selección por fenotipo o detección de la característica genética deseada mediante técnicas moleculares como PCR. En el caso de seleccionar machos de la F1, los mismos son aislados para continuar la crua, repitiendo el procedimiento.

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 1mL
- 1M KPO₄ pH 6.0 25 mL

1 M KPO₄ Buffer (1 L de solución)

- KH₂PO₄ 108,3 g
- K₂HPO₄ 35,6 g
- ddH₂O c.s.p. 1 L
- Ajustar a pH 6 con NaOH
- Autoclave (121 °C, 15 min)

Stock de Colesterol (5 mg/ml) (1 L de solución)

El colesterol no es soluble en agua, por lo que debe ser disuelto en etanol 100%

- Colesterol 5 g
- Etanol 100%

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

LB Agar (1 L de solución)

- Bacto-Agar 20 g
- Peptona (Trypteína Bacteriológica) 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Peptona 10 g
- NaCl 10 g
- ddH₂O c.s.p. 1L
- Ajustar a pH 7,0 con NaOH

M9 (1 L de solución)

- Na_2HPO_4 5,8 g
- KH_2PO_4 3,0 g
- NaCl 0,5 g
- NH_4Cl 1,0 g
- ddH_2O c.s.p. 1L
- Autoclave (121 °C, 15 min)

Worm Bleaching Solution (Solución fuerte)

- Hipoclorito de sodio (NaOCl) 5% 2 mL
- ddH_2O 2 ml
- NaOH 1 pellet

Worm Bleaching Solution (Solución suave, para cepas más vulnerables)

- Hipoclorito de sodio (NaOCl) 5% 1,25 mL
- ddH_2O 1.25 ml
- 2M NaOH 7.5 mL

50 x TAE (1L de solución)

- Tris Base 242 g
- Ácido acético glacial 57,1 g
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37,2 g
- ddH_2O c.s.p. 1L
- Llevar a pH 8.5

Buffer de lisis 2x (60 mL de solución)

- KCl 1M 6 mL
- Tris (pH 8,3) 1,2 mL
- MgCl_2 1M 300 μL
- IGEPAL 100% (o NP40) 540 μL
- Tween-20 100% 540 μL
- Gelatina 1% 1,2 mL
- Proteinasa K 20 mg/mL 600 μL
- ddH_2O 49,6 mL

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

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

Gel de agarosa al 2% para Pads de microscopía (30 mL)

- Agarosa 0,6 g
- M9 30 mL

Protocolos específicos de ensayos

Ensayos farmacológicos de parálisis con levamisol y aldicarb

Los ensayos de parálisis se llevaron a cabo en placas estándar NGM con 2 mM de aldicarb (Sigma-Aldrich) o 0,5 mM de levamisol (Alfa Aesar). Se transfirieron 25-30 gusanos L4 a cada placa y los animales paralizados se contaron cada 15 o 30 minutos. Cada animal fue considerado como paralizado cuando no respondía después de ser estimulado tres veces con el *worm picker* sobre la cabeza y la cola. Se realizaron al menos cuatro ensayos independientes con 25-30 animales para cada condición. Se utilizó el área bajo la curva (ABC) de cada experimento para comparaciones estadísticas.

Medición de longitud corporal (fenotipo “shrinker”)

Las mediciones de longitud corporal se realizaron en placas estándar de agar NGM sin bacterias. Se transfirieron gusanos L4 y se les permitió aclimatarse durante al menos 5 minutos. Cada animal fue estimulado mecánicamente con un *worm picker* en la región anterior. Durante el estímulo los gusanos fueron filmados con una cámara Amscope Mu300 y la longitud corporal del animal se midió utilizando el *software* FIJI Image J. La cuantificación del acortamiento del cuerpo después del contacto se calculó como la disminución de la longitud corporal en relación con la longitud del animal antes de ser tocado.

Ensayo de respuesta de escape

Los ensayos de respuesta de escape se realizaron en placas de agar NGM sembradas con una capa delgada de bacteria OP50 *E. coli* crecida en “césped”. Para ello, se sembraron 120 μ L de bacterias 24 horas antes del ensayo, y se las esparció de manera uniforme sobre toda la superficie del NGM. Luego, las cajas de Petri fueron incubadas a 37° C durante la noche previa al ensayo. El día del experimento, se transfirieron animales L4 a las placas y se les permitió aclimatarse durante al menos 5 minutos. Los giros en omega fueron inducidos por un toque suave en la región anterior con un pelo fino. Los mismos se clasificaron como cerrados o completos cuando el gusano tocaba la cola con la cabeza, mientras que fueron considerados como abiertos o incompletos cuando la cabeza no tomó contacto con la región de la cola durante la ejecución¹⁴¹. Se realizaron entre 4 y 7 ensayos independientes con aproximadamente 20 animales para cada condición. Videos representativos disponibles en youtube:

Giro en omega cerrado: <https://youtu.be/wH1mBq6svoo> (video 1)

Giro en omega abierto: <https://youtu.be/ibz3GsJeELs> (video 2)

Optogenética

Para la estimulación optogenética, se utilizaron adultos jóvenes (6-8 horas post L4) que expresan *Channelrhodopsin* (ChR2) en neuronas GABAérgicas (*Punc-47::ChR2*) o colinérgicas (*Punc-17::ChR2*). El ensayo se realizó en placas conteniendo agar NGM de 6 mm sin alimento, y se dejó a los animales aclimatarse durante 5 minutos. Cada animal fue filmado a 15 fps utilizando una cámara Allied Vision Alvium 1800 U-500m. Para estimular la actividad neuronal, expusimos a los animales a pulsos de luz de 470 nm durante 5 segundos. Estos pulsos de luz se emitieron utilizando un *script* personalizado en Python (VIMBA Perón, escrito por el Dr. Andrés Garelli, disponible en <https://github.com/AndresGarelli/VimbaPeron>) a un microcontrolador Arduino Uno, que opera un controlador LED compacto universal de Mightex (Mightex SLC-MA02-U). La emisión de luz se logró a través de una Fuente de Colimador de LED de Alta Potencia de Mightex (LCS-0470-03-11). Para seguir con precisión los cambios en el cuerpo del gusano, se registró su área desde 5 segundos antes del estímulo de luz y de forma continua hasta 5 segundos finalizado el estímulo. El análisis de los cambios del tamaño corporal fue realizado de forma automática mediante un macro de FIJI-Image J (escrito por la Dra. Gabriela Blanco) capaz de rastrear el área del cuerpo en cada cuadro, aprovechando el claro contraste entre el cuerpo del gusano y el fondo. Para validar nuestro sistema de medición, medimos manualmente el ancho de 6-8 animales en el punto de estimulación de luz (a los 2,5 segundos) y los comparamos con el área y la longitud del cuerpo. Nuestras mediciones mostraron consistentemente que, independientemente de si el área aumenta o disminuye (dependiendo de la activación de las neuronas GABAérgicas o colinérgicas), el ancho permanece en su mayoría sin cambios (Fig. 25). Videos representativos de la técnica disponibles en youtube:

Estimulación optogenética GABAérgica: https://youtu.be/ZQ_SO3H1QzM (video 3)

Estimulación optogenética colinérgica: <https://youtu.be/9LYSw8fvz4Y> (video 4)

Microscopía: análisis de la expresión de SOD-3

Los niveles de expresión de *SOD-3* fueron analizados en cepas transgénicas que contienen el reportero transcripcional *muls84* (*SOD-3::GFP*). Los animales fueron sincronizados hasta el estadio L4 y luego paralizados mediante Azida de Sodio (0,25 M) en láminas de agarosa al 2%. Se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000 para la toma de imágenes. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada en regiones de interés (ROIs) del mismo tamaño en la cabeza de cada animal utilizando el *software* Image J FIJI. Los resultados fueron normalizados al control (animales *wild type* sin β HB). Se analizaron aproximadamente 40-60 animales para cada genotipo/condición.

Microscopía: análisis de comisuras de neuronas GABAérgicas y colinérgicas

Animales sincronizados (L1 o L4, dependiendo el ensayo) con los reporteros fluorescentes *vsIs48* (*Punc-17::GFP*, neuronas colinérgicas) o *ufls34* (*Punc-47::mCherry*, neuronas GABAérgicas) fueron inmovilizados con azida de sodio (0,25 M) en láminas de agarosa al 2%. Las comisuras de las neuronas GABAérgicas y colinérgicas se analizaron mediante un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000. Los defectos en las comisuras, incluidos los defectos de guiado, ramificación anormal, truncamientos, etc., se clasificaron de manera similar a publicaciones previas¹⁴². Se calculó el porcentaje de animales con al menos un defecto en alguna comisura para cada grupo neuronal (colinérgicas o GABAérgicas). Las imágenes representativas mostradas en las figuras se tomaron mediante un microscopio confocal láser (ZEISS LSM 900 con AirScan II) con objetivos de 20× y 63×.

Microscopía: análisis de la morfología y migración de las neuronas AIYs y HSNs.

Animales sincronizados en el estadio L4 (para el análisis de las AIYs) o adultos jóvenes (para el análisis de las HSNs) con los reporteros fluorescentes *Pttx-3::GFP* y *Ptph-1::GFP* respectivamente fueron inmovilizados con azida de sodio (0,25 M) en láminas de agarosa al 2% y analizados con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000. La morfología de las neuronas AIYs se clasificó en tres categorías cualitativas según la extensión de los procesos de las mismas: I) Desarrollo completo; II) Desarrollo incompleto moderado (axones ingresan al anillo nervioso pero no se contactan entre sí en la línea media dorsal); y III) Desarrollo incompleto severo (axones que no alcanzaron al anillo nervioso, o bien lo alcanzaron pero no realizaron el giro característico hacia dorsal que evidencia la localización del anillo nervioso). Por otro lado, la migración de las HSNs se clasificó en categorías cuantitativas utilizando el *software* ImageJ según el grado de migración, tomando como referencia el largo del cuerpo y la ubicación relativa de las neuronas como una proporción del mismo ($\geq 0,4$: migración completa; $>0,2$ - $<0,4$: migración deficiente intermedia; $\leq 0,2$: migración deficiente severa).

Ensayos con DL-β-Hidroxibutirato

Los animales fueron expuestos a 20 mM de DL-β-Hidroxibutirato (βHB) (Acros Organics) en placas de agar NGM sembradas con *E. coli* OP50. El compuesto fue diluido junto con el NGM a 60° C durante el preparado de las placas. La exposición al mismo se realizó según lo especificado para cada ensayo.

Análisis estadístico

Los resultados presentados en cada figura son el promedio de al menos tres experimentos independientes. Las barras representan la media $\pm$ el desvío estándar (SD). Generalmente, se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para analizar múltiples muestras paramétricas, y se utilizó la prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones por pares entre todos los grupos. Para comparaciones contra un grupo control, se utilizó la prueba *post hoc* de Dunnett. Para múltiples muestras no paramétricas, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba *post hoc* de Dunn, que también se utilizó para comparaciones contra el grupo control. En los casos donde se hicieron comparaciones entre dos condiciones independientes, se utilizó la prueba t para datos paramétricos, mientras que se empleó la prueba de Mann-Whitney U para datos no paramétricos. Utilizamos el *software* GraphPad Prism versión 6.01 para realizar los análisis estadísticos. La información estadística se indica en las leyendas de las figuras. Para todos los ensayos, la recopilación y el análisis de datos se realizaron de manera ciega. Leyenda de Significación Estadística: ns $p > 0.05$; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

PCR punto final

Esta técnica se utilizó para el genotipado de cruza genéticas. Para la extracción de ADN, se utilizó un buffer de lisis con proteinasa K (Anexo I) sobre aproximadamente unos 20 animales adultos durante 75 minutos a 65°C. Luego, para la amplificación del gen, se utilizaron los siguientes reactivos (volumen final 20 uL por reacción):

Agua.....	13 uL
Buffer 10X.....	2 uL
MIX dNTPS 2,5 mM (desoxirribonucleótidos).....	1 uL
<i>primer</i> 1 sentido	1 uL
<i>primer</i> 2 antisentido	1 uL
ADN polimerasa termoestable (TAQ).....	1 uL
lisado.....	1 uL

La polimerasa utilizada mayoritariamente fue la TAQ, termoestable a temperaturas de hasta 95°C y extraída originalmente de la bacteria *Thermus aquaticus*. Los *primers* fueron diseñados mediante el *software* ApE- A Plasmid Editor v 3.0.8 y se adquirieron a través de proveedores comerciales.

Programa estándar de PCR para termociclador utilizado:

- 1) 93° C (desnaturalización inicial) 5'
- 2) 93° C (desnaturalización) 20''
- 3) 55° C (hibridación de *primers*) 30-45'' *La temperatura depende de cada primer.*

- 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 para electroforesis al 1% y se corrió en un buffer de TAE (anexo I) a 65-70 V durante 15-20 minutos en un sistema de electroforesis.

Anexo de protocolos específicos: cepas utilizadas

La cepa de referencia *wild type* utilizada en este estudio es N2 Bristol. Algunas de las cepas fueron obtenidas del CGC. Las cepas transgénicas generadas específicamente para el presente trabajo fueron obtenidas mediante microinyección de ADN plasmídico con la construcción *Punc-47::daf-18cDNA* (gentilmente proporcionado por la Dra. Alexandra Byrne, UMASS Medical School) a una concentración de 20 ng/μL en la línea germinal de mutantes dobles (*daf-18(ok480); lin-15(n765ts)*), con el marcador de co-inyección *lin-15* rescatando el plásmido pL15EK (a 80 ng/μl). La nomenclatura de las cepas en *C. elegans* incluye letras en mayúscula que se refieren al laboratorio donde fueron obtenidas seguidas por un número que indica el orden de esa cepa en el laboratorio. Luego, en letra itálica minúscula, se detalla el nombre del gen, seguido por el alelo del mismo entre paréntesis, y finalmente el cromosoma donde se encuentra. Por ejemplo, la cepa CB156 *unc-25(e156) III* es la cepa número 156, obtenida en el laboratorio de Jonathan A Hodgkin en Oxford, que contiene un alelo mutado (*e156*) en el gen *unc-25* que está en el cromosoma III. Para los animales transgénicos el sufijo *Is* implica que el transgen está incorporado en el genoma (por ejemplo, *vsIs48*). Las cepas utilizadas fueron:

CB156 *unc-25(e156) III*

MT6201 *unc-47(n2409) III*

CB1375 *daf-18(e1375) IV*

OAR144 *daf-18(ok480) IV*

GR1307 *daf-16(mgdf50) I*

OAR115 *daf-16(mgDf50); daf-18(ok480)*

OAR161 *daf-18(ok480); Punc-47::daf-18*

LX929 *vsIs48 (Punc-17::gfp)*

IZ629 *ufIs34 (Punc-47::mCherry)*

OAR117 *ufIs34 (Punc-47::mCherry); daf-18(ok480)*

OAR118 *vsIs48 (Punc-17::gfp); daf-18(ok480)*

OAR142 *ufIs34 (Punc-47::mCherry); daf-16(mgDf50)*

OAR143 *ufIs34 (Punc-47::mCherry); daf-16(mgDf50); daf-18(ok480)*

CF1553 *mulS84 [(pAD76) Psod-3::gfp + rol-6(su1006)]*

OAR140 *mulS84 [(pAD76) Psod-3::gfp + rol-6]; daf-18(ok480)*

OAR141 *mulS84 [(pAD76) Psod-3::gfp + rol-6]; daf-16(mgDf50)*

OH99 *mgIs18[PttX-3::gfp]*

OAR83 *daf-18(ok480); mglS18[Pttx-3::gfp]*
MT13471 [*Ptph-1::gfp*]
OAR112 [*Ptph-1::gfp*]; *daf-18(ok480)*
IZ805 [*Punc-17::ChR2*]
ZM3266 [*Punc-47::ChR2*]
OAR177 [*Punc-17::ChR2*]; *daf-18(ok480)*
OAR178 [*Punc-17::ChR2*]; *daf-16(mgDf50)*
OAR179 [*Punc-47::ChR2*]; *daf-18(ok480)*
OAR180 [*Punc-17::ChR2*]; *daf-16(mgDf50)*
TJ1052 *age-1(hx546)*
GR1310 *akt-1(mg144)*
GR1318 *pdk-1(mg142)*
JT9609 *pdk-1(sa680)*
VC204 *akt-2(ok393)*
VC222 *raga-1(ok386)*
KQ1366 *rict-1(ft7)*

Primera Sección

*Efectos de la mutación de daf-18 en
el neurodesarrollo de C. elegans*

Introducción

PTEN es un importante regulador del ciclo celular

PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina eliminado en el cromosoma 10) es un gen supresor de tumores que en humanos se localiza en la región del cromosoma 10q23.3¹⁴³. Este gen controla importantes procesos tales como la progresión del ciclo celular, la supervivencia celular, la traducción, la organización del citoesqueleto, el tráfico a través de membrana y el metabolismo^{37,144-148}. Mutaciones en este gen se han relacionado con una variedad de tumores, incluidos algunos tipos de tumores cerebrales, de mama y próstata; así como también graves implicancias en el neurodesarrollo⁴¹ (Fig. 6).

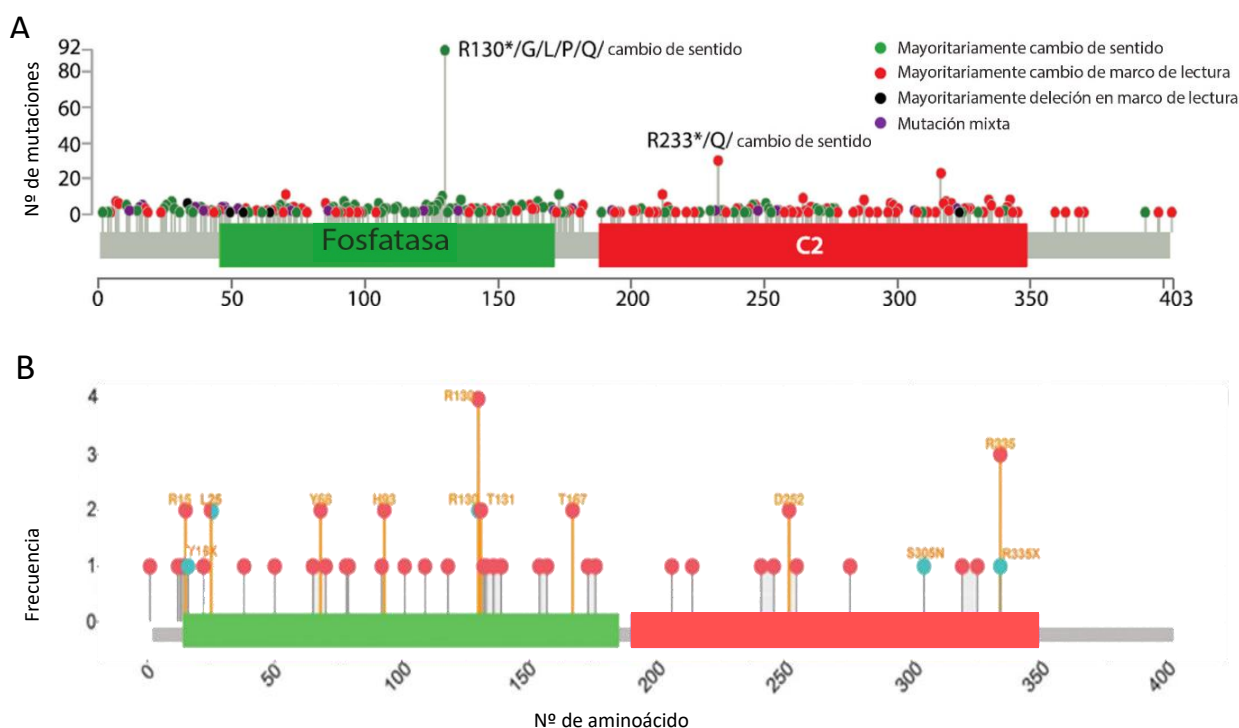


Figura 6. Frecuencia y sitios de mutaciones en el gen *PTEN* asociadas con cáncer y neurodesarrollo. A. Mutaciones en *PTEN* con incidencia en el desarrollo del cáncer. *PTEN* regula procesos como la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular, claves en el desarrollo de estas patologías. Adaptado de Hopkins *et. al* 2014. **B.** Mutaciones en *PTEN* conocidas por influir en el neurodesarrollo. Adaptado de De Spenza *et. al* 2020.

Actividad y función

PTEN tiene una actividad fosfatasa *dual*, lo que significa que tiene la capacidad de remover fosfatos tanto en lípidos como en proteínas. La actividad lípido fosfatasa más conocida que posee es la de catalizar la desfosforilación del fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) en la

membrana plasmática, antagonizando así el papel de la fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3K) y la quinasa AKT/proteína quinasa B (AKT/PKB). Por otro lado, la actividad proteína-fosfatasa más conocida es inhibir a MAPK, que a su vez regula la señalización a través de mTOR y GSK3 β ^{37,41,147,149-152}. Por lo tanto, la actividad de PTEN modula negativamente la cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR, caracterizada por su rol en la síntesis de proteínas, el avance del ciclo celular y la proliferación, entre otras^{153,154}. Existen varios mecanismos regulatorios que pueden reducir la afinidad de PTEN por la membrana, aumentando su localización en citoplasma y microtúbulos, donde tiene un rol fundamental al regular la dinámica del citoesqueleto y la motilidad celular. En el núcleo, PTEN interactúa con cuatro componentes diferentes de APC/C (Complejo Promotor de Anafase/Ciclosoma), que es una ligasa ubiquitina E3 que regula la degradación de muchas proteínas importantes en la vía del ciclo celular. Esta actividad, que resulta fundamental para su rol de gen supresor tumoral, no depende de su actividad fosfatasa sino de su habilidad de unirse al complejo promotor de anafase^{147,155}. En núcleo, también participa en la regulación del crecimiento celular¹⁵⁶ y promueve la supervivencia celular¹⁵⁷. La unión de PTEN a los centrómeros es esencial para prevenir roturas de doble cadena en el ADN^{158,159}.

Estructura y regulación

En su forma canónica, PTEN posee un total de 403 aminoácidos. Este incluye varios dominios importantes^{37,147} (Fig. 6):

- Un dominio de unión a PIP2 en el extremo N-terminal (PBD).
- Un dominio fosfatasa (residuos 7-185), que contiene el bucle catalítico P-loop (residuos 123-130).
- Un dominio C2 (residuos 186-351), que incluye el bucle CBR3 (residuos 260-269) y es crucial para la unión a la membrana.
- Una cola C-terminal (residuos 353-403), que contiene múltiples sitios de fosforilación que inhiben la actividad catalítica y la unión a la membrana. Esta región termina en un motivo de unión a PDZ, un importante dominio involucrado en la estabilidad, la señalización celular y la interacción con otras proteínas.

El dominio catalítico fosfatasa contiene el motivo típico de fosfatasa de especificidad dual HCXXGXXRS/T. La proteína también tiene homología con Tensina y Auxilina, fundamentalmente en el dominio de unión a membrana C2¹⁴⁷. Tanto la ubicación como su actividad pueden ser reguladas por modificaciones postraduccionales. PTEN puede ser fosforilado por diversas quinasas en múltiples sitios, especialmente en su cola C-terminal. Dependiendo del sitio

específico de fosforilación, los efectos pueden ser tanto inductores como inhibidores, e incluso pueden modificar la localización subcelular en algunos casos¹⁴⁷. Un clásico ejemplo es la regulación por CK2, una quinasa que fosforila un clúster de residuos en el extremo C terminal, produciendo que PTEN sea degradado lentamente en proteosomas¹⁶⁰. Por otro lado, esta quinasa puede ser activada por factores de crecimiento, fosforilando a PTEN e inhibiendo su afinidad con la membrana. Este proceso a menudo es común durante el crecimiento axonal, en el cual PTEN abandona la membrana y se une a los microtúbulos^{161,162}. Por el contrario, señales inhibitoras del crecimiento inducen la desfosforilación de PTEN, y su consecuente localización en membrana donde promueve la despolimerización de los microtúbulos al desfosforilar PIP3¹⁶³. La afinidad de PTEN por la membrana depende tanto del dominio C2 (dominio de unión a membrana) como también del dominio PBD. La fosforilación al extremo C terminal, inhibe la unión a membrana mediante el bloqueo competitivo de los sitios de interacción con la membrana de ambos dominios. Además, se conoce que con su actividad fosfatasa, PTEN puede autodesfosforilarse en múltiples residuos del extremo C-terminal. El nivel de fosforilación de este dominio es importante, por otro lado, para las interacciones de tipo proteína-proteína, así como también para la susceptibilidad a ser clivada por diferentes caspasas. Los distintos productos resultantes del clivado poseen menor actividad y estabilidad^{147,164}. Por otro lado, ciertos tipos específicos de fosforilación inactivan a PTEN, tal como es el caso de varios tipos de cáncer caracterizados por una fosforilación en el residuo Ser-380, demostrando así que su inactivación no depende únicamente de mutaciones en su gen¹⁴⁷.

Otros tipos de modificaciones postraduccionales pueden modular la actividad de PTEN. La acetilación puede disminuir la actividad de PTEN si esta ocurre, por ejemplo, en los residuos de lisina 125 y 128 del sitio catalítico. La acetilación en otros sitios puede regular las interacciones de tipo proteína-proteína¹⁴⁷. Como mencionamos, PTEN puede tener diferentes localizaciones intracelulares. PTEN puede estar tanto en membrana (donde posee su mayor efectividad para desfosforilar PIP3), como en el citoplasma y en el núcleo, viéndose favorecida la translocación nuclear cuando es monoubiquitinada, sumoilizada o tiene otro tipo de interacción proteína-proteína^{158,165,166}. Sin embargo, el efecto de la ubiquitinación depende de los residuos involucrados y puede afectar diferencialmente a la actividad, la estabilidad o localización. La poliubiquitinación, por el contrario, suele estar más asociada con la degradación¹⁴⁷.

Otros procesos que determinan la función, conformación, estabilidad y ubicación de PTEN son las interacciones de tipo proteína-proteína. Un ejemplo clásico es la unión de p85 a PTEN, estimulada por la señalización de EGF (factor de crecimiento epidérmico), lo que aumenta su actividad fosfatasa¹⁶⁷. Por último, PTEN puede ser reprimido por metilación en su promotor, lo

cual suele ser también frecuente en varios tipos de cáncer; así como también mediante varios micro ARN y ARN no codificantes¹⁴⁷.

Efectos de la pérdida de función de PTEN

La disfunción de *PTEN* provoca la desregulación de la cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR, lo que normalmente resulta en un crecimiento celular excesivo. Las mutaciones en este gen han sido encontradas en un amplio espectro de tumores. Este gen es uno de los principales genes supresores tumorales en la célula, y se encuentra entre los genes más mutados en la mayoría de los pacientes con dicha enfermedad¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ (Fig. 6). Con el transcurso del tiempo, se hizo claro que las alteraciones en *PTEN* pueden desencadenar una variedad de fenotipos, por lo que se introdujo el término amplio de síndrome de tumor hamartomatoso *PTEN* (PHTS). Estos trastornos incluyen el síndrome de Cowden (CS), el síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, la enfermedad de Lhermitte-Duclos en adultos y los TEA asociados con macrocefalia^{171,172}. El rol de este gen durante el desarrollo del SN parece ser crítico: un gran número de mutaciones han sido encontradas en pacientes con desórdenes neurológicos¹⁴⁴. En los últimos años, el papel que este gen posee en el neurodesarrollo está fuertemente respaldado por múltiples líneas de evidencia. En ratones, si bien las mutaciones germinales de *PTEN* son letales en etapas embrionarias¹⁷³, condiciones heterocigotas (como ocurre en humanos) permiten el desarrollo de animales que presentan alteraciones en el tamaño cerebral, comportamientos sociales alterados, agresión, y una mayor frecuencia de comportamientos repetitivos^{174,175}. Está largamente demostrado que tanto ratones con mutaciones heterocigotas en *PTEN* como aquellos *knockout* condicionales de *PTEN* en grupos neuronales específicos recapitulan muchos de los síntomas asociados con el TEA en humanos. Estos síntomas varían según el modelo murino e incluyen macrocefalia, alteraciones anatómicas en cerebelo y ventrículo, hipertrofia neuronal, dendritas hipertrofiadas y ectópicas, tractos axonales con sinapsis aumentadas, deficiencias motoras, epilepsia, entre otros¹⁷⁶⁻¹⁸⁰.

daf-18 es el homólogo de PTEN en C. elegans

Al igual que *PTEN* en mamíferos, el gen homólogo *daf-18* en *C. elegans* desempeña un papel crucial en la regulación de la señalización de insulina y el control del ciclo celular, regulando negativamente la vía de ILPs/AGE-1/AKT (vía de insulina/PI3K/AKT en mamíferos)^{181,182} (Fig. 7). Estas vías de señalización celular, así como los genes que participan en las mismas, están altamente conservadas en *C. elegans*, así como en todo el reino animal en general^{148,183,184}. En particular para *C. elegans*, la región amino-terminal de DAF-18 contiene el dominio catalítico de la fosfatasa, y esta región comparte un 38% de identidad de secuencia con el dominio

correspondiente de PTEN humano. La región carboxilo-terminal de DAF-18 tiene niveles más bajos de homología de secuencia con PTEN. Por otro lado, los dominios no catalíticos de DAF-18 y PTEN pueden desempeñar un papel regulador dependiente de la especie¹⁸⁵. A diferencia de los roedores, en donde la pérdida germinal de *PTEN* es letal durante el desarrollo embrionario, la pérdida de *daf-18* en *C. elegans* no afecta a la supervivencia y permite el desarrollo de los animales^{150,182,186}. Esto permite utilizar a *C. elegans* como plataforma de estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a las mutaciones en este gen.

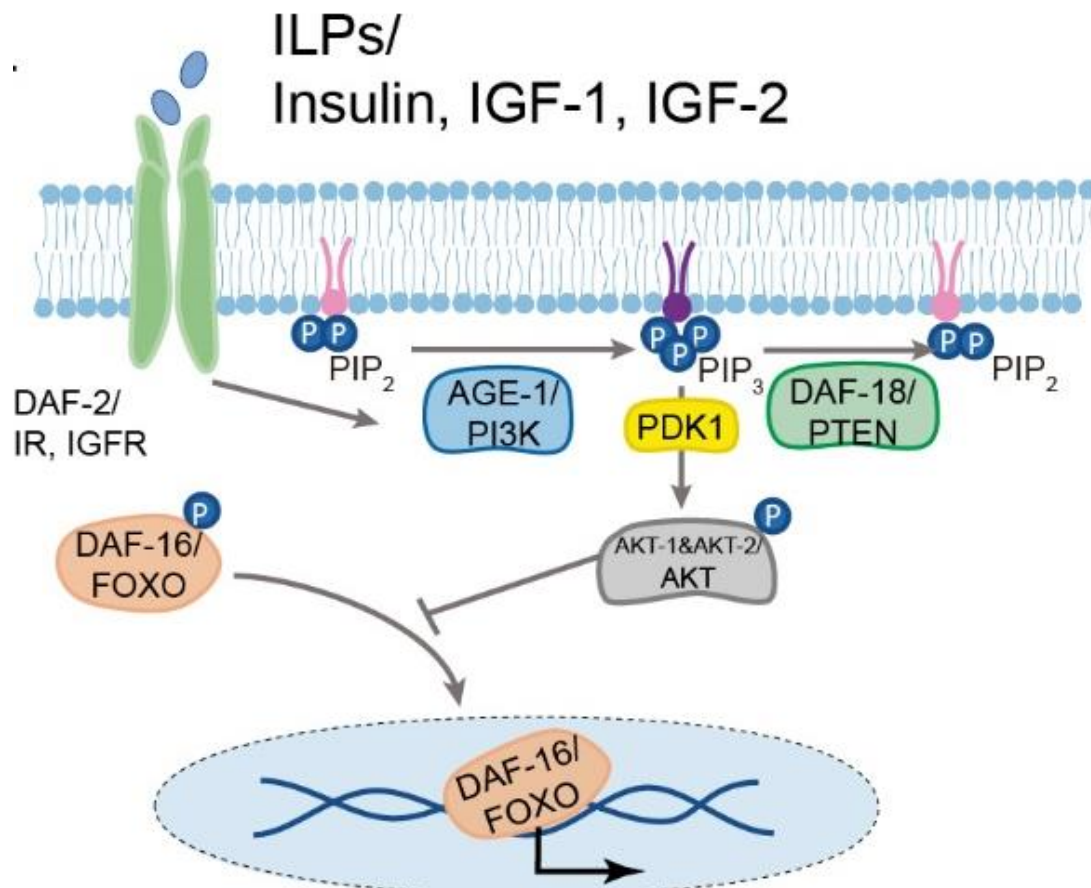


Figura 7. Vía de señalización insulínica en *C. elegans*. Representación de la vía insulínica de *C. elegans*, indicando en cada caso su respectivo homólogo en mamíferos luego de la barra oblicua "/". Esta vía muestra un alto nivel de conservación a lo largo del reino animal. La misma es regulada negativamente por *daf-18*, homólogo del gen *PTEN* de mamíferos.

El eje AGE-1/AKT cumple un importante rol en el neurodesarrollo de *C. elegans*

La señalización regulada por el eje *AGE-1/AKT* a través de DAF-16 (el único ortólogo en *C. elegans* de la familia de factores de transcripción FOXO de mamíferos) está implicada en el desarrollo de neuronas específicas en *C. elegans*. Mutaciones nulas en *daf-16*, así como la inhibición de la actividad de DAF-16 debido a una mutación en *daf-18/PTEN* y la activación de la señalización de

PI3K, causan un fenotipo de migración incompleta del par de neuronas motoras específicas de hermafroditas (HSNs), mientras que un aumento en la actividad de DAF-16 resultante de la disminución de la señalización de Insulina/IGF-1 conduce a una migración excesiva de las HSNs (Fig. 8). Esta migración depende de la expresión de DAF-16 en la hipodermis del animal¹⁸⁷. Las HSNs están presentes únicamente en hermafroditas, mientras que en los machos sufren

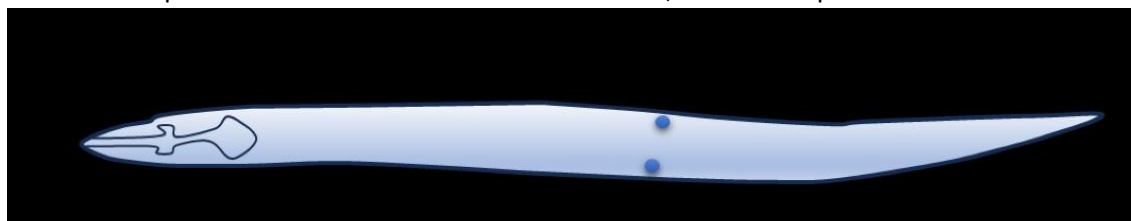


Figura 8. Neuronas HSNs en *C. elegans*. Esquema representativo mostrando la ubicación aproximada de las HSNs. Estas neuronas se generan en la cola del embrión y luego migran hacia la parte anterior, ubicándose cerca del centro del animal en ambos sexos. En los machos, estas células son eliminadas por un proceso de muerte celular programada (apoptosis) antes de que alcancen su madurez funcional.

apoptosis durante el desarrollo. Las mismas se generan en la cola del embrión y luego migran hacia adelante a posiciones cercanas al centro del animal en ambos sexos¹¹¹ (Fig. 8). Como función principal, las HSNs inervan los músculos de la vulva y estimulan la puesta de huevos. El axón de HSNR viaja en el fascículo derecho del cordón nervioso ventral, mientras que el axón de HSNL viaja en el lado izquierdo. El crecimiento del axón comienza durante L2 y L3, mientras que la formación de sinapsis tiene lugar en las etapas L3 y L4. Las células precursoras de la vulva guían los procesos emergentes de las HSNs ventralmente. También organizan los dos procesos de las HSNs para unirse al cordón nervioso ventral en dos fascículos separados e inducirlos a desfascicularse del cordón nervioso ventral y ramificarse en la vulva¹⁸⁸. Los fenotipos de migración incompleta o excesiva de las HSNs, sin embargo, no son el único efecto sobre el SN producto de la pérdida de *daf-16* o *daf-18* que se han descubierto en *C. elegans* hasta la fecha. La pérdida de función de cualquiera de estos genes produce, además, un truncamiento prematuro del par de interneuronas AIYs. A diferencia de las HSNs, DAF-16 actúa de manera autónoma para controlar el normal desarrollo de las AIYs⁶⁹. Las AIYs son uno de los cuatro pares de interneuronas (AIAs, AIBs, AIYs y AIZs) que reciben y procesan la salida sináptica de las neuronas sensoriales anfídicas. Son postsinápticas a varias neuronas sensoriales olfativas y gustativas, como ASE, ASI, AWA, AWC y AFD, y se presume que desempeñan un papel integrador, procesando múltiples corrientes de información sensorial, fundamentalmente de estímulos térmicos y químicos^{58,189}. Tienen un papel clave en la plasticidad conductual en paradigmas en los que el hambre se combina con una señal térmica o química^{190,191}. Las mismas se encuentran en la región anterior del animal. El proceso de cada neurona AIY ingresa al anillo nervioso desde el lado ventral. Después de correr dorsalmente dentro del anillo nervioso, se encuentra con su pareja contralateral en la línea media dorsal y establece una unión de

hendidura con ella^{58,192} (Fig. 9). A partir del efecto de la pérdida de función de *daf-16* y *daf-18* sobre el desarrollo específico de las HSNs y AIYs, resulta evidente el rol que dichos genes poseen durante el neurodesarrollo de *C. elegans*. Es probable que el estudio de estas mutaciones revele

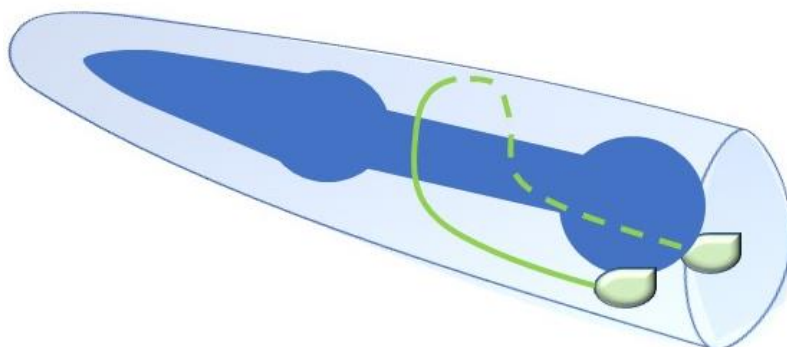


Figura 9. Neuronas AIYs en *C. elegans*. Esquema representativo de la región anterior de *C. elegans* mostrando la ubicación del par de neuronas AIYs. El crecimiento de sus neuritas comienza poco después de la aparición de los somas, con los conos de crecimiento extendiéndose desde el lado anterior de las células y alcanzando la línea media dorsal tras recorrer el anillo nervioso ubicado en el istmo.

en el futuro aún más neuronas afectadas.

El equilibrio entre los sistemas excitatorios e inhibitorios es clave para el correcto funcionamiento del SN

Los desórdenes del TEA son muy complejos y diversos en cuanto a su etiología y manifestaciones clínicas. Sin embargo, desde hace unos años, varias hipótesis han postulado que muchas formas de TEA pueden estar caracterizadas por un desequilibrio entre los sistemas Excitatorios e Inhibitorios (E/I) en el SN^{193,194}. En línea con esas hipótesis, múltiples líneas de evidencia reportaron deficiencias en el sistema GABAérgico tanto en pacientes con antecedentes genéticos vinculados al TEA como en modelos murinos inducidos farmacológicamente¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. En muchos casos se propuso que una disminución en la actividad inhibitoria mediada por GABA podría llevar a un aumento de la excitación neuronal en ciertas áreas cerebrales¹⁹⁸. Este fenómeno se ha asociado con características compatibles con TEA, como la hiperactividad, la hipersensibilidad sensorial y los patrones de comportamiento repetitivos¹⁹⁹. Además, se ha observado que los niveles de glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio, pueden estar desregulados en el cerebro de individuos con TEA. Esto puede contribuir a una mayor excitación neuronal y una menor capacidad para modular y regular la información sensorial²⁰⁰. Tras toda esta evidencia, el modelo de desequilibrio E/I se ha postulado también como posible mecanismo subyacente a varios DND^{193,201}. Si bien se han realizado estudios que demuestran un déficit E/I en roedores, el estudio de la transmisión sináptica en mamíferos resulta extremadamente complejo y requiere equipos sofisticados y costosos²⁰². Además, poco se sabe acerca del rol de

la proteína PTEN en este equilibrio. Otros modelos con SN más simples, como *C. elegans*, representan una plataforma ideal para realizar una primera aproximación que permita identificar vías moleculares asociadas a este proceso. Al estar dichos genes altamente conservados, muchos de los mecanismos fundamentales de la transmisión sináptica fueron descubiertos en *C. elegans*²⁰³.

La transmisión sináptica y el SN en *C. elegans* pueden ser estudiados mediante una amplia gama de técnicas

En las sinapsis químicas, la exocitosis de un neurotransmisor desde la neurona presináptica resulta en la activación de receptores postsinápticos y, finalmente, en la excitación o inhibición de la célula postsináptica²⁰⁴. Como se mencionó anteriormente, *C. elegans* presenta, a nivel de la unión neuromuscular, tanto señalización colinérgica excitatoria como GABAérgica inhibitoria (Fig. 10). Durante la locomoción, los distintos segmentos del cuerpo se contraen de manera alternada en sentido ventral o dorsal, permitiendo el característico movimiento sinusoidal del

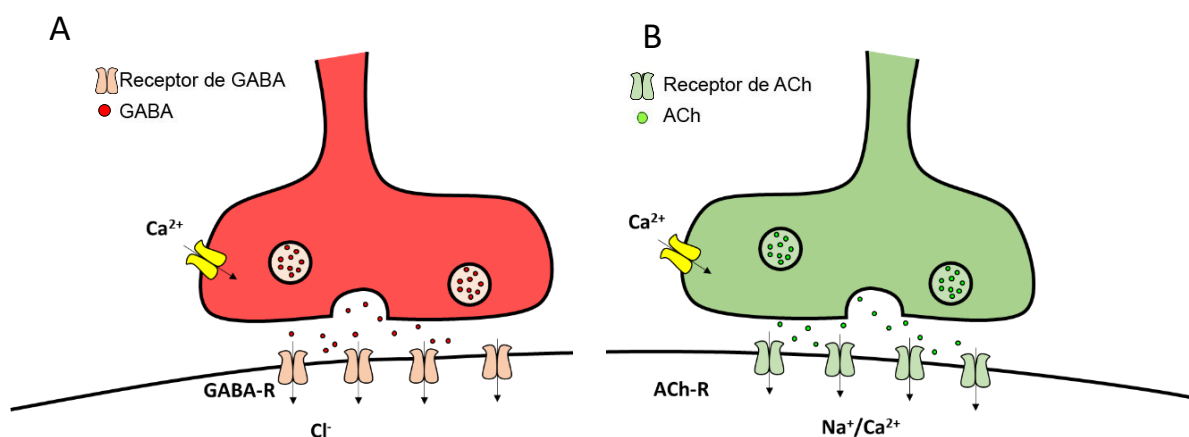


Figura 10. *C. elegans* presenta tanto sinapsis GABAérgicas como colinérgicas en la unión neuromuscular. Esquemas representativos de las sinapsis neuromusculares GABAérgicas inhibitorias (A) y colinérgicas excitatorias (B) con sus respectivos receptores. Ambos sistemas están presentes tanto a nivel dorsal como ventral, modulando las contracciones alternadas que definen el movimiento característico de *C. elegans*.

animal. Esto sucede, como ya vimos previamente, ya que dentro de cada segmento la señalización colinérgica contrae una de las paredes, y activa a las neuronas GABAérgicas que relajan la pared opuesta. De esta manera, muchas de las mutaciones que impactan en la transmisión sináptica a menudo provocan un fenotipo de locomoción. La presencia de ambos tipos de señalización en la unión neuromuscular, convierte a este animal en un potente modelo para estudiar la transmisión sináptica y el balance entre sistemas excitatorios e inhibitorios²⁰⁵. Al igual que los mamíferos, *C. elegans* utiliza ACh para controlar la contracción muscular. La ACh liberada por las neuronas motoras colinérgicas en la hendidura sináptica activa receptores ionotrópicos en la postsinapsis, lo que provoca la entrada de calcio en el músculo, y por lo tanto, la contracción (Fig. 11 A). Existen fármacos que permiten modular esta actividad, y pueden ser

utilizados para el estudio de la transmisión sináptica y la funcionalidad de los sistemas excitatorios e inhibitorios. En este contexto, aldicarb y levamisol han sido los compuestos más usados en nematodos. El aldicarb, un compuesto químico perteneciente a la familia de los carbamatos, inhibe la enzima acetilcolinesterasa, que normalmente se encarga de descomponer la ACh en la hendidura sináptica. Al bloquear esta enzima, se produce una acumulación del neurotransmisor en la hendidura sináptica y una sobreestimulación continua de los receptores, llevando a la parálisis muscular (Fig. 11 B)^{206,207}. El levamisol, por otro lado, es un agonista de receptores colinérgicos, produciendo también hipercontracción y parálisis muscular (Fig. 11 C)^{208,209}. Con ambas drogas, 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) son resistentes, mientras que si tardan menos en paralizarse, son hipersensibles. Resulta importante notar que no todos los animales

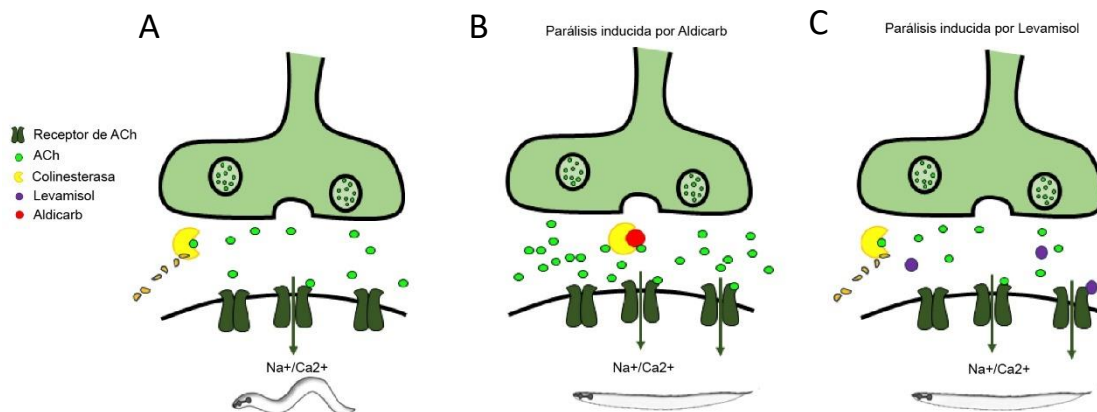


Figura 11. El aldicarb y levamisol son potentes moduladores de la actividad colinérgica. Figura ilustrativa de la sinapsis colinérgica bajo diferentes condiciones. **A.** Sinapsis colinérgica normal, donde la ACh liberada por las neuronas motoras activa receptores colinérgicos ionotrópicos en la postsinapsis. **B.** El aldicarb inhibe la acetilcolinesterasa, causando una acumulación de ACh en la hendidura sináptica y una sobreestimulación continua de los receptores, causando parálisis muscular. **C.** El levamisol, un agonista de los receptores colinérgicos, también induce hipercontracción y parálisis muscular por la sobreestimulación de los receptores.

responderán de igual manera ante la exposición a estos fármacos. Por ejemplo, si una cepa mutante presenta deficiencias en la síntesis, carga vesicular o liberación de ACh (problemas a nivel presináptico), liberará menor cantidad de ACh hacia la hendidura sináptica, y por lo tanto resultará susceptible al levamisol (ya que actúa sobre los receptores postsinápticos) pero resistente al aldicarb. Existen circunstancias en las que el aldicarb incluso mejora el movimiento de cepas con deficiencias presinápticas, ya que aumenta la concentración de ACh en la proximidad de los receptores. Por otro lado, mutantes con una liberación elevada de neurotransmisores, o bien con deficiencias en la señalización GABAérgica inhibitoria, resultan hipersensibles a ambos compuestos. Con respecto a animales con déficit a nivel postsináptico, serán resistentes a ambos compuestos. Al combinar los datos obtenidos en los ensayos de

aldicarb y levamisol, se puede estimar el origen del problema de la señalización. Si un mutante es resistente al aldicarb, pero no al levamisol, es probable que la proteína afectada esté involucrada en el funcionamiento de la presinapsis. Por el contrario, si una cepa muestra resistencia a ambos fármacos, es probable que el defecto se deba a alteraciones en la postsinapsis. Si un animal resulta hipersensible a ambos compuestos, es muy probable que tenga afectada la señalización que antagoniza este efecto, es decir, la GABAérgica inhibitoria. En conjunto, estos ensayos farmacológicos permiten realizar una evaluación preliminar de la transmisión sináptica y obtener evidencias indirectas acerca del estado general de los sistemas excitatorios e inhibitorios^{205,207,210-212}. Esto es especialmente útil para realizar *screenings* rápidos para identificar aquellas mutaciones que tengan un posible impacto en el equilibrio E/I.

C. elegans es un modelo animal en el que es posible realizar un flujo de trabajo para un análisis integral del SN. La optogenética, por ejemplo, es una técnica que utiliza la luz para controlar la actividad de células específicas mediante la expresión de proteínas fotosensibles, lo que facilita la observación de los efectos inmediatos a la activación o inhibición de neuronas específicas. Mediante el empleo de esta técnica, es posible investigar circuitos neuronales y la relación entre la actividad neuronal y el comportamiento *in vivo*²¹³⁻²¹⁵. Si bien la electrofisiología es la técnica de rutina utilizada para evaluar la funcionalidad neuronal en la mayoría de los animales, la electrofisiología en *C. elegans* presenta desafíos técnicos, por lo cual existen pocos laboratorios a nivel mundial capaces de realizar esta técnica. Además, debido a la necesidad de inmovilizar y disecar a los gusanos durante los registros electrofisiológicos, dificulta la correlación la actividad sináptica con respuestas conductuales. Por este motivo, en los casos donde la correlación de la actividad sináptica con el comportamiento es crucial, suelen preferirse métodos como la optogenética.

Adicionalmente al estudio de la funcionalidad, es posible analizar la morfología del SN utilizando reporteros fluorescentes bajo promotores específicos y técnicas de microscopía. Esto permite correlacionar cambios funcionales con alteraciones estructurales en las sinapsis y otros componentes neuronales⁴⁴.

Objetivos

El desequilibrio entre los sistemas excitatorios/inhibitorios ha sido propuesto como uno de los denominadores comunes en varios DND, entre los que se destaca el TEA. A su vez, muchos casos de estos trastornos están a menudo fuertemente vinculados a mutaciones en ciertos genes, como es el caso de *PTEN*. Sin embargo, no está del todo claro cómo las mutaciones en este gen originan defectos en el neurodesarrollo, ni si están implicadas en un desequilibrio E/I. Teniendo en cuenta esto, nos planteamos como objetivos el estudio de los efectos de la mutación de *daf-18* (homólogo del gen *PTEN*) en el neurodesarrollo de *C. elegans*; así como también en mutantes para otros genes homólogos que cumplen un rol clave en la vía de señalización AGE-1/AKT, donde DAF-18 juega un rol crítico. Se realizaron ensayos farmacológicos, funcionales y morfológicos para diagnosticar el funcionamiento de estos sistemas como primer estudio diagnóstico de los efectos de esta mutación. La detección de fenotipos alterados en cepas mutantes de *C. elegans* ha demostrado ser útil como punto de partida para el estudio en mayor profundidad de los mecanismos moleculares subyacentes a enfermedades o trastornos ocasionados por mutaciones genéticas; así como también para la búsqueda de potenciales tratamientos terapéuticos.

Objetivos específicos

- Evaluar si existe una desregulación entre los sistemas excitatorios e inhibitorios en mutantes de *daf-18*. Para ello, nos planteamos:
 - Evaluar la sensibilidad frente a fármacos estimuladores de la señalización colinérgica: aldicarb y levamisol
 - Determinar el desempeño comportamental en ensayos en los que el equilibrio E/I juega un papel fundamental
- Identificar fenotipos comportamentales alterados que pongan de manifiesto la desregulación de algún proceso fisiológico/morfológico en mutantes *daf-18*
- Estudiar mediante ensayos las vías de señalización implicadas en los procesos afectados y potenciales relaciones epistáticas.

Resultados

La alteración de la vía AGE-1/AKT por mutaciones en daf-18 genera fenotipos compatibles con un desequilibrio E/I

Para determinar el rol de *daf-18/PTEN* sobre el equilibrio E/I, analizamos la sensibilidad de mutantes *daf-18* al inhibidor de la acetilcolinesterasa aldicarb y al agonista colinérgico levamisol. En todos los casos, los ensayos se realizaron en placas NGM que contenían 2 mM de aldicarb o 0.5 mM de levamisol. Se utilizaron para ello dos alelos diferentes: *daf-18(e1375)*, cuya secuenciación demostró que posee una inserción de 30 pb en el exón IV (río abajo del sitio catalítico de actividad fosfatasa), la cual conduce a un truncamiento prematuro de la proteína; y *daf-18(ok480)*, el cual posee una delección de 956 pb que remueve la mayor parte del exón 4 y todo el exón 5 (Fig. 12). Mientras que el alelo *e1375* ha demostrado tener actividad reducida de DAF-18 y se considera que representa una reducción de función, el alelo *ok480* carece completamente de actividad y es considerado una mutante nula^{185,187,216-219}. A modo de control, se utilizó para estos ensayos la cepa *unc-25(e156)*, mutante nula para el gen que codifica la

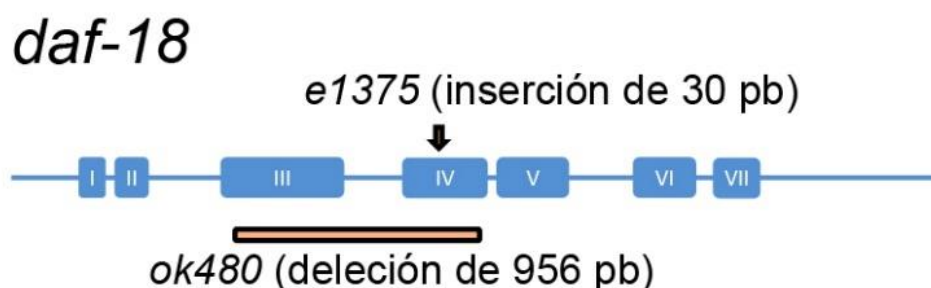


Figura 12. Mutaciones en *daf-18* utilizadas. Se ilustran dos mutaciones específicas en el gen: el alelo *e1375*, la cual se considera que produce una pérdida parcial de función; y el alelo *ok480*, considerado una mutante nula. Las mutaciones están indicadas en el mapa de exones, resaltando las regiones afectadas en cada una.

enzima ácido glutámico descarboxilasa, clave para la generación de GABA a partir de glutamato (Fig. 13). En estos animales, la señalización GABAérgica se encuentra completamente afectada. Fenotípicamente, son descoordinados en cuanto a su movimiento (con ondas corporales cortas y de movimiento ineficiente); no obstante, son capaces de crecer y desarrollarse normalmente²²⁰. Al tener afectada la señalización inhibitoria, poseen un desequilibrio comprobado en el sistema de señalización E/I, motivo por el cual resultan hipersensibles a los efectos del aldicarb y levamisol²²¹. En concordancia con lo reportado, los animales *unc-25* resultaron más sensibles a estos fármacos en los ensayos de parálisis (Fig. 14). Sin llegar a los niveles de hipersensibilidad de *unc-25*, se observó que tanto *daf-18(e1375)* como *daf-18(ok480)*

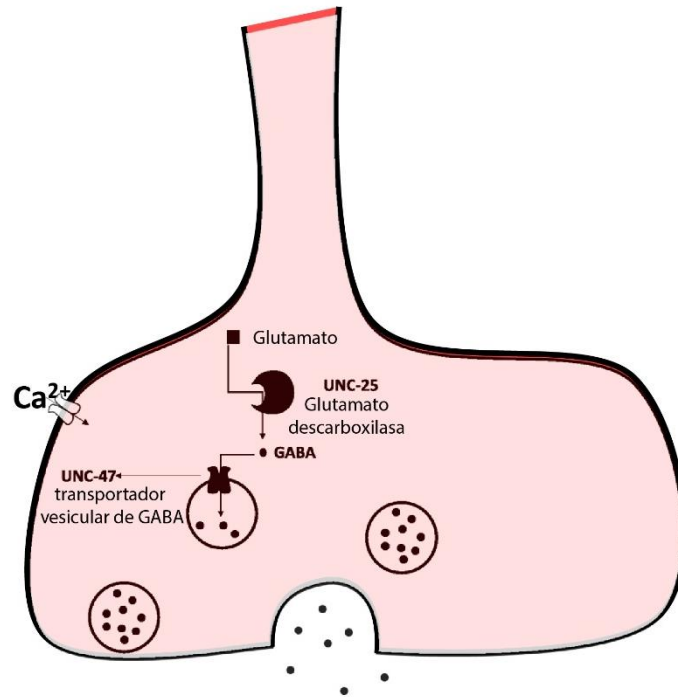


Figura 13. Genes implicados en la síntesis y carga vesicular de GABA en *C. elegans*. La mutación en genes claves como *unc-25* (clave para la síntesis de GABA) o *unc-47* (necesario para su carga vesicular) resultan en fenotipos severamente descoordinados.

también presentaron mayor sensibilidad a estas drogas comparados con animales *wild type* (Fig. 14). La mayor sensibilidad a estos fármacos colinérgicos sugiere una relación E/I aumentada²²¹⁻²²³. Como fue mencionado previamente, DAF-18 participa activamente de la vía AGE-1/AKT,

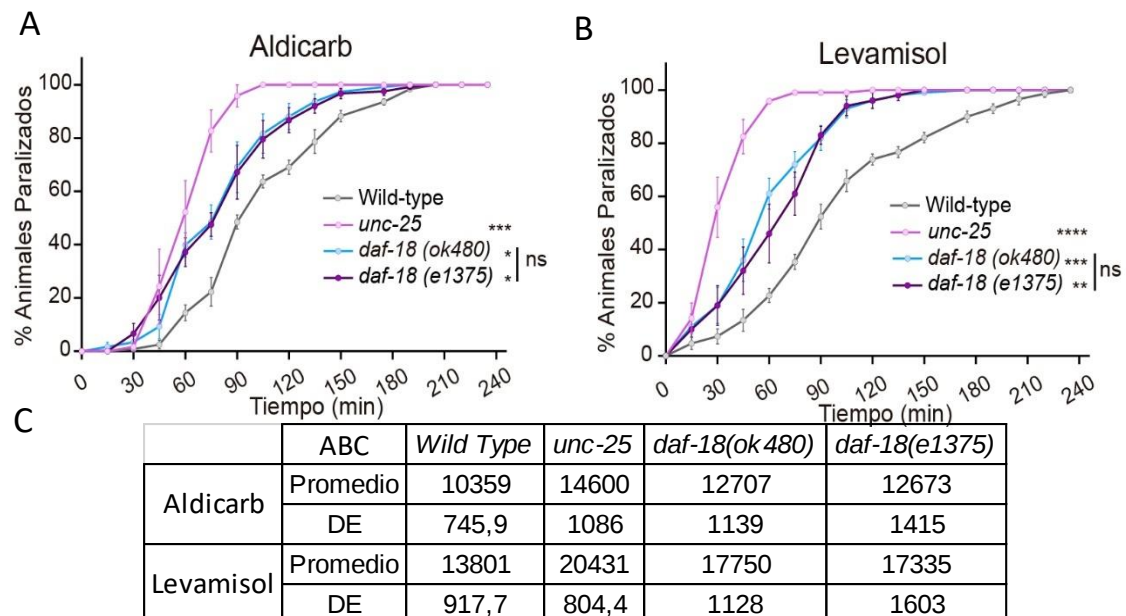


Figura 14: Mutantes *daf-18* presentan un fenotipo hipersensible a los fármacos aldicarb y levamisol. Los gráficos representan el porcentaje de animales paralizados en función del tiempo tras el contacto inicial con aldicarb 2mM (A) y levamisol 0,5 mM (B). Al menos cuatro experimentos independientes fueron realizados para cada condición, con un total de 25 a 30 animales por cada una. El análisis estadístico fue ANOVA para evaluar las diferencias utilizando el área bajo la curva (ABC) (C) de cada ensayo; seguido de la prueba de Turkey como análisis *post hoc*.

siendo el principal modulador negativo de la misma. Se ha demostrado ampliamente que una reducción en la actividad de DAF-18 exacerba esta vía, lo que incrementa el nivel de fosforilación e impide la translocación nuclear de DAF-16^{224,225} (Fig. 7). Para evaluar el efecto río abajo de las mutaciones en *daf-18*, evaluamos nuevamente el efecto de aldicarb y levamisol en la cepa *daf-16(mgDf50)*, la cual presenta una delección de 20193 pb y una pequeña inserción de 13 pb, resultando en una mutante nula con pérdida total de función²²⁵. Al igual que los mutantes *daf-18*, los mutantes nulos de *daf-16* resultaron hipersensibles a las drogas colinérgicas en nuestros ensayos farmacológicos (Fig. 15). Para evaluar si la hipersensibilidad de *daf-18* depende enteramente de *daf-16*, realizamos la doble cruza *daf-18(ok480);daf-16(mgDf50)*. No observamos diferencias significativas en la sensibilidad al aldicarb y al levamisol entre los mutantes dobles y los respectivos mutantes en cada gen, lo que sugiere que ambos genes afectan la señalización neuromuscular al actuar en la misma vía (Fig. 15). Además de *daf-16* y *daf-18*, evaluamos la sensibilidad a los efectos paralizantes de aldicarb y levamisol en mutantes

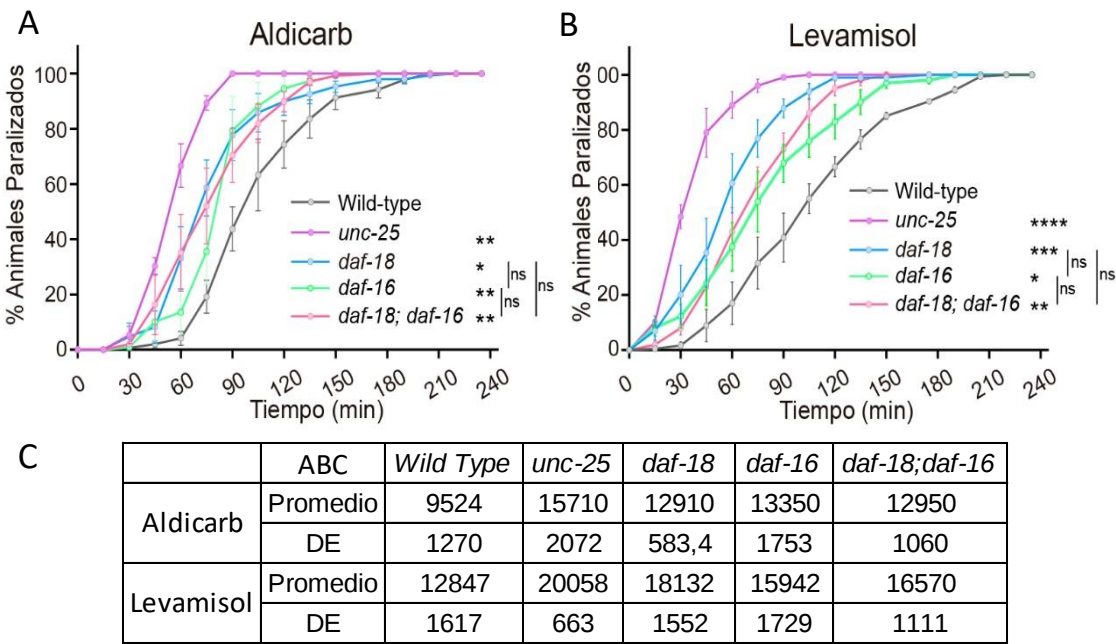
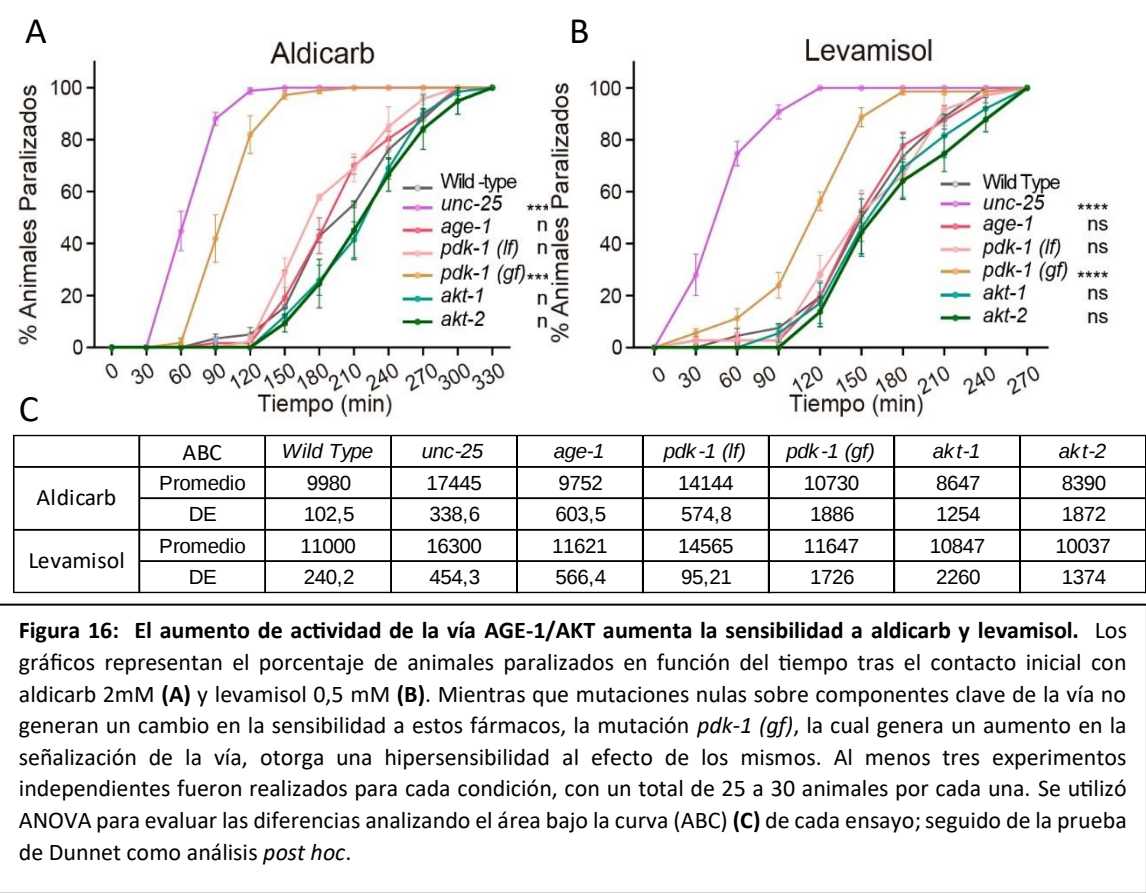


Figura 15: *daf-18* y *daf-16* afectan la señalización neuromuscular al actuar en la misma vía. Los gráficos representan el porcentaje de animales paralizados en función del tiempo tras el contacto inicial con aldicarb 2mM (A) y levamisol 0,5 mM (B). Al menos cuatro experimentos independientes fueron realizados para cada condición, con un total de 25 a 30 animales por cada una. Se utilizó ANOVA para evaluar las diferencias analizando el área bajo la curva (ABC) (C) de cada ensayo; seguido de la prueba de Turkey como análisis *post hoc*.

nulos de otros genes de la vía ILPs/AGE-1/AKT, como *age-1*, *pdk-1*, *akt-1* y *akt-2* (Fig. 16). Sin embargo, no observamos fenotipos hipersensibles ni resistentes en ninguna de estas cepas. Las mutaciones en estos genes presuntamente disminuyen la actividad de la vía en general, mientras que mutaciones en *daf-18* y *daf-16* aumentan la actividad de la misma. Como prueba de concepto, decidimos evaluar una mutación que produce una ganancia de función en el gen

pdk-1(mg142) la cual aumenta la actividad de la vía en general^{226,227}. En estos ensayos, observamos una hipersensibilidad a los fármacos similar a la de los mutantes *daf-16* y *daf-18*. Dado que se ha vinculado el aumento de la actividad de PDK-1 a la hiperfosforilación e inactivación de DAF-16 (Fig. 7), estos resultados respaldan la hipótesis de que la baja actividad de DAF-16 conduce al fenotipo hipersensible, independientemente el lugar donde la vía se encuentre afectada. No obstante, esta vía es más compleja e involucra varias quinasas que



modulan un *cross-talk* con la vía de TOR, ampliamente vinculada con el neurodesarrollo^{37,228,229}. En este punto, nos resultó atendible el estudio de genes que participan en la vía de TOR para dilucidar su posible contribución en este fenotipo.

La vía de TOR no influye en los fenotipos farmacológicos de *daf-18* y *daf-16* en *C. elegans*

La vía de mTOR está involucrada en el crecimiento y la síntesis de proteínas, y es necesaria para la proliferación celular¹⁵³. Como vimos previamente, esta vía juega un rol clave en el desarrollo, existiendo varios estudios en vertebrados que demostraron que alteraciones en la actividad de PTEN impactan sobre el desarrollo y la función neuronal al afectar la misma. Por este motivo, realizamos un *screening* exploratorio en los principales genes de los complejos de TOR de *C. elegans* (TORC) para evaluar si mutaciones en los mismos pueden llevar a cambios significativos en la sensibilidad a aldicarb y levamisol. Llamativamente, los resultados obtenidos indican que

ni los animales con pérdida del componente esencial TORC1 *raga-1/RagA* ni los animales con pérdida de función en el componente esencial TORC2 *rict-1/Rictor* mostraron alteraciones significativas en la sensibilidad a los fármacos colinérgicos en comparación con animales *wild type* (Fig. 17). Esto sugiere que la vía de TOR no está involucrada en los mecanismos moleculares que llevan a los fenotipos farmacológicos aquí observados para *daf-18* y *daf-16*.

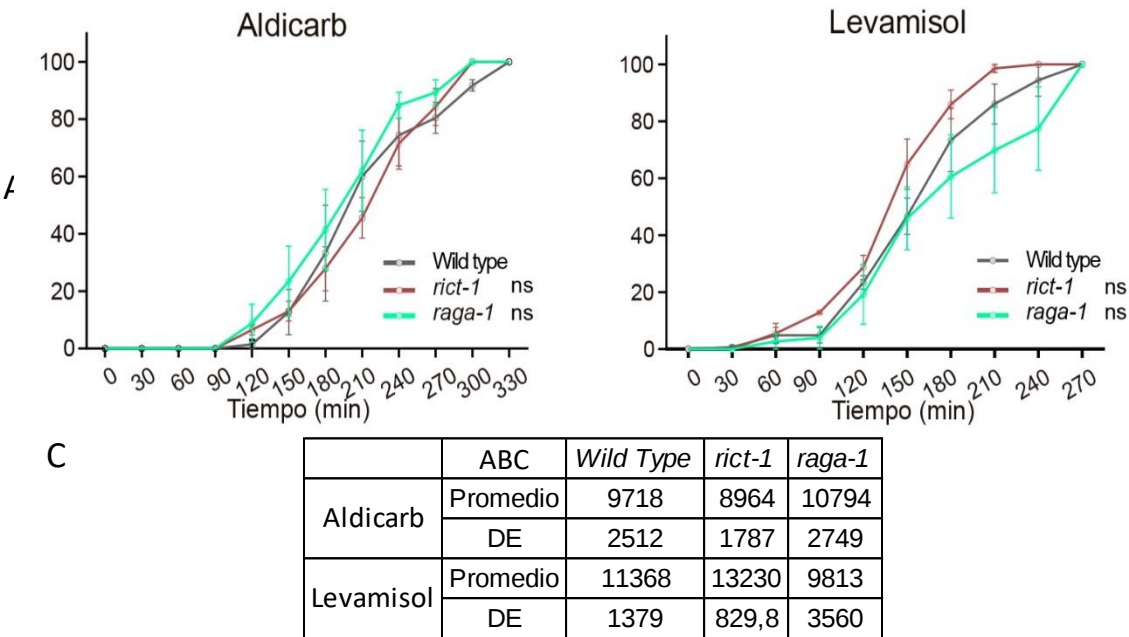


Figura 17: La hipersensibilidad a aldicarb y levamisol en mutantes de la vía AGE-1/AKT es independiente de la vía de TOR. Los gráficos representan el porcentaje de animales paralizados en función del tiempo tras el contacto inicial con aldicarb 2mM (A) y levamisol 0,5 mM (B). No se observan diferencias significativas en la sensibilidad a las drogas en animales con mutaciones en genes clave de la vía de TOR. Al menos tres experimentos independientes fueron realizados para cada condición, con un total de 25 a 30 animales por cada una. Se utilizó ANOVA para evaluar las diferencias analizando el área bajo la curva (ABC) (C) de cada ensayo; seguido de la prueba de Dunnet como análisis *post hoc*.

Estos ensayos farmacológicos, a pesar de no representar evidencia directa, nos dan indicios de un posible desequilibrio E/I en los mutantes *daf-18* y *daf-16*. Este tipo de desbalances a menudo están vinculados con otros fenotipos evidentes, como es el caso de *unc-25*. A diferencia de estos últimos, no observamos defectos notorios en la locomoción de los mutantes *daf-18* ni *daf-16*. Sin embargo, de igual manera que detectamos estas diferencias discretas, es razonable que existan otros fenotipos sutiles, los cuales podrían pasar desapercibidos bajo simple observación. Esto nos motivó a evaluar otros aspectos específicos de la locomoción en la que un desequilibrio E/I puede generar un impacto, como ya ha sido demostrado previamente.

Mutantes *daf-18* exhiben fenotipos característicos de deficiencias en la señalización GABAérgica ante estímulos mecanosensoriales

El estímulo físico en la región anterior del cuerpo provoca en *C. elegans* una típica reacción de huida, la cual resulta vital para poder escapar de predadores. Este comportamiento puede poner de manifiesto fenotipos que en otras circunstancias podrían no ser advertidos. Esta respuesta puede ser fácilmente inducida en el laboratorio mediante un toque suave en la región anterior con un pelo o cualquier elemento sutil en la región anterior, y comienza con una contracción bilateral de los músculos de la pared corporal que inicia una locomoción en reversa. Durante este fenómeno, es imprescindible que exista una fina coordinación entre los músculos que se

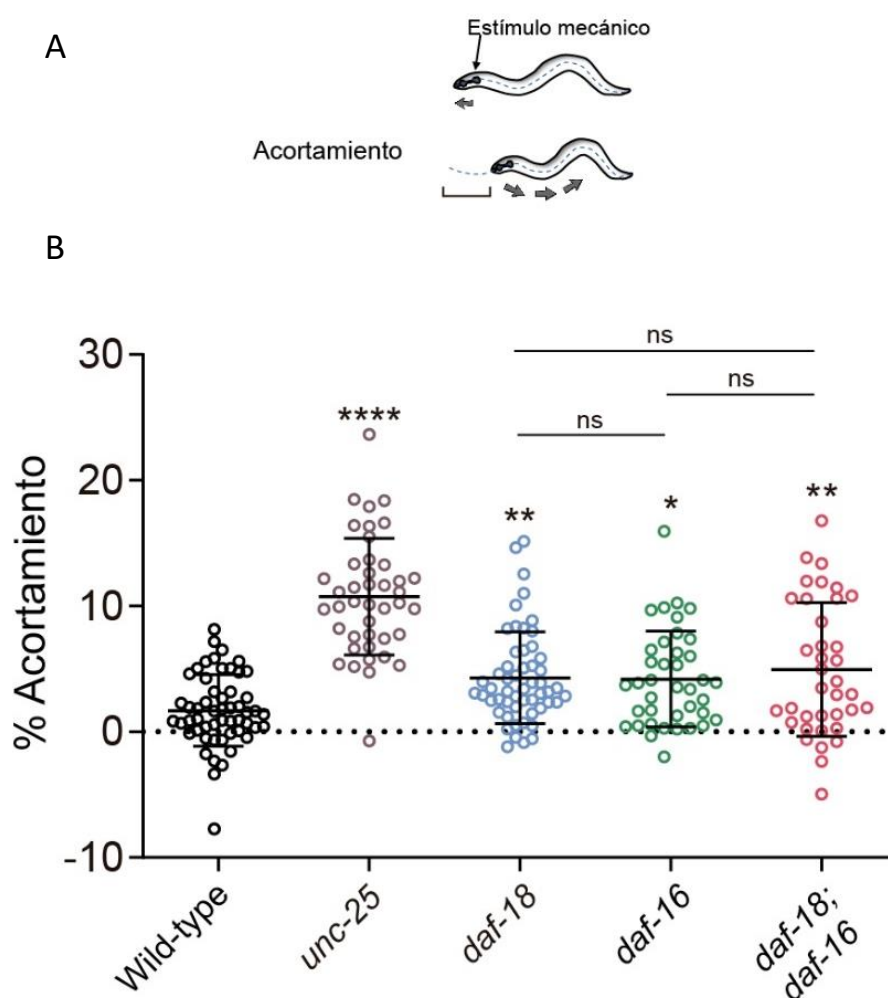


Figura 18: Animales *daf-18* y *daf-16* exhiben un acortamiento excesivo tras el estímulo mecánico. A. La primera fase de la respuesta de escape puede ser artificialmente inducida en el laboratorio mediante el estímulo mecánico en la región anterior del animal. En animales con deficiencias en la señalización GABAérgica, como *unc-25*, se observa un acortamiento característico (fenotipo *shrinker*). B. Se ilustran los resultados del acortamiento del cuerpo tras la estimulación mecánica en la región anterior. Animales *daf-18* y *daf-16*, al igual que los doble mutantes, exhiben un acortamiento similar y sutilmente superior al *wild type*, lo cual sugiere que ambos genes actúan en la misma vía afectando la señalización neuromuscular. Se contabilizó la respuesta de un total de 50 a 70 animales por genotipo, distribuidos en cuatro experimentos independientes. Los datos se presentan como media $\pm$ DE. Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba *post hoc* de Dunn para comparaciones múltiples.

contraen y los que se relajan para que la actividad muscular resulte en ondas corporales pronunciadas, dando lugar a un desplazamiento efectivo (Fig. 5). Sin embargo, en ausencia de señalización GABAérgica eficiente, como es el caso de las mutantes en *unc-25*, la mayor parte de los músculos se contraen, produciendo el acortamiento del largo del cuerpo (fenotipo *shrinker*²³⁰, Fig. 18 A). Para evaluar si en las mutantes *daf-18* y *daf-16* se produce un acortamiento similar al observado en animales deficitarios en la señal GABAérgica, decidimos evaluar este comportamiento. Para ello, estimulamos a los animales de forma mecánica en la región anterior, utilizando un pelo para garantizar que el toque sea suave y no produzca un daño o una reacción exagerada. Este comportamiento fue grabado y posteriormente analizado con el software FIJI Image J. Observamos que, luego de la estimulación mecánica en mutantes *daf-18*, se produce una sutil reducción del largo del cuerpo en estos animales ($4,3 \pm 3,7\%$). Esta reducción no es tan evidente como el fenotipo *shrinker* de *unc-25* ($10,8 \pm 4,6\%$), pero resultó ser estadísticamente significativa al compararla con los resultados obtenidos en animales *wild type*, los cuales se acortan en promedio un $1,7 \pm 2,9\%$ (Fig. 18 B). Notoriamente, tanto *daf-16* como la doble mutante *daf-18;daf-16* mostraron un acortamiento similar a *daf-18*, mostrando nuevamente que no hay diferencias significativas entre los mutantes dobles *daf-18;daf-16* y los mutantes simples (Fig. 18 B). Estos resultados respaldan aún más la idea de que ambos genes actúan en la misma vía afectando la señalización neuromuscular. El escape hacia atrás ante un estímulo mecánico, sin embargo, es solamente el primer paso de un comportamiento más complejo que también decidimos estudiar, ya que involucra movimientos adicionales en los cuales el correcto equilibrio entre los sistemas E/I resulta crítico.

Mutantes daf-18 y daf-16 exhiben una respuesta de escape deficiente ante estímulos mecanosensoriales

En la naturaleza, es muy común que la presencia de depredadores, sustancias tóxicas, temperaturas nocivas o cualquier otra amenaza, dispare un comportamiento característico en *C. elegans*: la respuesta de escape⁶³. Durante la locomoción normal, el animal se desplaza hacia adelante, pudiendo detectar mediante sus órganos sensoriales diversas amenazas. Como vimos en el ensayo anterior, la primera fase de la respuesta de escape consiste, por lo tanto, en el desplazamiento en reversa para escapar lo antes posible de dicho estímulo. Sin embargo, luego de un breve lapso, el animal realiza un giro agudo para reorientar su cuerpo en dirección opuesta a la potencial amenaza, retomando la locomoción segura hacia adelante. Durante este giro, denominado “giro en omega” (por la característica forma del cuerpo durante la ejecución), el cuerpo del animal se arquea tanto que la cabeza llega a tomar contacto con la cola (Fig. 19, video 1, <https://youtu.be/wH1mBq6svoo>). Por medio de esta maniobra, el ángulo de escape logrado

por la mayoría de los animales se acerca a los 180° , es decir, se movilizan hacia una dirección opuesta a la del origen de la amenaza. El programa motor que determina la respuesta de escape que *C. elegans* utiliza para evadir amenazas en su medio natural involucra la interacción entre

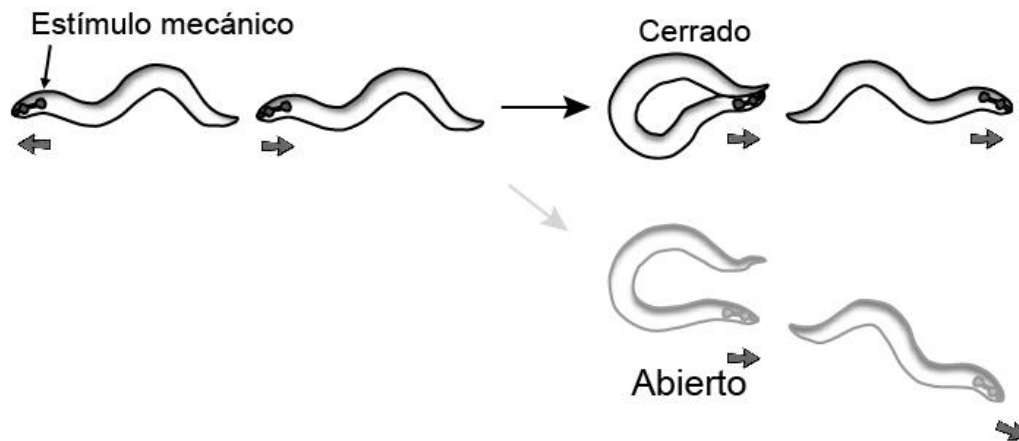


Figura 19: Esquema de la respuesta de escape de *C. elegans* tras un estímulo mecánico. El esquema ilustra la correcta ejecución de un giro en omega (arriba a la derecha, giro en omega "cerrado") con un ángulo de escape cercano a los 180° , y una ejecución deficiente (abajo a la derecha, giro en omega "abierto") con un ángulo de escape menor.

neuronas comando, interneuronas, motoneuronas y células musculares de una manera finamente sincronizada. Este comportamiento característico ha sido utilizado como plataforma de estudio para la comprensión de la conectividad y funcionalidad sináptica en estos animales. En estos estudios, se determinó que la fase inicial es comenzada por la liberación del neurotransmisor tiramina (homólogo de la noradrenalina en mamíferos) liberada por las neuronas RIM y RIC. La tiramina coordina temporalmente las diferentes fases de la respuesta de escape a través de la activación sináptica del receptor ionotrópico de acción rápida, LGC-55, y la activación extra sináptica del receptor metabotrópico de acción lenta, SER-2. Este último, a su vez, conduce a la ejecución, unos segundos después, del giro en omega. Las neuronas que poseen estos receptores metabotrópicos son aquellas que hacen contacto con los músculos ventrales del animal. La contracción de los músculos ventrales es desencadenada por las neuronas motoras colinérgicas (neuronas VA y VB) que hacen sinapsis en los músculos ventrales, las cuales también estimulan a neuronas GABAérgicas (DD) que inducen la relajación de los músculos dorsales¹⁴¹. En conjunto, estas características convierten a *C. elegans* en una plataforma potente para el análisis de la señalización neuromuscular: si la contracción ventral o la relajación dorsal de las paredes del cuerpo no son suficientes, el giro en omega puede verse comprometido, resultando en un giro incompleto en el que la cabeza no toma contacto con la cola. Esto resulta en un ángulo de escape menor, lo cual es probable que disminuya las probabilidades reales de los animales para un escape eficiente (Fig. 19, video 2,

<https://youtu.be/ibz3GsJeELs>). El protagonismo de las motoneuronas en este giro puede evidenciarse, por ejemplo, mediante la ablación de las motoneuronas GABAérgicas dorsales: estos animales no relajan de forma adecuada la región dorsal, lo cual disminuye notoriamente el ángulo del giro en omega¹⁴¹.

Esta respuesta de escape puede ser inducida artificialmente en el laboratorio mediante la estimulación mecánica en la región anterior, exactamente de la misma manera que realizamos el ensayo anterior. Decidimos entonces utilizar este comportamiento como plataforma para la evaluación funcional del sistema neuromuscular, realizando una clasificación cualitativa de este comportamiento. Consideramos las siguientes situaciones:

- Si la cabeza toma contacto con la región de la cola, el giro es efectivo y el ángulo cercano a los 180° (giro en omega “completo” o “cerrado”).
- Si la cabeza no toma contacto con la cola, el giro es insuficiente y el ángulo de escape es menor a 180° (giro en omega “incompleto” o “abierto”).

Aprovechando esta técnica sencilla que permite evaluar la funcionalidad de la señalización neuromuscular, evaluamos la eficacia del giro en omega en mutantes *daf-18* y *daf-16*. De forma

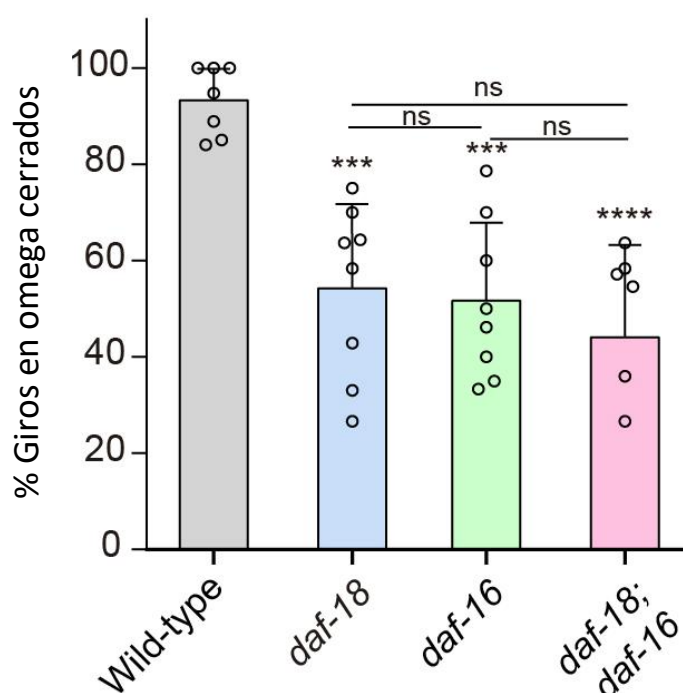


Figura 20: Mutantes *daf-18* y *daf-16* exhiben una reducción significativa en el porcentaje de giros en omega cerrados. Cuantificación de la proporción giros en omega cerrados tras estimulación mecánica en la región anterior. La pérdida de *daf-18*, al igual que la pérdida de *daf-16*, resulta en una disminución significativa en el número de veces que se ejecuta el giro en omega cerrado. La doble mutante *daf-18; daf-16* parece estar igualmente afectada, evidenciando el rol de DAF-16 en este fenotipo. Se realizaron al menos seis ensayos independientes para cada condición, con 20 a 25 animales por genotipo en cada ensayo. Los datos se representan como media $\pm$ DE. Se realizó un ANOVA de una vía, y la prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples.

similar a resultados ya reportados¹⁴¹, encontramos que el $93,2 \pm 7,2\%$ de los animales *wild type* realizaron giros en omega cerrados ante la estimulación en la región anterior (Fig. 20). Cuando realizamos este ensayo con mutantes *daf-18*, observamos que solamente el $54,2 \pm 17,8\%$ exhibe el contacto típico de cabeza-cola durante el giro en omega (Fig. 20). De manera similar a *daf-18*, los mutantes *daf-16* y la doble mutante *daf-18;daf-16* mostraron una disminución en la proporción de giros en omega cerrados ($51,6 \pm 16,5\%$ y $44,4 \pm 19,4\%$ respectivamente), mostrando una vez más que la inactivación DAF-16 podría ser la principal responsable de los defectos observados ante la pérdida de función de *daf-18*. Tanto estos resultados, así como también el acortamiento longitudinal del cuerpo ante el estímulo físico, van en el mismo sentido que los obtenidos en los ensayos de farmacología, y respaldan un posible desequilibrio en los sistemas E/I. Resulta evidente el rol crucial que cumplen tanto el sistema GABAérgico inhibitorio como el colinérgico excitatorio dentro de la respuesta de escape; y específicamente durante el giro en omega. No obstante, como explicamos anteriormente, se trata de un comportamiento complejo que involucra músculos, grupos diferenciados de neuronas, y otros procesos fisiológicos; por lo que resulta indispensable identificar de forma precisa si alguno de estos sistemas se encuentra particularmente afectado. En este sentido, las técnicas de electrofisiología han sido históricamente las herramientas más elegidas para este tipo de estudios. Sin embargo, como se mencionó previamente, esta técnica, además de compleja, involucra la disección del animal, por lo que no es posible evaluar comportamientos o movimientos. Por otro lado, la estimulación por optogenética en *C. elegans* ha sido validada y ampliamente utilizada en este modelo para caracterizar el funcionamiento neuronal en varios estudios²³¹⁻²³⁵. Decidimos, entonces, utilizar esta técnica para estudiar el funcionamiento neuromuscular de una forma más específica.

La estimulación optogenética selectiva en mutantes daf-18 y daf-16 muestra signos de una deficiencia en la señalización GABAérgica inhibitoria

Para evaluar la funcionalidad de ambos sistemas y obtener información del posible estado del balance E/I, decidimos realizar un ensayo más robusto estimulando específicamente las neuronas GABAérgicas y colinérgicas mediante optogenética. La optogenética implica el uso de la luz para controlar con precisión la activación de neuronas específicas, en las cuales se expresa para tal fin un canal iónico que se activa por luz llamado Channelrhodopsin-2 (ChR2). Extraído originalmente de un alga verde unicelular (*Chlamydomonas reinhardtii*), en presencia del cofactor *trans-retinal*, este canal experimenta un cambio conformacional que permite la entrada de cationes en la célula al ser iluminado con longitudes de onda del espectro de la luz azul (460 nm). Este flujo iónico causa una despolarización, activando la neurona en la que se está

expresando y, subsecuentemente, las neuronas o músculos conectados dentro de su red neuronal²³³ (Fig. 21). La expresión de ChR2 en neuronas motoras GABAérgicas mediante el promotor *unc-47* (ortólogo del transportador vesicular de GABA, Fig. 13) permite activar de forma masiva a todas las neuronas GABAérgicas, provocando la relajación muscular generalizada cuando estos animales son expuestos a la luz azul. Esta parálisis flácida conlleva al aumento consecuente de la longitud total del cuerpo, lo cual puede ser utilizado para cuantificar la

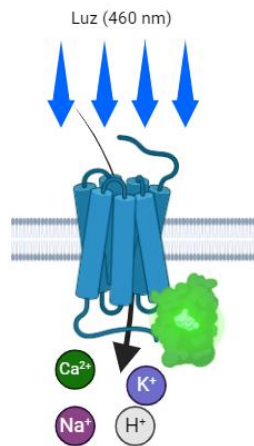


Figura 21: Uso de Channelrhodopsin para la activación neuronal mediante optogenética. Ilustración del uso de Channelrhodopsin (ChR2) para la activación neuronal en *C. elegans*. La luz azul (460 nm) provoca un cambio conformacional en el canal, permitiendo la entrada de cationes y despolarizando la neurona.

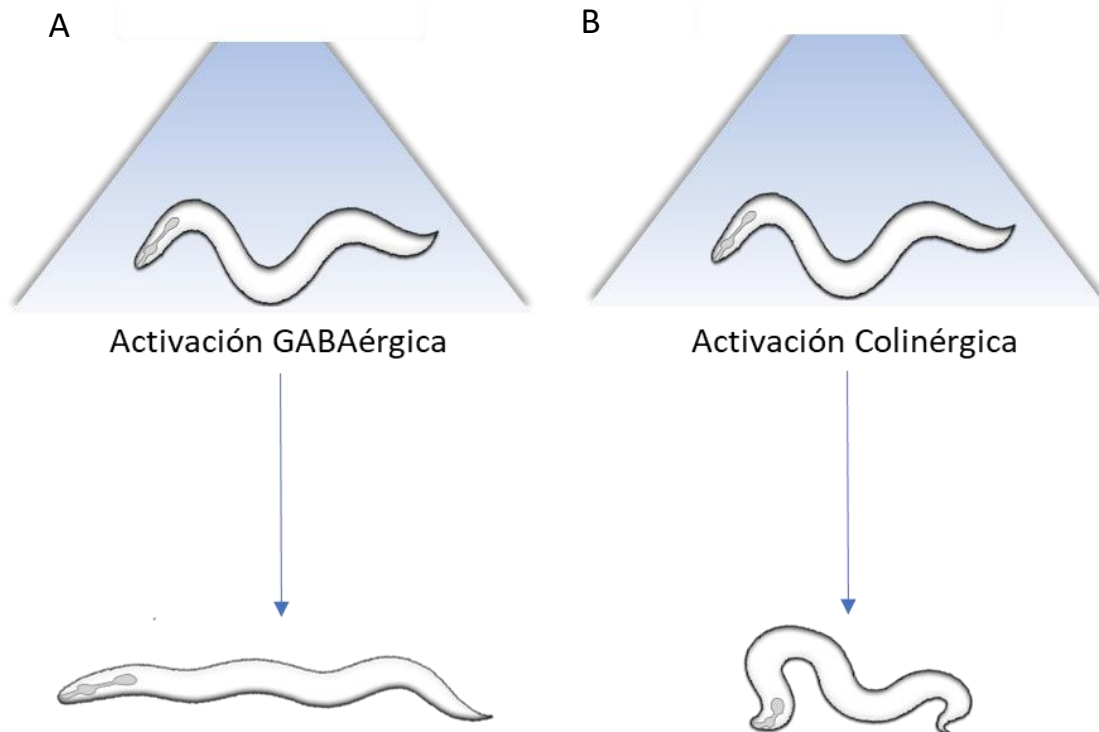


Figura 22: La estimulación optogenética de las motoneuronas permite tener una medida de su funcionalidad. La estimulación GABAérgica provoca una relajación generalizada que aumenta la longitud del cuerpo (A), mientras que la estimulación en motoneuronas colinérgicas genera una contracción masiva que lleva a una disminución del largo corporal (B). La medición del cambio de longitud corporal puede brindar información acerca de la funcionalidad de las motoneuronas en cepas mutantes.

funcionalidad del sistema GABAérgico²³⁶ (Fig. 22 A, video 3, https://youtu.be/ZQ_SO3H1QzM). De esta manera, para poder abordar el estudio de este sistema mediante optogenética, realizamos las cruas genéticas entre *Punc-47::ChR2* y los respectivos mutantes, *daf-18(ok480)* y *daf-16(mgDf50)*. En estos ensayos, encontramos que la elongación del animal después de la activación específica de las neuronas GABAérgicas es significativamente menor, tanto en los mutantes *daf-18* como en *daf-16*, cuando los comparamos con animales *wild type* (Fig. 23). Específicamente, mientras que los animales *wild type* expuestos a luz azul aumentaron su longitud en un $3,7 \pm 1,4\%$; el aumento de la longitud corporal en los mutantes *daf-18* y *daf-16* fue de $2,1 \pm 1,2\%$ y $1,8 \pm 1,1\%$ respectivamente. Una vez más, esto sugiere una posible falla en el sistema GABAérgico. A continuación, activamos recíprocamente las neuronas motoras colinérgicas en animales que expresan ChR2 bajo el promotor *unc-17*; para lo cual realizamos las cruas entre animales *Punc-17::ChR2* con mutantes *daf-18* y *daf-16*. La activación masiva del sistema colinérgico en animales *wild type* provoca una contracción muscular general y

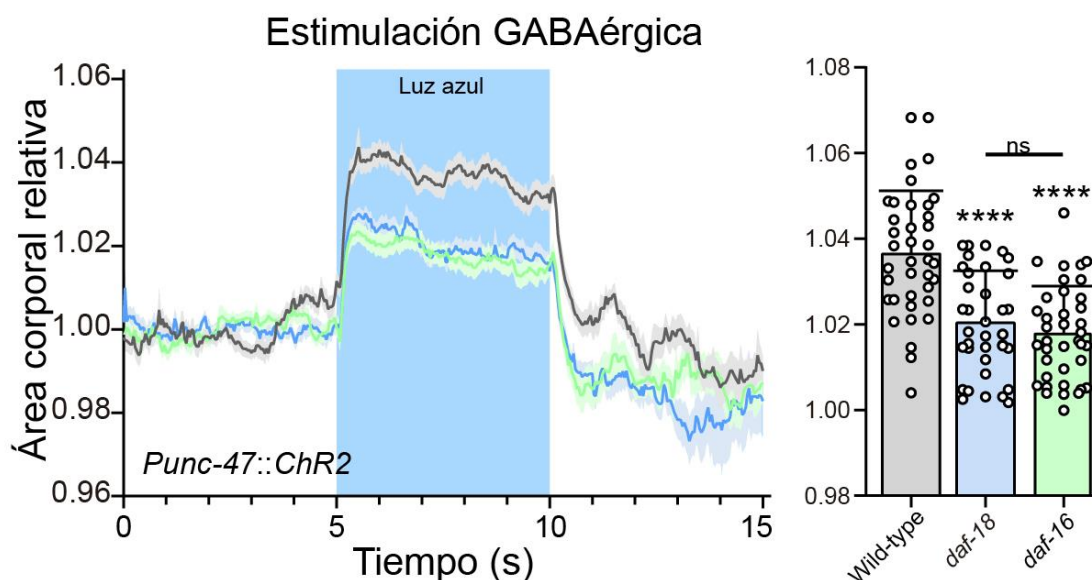


Figura 23: La estimulación de ChR2 en motoneuronas GABAérgicas induce un menor aumento del área corporal en mutantes *daf-18* y *daf-16*. Resultados de la estimulación GABAérgica por optogenética en animales expresando ChR2 en motoneuronas GABAérgicas durante y después de un pulso de luz de 460 nm de 5 segundos. **Izquierda:** Variación del área corporal relativa en función del tiempo. La media del área durante los primeros 125 cuadros (0-5 s) estableció una línea base para comparar los cambios inducidos por la luz. **Derecha:** Cuantificación del área bajo la curva para comparar los cambios inducidos por la luz entre diferentes cepas. Las mediciones del área corporal se promediaron desde el segundo 6 hasta el segundo 9. Se utilizaron aproximadamente 40 animales por genotipo, repartidos en al menos 3 ensayos independientes. Los datos se representan como media $\pm$ DE. Se realizó un ANOVA de una vía, y la prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples.

consecuentemente un acortamiento del cuerpo²³⁶ (Fig. 22 B, video 4, <https://youtu.be/9LYSw8fvz4Y>). Llamativamente, encontramos que la exposición a la luz y subsiguiente activación colinérgica en mutantes *daf-18* y *daf-16* causó una hiper contracción comparado con animales *wild type* (Fig. 24). Mientras que los animales *wild type* se contraen un

5,7 ± 1,6%; la disminución corporal de *daf-18* y *daf-16* fue de 7,7 ± 2,8% y 7,6 ± 2,8% respectivamente. Dado que la activación de las neuronas motoras colinérgicas no solo activa los músculos, sino que también estimula las neuronas GABAérgicas para relajar la pared muscular opuesta, resulta lógico pensar que un déficit GABAérgico en *daf-18* y *daf-16* podría conducir al mayor acortamiento del cuerpo en estas mutantes tras la activación colinérgica. Este déficit

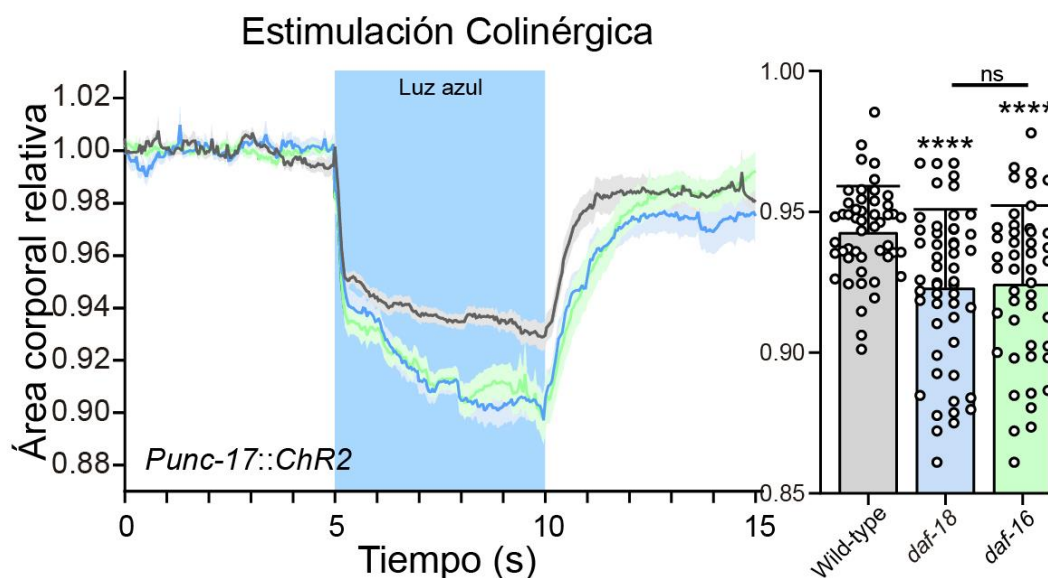


Figura 24: La estimulación de ChR2 en motoneuronas colinérgicas induce una hipercontracción en *daf-18* y *daf-16*. Resultados de la estimulación colinérgica por optogenética en animales expresando ChR2 en motoneuronas colinérgicas durante y después de un pulso de luz de 460 nm de 5 segundos. **Izquierda:** Variación del área corporal relativa en función del tiempo. La media del área durante los primeros 125 cuadros (0-5 s) estableció una línea base para comparar los cambios inducidos por la luz. **Derecha:** Cuantificación del área bajo la curva para comparar los cambios inducidos por la luz entre diferentes cepas. Las mediciones del área corporal se promediaron desde el segundo 6 hasta el segundo 9. Se utilizaron aproximadamente 50 animales por genotipo, repartidos en al menos 3 ensayos independientes. Los datos se representan como media ± DE. Se realizó un ANOVA de una vía, y la prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples.

podría ser consecuencia de fallos en diferentes etapas de la señalización GABAérgica.

Dado que para cuantificar estos experimentos generamos un macro de FIJI que permite medir el área del gusano en diferentes momentos, necesitábamos realizar experimentos que validen que los cambios en el área se deban exclusivamente al acortamiento o alargamiento longitudinal del animal, y no a cambios en su ancho. Para ello, medimos a los 2,5 segundos de la estimulación lumínica tanto el ancho como la longitud de varios animales y comparamos estas mediciones con las áreas correspondientes obtenidas a partir del análisis automatizado (ver Materiales y Métodos). El ancho de los animales se mantuvo relativamente constante, evidencia de que las alteraciones en el área corporal se deben principalmente a cambios en la longitud del animal (Fig. 25).

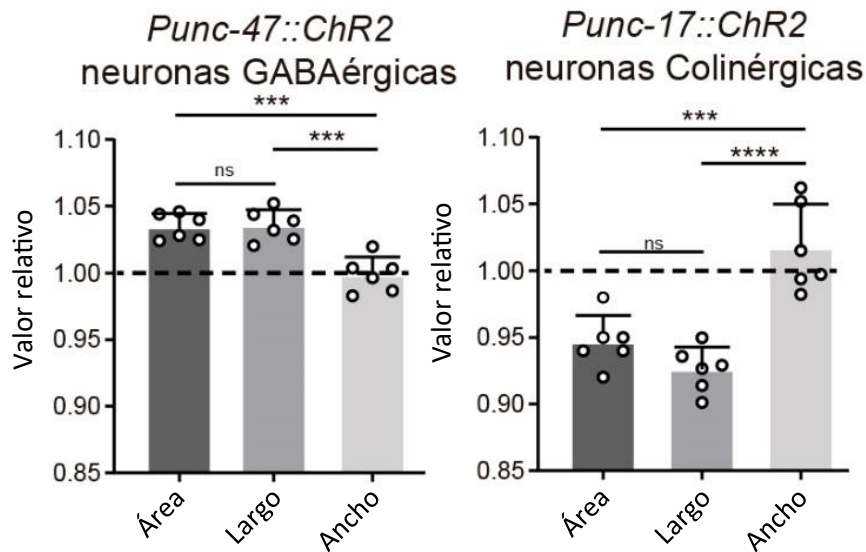


Figura 25: El ancho del cuerpo se mantiene constante tras la estimulación optogenética en motoneuronas GABAérgicas y colinérgicas. El gráfico muestra los resultados de la medición manual del ancho y la longitud del cuerpo de seis animales (seleccionados al azar) a los 2,5 segundos de estimulación lumínica en motoneuronas GABAérgicas (**izquierda**) y colinérgicas (**derecha**). Los datos se presentan como media $\pm$ DE. Se utilizó un ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples, usando el valor normalizado (1,00) como referencia. No se observaron diferencias significativas en el ancho del cuerpo comparado con las mediciones previas a la estimulación.

Estos resultados sugieren fuertemente que en mutantes *daf-18* y *daf-16* existe un déficit en la funcionalidad del sistema GABAérgico. Tanto un fallo en la liberación de GABA desde las neuronas GABAérgicas (presinapsis) como una disfunción en los receptores GABAérgicos en el músculo (postsinapsis) podrían resultar en el mismo fenotipo. Nos propusimos entonces examinar la morfología de las motoneuronas involucradas para evaluar el origen de este déficit.

Mutaciones en *daf-18* y *daf-16* repercuten en alteraciones morfológicas evidentes sobre procesos neuronales del sistema GABAérgico

Existen evidencias de que, tanto en cultivos de neuronas como en modelos animales, las mutaciones en *PTEN* conducen a alteraciones morfológicas en los procesos neuronales^{69,180,187}. Dado que nuestros resultados sugieren perturbaciones en la transmisión neuromuscular, pero no definen dónde están los defectos (neuronas, músculos o ambos), decidimos explorar la morfología de las neuronas motoras. Como vimos previamente, un total de 113 de las 302 neuronas de *C. elegans* pertenecen a la categoría de motoneuronas, y controlan comportamientos de movimiento tanto en medio sólido (arrastre) como el líquido (movimiento de natación); así como también la motilidad de los sistemas alimentario y reproductor. De estas 113 neuronas, unas 75 inervan a 79 músculos de la pared corporal posterior a la cabeza, entre los que se incluyen 16 músculos del cuello y 63 músculos del resto del cuerpo. Las mismas pertenecen a ocho clases distintas (AS, DA, DB, DD, VA, VB, VC y VD). Las motoneuronas de tipo

A y B (VA, VB, DA, DB y AS) son colinérgicas y excitatorias. Las motoneuronas de tipo D (VD y DD) son GABAérgicas inhibitorias y estrictamente postsinápticas a otras motoneuronas. Las motoneuronas VC expresan varios neurotransmisores y estimulan principalmente a músculos de la vulva. Si bien todos los somas de estas neuronas se encuentran en el CNV, las clases VA, VB, VC y VD inervan los músculos ventrales, mientras que las clases DA, DB, DD y AS envían comisuras hacia el lado dorsal para inervar los músculos dorsales^{58,137}. Debido a que en estas comisuras no existe prácticamente solapamiento, resultan un blanco ideal para el estudio de defectos en el desarrollo o mantenimiento de los procesos neuronales^{142,237}, por lo que decidimos focalizar nuestro análisis en las mismas. Para el estudio de las comisuras en motoneuronas GABAérgicas, empleamos animales que expresan el fluoróforo mCherry bajo el control del promotor del gen *unc-47*, el cual como ya vimos antes, se expresa únicamente en este tipo de neuronas. En animales *wild type*, 17 de las 19 neuronas del tipo D pertenecientes a la clase DD (6 células) o a la clase VD (13 células), envían comisuras circunferencialmente por el lado derecho del cuerpo del animal. Las dos neuronas que envían comisuras por el lado izquierdo son DD1 y VD2 en la región anterior (Fig. 26). Para evaluar la morfología de las comisuras en animales *daf-18*, *daf-16* y la doble mutante *daf-18;daf-16*; cruzamos dichos mutantes con la cepa *Punc-47::mCherry*. Notoriamente, al comparar la morfología en L4 y adultos jóvenes de *wild type* y mutantes *daf-18*, encontramos una gran variedad de defectos en estos últimos, tanto morfológicos como de orientación espacial. Algunas de las aberraciones observadas incluyen

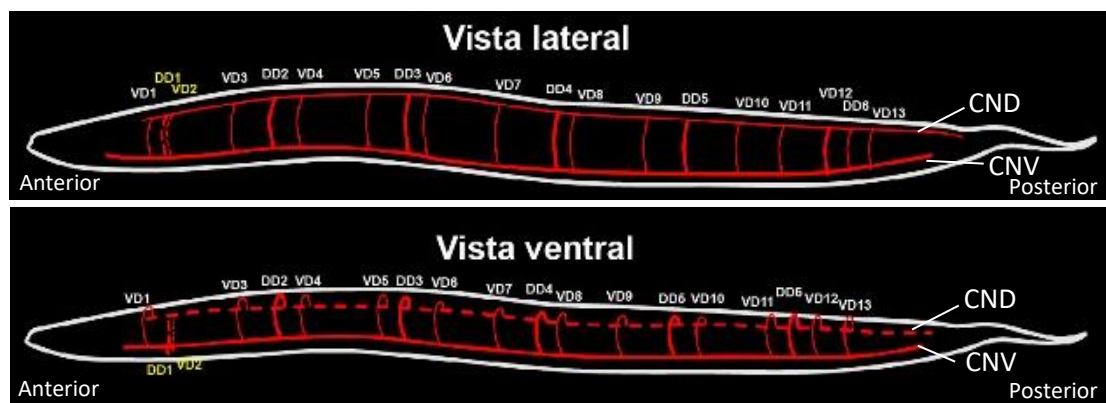


Figura 26. Mapeo canónico de las motoneuronas GABAérgicas en *C. elegans*. Esquema representativo de la posición de comisuras pertenecientes a motoneuronas tipo D en vista lateral (**arriba**) y ventral (**abajo**). Las motoneuronas tipo D poseen su soma en el cordón nervioso ventral (CNV), y todas envían comisuras hacia el cordón nervioso dorsal (CND) por el lado derecho excepto DD1 y VD2, las cuales lo hacen por el lado izquierdo.

defectos de guiado, ramificaciones ectópicas, comisuras que no alcanzan la cadena dorsal (truncadas) e incluso comisuras que migraron hacia la cadena dorsal por el costado opuesto al habitual (*handedness*), lo cual puede ser apreciado en vista dorsal o ventral (Fig. 27 A y B). Encontramos que un $85,5 \pm 9,1\%$ de los animales mutantes *daf-18* presenta al menos uno de estos defectos frente a un $28 \pm 11,4\%$ en la cepa *wild type* (Fig. 27 C). Al analizar la morfología

de las motoneuronas en mutantes *daf-16* y *daf-18;daf-16*, encontramos un escenario muy similar al de *daf-18*; con la misma variedad de defectos y en una frecuencia semejante ($91,3 \pm 8\%$ y $85,7 \pm 12,1\%$ respectivamente) (Fig. 27 C). Como ya mencionamos antes, existe cada vez más evidencia que respalda el hecho de que *PTEN* está involucrado en procesos de desarrollo, y que mutaciones en este gen serían las responsables de defectos en distintas poblaciones neuronales en mamíferos. Más aún, como ya comentamos, se ha reportado que mutaciones en *daf-18* producen defectos en las neuronas AIYs y HSNs de *C. elegans*. Habiendo encontrado evidencia de que las mutantes *daf-18* y *daf-16* poseen también aberraciones en las

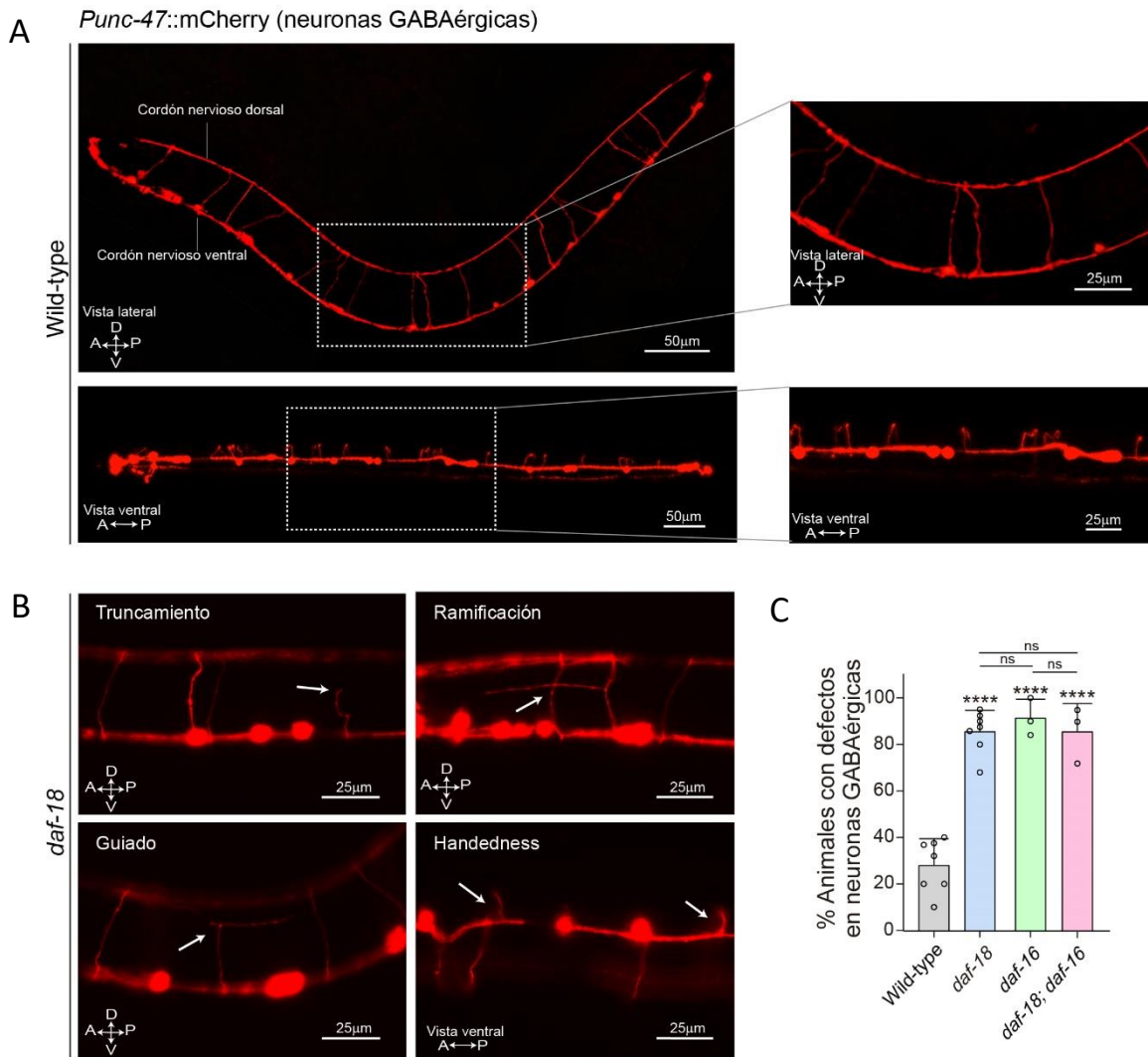


Figura 27. Animales *daf-18* muestran defectos morfológicos en las motoneuronas GABAérgicas. **A.** Imágenes representativas de animales *wild type* expresando mCherry en las motoneuronas GABAérgicas, en vistas lateral y ventral. En vista ventral, se puede apreciar que la mayoría de las comisuras viajan por el lado derecho del cuerpo del animal. **B.** Imágenes representativas de defectos en las comisuras observados en mutantes *daf-18* (flechas). **C.** Cuantificación de defectos en el sistema GABAérgico. Se realizaron al menos tres ensayos independientes para cada condición, utilizando aproximadamente 20-25 animales por genotipo/ensayo. Cada barra representa la media $\pm$ DE. Se utilizaron ANOVA de una vía, y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el análisis estadístico.

motoneuronas GABAérgicas, decidimos evaluar también a las motoneuronas colinérgicas en estas mutantes. Para ello, las cruzamos con la cepa *Punc-17::GFP*; la cual expresa GFP en todas

las neuronas colinérgicas al estar acoplado su gen a *unc-17*, gen que codifica para una proteína que funciona como transportador vesicular de ACh. Más de un tercio de las neuronas en *C. elegans* producen ACh (aproximadamente 120 neuronas en hermafroditas), de las cuales 113 son motoras. Nuevamente, elegimos las comisuras de las motoneuronas para evaluar su morfología. Según el mapeo canónico de las mismas, de las DA, solamente la DA2 corre por el lado derecho (DA7 y DA8 están en espejo en la región de la cola, una por cada lado). En cuanto a las DB; DB1, DB3, DB6 y DB7 envían comisuras por el lado derecho, mientras que DB2, DB4 y DB5 lo hacen por el izquierdo. Por último, todas las AS envían comisuras por el lado derecho del animal. Si bien la visibilidad de todas las comisuras no siempre es clara debido a las limitaciones técnicas y la variabilidad en la expresión del transgén¹³⁶, en la mayoría de los animales es posible observar gran parte de las comisuras si se utilizan objetivos con más poder de resolución. Para nuestra sorpresa, en contraste con nuestros hallazgos en las neuronas motoras GABAérgicas, no observamos defectos severos ni diferencias significativas entre las comisuras de las neuronas motoras colinérgicas en mutantes *daf-18* cuando se los comparó con animales *wild type*, con defectos promediando un $21,2 \pm 10,3\%$ y $20 \pm 12,2\%$ respectivamente (Fig. 28). Esto sugiere que las mutaciones en *daf-18* no producen defectos panneuronales, sino que parecen alterar

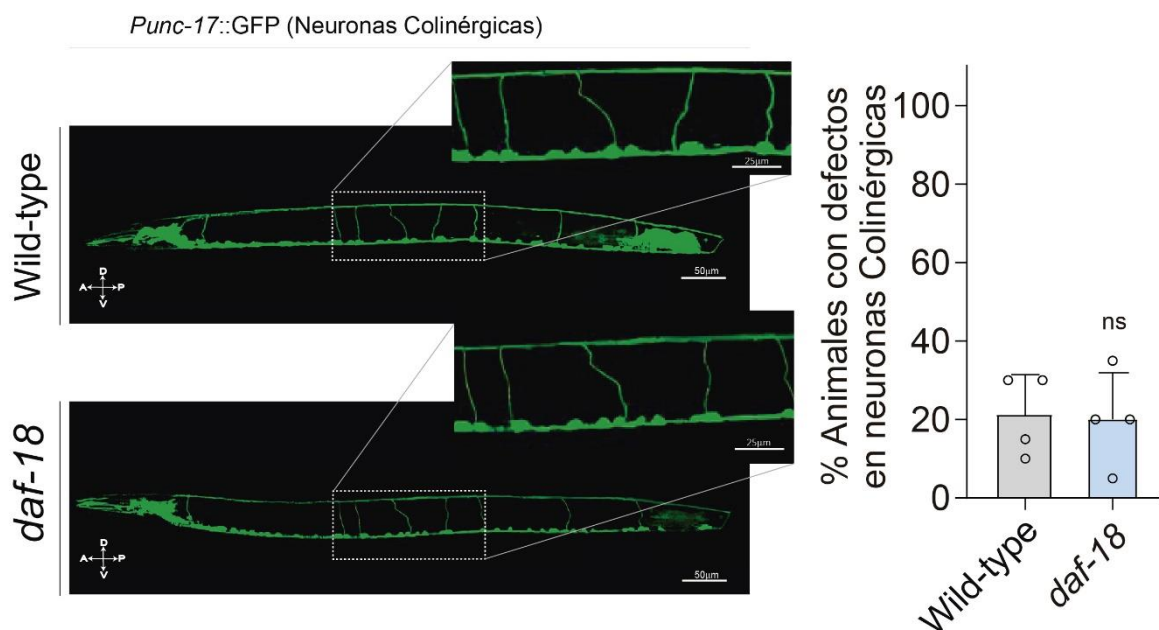


Figura 28. Las mutaciones en *daf-18* no afectan la morfología de las motoneuronas colinérgicas excitatorias. **Izquierda.** Imágenes representativas de animales que expresan GFP en las neuronas colinérgicas. En los recuadros se pueden apreciar las comisuras con mayor resolución. **Derecha.** Cuantificación de defectos. Se realizaron al menos cuatro ensayos independientes para cada condición, con aproximadamente 20 animales por genotipo/ensayo. Cada barra representa la media $\pm$ DE. La significancia estadística entre las cepas se determinó mediante la prueba t de Student a dos colas.

específicamente al sistema GABAérgico. Si estos defectos tuvieran consecuencias en la funcionalidad (lo cual parece evidente), podría esperarse un desequilibrio entre los sistemas E/I

como el expuesto en los experimentos farmacológicos y de comportamiento descriptos previamente. Un detalle importante en este punto es el origen de estos defectos, ya que los mecanismos subyacentes a fenómenos degenerativos y de desarrollo deficiente pueden diferir enormemente. Al observar estas neuronas en estadios como L4 y adultos jóvenes podríamos estar ignorando la posibilidad de que se trate de un fenómeno de neurodegeneración acelerada. Es por ello que decidimos analizar la morfología en estadios del desarrollo aún más tempranos. En este punto, es importante recordar que las motoneuronas VD se desarrollan más tarde que las DD, lo cual permite el análisis diferencial de estos tipos neuronales en estadios tempranos.

Las aberraciones en motoneuronas GABAérgicas están presentes tanto en las neuronas DD como en las VD

Existen dos clases de motoneuronas GABAérgicas tipo D que participan en la señalización neuromuscular inhibitoria. Como vimos previamente, las VD son las encargadas de relajar a los músculos de la región ventral; mientras que las DD hacen sinapsis sobre los músculos de la pared dorsal. En cuanto al desarrollo, existen marcadas diferencias entre ambos tipos, ya que las DD nacen embrionariamente y las VD nacen postembrionariamente, específicamente en el estadio L1 tardío²³⁸. Es por esto que un animal en el estadio L1 temprano tendrá únicamente las 6 motoneuronas DD. Más aún, las motoneuronas DD reciben sinapsis diádicas de neuronas motoras excitatorias de la cuerda ventral junto con músculos de la pared corporal. El patrón inicial de sinapsis de las neuronas DD es presináptico e inhibitorio para los músculos de la pared corporal ventral, mientras que son postsinápticas a las neuronas que activan los músculos de la pared corporal dorsal. Durante la etapa tardía de L1, después del nacimiento de las neuronas motoras VD, las neuronas DD cambian su patrón sináptico de tal manera que sus ramas dorsales se vuelven presinápticas e inhibitorias para los músculos de la pared corporal dorsal, mientras que sus ramas ventrales se vuelven postsinápticas a las neuronas excitatorias que hacen sinapsis en los músculos de la pared corporal ventral²³⁸⁻²⁴⁰. Las motoneuronas VD, por su parte, no llevan a cabo un remodelado como las DD; y tienen un crecimiento postembrionario desde su nacimiento (L1 tardío) hasta el estadio L2; con un crecimiento significativo en la transición L1-L2²³⁸. Al presentar patrones de desarrollo tan diferentes, surge la incógnita de si los defectos observados por la pérdida de *daf-18* y *daf-16* afectarán de igual modo a ambos tipos de neuronas, o solamente afectarán a una sola clase. La presencia de las aberraciones morfológicas en estadios tempranos puede, por otra parte, brindarnos información acerca del tipo de fenómeno (degenerativo o de desarrollo) subyacente a estas mutaciones. Para abordar este interrogante, decidimos examinar la morfología de las motoneuronas de animales en dos tiempos de desarrollo dentro del estadio L1, donde únicamente las 6 DD están presentes (L1

“temprana”, entre 30 y 60 minutos posteclosión del huevo; y L1 “intermedia”, entre 5 y 6 horas posteclosión, Fig. 29). Notoriamente, en animales *daf-18*, encontramos aberraciones similares a

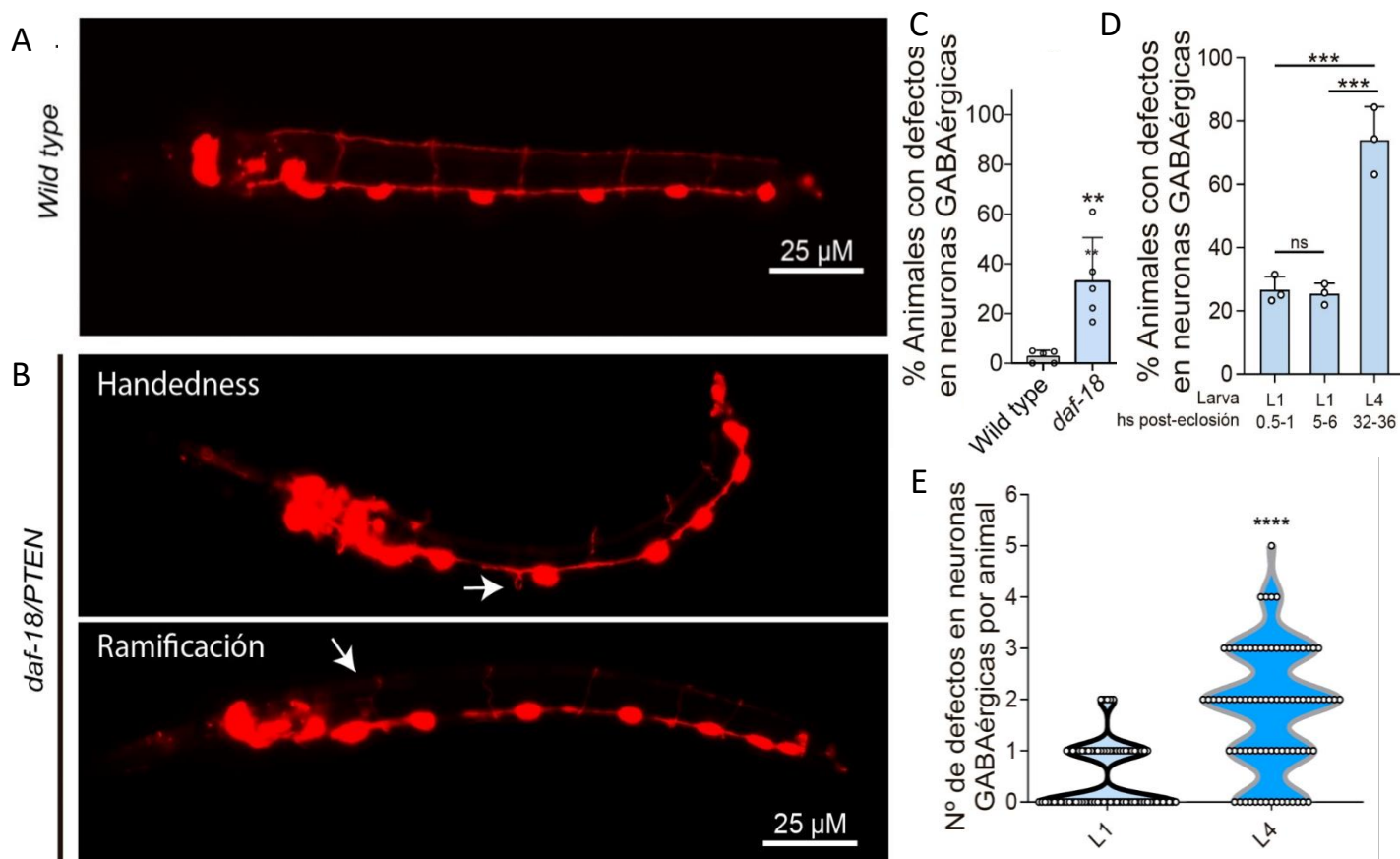


Fig. 29. Los defectos en las motoneuronas GABAérgicas están presentes en estadios tempranos del desarrollo. **A.** Imagen representativa de un animal *wild type* en estadio L1 temprano (1 h posteclosión) expresando mCherry en neuronas GABAérgicas. En esta etapa larval, solo se observan las seis motoneuronas GABAérgicas de tipo DD. **B.** Ejemplos de defectos morfológicos presentes en motoneuronas tipo DD encontrados en animales *daf-18* en el estadio L1 temprano. **C.** Cuantificación de defectos encontrados en larvas L1 de animales *wild type* y *daf-18*. **D.** Cuantificación de los defectos observados en varias etapas del desarrollo de animales *daf-18*: 0,5-1 h posteclosión (larva L1 temprana), 5-6 h posteclosión (larva L1 intermedia) y etapa L4 (32-36 h posteclosión). Se realizaron tres ensayos independientes para cada condición, con aproximadamente 30 animales por condición/ensayo. Los resultados se presentan como media $\pm$ DE. Se utilizó un ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. **E.** Cuantificación del número de errores por animal en larvas L1 y L4 de animales *daf-18*. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Mann-Whitney.

las halladas en adultos en estadios larvales L1, particularmente ramificaciones y defectos tipo *handedness* (Fig. 29 B y C). Debido a que estos defectos son similares en ambos tiempos del desarrollo tan tempranos ($26,6 \pm 4,2\%$ en L1 temprana y $25,4 \pm 3,4\%$ en L1 intermedia, Fig. 29 D), resulta más probable que dichos defectos en realidad sean producto de fenómenos del desarrollo deficiente más que el resultado de algún proceso neurodegenerativo.

Para poder responder a la incógnita de si las neuronas afectadas son únicamente las DDs, analizamos nuevamente animales adultos, en los cuales, basados en la posición de las comisuras, identificamos el tipo neuronal (VDs o DDs) de las comisuras con defectos. De esta manera, pudimos observar que existen defectos tanto en las neuronas DDs como en las VDs (Fig. 30).

Como las VDs aparecen más tarde en el desarrollo, esto permite explicar el aumento en el porcentaje de animales con defectos en el estadio adulto ($74,2 \pm 10,2\%$, Fig. 29 D) así como

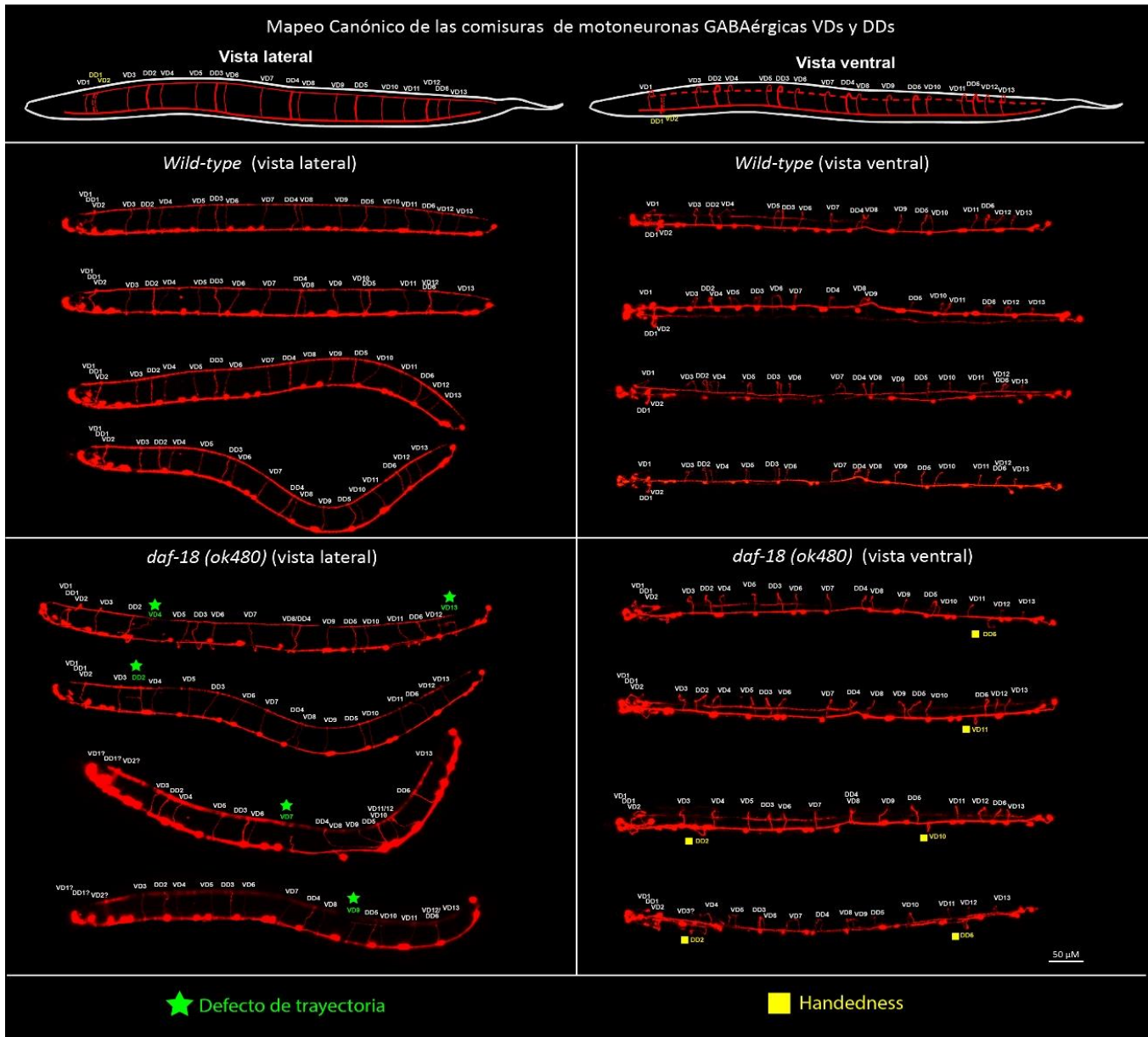


Figura 30. Los defectos morfológicos de *daf-18* se encuentran tanto en neuronas GABAérgicas DD como en las VD. Imágenes representativas de los defectos morfológicos observados sobre las motoneuronas GABAérgicas. **Arriba:** Representación esquemática de la ubicación de las comisuras pertenecientes a los dos tipos de neuronas GABAérgicas en vistas lateral y ventral. Adaptado de Gujar *et. al*, 2017. **Abajo:** Imágenes representativas de animales *wild-type* y *daf-18* en vista lateral (izquierda) y ventral (derecha). La evaluación detallada reveló defectos tanto en las neuronas DD como en las VD. Para el análisis, las tres comisuras anteriores (VD1, DD1 y VD2) no se consideraron debido a la dificultad para identificarlas.

también en el número de defectos por animal en el estadio L4 ($1,78 \pm 1,2\%$) en comparación con los defectos encontrados en estadios larvales más tempranos en estos ensayos ($0,48 \pm 0,62\%$, Fig. 29 E).

Podemos concluir, entonces, que las mutaciones en *daf-18* afectan el neurodesarrollo de todo el sistema GABAérgico (DDs y VDs) sin afectar la morfología del sistema colinérgico.

DAF-18 actúa de forma autónoma para regular el desarrollo de motoneuronas GABAérgicas

Quizás una de las cuestiones más intrigantes sobre las consecuencias morfológicas de las mutaciones en *daf-18* sobre las motoneuronas GABAérgicas es justamente que *daf-18* es un gen que se expresa de manera ubicua en todos los tejidos, regulando múltiples procesos por su rol protagónico en la importante vía AGE-1/AKT. Como ya vimos, se trata de un gen que regula importantes cascadas y procesos celulares. Resulta enigmático cómo la disfunción de un gen puede afectar selectivamente sobre algunos tipos de células, sin aparentemente afectar a otras. En relación con esto, nos preguntamos si el desarrollo adecuado de las neuronas GABAérgicas depende directamente de la actividad autónoma de DAF-18 en estas neuronas, o bien si es necesaria su expresión en otros tejidos. Por lo tanto, decidimos generar un transgénico que expresa *daf-18* únicamente en neuronas GABAérgicas. Para hacer este rescate, se realizó un constructo donde se posicionó al ADNc de *daf-18* bajo el control del promotor *Punc-47*. A continuación, analizamos la morfología neuronal cruzando dicha cepa con el reportero

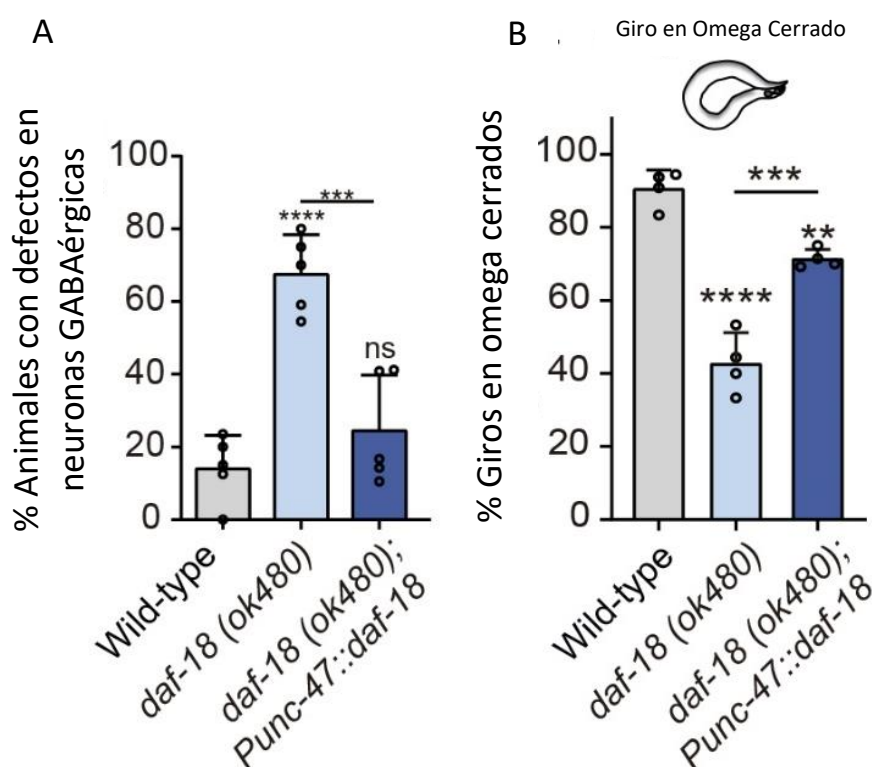


Figura 31. El rescate neuronal de *daf-18* en neuronas GABAérgicas disminuye la incidencia de defectos morfológicos, y mejora la ejecución de giros en omega. Evaluación de fenotipos en animales que expresan *daf-18* únicamente en neuronas GABAérgicas bajo el promotor *unc-47*. **A.** Cuantificación de defectos en comisuras de motoneuronas GABAérgicas. **B.** Cuantificación de giros en omega cerrados. En ambos casos se observa que la expresión de *daf-18* específicamente en motoneuronas GABAérgicas disminuye la cantidad de defectos morfológicos e incide positivamente en la habilidad de ejecutar giros en omega durante la respuesta de escape. Se llevaron a cabo al menos cuatro ensayos independientes para cada ensayo, utilizando 15 a 20 animales por cada genotipo/ensayo. Los resultados se presentan como media $\pm$ DE. Para el análisis estadístico, se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey en ambos casos.

fluorescente, y observamos una notoria disminución en la cantidad de defectos observados por animal ($24,7 \pm 15\%$ en el rescate neuronal, y un $67,7 \pm 10,7\%$ en el mutante nulo frente a un $14,2 \pm 9\%$ en el *wild type*, Fig. 31 A). Este rescate neuronal también demostró ser eficiente para mejorar el rendimiento en los ensayos de respuesta de escape, mostrando un aumento significativo en el número de giros en omega cerrados ($71,4 \pm 2,5\%$ en el rescate neuronal, y un $42,8 \pm 8,4\%$ en el mutante nulo frente a un $90,6 \pm 5\%$ en el *wild type*, Fig. 31 B). Si bien estas diferencias no representan un rescate total, es indicativo de que DAF-18 actúa de manera autónoma en las neuronas motoras GABAérgicas para regular su desarrollo, y que la menor incidencia de errores impactaría positivamente en la habilidad de ejecutar giros en omega cerrados.

Discusión

El gen *PTEN* fue descubierto en el año 1997¹⁵², y desde entonces se ha ido esclareciendo su papel en diversas vías celulares, destacando su función crítica en la regulación del ciclo celular y su asociación con la aparición de tumores. Ya han pasado más de 25 años desde entonces, y nuestra comprensión del papel protagonista de este gen en la fisiología celular y la salud continúa en expansión. En la actualidad, se sabe que disrupciones en *PTEN* pueden tener consecuencias directas sobre el neurodesarrollo, y ha sido fuertemente vinculado con la aparición de TEA. En esta primera sección, mediante el uso del nematode *C. elegans* como modelo de estudio, abordamos los fenómenos asociados a la pérdida de función de este gen, fundamentalmente sobre el SN y sus consecuencias funcionales. Hemos visto que la vía de PI3K/AKT/FOXO está altamente conservada en estos animales, siendo *daf-18* el homólogo de *PTEN* en gusanos, y *daf-16* el homólogo de *FOXO*, una familia importantísima de factores de transcripción. Como una primera aproximación, realizamos ensayos con los fármacos estimulantes del sistema colinérgico aldicarb y levamisol, compuestos que han sido validados para el estudio de fallas a nivel de la transmisión pre y postsináptica. Los resultados de estos ensayos demuestran que mutantes *daf-18* y *daf-16* presentan una hipersensibilidad a los mismos. Estos resultados son compatibles con una elevada actividad del sistema de señalización colinérgico excitatorio, o bien con una deficiencia en el sistema GABAérgico inhibitorio, ya que la actividad de este último se opone y limita a la estimulación colinérgica. En una situación ideal, ambos sistemas deben mantenerse en un estricto equilibrio, ya que fallas en alguno de estos sistemas pueden producir desequilibrios que conduzcan a fenotipos deficientes. Por ejemplo, mutantes *unc-25* (incapaces de producir GABA por carecer de la enzima glutamato descarboxilasa), son severamente descoordinados. En los ensayos con aldicarb y levamisol, *unc-25* exhibe una marcada sensibilidad a estos compuestos, lo cual demuestra el alto valor predictivo de estos ensayos acerca de la funcionalidad de los sistemas E/I. En este contexto, el fenotipo hipersensible que detectamos en mutantes *daf-18* y *daf-16* durante estas pruebas es evidencia de que dichas mutaciones podrían estar vinculadas con una disrupción en el equilibrio E/I. Si este es el caso, está claro que dicha disrupción es sutil comparada con la de animales *unc-25*, lo cual es esperable por el papel que juega el gen *unc-25* en el funcionamiento del sistema GABAérgico. Además, no pudimos observar fenotipos evidentes en el movimiento de estos animales, sino hasta que estudiamos comportamientos más complejos como la respuesta de escape, donde los sistemas E/I juegan un rol crítico. En estos ensayos, pudimos observar que tanto los mutantes

daf-18 como *daf-16* exhiben un acortamiento excesivo de la longitud corporal luego de la estimulación mecánica en la región anterior, así como también una menor proporción de giros en omega cerrados durante la respuesta de escape. Aprovechando que la funcionalidad de las neuronas GABAérgicas y colinérgicas (directamente implicadas en los fenotipos observados) puede ser evaluada de una forma más específica mediante optogenética, estimulamos ambos grupos neuronales y pudimos observar que la activación de neuronas GABAérgicas, tanto en animales *daf-18* como *daf-16*, resultó en un alargamiento del cuerpo de menor magnitud a la observada en animales *wild type*. Por otro lado, la estimulación neuronal colinérgica en estos mutantes produjo una contracción exagerada del cuerpo frente a animales *wild type*. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los ensayos de respuesta de escape y farmacológicos, y dan indicios de posibles alteraciones en el equilibrio entre los sistemas E/I. Relativo a esto, al evaluar el estado morfológico de las motoneuronas mediante reporteros fluorescentes, pudimos comprobar que tanto mutantes *daf-18* como *daf-16* presentan defectos morfológicos en comisuras de neuronas tipo D pertenecientes al sistema GABAérgico, pero no así defectos evidentes en comisuras del sistema colinérgico. Estas aberraciones son visibles ya en el primer estadio larval L1, y son rescatadas por la expresión específica de *daf-18* en neuronas GABAérgicas.

Es evidente que en todos los experimentos, *daf-16* exhibe defectos de igual magnitud que *daf-18*, y no parece haber un efecto aditivo en la doble mutante *daf-18;daf-16*. Si se tienen en cuenta las relaciones epistáticas entre ambos genes y la vía principal en la que participan, esto parece indicar que la vía de señalización comprometida es la de AGE-1/AKT/DAF-16, la cual negativamente regulada por la actividad de DAF-18, que evita la fosforilación de DAF-16. Cuando está hiperfosforilado, DAF-16 se mantiene fuera del núcleo, y por lo tanto es incapaz de favorecer la transcripción de sus genes diana. La actividad de DAF-18 disminuye la actividad de la vía al disminuir la cantidad de PIP3 mediante su desfosforilación, generando PIP2²⁴¹. En principio, estos resultados pueden parecer llamativos ya que las mutaciones en *PTEN* han sido vinculadas en mamíferos con defectos en el neurodesarrollo por comprometer a la vía de mTOR. Sin embargo, cuando evaluamos a los componentes homólogos clave de estas vías, como *raga-1/RagA* (componente esencial TORC1) y *rict-1/Rictor* (componente esencial TORC2) no observamos alteraciones significativas en la sensibilidad a los fármacos colinérgicos en estos animales. Estos resultados, además, no son tan sorprendentes si se tiene en cuenta que ya ha sido demostrado, en *C. elegans*, que el factor de transcripción DAF-16 regula autónomamente el desarrollo neuronal de las interneuronas AIYs⁶⁹ así como de manera no autónoma la migración

de las HSNs¹⁸⁷ por mecanismos independientes a la vía de CeTOR. Por lo tanto, parece ser que este factor de transcripción juega un rol protagónico en el desarrollo del SN en estos animales.

Recientemente, en ratones adultos, se ha postulado que las proteínas FOXO regulan la morfogénesis neuronal a través del mantenimiento del flujo de autofagia durante la neurogénesis adulta^{242,243}. Por otro lado, utilizando *Drosophila melanogaster*, se propuso que la vía Toll-6/FOXO está implicada en la regulación de la dinámica de los microtúbulos en el neurodesarrollo y la plasticidad sináptica²⁴⁴. La familia de factores de transcripción FOXO, por lo tanto, parece tener una enorme importancia en procesos que regulan el neurodesarrollo. Puntualmente, para las motoneuronas GABAérgicas de *C. elegans*, el gen *daf-18* parece cumplir un rol autónomo en el desarrollo, ya que el rescate neuronal de *daf-18* revirtió los defectos morfológicos observados a nivel de las comisuras. Si bien es esperable que la sola expresión de *daf-16* en las motoneuronas GABAérgicas también revierta este fenotipo en un *background daf-16* nulo, sería interesante realizar este rescate para confirmar de manera más robusta la exclusividad de esta vía en esta afección. Por otro lado, solamente observamos un rescate parcial en el número de giros en omega cerrados en los ensayos de respuesta de escape. Hay varios puntos que podrían explicar estas diferencias. En principio, los rescates genéticos a menudo suelen presentar diferencias en la expresión del gen cuando se lo compara con la expresión en un animal *wild type*, lo cual puede estar relacionado en parte al promotor utilizado²⁴⁵⁻²⁴⁷. Incluso es posible que la transcripción del gen se de en ventanas temporales diferentes durante el desarrollo y la vida del animal. Por otro lado, es posible que la pérdida de *daf-18* tenga efectos en otros tejidos o bien en otros procesos celulares de los cuales también depende la correcta ejecución del giro en omega. Es esperable que, si el giro en omega “cerrado” depende de otros tejidos y no solamente de las motoneuronas GABAérgicas, el rescate de *daf-18* en esta población neuronal no sea suficiente para revertir el fenotipo. Por último, podría haber defectos en las motoneuronas GABAérgicas o colinérgicas que no fuimos capaces de ver. Nuestras observaciones se basaron puntualmente en las comisuras porque son regiones de poco o nulo solapamiento entre neuronas individuales, por lo que podrían existir defectos en otras regiones del SN que pasen desapercibidos. Por este motivo, sería interesante, a futuro, evaluar la morfología de neuronas individuales de ambos grupos neuronales utilizando reporteros específicos, en lugar de reporteros que se expresan en toda una misma población, para evitar el sesgo producto del solapamiento neuronal. Otro aspecto importante que merece análisis, es si los defectos observados tienen relevancia funcional. Si bien existe una clarísima correlación, un estudio más específico sobre neuronas individuales y/o músculos podría ayudar a determinar el verdadero impacto de estos defectos. Esto es necesario, ya que la pérdida de *daf-18* o *daf-16*

podría tener consecuencias que van más allá de las aberraciones morfológicas en neuronas, por lo que no es posible descartar que los fenotipos observados se deban a otros fenómenos (receptores postsinápticos, musculatura, etc.). Sin embargo, si bien una correlación no establece una relación de causa y efecto, es importante enfatizar la importancia de los resultados obtenidos. Los mismos representan un excelente punto de partida, y permiten circunscribir las posibles causas de estos defectos. Por ejemplo, a diferencia de los ensayos comportamentales en los que evaluamos el acortamiento posterior al estímulo y la capacidad de efectuar giros en omega; los fenotipos observados en los ensayos de optogenética son independientes de las neuronas presinápticas a las motoras (neuronas mecanosensoriales, comando e interneuronas), ya que en esta técnica estimulamos directamente las motoneuronas. En este punto, restará dilucidar puntualmente la funcionalidad de las neuronas con aberraciones morfológicas y el tipo de falla que resulte de las mismas en las células postsinápticas. Si bien la optogenética ofrece la ventaja de evaluar redes neuronales completas y las consecuencias comportamentales de forma directa, no es posible medir potenciales de acción y potenciales postsinápticos, para lo cual se deberá recurrir a técnicas de electrofisiología. Esto es importante para poder determinar, por ejemplo, si los defectos observados en una determinada comisura tienen un impacto directo en la postsinapsis, y dilucidar cuáles son los procesos específicamente comprometidos por estas aberraciones. Si bien varias veces hemos hecho hincapié en las ventajas de la optogenética para evaluar en un organismo vivo la funcionalidad sináptica y las consecuencias comportamentales; es necesario aclarar que ambas técnicas (optogenética y electrofisiología) son más bien complementarias y ofrecen soluciones que pueden ser explotadas para un análisis robusto de los mecanismos neuronales subyacentes y su impacto funcional en la red sináptica.

A pesar de todos estos interrogantes, no obstante, hay algunos aspectos interesantes a resaltar en base a los resultados obtenidos. Mutaciones en *PTEN* han sido vinculadas en numerosas oportunidades con un desbalance E/I en mamíferos. En este sentido, nuestros resultados avalan fuertemente la idea de un posible desbalance entre los sistemas E/I, con una mayor preponderancia del sistema excitatorio frente al inhibitorio. Esto es así, ya que, si estos animales tuvieran una deficiencia en el sistema colinérgico, se esperaría que sean resistentes al aldicarb y levamisol. En relación con esto, la hipersensibilidad observada a estos fármacos se podría explicar en principio por una posible afección del sistema GABAérgico. Una segunda posibilidad, es que ambos sistemas se encuentren afectados, pero el GABAérgico en mayor magnitud. Por último, aunque menos probable, un aumento o ganancia de función de la actividad excitatoria también podría ser compatible con algunos de los resultados obtenidos. Un ejemplo de esto, es el sistema que regula la liberación de ACh desde el cordón ventral, en el cual participan RIC-8,

EGL-30 y EGL-8. Estas proteínas participan en la producción de DAG como segundo mensajero, el cual estimula la liberación de ACh. Si bien no son las más frecuentes, existen mutaciones que originan una ganancia de función en distintos componentes de este sistema, produciendo una liberación aumentada del neurotransmisor. Estos animales son hipersensibles a aldicarb y levamisol, y a menudo adquieren fenotipos hiperactivos, así como también un aumento en la puesta de huevos²⁴⁸. En este contexto, no notamos fenotipos hiperactivos o evidencias de una mayor puesta de huevos en mutantes *daf-18* ni *daf-16*, por lo que resulta poco probable que estos animales tengan un aumento en la actividad colinérgica, a no ser que dicho aumento sea muy sutil. Si bien no disponemos de evidencia directa para descartar otras posibilidades, los resultados de nuestros experimentos apuntan en principio a que las mutaciones en *daf-18* estarían comprometiendo exclusivamente al sistema GABAérgico producto de una menor actividad del factor de transcripción DAF-16. Esta hipótesis parece ser la más probable, especialmente si se tiene en cuenta que las aberraciones morfológicas encontradas en el sistema GABAérgico se correlacionan con los fenotipos defectuosos en comportamientos sobre los cuales este sistema tiene un rol crítico.

Por otro lado, es interesante destacar que las afecciones sobre el sistema GABAérgico parecen ser sutiles. La mayor sensibilidad a estimulantes colinérgicos de *daf-18* y *daf-16* no es comparable con la hipersensibilidad que otros mutantes severos manifiestan, como el caso de mutantes *unc-25* comentado previamente. Además, a diferencia de *unc-25*, tampoco observamos una locomoción descoordinada en estas mutantes. En este sentido, hay que tener en cuenta que el desplazamiento efectivo durante la locomoción se produce mediante la propagación de ondas corporales alternadas, producto de la contracción muscular inducida por actividad colinérgica y la relajación de la pared opuesta por actividad GABAérgica en cada segmento. El rol de esta actividad inhibitoria, no obstante, es el de exacerbar la curvatura producida por las motoneuronas colinérgicas, lo que produce una disminución de la longitud de onda y un aumento en la eficiencia del movimiento. A pesar de que esta actividad es extremadamente importante, no parece ser esencial, ya que mutantes severos como *unc-25* no solamente son viables, sino que también pueden desplazarse, aunque de manera descoordinada, lenta e ineficiente²²⁰. Por lo tanto, en animales con deficiencias leves en GABA, sería razonable que no se detecten fenotipos a simple vista. Sería interesante a futuro evaluar con más detalle los movimientos de estos animales mediante el análisis del ángulo de las curvaturas o la longitud de onda durante la locomoción normal para verificar si existen diferencias en *daf-18* y *daf-16* con animales *wild type*. Más allá de esto, los resultados de los otros experimentos también avalan la idea de la afección leve en el sistema GABAérgico. En

comportamientos donde la fina coordinación y el correcto funcionamiento de los sistemas E/I es importante, por ejemplo, ante un estímulo mecánico en la región anterior, también notamos diferencias sutiles. Como vimos, tras el estímulo mecánico, los animales *wild type* se mueven eficazmente hacia atrás gracias a la fina coordinación de los sistemas E/I que modulan la contracción muscular alternada en los distintos segmentos. Sin embargo, mutantes severos como *unc-25* manifiestan un fenotipo *shrinker* (acortamiento abrupto del cuerpo), producto de una contracción muscular excesiva. Si bien el acortamiento observado tras la estimulación mecánica en mutantes *daf-18* y *daf-16* es significativamente diferente al *wild type*, es mínimo cuando se lo compara con el fenotipo *shrinker* de *unc-25*.

Otro de los interrogantes que intentamos abordar, relativo a los defectos morfológicos observados en las motoneuronas GABAérgicas, es si se trata de defectos del neurodesarrollo, o si en cambio se trata de una afección sobre procesos relacionados con el mantenimiento neuronal. Los defectos observados ya se encuentran presentes en las neuronas DD en una etapa temprana de desarrollo, antes de que se desarrollen las VD hacia el final del estadio larval L1. Si bien es lógico pensar que en un período de desarrollo tan temprano hubo poco tiempo para que ocurran fenómenos degenerativos, esta posibilidad no puede ser descartada por completo si se tiene en cuenta que DAF-18 y/o DAF-16 podrían tener un rol específico de mantenimiento en estas neuronas. Sin embargo, si tenemos en cuenta las características de los defectos morfológicos observados, parece ser poco probable que los mismos provengan de fenómenos de neurodegeneración. Si bien no podemos negar la posibilidad que procesos neurodegenerativos conduzcan a aberraciones morfológicas como ramificaciones, existen ciertos defectos de guiado ectópico o de ubicación de los procesos axonales (fundamentalmente los errores descritos como *handedness*, aquellos en los que la comisura se encuentra por el lado contrario al habitual) que difícilmente puedan haber surgido por fenómenos de neurodegeneración. Más aún, como fue mencionado previamente, se ha establecido y comprobado que la pérdida de *daf-18* y *daf-16* compromete la morfología de las neuronas AIYs y HSNs, afectando específicamente el desarrollo de las mismas, y no por medio de procesos degenerativos^{69,187}. Teniendo en cuenta el comprobado rol de estos genes en el neurodesarrollo, es altamente probable que en este caso también estén cumpliendo un rol fundamental en el correcto desarrollo de las motoneuronas GABAérgicas. El hecho de que en humanos las mutaciones en *PTEN* pueden conducir al TEA (un fenómeno de neurodesarrollo), y que existen múltiples líneas de evidencia que sugieren que desbalances E/I podrían ser un mecanismo común a este tipo de trastornos, subraya la relevancia de nuestro estudio en *C. elegans*. Este modelo proporciona una plataforma valiosa para investigar los mecanismos subyacentes a estas

mutaciones y sus efectos en el equilibrio E/I, lo cual puede ofrecer nuevas perspectivas sobre el rol de estos desbalances en los trastornos del neurodesarrollo.

Conclusiones parciales

- *La hipersensibilidad a fármacos que incrementan la actividad colinérgica, junto con los resultados de ensayos comportamentales y de optogenética, sugiere un posible desequilibrio E/I en las motoneuronas, presumiblemente debido a fallas en la actividad GABAérgica.*
- *Los defectos morfológicos en motoneuronas GABAérgicas, observados también en estadios etarios tempranos, parecen originarse por defectos del neurodesarrollo más que por fenómenos neurodegenerativos.*
- *Estos defectos morfológicos parecen ser específicos de las neuronas GABAérgicas, sin afectar a las neuronas colinérgicas excitatorias.*
- *La pérdida de daf-18 impacta en el desarrollo del SN a través de la reducción de la actividad del factor de transcripción DAF-16.*
- *En conjunto, los genes daf-18 y daf-16 son esenciales para el desarrollo adecuado de las motoneuronas GABAérgicas en C. elegans.*

Segunda Sección

*Modulación cetogénica del
neurodesarrollo GABAérgico*

Introducción

Cuando se trata de trastornos tan complejos como el TEA, existen muchos factores que pueden contribuir a su aparición, tanto genéticos como ambientales. La búsqueda de tratamientos para este tipo de trastornos es un campo en constante investigación, en donde *C. elegans* puede cumplir también un rol fundamental para su avance. Como ya vimos en la sección anterior, las alteraciones en la señalización de la vía AGE-1/AKT producto de mutaciones en los genes *daf-18* y *daf-16* están íntimamente relacionadas con la afectación de procesos de desarrollo de neuronas pertenecientes al sistema GABAérgico. Estas alteraciones podrían comprometer el balance entre excitación e inhibición, afectando variados procesos biológicos. En humanos, se postula que muchos casos de TEA, así como otros desórdenes del SN, podrían presentar un desbalance entre ambos sistemas, en donde la señalización excitatoria predomina sobre la inhibitoria. Uno de los mayores interrogantes en este aspecto es si es posible realizar intervenciones que restablezcan dicho balance. En relación con esto, los resultados obtenidos previamente ponen en evidencia la posibilidad de utilizar a mutantes *daf-18* y *daf-16* como plataforma para la evaluación de estrategias que disminuyan o reviertan los fenotipos observados. Si los mecanismos fundamentales que orquestan el correcto desarrollo en el SN de gusanos son similares a los de mamíferos, *C. elegans* puede representar una herramienta para la evaluación rápida de fármacos e intervenciones dietarias en búsqueda de alternativas terapéuticas.

Perspectivas terapéuticas de los TEA

Cuando se habla de TEA, es fundamental comprender que comúnmente están presentes síntomas centrales distintivos, pero además también pueden presentarse otros trastornos a modo de comorbilidades. Como ya vimos anteriormente, los síntomas centrales distintivos incluyen dificultades en la comunicación e interacción social, así como patrones de comportamiento repetitivos y restringidos. Desafortunadamente, no se disponen a la fecha medicamentos aprobados para tratar los síntomas centrales, por lo que habitualmente se recurre a estrategias educativas y conductuales que buscan mejorar la calidad de vida tanto de las personas afectadas como de sus familias, utilizándose fármacos fundamentalmente para el tratamiento de comorbilidades en caso de presentarse^{21,249,250}. Entre los medicamentos disponibles se incluyen antipsicóticos, antidepresivos y estabilizadores de humor; sin embargo, es frecuente que los síntomas del TEA y las afecciones relacionadas a menudo persistan de manera refractaria. Como perspectivas a futuro, es de esperar que los tratamientos se hagan más personalizados conforme avanza nuestra comprensión de la heterogeneidad de los TEA.

Como en muchos casos se sabe que existen mutaciones involucradas en la patogénesis de este trastorno, muchas líneas de investigación apuntan al desarrollo de terapias centradas en el tratamiento de los mecanismos celulares alterados por las mismas²¹. Otras estrategias más innovadoras, como la terapia génica, aún están en sus primeras etapas de desarrollo²⁵¹. Actualmente, las estrategias más utilizadas para el tratamiento del TEA incluyen enfoques conductuales, farmacológicos e intervenciones alimentarias.

Tratamientos conductuales

A la fecha, existen numerosas estrategias que surgieron como variaciones de la estrategia denominada “Método Lovaas de Análisis de Conducta Aplicada” (también conocido como “Entrenamiento de Ensayo Discreto”, DTT)²⁵²⁻²⁵⁴. Este método se basa en la intervención conductual intensiva, altamente estructurada y a largo plazo, y fue diseñado para niños pequeños. Se realiza de manera individual y tiene un sólido respaldo empírico, sirviendo como base para muchas intervenciones conductuales derivadas que se utilizan en la actualidad. Si bien el inicio temprano del tratamiento impacta positivamente en su efectividad, el mismo también es utilizado, modificando parcialmente su enfoque, en niños mayores, adolescentes y adultos, siendo el alcance del mismo en estos últimos más limitado²¹.

Tratamientos farmacológicos

Aproximadamente un 70% de los pacientes con TEA presentan, además de los síntomas centrales, otras condiciones coexistentes, como el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), irritabilidad, agresión, problemas de estado de ánimo, ansiedad, entre otros²⁵⁵⁻²⁵⁷. Se estima que dos tercios de estos pacientes son medicados con fármacos para tratar estos síntomas^{21,256}. El uso de fármacos depende en gran medida de las características individuales de cada paciente, ya que existen diversos perfiles de TEA para los cuales pueden ser necesarios medicamentos específicos. Algunos estudios demostraron, por ejemplo, que en ciertos casos puede existir una desregulación de los niveles de serotonina. Los niveles alterados de serotonina están vinculados a menudo a varios síntomas, como ansiedad y comportamientos repetitivos. En algunos de estos pacientes, a menudo se han utilizado inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, y antidepresivos tricíclicos como medicamentos²⁵⁸. La sertralina es un fármaco que es habitualmente utilizado para estos casos, incluso en poblaciones etarias para las que no fueron diseñados^{21,259,260}. Otros medicamentos que han demostrado utilidad para el tratamiento de síntomas como irritabilidad, y en menor medida para comportamientos repetitivos, son los antipsicóticos atípicos risperidona y aripiprazol; los cuales tienen afinidad sobre receptores de dopamina, serotonina, histamina y alfa-

adrenérgicos²⁶¹⁻²⁶⁴. Los antipsicóticos convencionales, como el haloperidol, al presentar mayor riesgo de efectos colaterales, se suelen reservar para casos severos y refractarios a esta nueva clase de antipsicóticos^{21,265,266}. Por otro lado, debido a que un gran porcentaje de niños con TEA padecen además trastorno de déficit de atención e hiperactividad, se utilizan estimulantes de las familias de anfetaminas (mayor eficacia) y derivados de metilfenidato (mejor tolerancia) con el objetivo de mejorar a corto plazo el rendimiento diario en actividades como el aprendizaje²⁶⁷. Con menor respaldo de efectividad, los agonistas alfa-2-adrenérgicos también son utilizados para tratar el déficit de atención e hiperactividad en los casos en los que los estimulantes no sean efectivos o sus efectos secundarios resulten inaceptables^{268,269}.

Dietas y suplementos dietarios como terapias para el TEA

Las estrategias alimentarias utilizadas para mejorar síntomas del TEA varían desde suplementos puntuales hasta dietas complejas. Algunas estrategias involucran alimentos con características antioxidantes. El sulforafano, por ejemplo, que puede ser encontrado en verduras crucíferas, actúa como antioxidante, antiinflamatorio y protector mitocondrial. El mismo puede penetrar la barrera hematoencefálica, e induce el factor de transcripción Nrf2, estimulando la expresión de genes antioxidantes²⁷⁰. Algunos estudios mostraron que la suplementación de este compuesto produce mejoras significativas en síntomas de déficit de atención e hiperactividad. Otros antioxidantes, como ácidos grasos omega-3, también se han estudiado con resultados controversiales²¹. En este dinámico escenario terapéutico, se destaca un interés en constante crecimiento hacia enfoques alimentarios innovadores, siendo las dietas cetogénicas (DCs) un destacado ejemplo. Las DCs son regímenes alimentarios que implican una ingesta muy baja de carbohidratos, moderada en proteínas y alta en grasas. El objetivo es inducir un estado metabólico llamado cetosis, en el cual se metabolizan grasas para la obtención de energía debido a la falta de carbohidratos. Este proceso da lugar a la producción de cuerpos cetónicos (CCs), moléculas con funciones energéticas y de señalización que sirven como reemplazo de la glucosa en células y tejidos^{271,272}. Las DCs han demostrado ser efectivas para ciertos pacientes en el tratamiento de la epilepsia, especialmente en casos de epilepsia refractaria, en la que el paciente no responde bien a los medicamentos convencionales²⁷³⁻²⁷⁷. En los últimos tiempos, además, ha existido un creciente interés en el potencial de estas dietas por su impacto en la mejora de la comunicación y el comportamiento en individuos con TEA. A pesar de ello, la efectividad terapéutica en estos casos sigue siendo discutida, con algunos estudios que la apoyan y otros que presentan resultados divergentes^{278,279}. Más aún, los mecanismos moleculares por los cuales estas dietas podrían representar un beneficio se desconocen. En los últimos años, se han propuesto algunas teorías que podrían sentar las bases para comprender

los beneficios de esta intervención alimentaria en distintas patologías. Una de las claves podría recaer sobre los CCs.

El rol de los cuerpos cetónicos en la restricción calórica y las DCs

En diversos modelos, tanto en invertebrados como nematodos y moscas, como también en varios vertebrados que incluyen desde roedores hasta primates, se han investigado los efectos de la restricción calórica en el aumento de la esperanza de vida²⁸⁰⁻²⁸³. Los beneficios de la restricción calórica (sin déficit nutricional) han sido evidenciados con marcadores de edad, y múltiples líneas de evidencia indican que brindarían una disminución de los factores de riesgo relativos a la patofisiología de la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, cáncer y desórdenes neurológicos^{281,284-288}. La evidencia del potencial beneficio de la restricción calórica se puso de manifiesto incluso hasta en levaduras, en las que se demostró que este régimen aumenta el tiempo de vida cronológico de estos hongos²⁸⁹.

Si bien no existe un consenso generalizado, la extensión de la longevidad parece estar relacionada con una disminución de la señalización a través de la vía de la insulina/receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IIS), vía altamente conservada en todo el reino animal. Como ya vimos, la reducción de IIS disminuye la producción de fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3), lo que lleva a una reducción en la actividad de las quinasas PI3K y AKT y una disminución en la fosforilación del factor de transcripción FOXO. Como resultado, este factor de transcripción permanece en el núcleo, aumentando la transcripción de cientos de genes. Entre ellos, se destacan varios genes que codifican para enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa 2, catalasa, glutatión peroxidasa, etc^{280,290}. En *C. elegans*, el descubrimiento del gen que codifica para el receptor de insulina *daf-2* demostró que la pérdida del mismo duplica la esperanza de vida de estos mutantes, poniendo de manifiesto la importancia de esta vía de señalización en el aumento de la longevidad. Varios autores han propuesto que los beneficios de la restricción calórica podrían deberse, al menos en parte, al aumento de los niveles de CCs^{280,290-292}.

Los CCs son moléculas pequeñas derivadas de lípidos que proporcionan energía a los tejidos cuando hay escasez de glucosa, como en casos de restricción alimentaria o DC. En estos escenarios, después de que se agotan las reservas de glucógeno muscular y hepático, los ácidos grasos se movilizan desde los adipocitos y se transportan al hígado para su conversión en CCs: acetoacetato, β -Hidroxibutirato (β HB) y acetona, siendo el β HB el más abundante en el estado de cetosis. Estos CCs se distribuyen a través de la circulación sanguínea a tejidos metabólicamente activos, como el músculo o el cerebro, donde se metabolizan para producir ATP^{290,292,293}.

Metabolismo y funciones energéticas del β -Hidroxibutirato

El β -Hidroxibutirato (β HB) se ha identificado como un pequeño compuesto derivado de lípidos que actúa como portador de energía del hígado a los tejidos periféricos cuando los niveles de glucosa son insuficientes para cubrir las necesidades energéticas del cuerpo, como durante el ejercicio prolongado, la inanición o la ausencia de carbohidratos en la dieta. En humanos, la concentración sérica de β HB suele estar en bajos niveles del rango micromolar, pero comienza a aumentar a varios cientos de micromoles después de 12 a 16 horas de ayuno, alcanzando de 1 a 2 mM después de 2 días de ayuno y de 6 a 8 mM con inanición prolongada. Los niveles séricos de β HB también pueden alcanzar de 1 a 2 mM después de 90 minutos de ejercicio intenso. Concentraciones por encima de 2 mM también se alcanzan con una dieta cetogénica casi desprovista de carbohidratos. Sin embargo, en ciertas condiciones patológicas, como la cetoacidosis diabética, los cuerpos cetónicos pueden superar los 20 mM²⁹⁴.

Como se mencionó previamente, el β HB se produce en el hígado, principalmente a partir de la descomposición catabólica de los ácidos grasos, y se utiliza como fuente de energía alternativa para el resto del cuerpo cuando los niveles de glucosa no alcanzan para cubrir las demandas metabólicas de los tejidos y órganos. Esto es especialmente importante en el cerebro, donde solo ocurre una cantidad muy limitada de beta-oxidación de ácidos grasos. En las mitocondrias

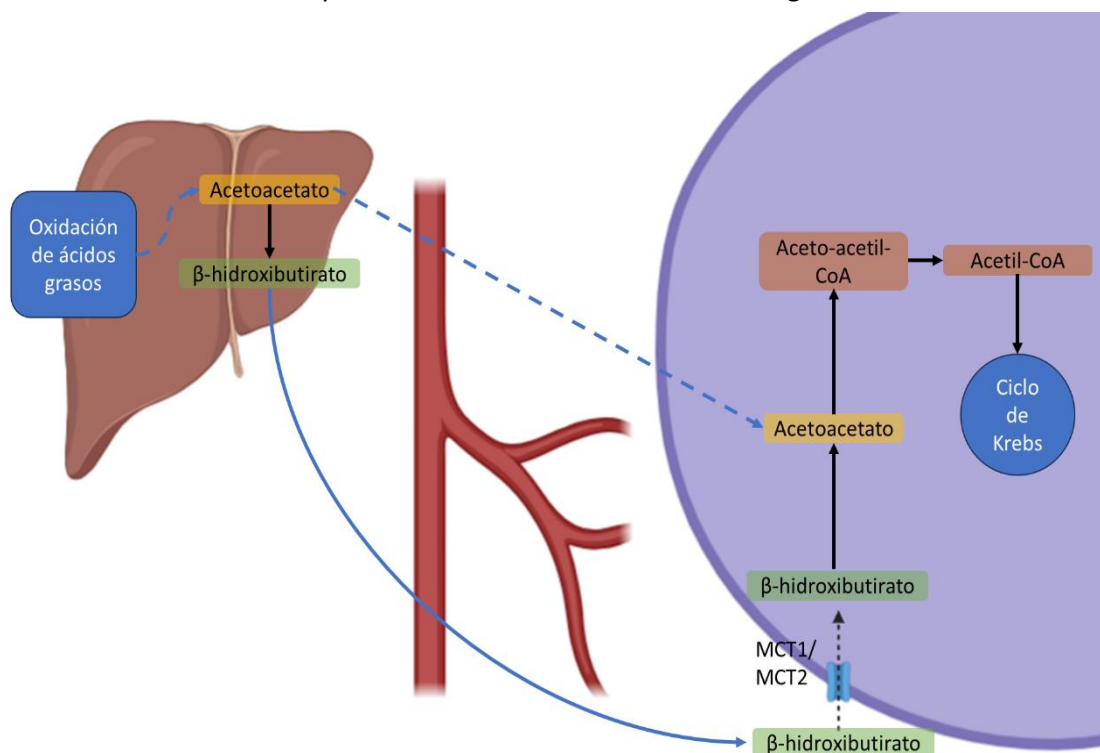


Figura 32. Esquema del metabolismo del β HB. La imagen ilustra el mecanismo general por el cual el β HB llega hasta la célula y es metabolizado en la mitocondria. De igual manera, los precursores del β HB pueden viajar por el torrente sanguíneo e ingresar a las células.

de las células que utilizan el β HB, el mismo se cataboliza a acetoacetato por la β -Hidroxibutirato Deshidrogenasa 1 (BDH1). La reacción está vinculada a la reducción de NAD a NADH, el cual se dirige al complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. El acetoacetato resultante se cataboliza a acetoacetyl-CoA y luego a acetyl-CoA, que se metaboliza como parte del ciclo de Krebs (Fig. 32). Como vimos antes, el β -Hidroxibutirato ha sido descrito como un compuesto mimético de la restricción calórica²⁹⁵. Sus niveles aumentan en el plasma durante la misma; y cuando se administra exógenamente, conduce a la disminución de los niveles de estrés oxidativo. Esto ha despertado un creciente atractivo en el potencial terapéutico de este compuesto.

El β -Hidroxibutirato es un potente regulador epigenético

Tradicionalmente conocido por su papel como fuente alternativa de energía, el β HB ha emergido recientemente como un importante regulador epigenético. La epigenética es un concepto relativo a los cambios en la expresión génica que no implican alteraciones en la secuencia del ADN, y abarca modificaciones tales como la metilación de citosinas, modificación de histonas, etc. Estas modificaciones pueden ser influenciadas por factores ambientales y metabólicos²⁹⁶⁻²⁹⁸. Una de las formas en que el β HB regula la epigenética es a través de la inhibición de las histonas desacetilasas (HDACs)^{299,300}. Las HDACs son enzimas que eliminan grupos acetilo de las histonas y de otras proteínas no histonas tales como NF- κ B, TP53, MYC y MYOD1, entre otros. Si las histonas se encuentran más acetiladas, la cromatina presenta una estructura más laxa, lo que generalmente resulta en una mayor transcripción génica³⁰¹ (Fig. 33 A). El β HB ha demostrado ser un potente inhibidor de las HDACs de clase I y IIa, facilitando la transcripción de genes asociados con la supervivencia celular, la resistencia al estrés y la longevidad^{290,299,300} (Fig. 33 B). Llamativamente, uno de los genes que son reprimidos por la actividad de las HDACs es el gen FOXO3a, lo cual repercute en una menor transcripción de enzimas de las vías antioxidantes^{302,303}. Por otro lado, se demostró también que el β HB posee al menos 44 sitios específicos de unión a residuos de lisina en las histonas, produciendo así una regulación epigenética similar a la acetilación. Este tipo de interacción fue denominada β -Hidroxibutirilación, y aumenta bajo condiciones de hambre y DC en roedores³⁰⁴ (Fig. 33 C). La β -Hidroxibutirilación de las histonas tiene varias consecuencias importantes. En primer lugar, esta modificación epigenética puede aumentar la accesibilidad de la cromatina de igual manera que lo hace al inhibir a las HDACs, facilitando aún más la transcripción de genes que están implicados en la resistencia al estrés, la supervivencia celular y la longevidad. Sin embargo, esta modificación epigenética es aún más compleja, ya que los diferentes sitios de unión del β HB a las histonas pueden tener diversas consecuencias en la modulación de la transcripción génica.

De esta manera, el β HB cumpliría una doble función en contextos de restricción dietaria, reemplazando a la glucosa como metabolito energético, y conectando ampliamente el entorno exterior con la regulación epigenética y la función celular.

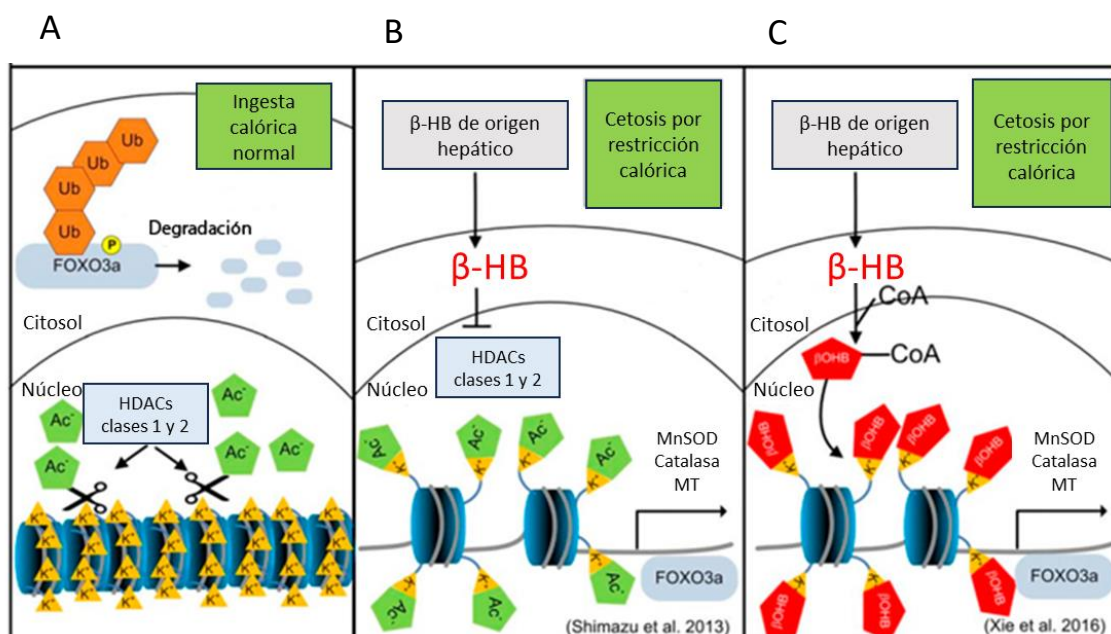


Figura 33. El β -Hidroxibutirato es un potente regulador epigenético. En situaciones de ingesta calórica normal, la actividad de la vía PI3K/AKT culmina en la fosforilación del factor de transcripción FOXO3a, el cual es degradado por ubiquitinación en proteosomas (A). Bajo restricción calórica, el β HB inhibe a las histonas desacetilasas clase 1 y 2 (B); y, alternatively, se une a residuos específicos de lisina en las histonas (C). Cualquiera de las últimas dos situaciones, no mutuamente excluyentes, facilitan la expresión de genes citoprotectores y anti oxidativos río abajo. La inactividad de la vía PI3K/AKT, además, permite la translocación nuclear de FOXO3A. Adaptado de Veech et. al 2017.

El β -Hidroxibutirato como potencial agente terapéutico

Como fue mencionado hasta ahora, existe creciente evidencia de que los CCs podrían ser los responsables de los beneficios observados en la restricción calórica, lo cual ha despertado gran interés en las DCs. Se postula que estas dietas podrían brindar beneficios similares a la restricción calórica, sin la necesidad de importantes ventanas de ayuno^{305,306}. Este enfoque es particularmente interesante debido a que es factible implementar este tipo de dietas en pacientes con TEA. Sin embargo, su implementación no es sencilla y puede requerir un seguimiento especializado y ajustes personalizados en cada paciente. Algunos investigadores, por otro lado, han focalizado el interés directamente en el potencial de los CCs como reemplazo de la restricción calórica y de las DCs^{280,295}. Más aún, varias líneas de evidencia sugieren que el β HB puede aumentar la actividad de las proteínas FOXO, aumentando la expresión de genes río abajo^{305,307,308}. En conjunto, estas características han situado al β HB como uno de los posibles

responsables de los beneficios de estas estrategias nutricionales^{280,290,305}. Este metabolito ha sido objeto de investigación en varios modelos animales. Los beneficios observados en *C. elegans* van desde aumentos en la resistencia al estrés, termotolerancia, tiempo de vida, así como también disminución de agregados proteotóxicos en modelos de Parkinson y Alzheimer²⁹⁰. El potencial de este CC en la regulación de la vía PI3K/AKT no es un dato menor, y despierta la intrigante posibilidad de utilizar al mismo como herramienta terapéutica en los casos en los que la vía se encuentra desregulada, administrándolo de forma exógena, y evitando así la necesidad de implementar complejas dietas.

Objetivos

Diversas hipótesis postulan que el metabolito β HB, característico de las DCs y la restricción dietaria, es capaz de inducir la actividad del factor de transcripción FOXO^{280,292}. Este factor de transcripción resulta de vital importancia para el normal funcionamiento de la célula, los procesos que regulan el ciclo de vida, y la homeostasis en general. Como fue mencionado en la sección previa, DAF-16 (homólogo de FOXO en *C. elegans*) resulta fundamental para el neurodesarrollo, en particular de las neuronas del sistema GABAérgico, las HSNs y las interneuronas AIYs. La falta de actividad de PTEN afecta negativamente a la actividad de FOXO debido a que es el principal modulador negativo de la vía de PI3K/AKT, que lo mantiene inactivo cuando es activada. La modulación positiva de la actividad de FOXO resulta entonces una estrategia terapéutica prometedora en contextos en los que PTEN pierde o disminuye su actividad. En esta sección, se exploró la potencialidad del β HB en la mejora en los defectos comportamentales y morfológicos que previamente describimos en mutantes *daf-18*. Si el β HB es capaz de modular la actividad de DAF-16 como se ha reportado, es posible que este compuesto tenga el potencial de aminorar los fenotipos observados en mutantes *daf-18*, ofreciendo así una posible intervención terapéutica para mejorar los defectos asociados con la disfunción de este gen.

Objetivos específicos

- Evaluar los efectos de la administración exógena del β HB, y particularmente, su potencial para aumentar la actividad del factor de transcripción DAF-16.
- Evaluar el efecto de la suplementación de β HB sobre fenotipos alterados descubiertos en mutantes de *daf-18* y *daf-16*, a saber:
 - Hipersensibilidad a fármacos estimuladores de la señalización colinérgica: aldicarb y levamisol.
 - Deficiencias durante la respuesta de escape disparada por estímulos mecánicos en región anterior (acortamiento excesivo inicial y giros en omega).
 - Morfología alterada en las comisuras de las motoneuronas GABAérgicas, HSNs y AIYs.
 - Respuesta deficiente ante la estimulación optogenética de los sistemas GABAérgico y colinérgico.

Resultados

El β HB aumenta la expresión de SOD-3 en *C. elegans*

Uno de los mecanismos propuestos para los efectos previamente reportados del β HB en *C. elegans* es el aumento de la actividad del factor de transcripción DAF-16. Dicha actividad puede ser evidenciada evaluando los niveles de expresión de sus genes diana, como lo es el gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa SOD-3²⁹⁰. Por ello, decidimos llevar a cabo esta

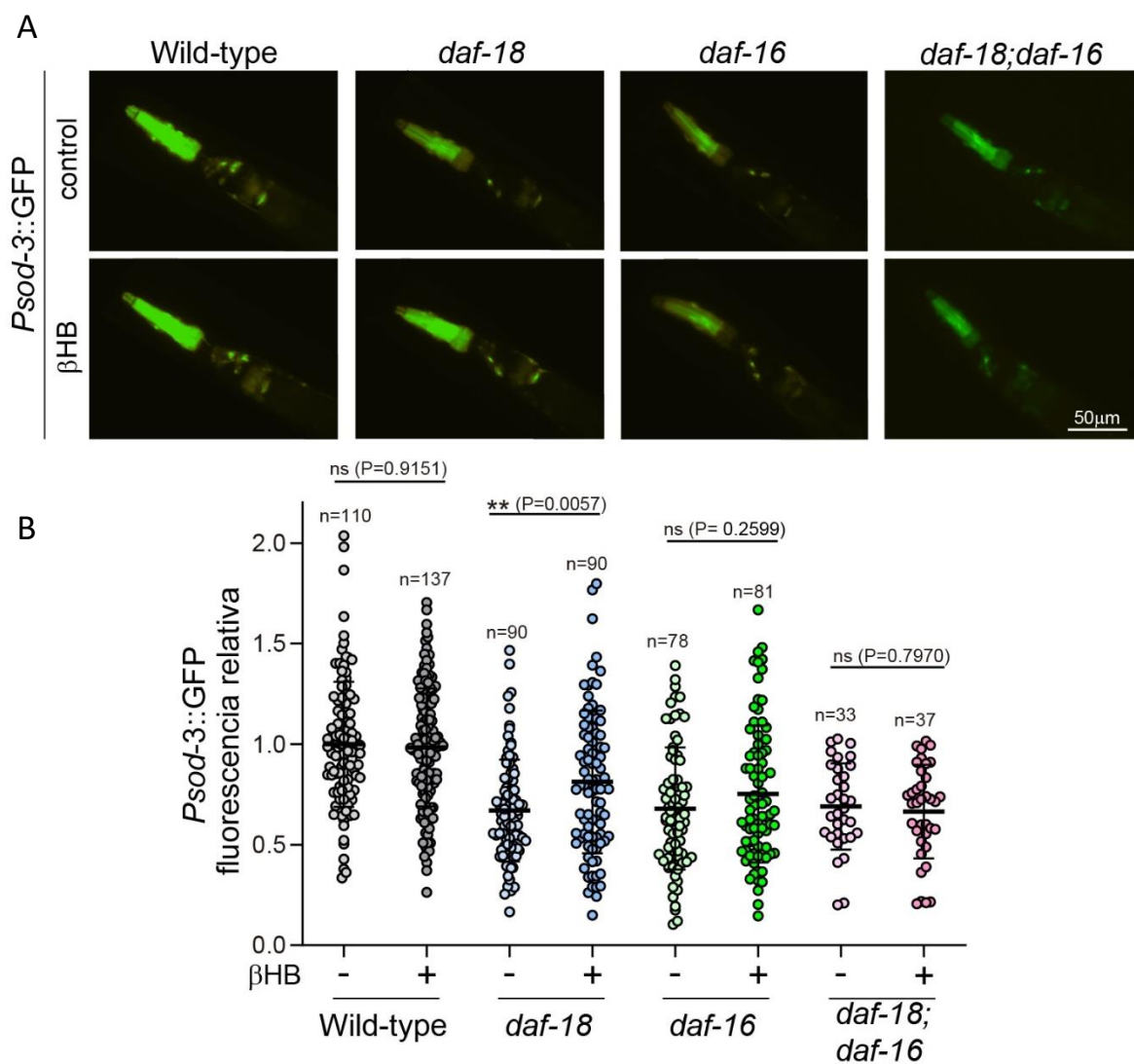


Figura 34. La exposición a β HB induce la expresión de *sod-3* en mutantes *daf-18*, pero no en *daf-16*. Se evaluó la expresión de SOD-3 mediante fluorescencia en animales L4 control y expuestos a β HB (20mM) durante todo el desarrollo. **A.** Imágenes representativas de la fluorescencia. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de cada animal relativizada a la condición no tratada de animales *wild type*. Se llevaron a cabo al menos tres ensayos independientes, utilizando 12 a 20 animales por cada genotipo/ensayo. La significancia estadística entre animales control y tratados de cada cepa se determinó mediante la prueba de Mann-Whitney.

estrategia utilizando una cepa que expresa el reportero transcripcional GFP bajo el promotor de *sod-3*. Adicionalmente, realizamos las cruza genéticas *Psod-3::GFP;daf-18*, *Psod-3::GFP;daf-16* y la doble cruza *Psod-3::GFP;daf-18;daf-16*, para evaluar el efecto del β HB en las mismas. La exposición a β HB fue realizada mediante la incorporación de este compuesto tanto en el medio NGM como en la bacteria utilizada como alimento, y se mantuvo a los animales durante todo su desarrollo hasta el estadio L4, momento en el que determinamos la intensidad de fluorescencia de SOD-3 mediante microscopía. Posteriormente, analizamos los niveles de fluorescencia con el software FIJI Image J. Como era esperado, notamos que tanto los mutantes *daf-18*, así como también *daf-16* y la doble mutante, expresan menores niveles de SOD-3 en condiciones basales que animales *wild type* (Fig. 34). Por otro lado, encontramos que la exposición a β HB aumenta la expresión de SOD-3 en animales *daf-18*, pero no en *daf-16* ni en la doble mutante *daf-18;daf-16* (Fig. 34). El aumento de SOD-3 ante la exposición a β HB parece ser dependiente de DAF-16, lo que respalda el hecho de que este compuesto podría estar elevando la actividad de este factor de transcripción. Llamativamente, no observamos un aumento de la expresión de SOD-3 en animales *wild type*. Esto podría deberse a la alta expresión de esta proteína en condiciones basales, lo cual podría inducir mecanismos regulatorios que limiten la capacidad del β HB para aumentar aún más sus niveles. En base a estos resultados, decidimos evaluar la capacidad del β HB para mitigar los defectos de *daf-18* en aquellos ensayos en los que estos mutantes presentaron fenotipos deficientes.

El β HB revierte algunos fenotipos asociados a la pérdida de *daf-18*

Previamente, observamos que animales *daf-18* presentaron fenotipos evidentes en varios tipos de ensayos, tanto farmacológicos como comportamentales, así como también anomalías en la morfología neuronal. Más aún, estos fenotipos parecen ser el resultado de una menor actividad del factor de transcripción DAF-16. Ya que el β HB parecería poder aumentar la actividad de DAF-16, decidimos evaluar entonces el potencial de este compuesto para revertir los fenotipos de animales *daf-18*, en los que la actividad de DAF-16 se encuentra comprometida. Para comenzar, evaluamos un subconjunto de fenotipos seleccionados para determinar la eficacia inicial del compuesto, y repetimos los ensayos de farmacología y de respuesta de escape utilizando únicamente animales *daf-18* y *wild type* expuestos durante todo su desarrollo a β HB. En estos experimentos, encontramos que la suplementación exógena de β HB redujo significativamente la hipersensibilidad de *daf-18* a los agonistas colinérgicos hasta llegar incluso a los niveles de sensibilidad de animales *wild type* (Fig. 35 A). Más aún, el β HB también fue capaz de rescatar el fenotipo de acortamiento excesivo tras el estímulo mecánico en la región anterior durante la

primera fase de la respuesta de escape, lo cual refuerza la idea de que este cuerpo cetónico es capaz de revertir algunos fenotipos asociados a la pérdida de *daf-18* (Fig. 35 B).

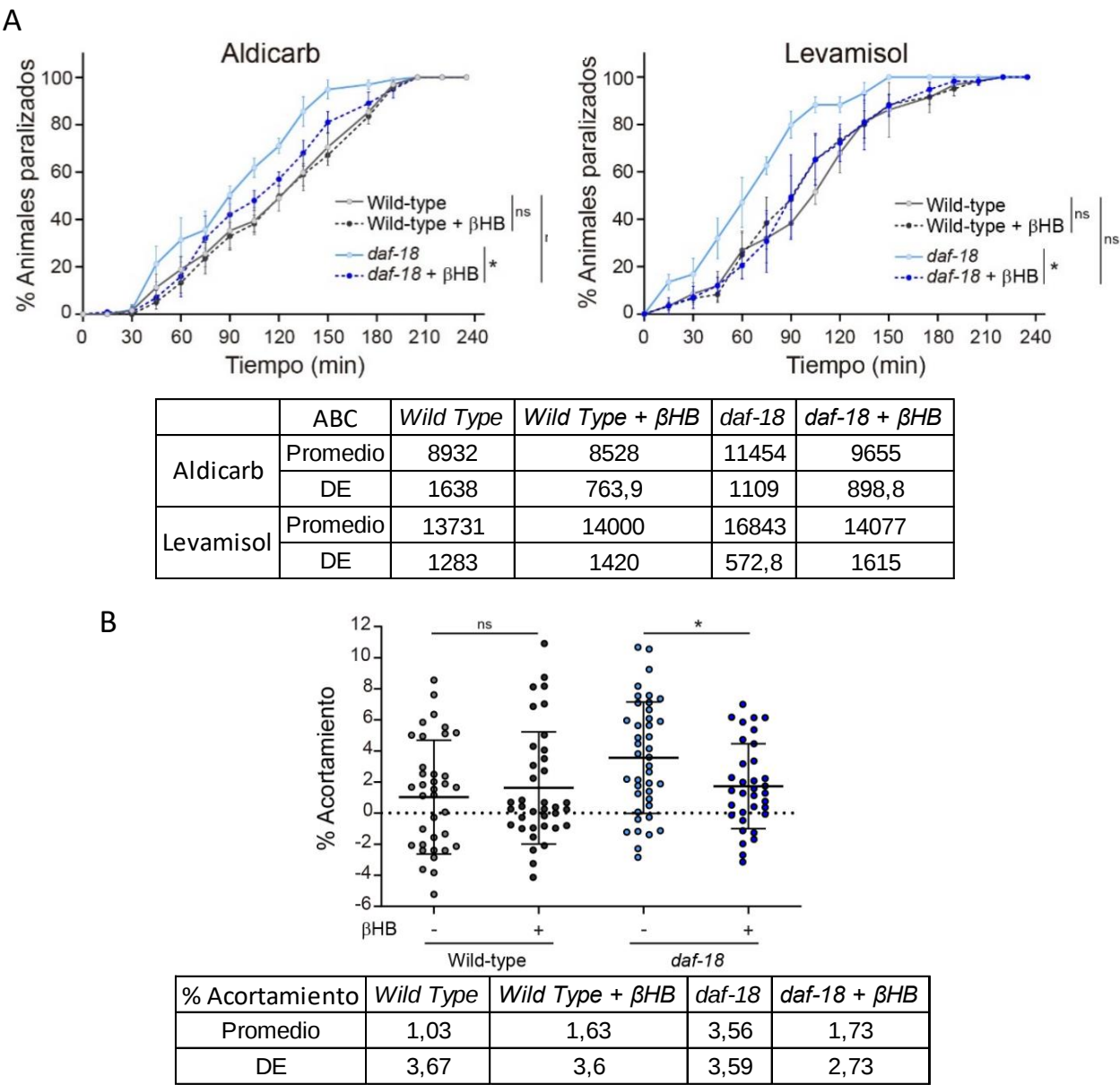


Figura 35. La suplementación con β HB mejora déficits en mutantes *daf-18*. Los animales fueron expuestos a β HB (20 mM) durante todo el desarrollo (desde embrión hasta adultos jóvenes/L4) para evaluar un subconjunto de fenotipos seleccionados. **A.** Porcentaje de animales paralizados en función del tiempo tras el contacto inicial con agonistas colinérgicos. Se realizaron al menos cuatro experimentos independientes para cada condición, utilizando aproximadamente 20-25 animales por genotipo/ensayo. El análisis estadístico fue la prueba t de Student para comparar animales tratados y no tratados con β HB, utilizando el área bajo la curva (ABC) de cada ensayo. **B.** Medición de la longitud corporal en respuesta al estímulo mecánico anterior. Se realizaron tres experimentos independientes, con 30-40 animales por genotipo/ensayo distribuidos en tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba t de Student para comparar animales tratados y no tratados con β HB.

El β HB actúa a través de la modulación positiva de DAF-16

Tras validar el potencial del β HB para aminorar los fenotipos observados en animales *daf-18*, decidimos profundizar nuestro estudio, evaluando el efecto de la exposición de este compuesto tanto en animales *daf-18* como también *daf-16* para determinar si el factor de transcripción DAF-16 tiene un rol protagónico en el mecanismo de acción del mismo. Como demostramos en experimentos previos, la estimulación optogenética sobre el sistema de señalización

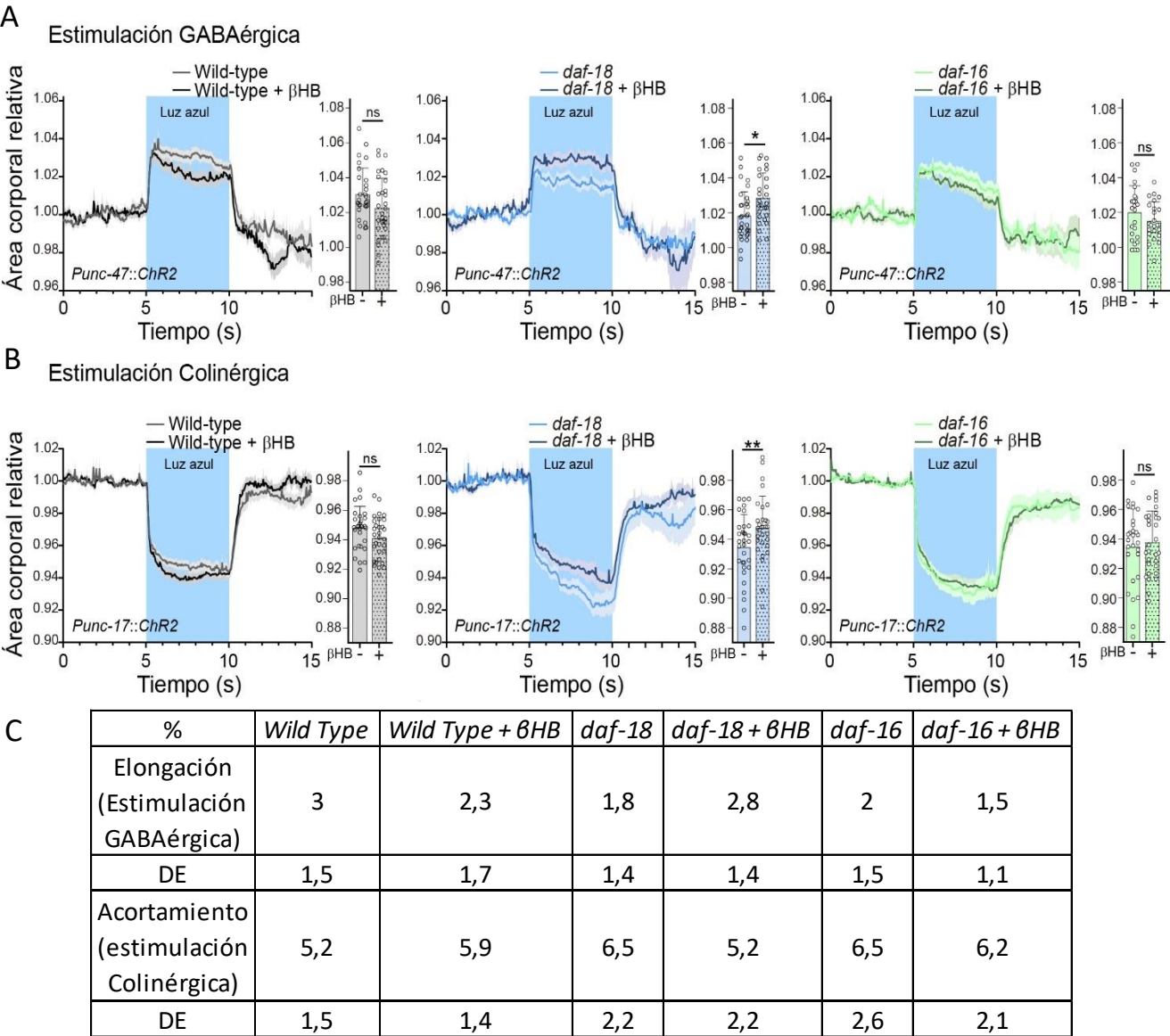
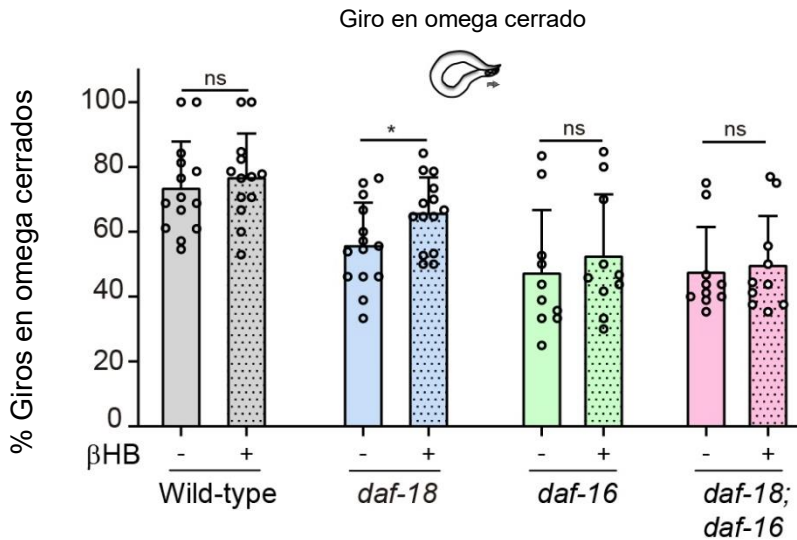


Figura 36. El β HB mejora la respuesta motora de animales *daf-18* ante estímulos optogenéticos selectivos sobre las motoneuronas GABAérgicas y colinérgicas. Resultados de la estimulación de la actividad neuronal mediante optogenética en animales expresando ChR2 en motoneuronas GABAérgicas (**A**) y colinérgicas (**B**) durante un pulso de luz de 470 nm de 5 segundos sobre animales control y expuestos a β HB 20 mM durante todo el desarrollo. En cada gráfico se muestra la variación del área corporal relativa en función del tiempo (izquierda) y la cuantificación del área bajo la curva (media $\pm$ DE) para comparar los cambios inducidos por la luz entre diferentes cepas (derecha). Los cambios pueden expresarse en función del porcentaje de la variación en la longitud corporal (**C**). La exposición a β HB revirtió los defectos en mutantes *daf-18*, pero no en mutantes *daf-16*, indicando que β HB actúa a través de la modulación del factor de transcripción DAF-16. Se utilizaron entre 25 a 35 animales por genotipo, repartidos en al menos 3 ensayos independientes. Los datos se representan como media $\pm$ DE. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student.

GABAérgico induce la relajación general del cuerpo con el consecuente aumento de su longitud, mientras que la estimulación sobre el sistema colinérgico produce una contracción súbita que resulta en la disminución momentánea de la longitud total. Como también vimos previamente, mutantes *daf-18* y *daf-16* presentan un aumento menor en la longitud del cuerpo luego de una estimulación GABAérgica y una contracción exagerada ante estimulación selectiva del sistema colinérgico. Al repetir estos ensayos incubando previamente a estos animales con β HB, encontramos que el compuesto es capaz de revertir los defectos en mutantes *daf-18*, pero no en mutantes *daf-16* (Fig. 36). Estos resultados respaldan la hipótesis de que el mecanismo de acción del β HB podría ser explicado, tal como fue sugerido, a través del aumento de la actividad del factor de transcripción DAF-16.

En el mismo sentido, encontramos que únicamente los mutantes *daf-18* tratados con este compuesto mostraron un aumento significativo en la proporción de giros en omega cerrados durante la respuesta de escape en comparación con la condición no tratada (Fig. 37). Si bien esta mejora es sutil y parcial, resulta notorio que la exposición a β HB no mejoró el desempeño de animales *daf-16*. Más aún, la doble mutante *daf-18;daf-16* tampoco mejoró su desempeño en este ensayo, resultado que ratifica que este compuesto estaría actuando a través de la modulación del factor de transcripción DAF-16 (Fig. 37).

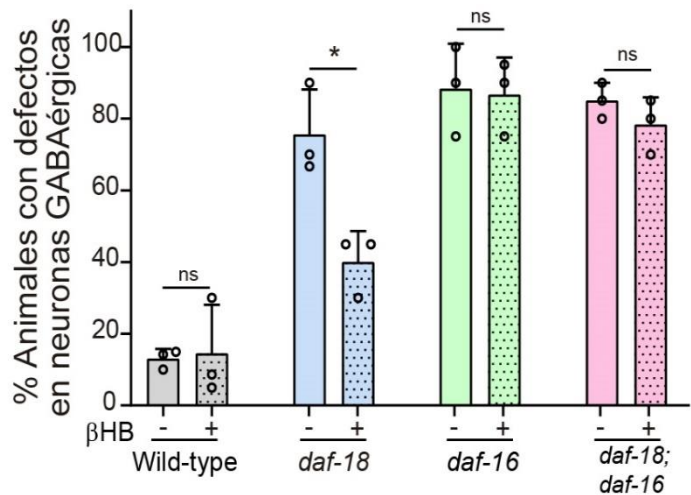


% Giro en omega cerrado	Wild Type	Wild Type + β HB	<i>daf-18</i>	<i>daf-18</i> + β HB	<i>daf-16</i>	<i>daf-16</i> + β HB	<i>daf-18;daf-16</i>	<i>daf-18;daf-16</i> + β HB
Promedio	73,49	76,73	55,81	65,75	47,38	52,59	47,6	49,71
DE	14,29	13,55	13,17	11,06	19,34	18,99	13,88	15,12

Figura 37. El β HB aumenta la proporción de giros en omega cerrados de mutantes *daf-18* durante la respuesta de escape. Cuantificación de giros en omega cerrados sobre el total de giros durante la respuesta de escape en animales L4 control y expuestos a β HB 20 mM durante todo el desarrollo. Se realizaron al menos ocho ensayos independientes para cada condición, utilizando aproximadamente 20 animales por genotipo/ensayo. Los resultados se presentan como media $\pm$ DE. Para la comparación estadística entre animales tratados y sus controles se utilizó la prueba t de Student.

Animales tratados con β HB presentan una menor incidencia de defectos morfológicos en motoneuronas GABAérgicas

En virtud de la correlación que encontramos previamente entre los resultados de los ensayos farmacológicos, comportamentales, y la morfología neuronal; el siguiente paso lógico fue continuar explorando el efecto que este compuesto puede tener sobre los procesos que regulan el desarrollo y/o mantenimiento de las neuronas GABAérgicas, también afectadas por la pérdida de *daf-18*. Notablemente, al evaluar las comisuras de las motoneuronas GABAérgicas de animales expuestos a β HB durante todo el desarrollo, encontramos una considerable reducción de defectos en mutantes *daf-18* (Fig. 38). De manera consistente con los resultados observados para los ensayos comportamentales, la exposición a β HB no redujo los defectos en neuronas



% Animales con defectos	Wild Type	Wild Type + β HB	<i>daf-18</i>	<i>daf-18</i> + β HB	<i>daf-16</i>	<i>daf-16</i> + β HB	<i>daf-18;daf-16</i>	<i>daf-18;daf-16</i> + β HB
Promedio	13,1	14,57	75,56	40	88,33	86,67	85	78,33
DE	2,705	13,49	12,62	8,66	12,58	10,41	5	7,638

Figura 38. El β HB reduce los defectos de las comisuras GABAérgicas en mutantes *daf-18* de manera dependiente de DAF-16. Cuantificación de defectos en las comisuras en neuronas GABAérgicas en animales L4 control y expuestos a β HB 20 mM durante todo el desarrollo. Se realizaron tres ensayos independientes para cada condición, utilizando aproximadamente 20 animales por genotipo/ensayo. Los resultados se presentan como media $\pm$ DE. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student.

GABAérgicas en mutantes *daf-16* ni en la doble mutante *daf-18;daf-16*. En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de que el β HB tendría el potencial de mejorar los defectos asociados a la pérdida de *daf-18*, a través de la modulación positiva del factor de transcripción DAF-16. En este sentido, vale la pena recordar que las motoneuronas GABAérgicas no son las únicas que presentan aberraciones morfológicas en mutantes *daf-18*. Como vimos previamente, a la fecha existen reportados al menos dos pares de neuronas en las que estos mutantes también presentan defectos; a saber: 1) HSNs, las cuales presentan un fenotipo de submigración tras la pérdida de *daf-18*¹⁸⁷; y 2) AIYs, un par de interneuronas que en estos mutantes detienen

prematuramente su desarrollo quedando “truncas”⁶⁹. En base a esto, nos preguntamos entonces si este compuesto es capaz de prevenir o revertir los defectos de estas neuronas.

El β HB tiene efectos selectivos sobre las motoneuronas GABAérgicas, actuando a través de mecanismos específicos

Para evaluar si el β HB es capaz de compensar los defectos ocasionados por la pérdida de función de *daf-18* en las neuronas AIYs y HSNs, realizamos las cruza genéticas *daf-18(ok480);mglS18[Pttx-3::GFP]* (mutante nulo *daf-18* con un reportero fluorescente en interneuronas AIYs) y *daf-18(ok480);[Ptph-1::GFP]* (mutante nulo *daf-18* con reportero fluorescente en neuronas HSNs). En línea con lo reportado en la bibliografía, pudimos corroborar que la pérdida de *daf-18* produce un truncamiento prematuro de las interneuronas AIYs en el 100% de los animales (Fig 39 A); y distintos grados de sub migración de al menos una o las dos

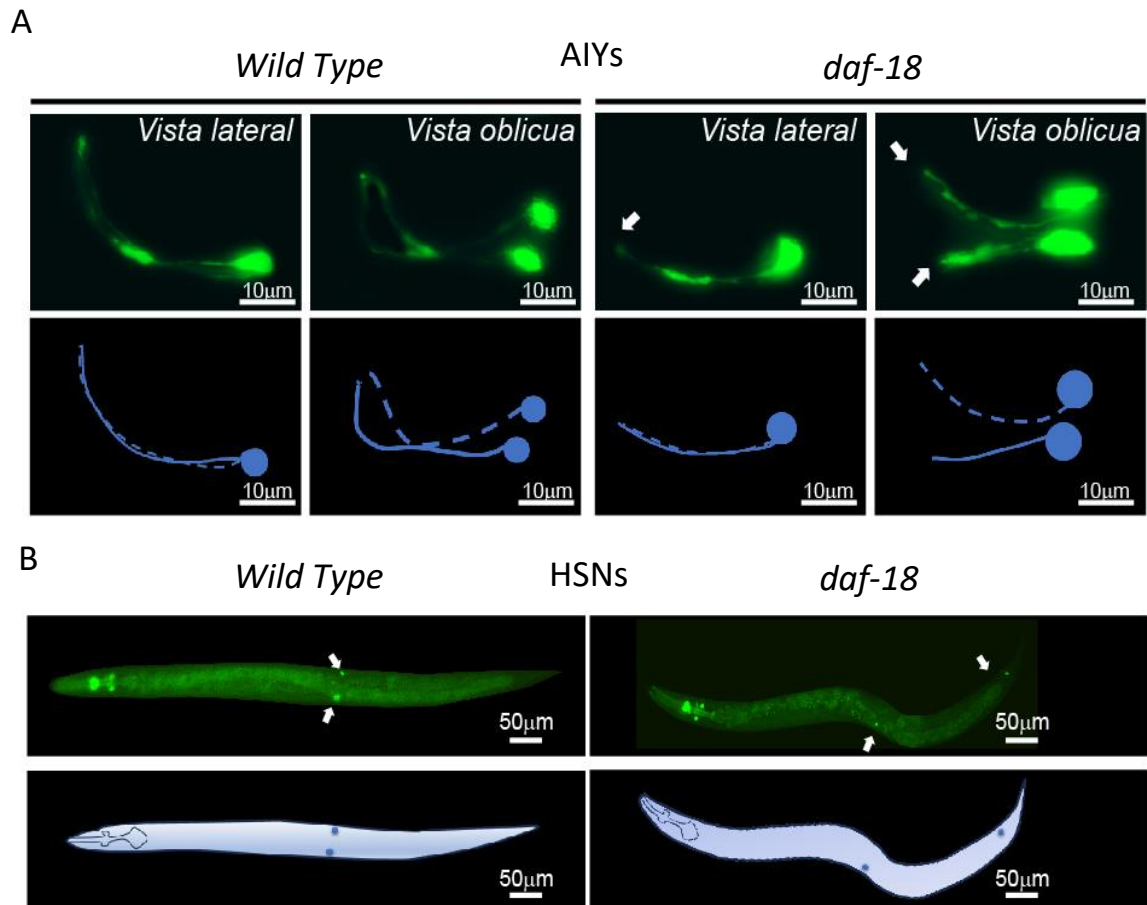


Figura 39. La pérdida de *daf-18* compromete el normal desarrollo de las neuronas AIYs y HSNs. A. Animales *daf-18(ok480);mglS18[Pttx-3::GFP]* expresando GFP en interneuronas AIYs. Las figuras de los cuadros inferiores muestran una representación esquemática de la imagen para facilitar la visualización, indicando con líneas de puntos el axón que está en un plano más profundo. Mutantes *daf-18* muestran un truncamiento prematuro de los axones en el 100% de los casos (flechas blancas). **B.** Animales *daf-18(ok480);[Ptph-1::GFP]* expresando GFP en neuronas serotoninérgicas. Las ilustraciones de los cuadros inferiores representan esquemáticamente la ubicación de los somas correspondientes a las imágenes originales. Mutantes *daf-18* presentan distintos grados de sub migración en al menos una o ambas neuronas HSNs en un gran porcentaje de los casos (flechas blancas).

HSNs en un gran porcentaje de los animales (Fig. 39 B). A continuación, incubamos animales con β HB durante todo el desarrollo, para evaluar la morfología bajo microscopio. La evaluación de las AIYs se realizó en el estadio L4, mientras que las HSNs se evaluaron en estadio adulto joven para una mejor visualización de las mismas. Llamativamente, la incubación con β HB no mostró tener eficacia para evitar o revertir estos fenotipos morfológicos en las HSNs ni en las

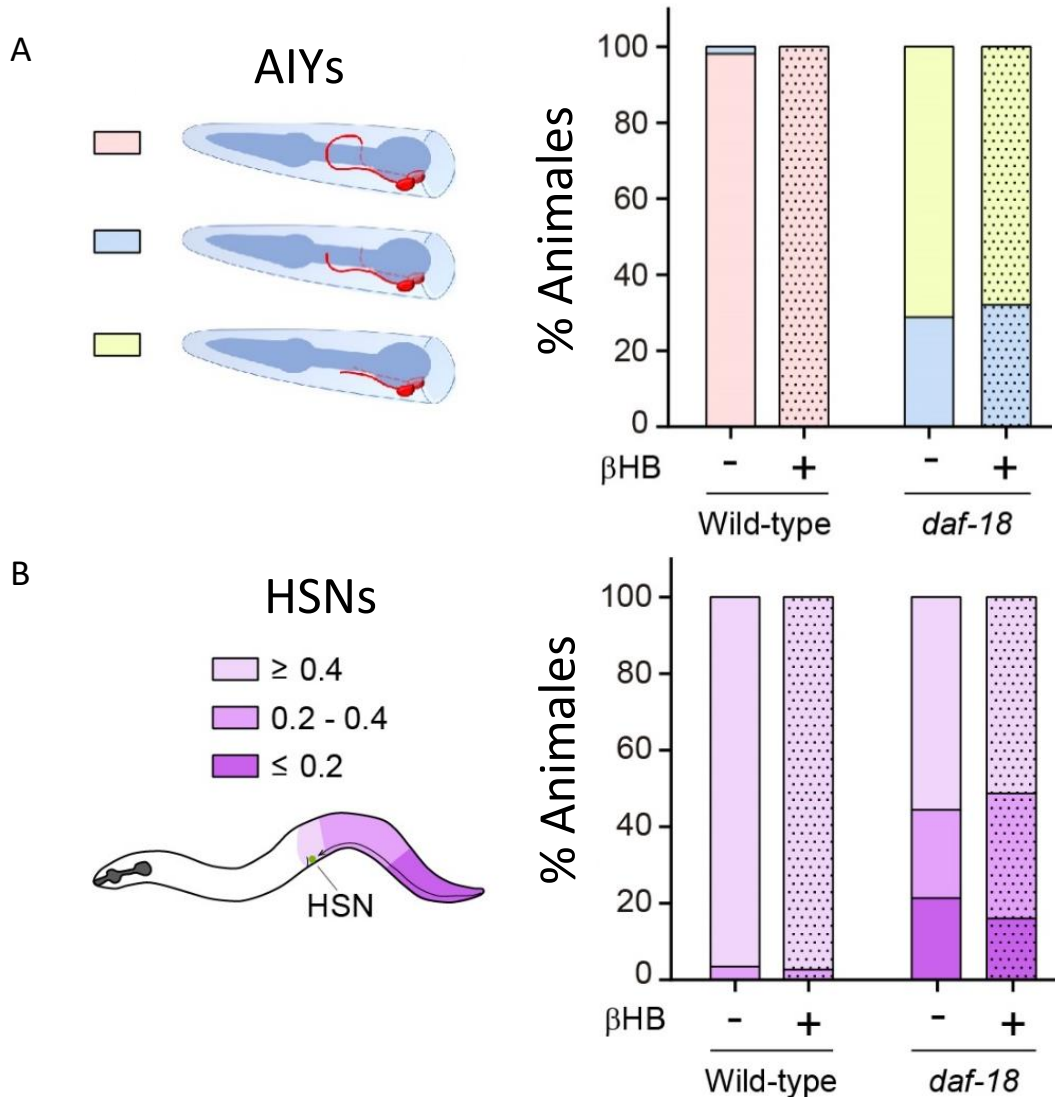


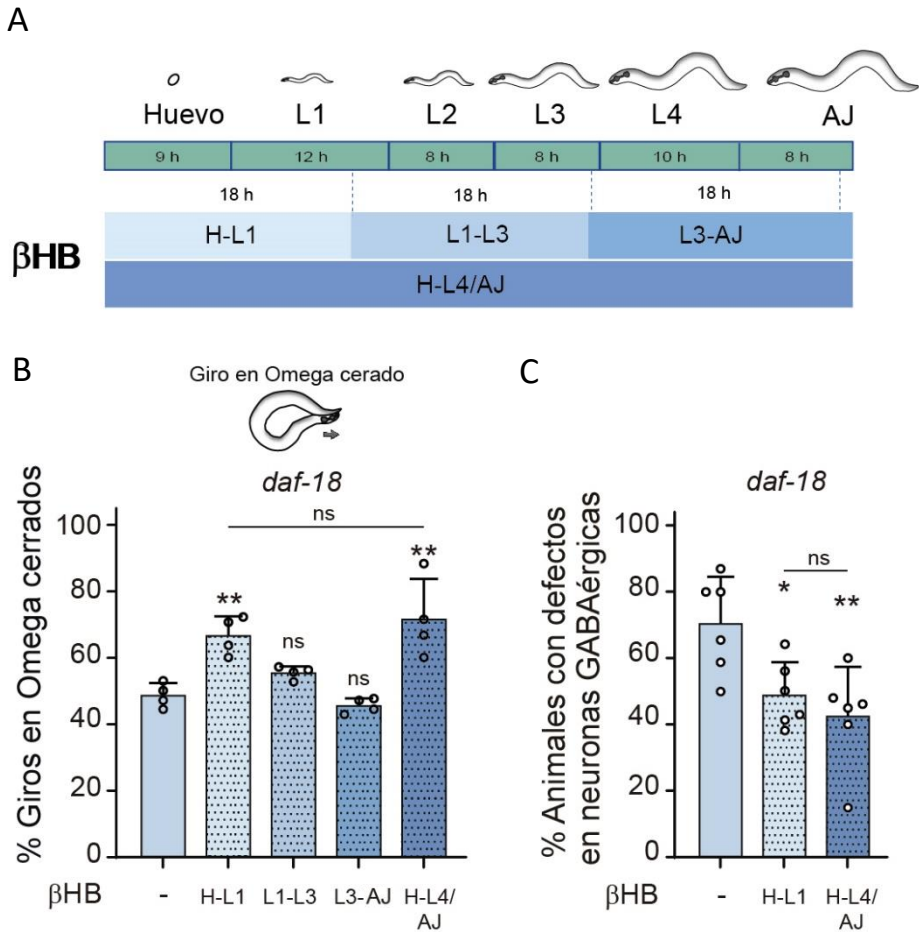
Figura 40. El β HB no previene los defectos de las neuronas AIYs y HSNs en animales *daf-18*. **A.** Los procesos de las AIYs se visualizaron en animales L4 que expresan GFP en neuronas AIYs (*Pttx-3b::GFP*). Izquierda: Esquema de la morfología y criterios para la clasificación del nivel de truncamiento (ver materiales y métodos). Rosa: Normal. Celeste: intermedio. Amarillo: severo. Derecha: Cuantificación de los defectos en animales control o bajo exposición a β HB (20 mM). **B.** Se visualizaron las HSNs en animales que expresan GFP en neuronas serotoninérgicas (*Ptph-1::GFP*). Izquierda: Esquema de la ruta migratoria de una HSN durante la embriogénesis y la posición normal aproximada del soma (círculo verde) en un animal adulto joven. Se ilustra solo una de las dos HSNs bilaterales. La clasificación se basa en la ubicación del soma en relación con la longitud del cuerpo, expresada como una proporción: púrpura claro (≥ 0.4 , migración completa), púrpura intermedio ($>0.2 - <0.4$, migración deficiente intermedia), púrpura oscuro (≤ 0.2 , migración deficiente severa). Derecha: Cuantificación del porcentaje de animales con diferentes posiciones de migración (se consideró la neurona que menos migró en cada animal). Se analizaron adultos jóvenes control y bajo exposición a β HB (20 mM). Las barras representan los valores medios de al menos tres experimentos independientes.

interneuronas AIYs (Fig. 40 A y B), indicando que los procesos biológicos que gobiernan el desarrollo y/o mantenimiento de las mismas podría ser diferente al de las motoneuronas GABAérgicas. A pesar de que se ha reportado que estas neuronas se ven afectadas por la deficiente o nula actividad de DAF-16, la efectividad del β HB en prevenir o revertir estos fenotipos parece ser selectiva y específica de motoneuronas GABAérgicas.

El β HB podría prevenir los defectos de *daf-18* al actuar en una ventana crítica del desarrollo

En los experimentos anteriores, se expuso a los animales a β HB durante todo el desarrollo, desde las etapas embrionarias hasta la etapa larvaria L4 o adulto joven, estadios donde se realizaron los ensayos. Este período de exposición es prolongado, y excede largamente al momento en el que las neuronas GABAérgicas completan su desarrollo. Como mencionamos, mientras que las motoneuronas VD son de desarrollo postembrionario y completan su diferenciación entre los estadios L1-L2; las DD son de desarrollo embrionario, estando ya presentes en el estadio L1 temprano. Por ello, nos preguntamos si hay un período crítico durante el desarrollo en el que se requiere la acción de β HB para prevenir defectos en las mismas. Para responder a este interrogante, realizamos tres ventanas de exposición de 18 horas en diferentes grupos de animales. En cada grupo, los animales fueron expuestos al compuesto solo durante las ventanas temporales indicadas. La primera exposición fue realizada durante las 18 horas siguientes a la puesta del huevo, abarcando el desarrollo embrionario *ex utero* y las primeras 8-9 horas de la etapa L1 (etapa H-L1). La segunda ventana de exposición incluyó la parte final de la etapa L1, toda la etapa L2 y la mayoría de la etapa L3 (L1-L3). La tercera ventana abarcó la parte final de la etapa L3, toda la etapa L4 y las primeras 6-7 horas de la etapa adulta (L3-AJ). Además, también incluimos un grupo que nuevamente estuvo expuesto desde huevo hasta 6-7 horas de la etapa adulta. Esta última ventana de exposición, al ser similar a la utilizada en los ensayos anteriores (H-L4), la denominamos H-L4/AJ. Los animales cuyo período de exposición finalizó antes del momento de ser evaluados, fueron transferidos a placas sin β HB para que continúen su desarrollo sin la presencia de la droga. Finalmente, evaluamos el porcentaje de giros en omega en el ensayo de respuesta de escape en el estadio AJ para todos los grupos (Fig. 41 A). Curiosamente, la exposición a β HB durante el desarrollo temprano (H-L1) resultó suficiente para aumentar la performance de los mutantes *daf-18*, mientras que las exposiciones al compuesto durante etapas juveniles posteriores (L1-L3 o L3-AJ), no fueron capaces de mejorar la respuesta de escape de estos animales (Fig. 41 B). Nuevamente, la exposición durante todo el desarrollo (H-L4/AJ) mostró tener el potencial de aumentar el porcentaje de giros en omega. En este contexto, decidimos evaluar la ventana de exposición más temprana (H-L1) y su efecto sobre la morfología de las motoneuronas GABAérgicas afectadas en estos mutantes. La exposición

durante el desarrollo temprano de los animales a β HB (H-L1) fue suficiente para reducir los defectos morfológicos observados en las motoneuronas GABAérgicas de animales *daf-18*, de igual manera que la exposición más larga (H-L4/AJ) (Fig. 41 C).



% Giro en omega cerrado	Control	H-L1	L1-L3	L3-AJ	H-L4/AJ	% Animales con defectos	Control	H-L1	H-L4/AJ
Promedio	48,61	66,6	55,4	45,49	71,58	Promedio	70,22	48,69	42,36
DE	3,672	5,77	1,953	2,237	12,05	DE	14,37	9,921	14,96

Figura 41. La exposición durante el desarrollo temprano a β HB es suficiente para reducir los defectos del sistema GABAérgico en animales *daf-18*. **A.** Los animales fueron expuestos a β HB durante periodos de 18 horas en diferentes etapas del desarrollo: i) H-L1, la cual cubrió el desarrollo embrionario *ex utero* (~ 9 h) y las primeras 8-9 h de la etapa L1; ii) L1-L3, la cual cubrió la última parte de la etapa L1 (~3-4 h), toda la etapa L2 (~8 h) y la mayor parte de la etapa L3 (~6-7 h); iii) L3-AJ, que abarcó la última parte de la etapa L3 (~1-2 h), toda la etapa L4 (~10 h) y las primeras 6-7 h como adultos; y iv) H-L4/AJ, la cual indica exposición durante todo el desarrollo. **B.** Cuantificación de giros en omega cerrados en *daf-18*. **C.** Cuantificación de defectos en las comisuras GABAérgicas. Se realizaron cuatro y seis ensayos independientes para cada condición en B y C, respectivamente; utilizando aproximadamente 20-25 animales por genotipo/ensayo. Los resultados se presentan como media $\pm$ DE. Se realizó un ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey para las comparaciones múltiples.

Para esclarecer aún más el momento crítico en el cual el β HB tiene su efecto, repetimos este experimento con dos nuevas ventanas temporales de exposición, una para cada grupo de animales. El primer grupo fue expuesto desde huevo hasta la eclosión de los mismos, finalizando la exposición en el estadio L1 temprano. Este grupo de animales fue analizado bajo microscopio

tanto en el estadio L1 (donde solamente las DD están presentes) como también en el estadio L4. Para el segundo grupo, repetimos a modo de control el tiempo de exposición de 18 horas comenzando la exposición desde la puesta de los huevos, para ser luego analizados en el estadio L4 (Fig. 42). Llamativamente, la exposición breve de 9 horas durante la cual se da el desarrollo embrionario *ex utero*, no fue capaz de mitigar los defectos morfológicos, probablemente por la impermeabilidad del huevo al β HB. Debido a que nuevamente observamos mejoras en animales expuestos durante 18 horas al β HB, parece probable que el β HB actúe en etapas muy tempranas del desarrollo en el estadio L1 reduciendo los defectos morfológicos del sistema GABAérgico producto de la pérdida de *daf-18*.

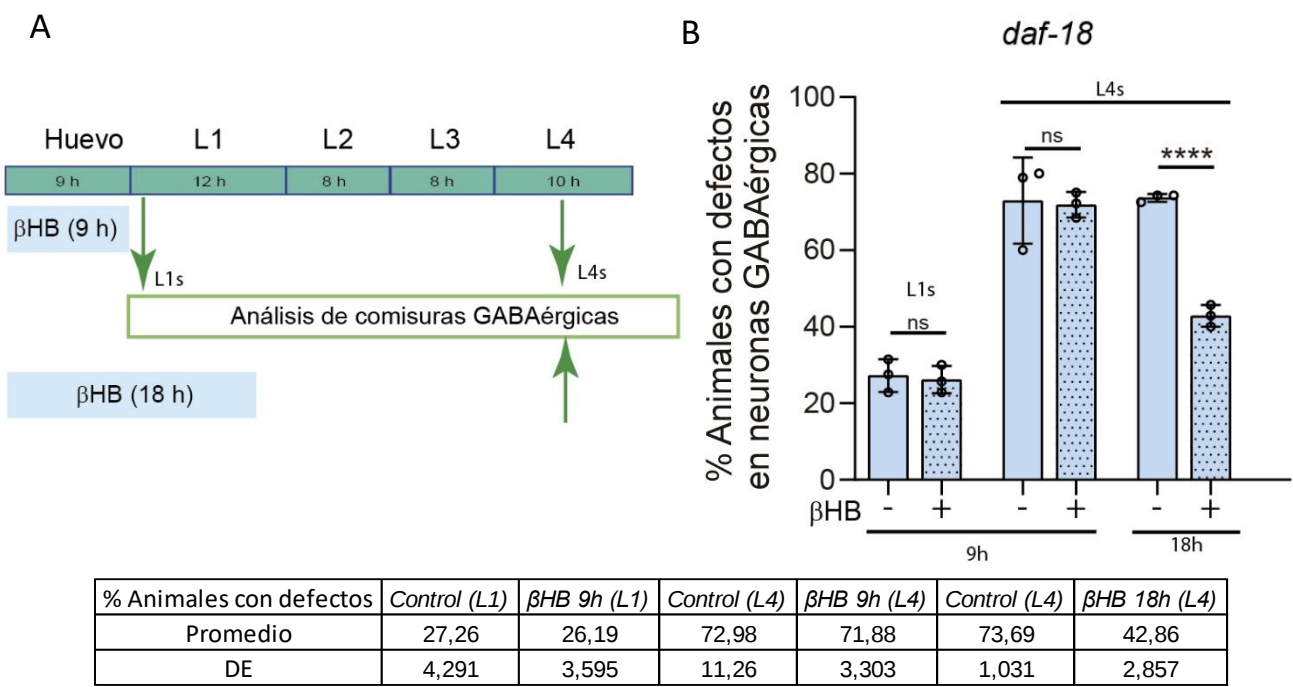


Figura 42. El β HB no previene los defectos de neuronas GABAérgicas cuando se suministra exclusivamente durante el desarrollo embrionario *ex utero*. **A.** Diseño experimental. Los animales fueron expuestos a β HB en dos ventanas temporales distintas: i) desde la puesta del huevo hasta la eclosión (finalizando en estadio L1 temprano) y ii) durante 18 horas desde la puesta del huevo, como control. Los animales del primer grupo fueron analizados en los estadios L1 y L4, mientras que el segundo grupo fue analizado únicamente en el estadio L4. **B.** Comparación de defectos morfológicos entre los animales expuestos 9 horas, y aquellos expuestos durante 18 horas. Se realizaron tres ensayos independientes por condición, utilizando aproximadamente 20-25 animales por genotipo/ensayo. Los resultados se presentan como media $\pm$ DE. Se utilizó una prueba t de Student para el análisis estadístico.

Discusión

La búsqueda de tratamientos para los desórdenes del neurodesarrollo, y particularmente el TEA, está en constante desarrollo y evolución. Aunque aún no existe un tratamiento definitivo para el TEA, se han realizado avances significativos en la comprensión de este trastorno que han ayudado a desarrollar algunos abordajes terapéuticos. En esta sección, realizamos un abordaje general a diferentes tipos de tratamientos utilizados en la actualidad. Tanto este tipo de trastornos, así como también muchos otros relacionados con el neurodesarrollo, carecen de terapias totalmente efectivas.

Las opciones terapéuticas disponibles que han demostrado cierto grado de eficacia pueden ser clasificadas en tratamientos comportamentales, farmacológicos y dietarios. Los abordajes comportamentales, apuntan a una mejora en la calidad de vida de los individuos afectados por TEA y sus familias, mediante un abordaje intensivo educacional y de entrenamiento de aspectos básicos del aprendizaje, en los cuales se busca mejorar al máximo posible las habilidades sociales y educacionales de estos individuos. Las estrategias farmacológicas, por su parte, abarcan el uso de fármacos con efectividad comprobada para el tratamiento de síntomas relativos a las comorbilidades comunes al TEA. Sin embargo, como vimos, las drogas utilizadas pueden no ser efectivas, o ser parcialmente efectivas, sin contar con los posibles efectos secundarios y la tolerancia a las mismas. Además, este enfoque apunta a mejorar ciertos aspectos de la sintomatología de las comorbilidades, sin resolver el origen del problema ni atacar a los síntomas centrales del TEA²¹. Por otro lado, las estrategias dietarias han demostrado ser prometedoras en ciertos tipos de trastornos. Entre las más conocidas, se ha sugerido que las DCs pueden resultar efectivas para algunos pacientes que presentan trastornos caracterizados por desequilibrios E/I, como es el caso de la epilepsia refractaria y algunos casos de TEA. No obstante, poco se sabe del mecanismo por el cual otorgarían beneficios, ni tampoco el perfil de los pacientes en los cuales las mismas podrían dar resultados alentadores.

En esta sección, hemos optado por una intervención dietaria basada en el metabolito β HB como objetivo de estudio debido a la gran cantidad de evidencia que respalda su potencial beneficio clínico. Este compuesto, que se genera de manera endógena bajo condiciones de restricción calórica y dietas libres de carbohidratos, es uno de los candidatos que permitirían explicar los mecanismos benéficos de estos regímenes alimentarios. Aparte de sus funciones energéticas, se ha demostrado que el β HB participa en mecanismos de señalización celular y epigenéticos, y que administrado de forma exógena es capaz de aumentar la actividad del factor de

transcripción FOXO en mamíferos. Esta característica convierte al β HB en un candidato prometedor para una estrategia terapéutica destinada a contrarrestar la baja actividad de FOXO producto de mutaciones en *PTEN*. En la primera sección, observamos que en *C. elegans*, mutantes *daf-18* exhiben fenotipos defectuosos compatibles con un desequilibrio E/I, presumiblemente debido a defectos en el sistema GABAérgico inhibitorio. Estos defectos son ocasionados por la pérdida de función o la baja actividad del factor de transcripción DAF-16. Por este motivo, los animales *daf-18* resultan un modelo interesante para poner a prueba la capacidad del β HB de aminorar los fenotipos defectuosos asociados a esta mutación. Por lo tanto, en esta sección, nos propusimos evaluar la capacidad del β HB para prevenir o revertir estos fenotipos. En mutantes *daf-18*, observamos que la exposición a este compuesto aumenta la expresión de SOD-3, una proteína diana de DAF-16, lo que permite evidenciar el aumento de la actividad de este factor de transcripción^{290,309,310}. Más aún, en mutantes *daf-16*, el compuesto no mostró un aumento en la expresión de SOD-3, indicando que este efecto del β HB depende efectivamente de la actividad de DAF-16. En un análisis inicial, observamos que animales *daf-18* incubados con β HB mostraron un acortamiento similar al de animales *wild type* en la respuesta de escape ante un estímulo mecánico, y perdieron la hipersensibilidad a los fármacos estimulantes de la actividad colinérgica aldicarb y levamisol. Estas pruebas demostraron que el compuesto tiene la capacidad de revertir algunos defectos de *daf-18*, por lo que decidimos evaluar su potencial para revertir el resto de los fenotipos previamente caracterizados. Pudimos comprobar que el β HB rescata los fenotipos de sobrealargamiento e hipercontracción tras la estimulación optogenética en los sistemas GABAérgico y colinérgico, respectivamente. Sin embargo, estos efectos no fueron observados en mutantes *daf-16*. La incubación con β HB también logró aumentar el porcentaje de giros en omega cerrados durante la respuesta de escape tras estimulación mecánica en *daf-18*, pero no así en mutantes *daf-16*. Por otro lado, uno de los resultados más impactantes que obtuvimos fue la reducción significativa de los defectos morfológicos de las motoneuronas GABAérgicas de mutantes *daf-18* tras la incubación con β HB. En relación con esto, comprobamos que una breve exposición al β HB durante el desarrollo temprano fue suficiente para revertir estos defectos morfológicos, así como también para mejorar la ejecución de los giros en omega en los ensayos de comportamiento. De forma notoria, ninguno de estos defectos fue corregido en mutantes *daf-16* ni en los mutantes dobles *daf-18;daf-16*. Este compuesto, sin embargo, resultó incapaz de prevenir o revertir los defectos asociados al desarrollo de las neuronas AIYs y HSNs de mutantes *daf-18*.

En base a estos resultados, surgen varios aspectos que merecen ser analizados. Como ya fue discutido en la sección anterior, *daf-18* y *daf-16* se caracterizan por una serie de defectos que

se evidencian en experimentos farmacológicos y comportamentales usualmente utilizados como *screenings* rápidos para detectar animales con posibles desbalances entre los sistemas de excitación e inhibición. Estos fenotipos, a su vez, se correlacionan fuertemente con aquellos observados en los ensayos de optogenética, y más aún con los defectos morfológicos observados en las motoneuronas GABAérgicas. Si existe un vínculo real entre estos defectos morfológicos y el resto de los fenotipos comportamentales, parecería lógico hipotetizar que el β HB podría estar aminorando los defectos comportamentales al disminuir la cantidad de aberraciones morfológicas en el sistema GABAérgico. Resultará entonces fundamental profundizar nuestro conocimiento sobre el probable vínculo entre estas aberraciones neuronales y el resto de los fenotipos comportamentales para poder entender si los beneficios resultantes por la administración de β HB se deben al mejoramiento general de la señalización GABAérgica.

En segundo lugar, es destacable el hecho de que este compuesto fue capaz de aminorar o prevenir los defectos asociados a *daf-18*, pero en ningún caso logró rescatar los defectos asociados a *daf-16* ni a la doble mutante *daf-18; daf-16*. En base a esto, resulta evidente que el factor de transcripción DAF-16 es clave en el mecanismo molecular por el cual el β HB está ejerciendo su efecto, tal como fue sugerido previamente. Sin embargo, mucho queda por investigar para comprender de manera profunda el mecanismo subyacente mediante el cual el β HB estaría aumentando la actividad del mismo. El β HB ha sido extensamente estudiado en *C. elegans* en el contexto de envejecimiento. Se ha demostrado que la suplementación del mismo ha logrado extender el tiempo de vida, mejorar la resistencia al estrés oxidativo y térmico, y promover la expresión de genes citoprotectores, además de regular el metabolismo y la homeostasis en estos nematodos²⁹⁰. Uno de los mecanismos más estudiados del β HB es su capacidad de modular la expresión génica mediante epigenética. Como fue mencionado previamente, el β HB es un potente inhibidor de las histonas desacetilasas HDAC1 y HDAC2 en mamíferos, lo que genera el aumento de los niveles de acetilación en diversas regiones cromosómicas. La acetilación de histonas generalmente está asociada con la activación de la transcripción génica por alteración de la estructura de la cromatina. Cuando las histonas están acetiladas, su carga eléctrica se neutraliza, lo que reduce la atracción entre las histonas y el ADN. Esto hace que la cromatina se desenrolle más fácilmente, exponiendo así las regiones de ADN que contienen los genes para la transcripción. Como resultado, los factores de transcripción y las enzimas involucradas en este proceso tienen un mejor acceso al ADN, lo que facilita y aumenta la transcripción de los genes. Como fue mencionado previamente, se ha demostrado en mamíferos que el aumento de la acetilación por β HB promueve el aumento de los niveles de

FOXO3a; así como también otros genes antioxidantes y citoprotectores. Es muy importante destacar, además, que HDAC1 y HDAC2 juegan un papel importante como reguladores del desarrollo neuronal. Durante el desarrollo del SN, estas HDACs participan en la regulación de la expresión génica y la plasticidad sináptica. Eliminar HDAC1 o HDAC2 individualmente en modelos animales puede tener efectos moderados en el desarrollo neuronal, pero la eliminación de ambos HDACs conduce a defectos más graves en la neurogénesis, la supervivencia celular y la función sináptica^{311,312}. De manera similar a lo que ocurre en mamíferos, en *C. elegans*, el β HB inhibe las HDACs de clase I, aumentando la actividad de DAF-16²⁹⁰. Por lo tanto, es posible que este aumento de actividad de DAF-16 por la inhibición de HDACs mediada por β HB esté compensando la merma en la actividad del mismo producida por la hiperactivación de la vía PI3K en mutantes *daf-18* (es importante recordar, en este punto, que una baja o nula actividad de DAF-18 repercute en una alta actividad de la vía AGE-1/AKT, la cual culmina en la fosforilación de DAF-16, su ubiquitinación y posterior degradación). Es posible que, al facilitar el acceso a la cromatina, se esté produciendo un efecto compensatorio a los bajos niveles de DAF-16 en un *background daf-18*. Sin embargo, la inhibición de las HDACs por parte del β HB abre un abanico de preguntas que merecen tratamiento a futuro. Como se ha visto en mamíferos, las HDACs revisten una enorme importancia en el desarrollo y la supervivencia neuronal. En principio, el hecho de que la inhibición de las mismas promueva el aumento de expresión de muchos genes río abajo abriría la posibilidad de que haya otros procesos, paralelos a DAF-16, que estén involucrados en el correcto desarrollo de las motoneuronas GABAérgicas. No obstante, el rol de DAF-16 parece ser crucial ya que no observamos beneficios parciales cuando evaluamos el efecto del β HB sobre mutantes *daf-16*. Por otro lado, como también vimos previamente, el β HB se destaca por tener un rol particular en la señalización celular, especialmente si se considera el fenómeno de la β -Hidroxibutirilación, otro mecanismo conocido por el cual el β HB modula la regulación epigenética en la cual el β HB se une directamente a distintos residuos de lisina para regular la expresión génica³⁰⁴. Si bien tanto la inhibición de las HDACs (y por lo tanto el aumento de acetilación) como la β -Hidroxibutirilación de histonas son mecanismos compatibles uno con el otro y no excluyentes, esto diferencia al β HB de otros inhibidores de HDACs como el ácido valproico, por lo cual sería interesante evaluar el efecto que otros inhibidores de HDACs podrían tener sobre mutantes *daf-18*. Esto podría aportar evidencias acerca de cuál de los dos fenómenos epigenéticos (inhibición de HDACs o β -Hidroxibutirilación) es más determinante en este contexto, si es que alguno reviste más importancia. En este sentido, es importante destacar que la β -Hidroxibutirilación puede ocurrir en muchos sitios específicos, variando sus efectos en consecuencia. Por este motivo, esta marca epigenética debe ser diferenciada de otras como la acetilación y la metilación. Un ejemplo de ello es la marca H3K9 β HB, la cual aumenta la

expresión de genes relacionados con la respuesta al hambre. En contraste, otras marcas epigenéticas asociadas con el aumento de la expresión genética, como lo son H3K9ac y H3K4me3, aumentan la expresión de distintos grupos de genes de los que se estimulan con H3K9b β HB³⁰⁴.

Se ha propuesto, por otro lado, diversos mecanismos por los cuales el β HB podría estar modulando de forma directa la actividad de la vía de señalización insulinérgica^{290,295}. En mamíferos, la administración de β HB reduce la señalización de la insulina en el músculo³¹³. En ratas, por ejemplo, se ha demostrado que la administración de β HB reduce la fosforilación y la actividad de AKT río abajo del receptor de insulina^{314,315}. En *C. elegans*, la inhibición de AKT-1 activa DAF-16, por lo que el β HB podría influir también en la actividad de DAF-16 mediante la inhibición de al menos una de las quinasas que regulan a DAF-16.

Sería válido, por otro lado, pensar que la inhibición de las HDACs podría aumentar la actividad del factor de transcripción SKN-1, homólogo al Nrf-2 en mamíferos, un factor de transcripción que regula la respuesta al estrés oxidativo y el mantenimiento de la homeostasis celular. Este factor de transcripción disminuye la expresión de péptidos similares a insulina tales como DAF-28 e INS-29, los cuales podrían disminuir la actividad general del receptor de insulina DAF-2, mientras que la disminución de esta vía podría a su vez disminuir la fosforilación de DAF-16, aumentando su actividad³¹⁶. Más aún, la extensión del tiempo de vida en *C. elegans* por la suplementación de β HB depende tanto de DAF-16 como de SKN-1²⁹⁰. Dado que Nrf2 en mamíferos promueve la expresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes y de reparación en respuesta a condiciones adversas³¹⁷, podría pensarse que SKN-1 también esté involucrado en el mecanismo de acción del β HB en el contexto del presente trabajo. Sin embargo, tal como mencionamos previamente, no observamos beneficios parciales tras la suplementación de β HB en mutantes *daf-16*, por lo cual parece poco probable que SKN-1 tenga un rol independiente a DAF-16 en la regulación de los procesos que determinan los fenotipos observados.

Desde otra perspectiva, se ha propuesto que los mecanismos subyacentes a los beneficios del β HB podrían deberse al metabolismo del mismo. La suplementación con β HB podría aumentar algunos intermediarios específicos del ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs). Algunos de estos intermediarios, como el fumarato, malato y oxalacetato, aumentan la transcripción nuclear de DAF-16^{318,319}. Por otro lado, también se ha demostrado que el metabolito alfa-ketoglutarato alarga la vida en *C. elegans* por mecanismos dependientes de la vía de TOR³²⁰. Sin embargo, al igual que con SKN-1, al no observar beneficios parciales del β HB sobre mutantes *daf-16*,

únicamente las vías que conectan a TOR con DAF-16 podrían respaldar este mecanismo, al menos en el contexto de los fenotipos observados en el presente trabajo. Restará profundizar en el efecto del aumento de los otros intermediarios del ciclo de Krebs tras la suplementación de β HB, aunque en principio, parece ser que la modulación epigenética es un mecanismo que podría explicar los beneficios de este metabolito de forma más robusta.

Por último, aunque menos estudiado, es posible también que el β HB produzca cambios en el *splicing* alternativo de distintos genes, lo cual se podría dar por cambios en la velocidad de transcripción del ADN. La acción inhibidora sobre las HDACs puede favorecer la acetilación, generando una cromatina más laxa, mientras que la β -Hidroxibutirilación puede generar una gran diversidad de marcas sobre las histonas³⁰⁴. En conjunto, estas marcas epigenéticas pueden alterar la velocidad de elongación de la Polimerasa II, lo cual tiene un impacto directo en los mecanismos que regulan el *splicing* sobre las distintas clases de exones³²¹⁻³²⁵. A modo de ejemplo, se ha utilizado ácido valproico, trichostatina A, y otros HDACs como complementos para favorecer la inclusión del exón E7 del gen *SMN2*, un gen afectado en la atrofia muscular espinal, evidenciando así el rol protagónico de los HDACs en los mecanismos regulatorios del *splicing*³²⁶. Sería interesante, por lo tanto, estudiar si existen cambios en el proceso de *splicing* tras la administración del β HB para determinar si este influye en variantes de transcripción que puedan explicar sus beneficios.

Otro aspecto interesante relativo al potencial terapéutico que posee el β HB es el momento crítico en el cual este compuesto ha mostrado efectividad para mitigar los defectos asociados a la pérdida del gen *daf-18*. Nuestros resultados indican que el β HB puede corregir los defectos fenotípicos únicamente cuando se administra durante una ventana crítica del desarrollo temprano. La falta de efectos significativos al administrarlo más tarde sugiere que las mejoras están probablemente relacionadas con la capacidad del β HB en corregir o evitar procesos deficientes relativos al desarrollo. De no ser así, se esperaría que el mismo sea capaz de brindar beneficios independientemente del momento en el que es suministrado. Estos resultados refuerzan la hipótesis, planteada en la sección previa, de que los fenotipos observados podrían ser el resultado de procesos de desarrollo deficiente y no de procesos degenerativos; así como también muestran que el potencial terapéutico del β HB es fundamentalmente de tipo preventivo.

Una de las mayores incógnitas que surgen de los resultados obtenidos, es el efecto específico que el β HB parece tener sobre las motoneuronas GABAérgicas, fundamentalmente por la incapacidad del compuesto en prevenir los defectos que ocurren en las HSNs y las interneuronas

AIYs. Es destacable el hecho de que las mismas mutaciones (tanto *daf-18* como *daf-16*) afectan a estas neuronas, y que en todos los casos parece estar comprometido el desarrollo de las mismas, de una manera dependiente de DAF-16.

Aunque comprender el mecanismo detrás de la acción de β HB requerirá estudios adicionales, nuestros resultados demuestran que este cuerpo cetónico modula positivamente a DAF-16 durante el desarrollo neuronal. El siguiente paso lógico sería evaluar la expresión genética río abajo para determinar el o los genes que están implicados en estos fenómenos.

Conclusiones parciales

- *El θ HB incrementa la expresión del factor de transcripción DAF-16.*
- *La incubación prolongada con θ HB durante el desarrollo mejora los fenotipos deficientes de mutantes de *daf-18*, reduciendo la hipersensibilidad a estimulantes colinérgicos, y respuestas erráticas en la respuesta de escape y ante estímulos optogenéticos.*
- *El θ HB reduce defectos morfológicos en las comisuras de motoneuronas tipo D GABAérgicas.*
- *Una breve exposición al θ HB durante el desarrollo temprano es suficiente para observar mejoras tanto a nivel morfológico como comportamental.*
- *Los efectos del θ HB no se observan en mutantes de *daf-16* ni en la doble mutante *daf-18;daf-16*, sugiriendo que el θ HB actúa a través de la modulación de DAF-16.*
- *El θ HB no previene defectos en la migración de las HSNs ni en el desarrollo de interneuronas AIYs, indicativo de una acción selectiva específica.*

Discusión general y perspectivas futuras

A lo largo de este trabajo, hemos discutido brevemente las principales características de los TEA, y destacamos la alta incidencia de este tipo de trastornos en pacientes que presentan mutaciones en el gen *PTEN*. Hemos repasado las estrategias terapéuticas que se utilizan en la actualidad, y particularmente hicimos foco en una estrategia dietaria basada en el metabolito β HB, fundamentalmente por la gran cantidad de evidencia que sugiere potenciales beneficios. Para ello, utilizamos al nematode *C. elegans* como plataforma para el estudio de las mutaciones en el gen *daf-18/PTEN* (fuertemente vinculado al TEA según la base de datos de SFARI), así como también para el estudio de los efectos que el β HB posee sobre estos mutantes. Hemos expuesto robusta evidencia acerca del rol crítico que el gen *daf-18*, en conjunto con el gen *daf-16*, poseen en el neurodesarrollo del SN. En mutantes *daf-18* y *daf-16*, pudimos encontrar aberraciones morfológicas de las motoneuronas GABAérgicas, las cuales se manifiestan junto con otra serie de fenotipos y podrían ser la causa de los mismos. Estos fenotipos incluyen hipersensibilidad a fármacos estimulantes del sistema colinérgico, déficits en la ejecución de comportamientos que requieren una fina coordinación entre los sistemas de señalización inhibitoria y excitatoria hacia los músculos durante la respuesta de escape, y respuestas musculares erráticas ante el estímulo optogenético específico sobre los sistemas GABAérgicos y colinérgicos. Mediante ensayos genéticos y análisis epistáticos, determinamos que los defectos en el desarrollo GABAérgico de los animales *daf-18* se deben a la reducción de la actividad del ortólogo de FOXO, DAF-16. En efecto, DAF-16 se encuentra río debajo de DAF-18 en la vía de señalización insulinérgica AGE-1/AKT, y pudimos observar, en mutantes de *daf-16*, fenotipos similares a los encontrados en mutantes *daf-18*. Por último, pudimos observar que la exposición al CC β HB durante las etapas tempranas del desarrollo mitiga los efectos perjudiciales de las mutaciones de *daf-18* por su capacidad de inducir la actividad de DAF-16. Todos estos resultados representan, en conjunto, un aporte fundamental al entendimiento de las mutaciones en *PTEN* y sus consecuencias sobre el desarrollo del SN; así como también sobre el potencial terapéutico del β HB. A continuación, ampliaremos la discusión de algunas de las aristas más interesantes que derivan de los resultados obtenidos, subrayando aquellos aspectos que merecen ser estudiados en mayor profundidad. En este sentido, también discutiremos posibles estrategias para abordarlos en futuras líneas de investigación.

Impacto funcional de defectos en motoneuronas GABAérgicas

Uno de los puntos clave a abordar a futuro es establecer con mayor nivel de detalle el vínculo que existe entre los defectos morfológicos en neuronas GABAérgicas y el resto de los fenotipos. Como ya hemos discutido en la primera sección, los resultados de los experimentos sugieren fuertemente que los distintos fenotipos observados podrían ser la consecuencia de los defectos morfológicos presentes en las motoneuronas GABAérgicas. No obstante, a pesar de la fuerte correlación entre los mismos, no disponemos de evidencia directa para aseverar una relación de tipo causa-efecto. Por otro lado, hemos mencionado también varias veces que muchos de los fenotipos descritos para mutantes *daf-18* y *daf-16* son compatibles con un posible desequilibrio E/I. Más aún, nuestros ensayos iniciales de farmacología en los que detectamos hipersensibilidad en estos mutantes, son pruebas utilizadas a menudo como *screenings* rápidos para detectar disrupciones en este equilibrio. Sin embargo, es fundamental destacar una vez más la importancia de realizar otro tipo de ensayos tales como electrofisiología para determinar inequívocamente esta situación. Esta técnica ha demostrado ser efectiva para el análisis funcional de uniones neuromusculares individuales^{212,327,328}. Más aún, la exploración de las respuestas neuronales y musculares en distintas células del animal podría indicar si este desbalance es específico para ciertas regiones del sistema neuromuscular, o bien una situación generalizada. Adicionalmente, sería conveniente extender este análisis también al estudio de las terminales postsinápticas musculares, así como también a la funcionalidad y anatomía de estas células en búsqueda de posibles fallas ocasionadas por mutaciones en los genes mencionados. Esto resulta fundamental para descartar posibles alteraciones en el sistema muscular que estén vinculadas a estos fenotipos. En conjunto, estos ensayos podrían aportar datos fundamentales para la comprensión de las implicancias funcionales de las aberraciones morfológicas GABAérgicas, y brindar pistas adicionales para comprender cómo las mismas podrían desencadenar los fenotipos de locomoción.

*Mutantes *daf-18* y *daf-16* como plataformas para el estudio del equilibrio E/I*

A raíz del desbalance E/I que se presenta muy a menudo en varios trastornos como el TEA, muchos investigadores han explorado enfoques terapéuticos que apuntan a restablecer dicho balance, existiendo diversos ensayos clínicos que han estudiado el efecto de fármacos para restaurar la actividad GABAérgica^{21,196,329}. En el contexto particular de *C. elegans*, donde mutaciones en los genes *daf-18* y *daf-16* podrían estar afectando al equilibrio E/I mediante aberraciones morfológicas y funcionales en motoneuronas GABAérgicas, sería interesante evaluar el potencial de las distintas estrategias disponibles para reestablecer el balance entre

ambos sistemas de señalización en el caso de que se confirme este escenario. Es posible encontrar varios ejemplos de fármacos bajo activa investigación por su potencial de reestablecer el equilibrio E/I. La Bumetanida, por ejemplo, es un diurético aprobado inicialmente para aliviar la retención de líquidos en personas con enfermedades cardíacas, hepáticas o renales, y se ha utilizado para tratar la hipertensión arterial. El fármaco normalizaría los niveles de iones de cloruro en el cerebro, un desequilibrio que repercute en una deficiente acción inhibitoria GABAérgica, inhibiendo específicamente el cotransportador NKCC1 y modulando los niveles intracelulares de cloruro. De esta manera, restauraría el gradiente electroquímico necesario para la acción inhibitoria de GABA³³⁰. A pesar de que no posee cerebro ni riñones, *C. elegans* posee homólogos de transportadores iónicos clave, y utiliza sistemas iónicos fundamentales similares, por lo que resulta razonable explorar si la bumetanida tiene efectos similares en este modelo. El Arbaclofeno, un agonista del receptor metabotrópico GABA_B, es otro ejemplo de fármaco con potencial terapéutico para estos casos. Al activar estos receptores, el Arbaclofeno ayuda a disminuir la excitabilidad neuronal y promueve efectos inhibitorios en el SN central, ayudando así a corregir los desequilibrios en la neurotransmisión que se observan en personas con TEA. El Canabidiol (CBD), un compuesto no psicotrópico de la marihuana, también ha sido investigado en este contexto. Aunque el CBD no actúa directamente como un agonista o antagonista del receptor GABA, puede influir en la neurotransmisión GABAérgica a través de la modulación indirecta de los receptores de endocannabinoides, también presentes en *C. elegans*³³¹⁻³³³. Estos son solo algunos ejemplos del enorme abanico de medicamentos bajo estudio. Sin embargo, la eficacia de este tipo de estrategias dependerá, finalmente, de la naturaleza del defecto que comprometa al equilibrio E/I. Si bien no comprendemos del todo las bases del presunto desequilibrio en mutantes *daf-18* y *daf-16*, en el caso puntual de que las aberraciones morfológicas sean la causa de un desequilibrio E/I, podríamos anticipar que el abordaje terapéutico será complejo y probablemente más limitado que en otros casos donde la conectividad sináptica no se encuentre afectada. En este punto, por otra parte, merece la pena recordar además que el βHB es efectivo para la prevención temprana de los defectos encontrados en mutantes *daf-18*, pero no para su tratamiento posterior. Ya que casi todos los casos de DND son diagnosticados solo recién cuando los síntomas aparecen, resulta de especial interés el estudio de toda estrategia que apunte a tratar, al menos en forma paliativa, las distintas formas del desequilibrio E/I una vez que este escenario ya está presente. La presencia de fenotipos específicos en los mutantes *daf-18* y el posible desequilibrio E/I hacen de *C. elegans* un modelo experimental muy adecuado para estudiar y comprender los efectos de los distintos enfoques terapéuticos en un contexto biológico simplificado.

Análisis funcional de las mutaciones humanas de PTEN en C. elegans

A raíz del enorme vínculo entre mutaciones de *PTEN* y el desarrollo de TEA en humanos, y las aberraciones morfológicas de motoneuronas GABAérgicas producto de mutaciones en *daf-18* en *C. elegans*, es evidente cuestionar si las mutaciones que ocurren realmente en humanos podrían tener consecuencias similares que las observadas en *C. elegans*. Sin embargo, lejos de ser grandes deleciones, las mutaciones en *PTEN* vinculadas con TEA en humanos suelen ser mutaciones puntuales o pequeñas inserciones/deleciones que alteran de manera específica la función de la proteína, muchas veces sin eliminar completamente su actividad. Estas mutaciones pueden afectar dominios funcionales clave, como el dominio fosfatasa o los sitios de interacción con otras proteínas, lo que da lugar a alteraciones en vías de señalización críticas, como la de PI3K/AKT^{144,334-336}. Dado que *daf-18* regula procesos similares, surge la posibilidad de introducir mutaciones puntuales equivalentes en *C. elegans* para evaluar las consecuencias moleculares y celulares de estas alteraciones, así como también para explorar cómo las mutaciones específicas influyen en el desarrollo neuronal y la funcionalidad de las motoneuronas GABAérgicas en un sistema simplificado y altamente manipulable. De encontrar aberraciones morfológicas con las variantes humanas, este sistema podría ganar aún más robustez para el estudio de TEA. Como vimos, *daf-18* tiene un gran porcentaje de homología con *PTEN*, por lo que es posible realizar sustituciones en *daf-18* similares a la que ocurren en *PTEN*. Más aún, es factible realizar el reemplazo directo por el gen humano, el cual se sabe que es capaz de reemplazar perfectamente las funciones de *daf-18*, por lo que este modelo es ideal para evaluar directamente a *PTEN*, incluyendo tanto las mutaciones conocidas como las variantes de significado incierto²¹⁸.

Aspectos distintivos de las motoneuronas colinérgicas

Otro aspecto enigmático de la pérdida de *daf-18* es el hecho de que las motoneuronas colinérgicas no se ven, en principio, afectadas de similar manera a las GABAérgicas. En relación con esto, sería conveniente realizar estudios adicionales de microscopía con diferentes reporteros para evitar el efecto de solapamiento que impide observar posibles defectos en otras regiones aparte de las comisuras, tanto para motoneuronas GABAérgicas como para las colinérgicas. Si dentro del sistema neuromuscular, la pérdida de *daf-18* repercute únicamente en las motoneuronas GABAérgicas, podríamos esperar que existan características distintivas en el desarrollo de estas células que las diferencien de otras neuronas. En este sentido, como ya mencionamos, existen procesos específicos de reorganización neuronal durante el desarrollo larval en este grupo de neuronas. Tras la eclosión del huevo, los animales nacen con seis

neuronas motoras GABAérgicas DD que extienden comisuras hacia el lado dorsal, pero inicialmente solo forman sinapsis en los músculos ventrales del animal. Más tarde, avanzada la etapa L1, nacen 13 neuronas VD y forman sinapsis en las células musculares ventrales. En las larvas L1 recién nacidas, cada neurona motora DD inerva los músculos ventrales y extiende una conexión hacia el cordón nervioso dorsal para recibir señales de las neuronas colinérgicas DA y DB³³⁷⁻³³⁹. Avanzada la etapa L1, y hasta finales de la etapa L2, las sinapsis ventrales preexistentes se eliminan; la salida de las señales se desplaza hacia los músculos dorsales, y la entrada es proporcionada por las neuronas motoras colinérgicas VA y VB en el cordón nervioso ventral³³⁷⁻³⁴⁰. Durante esta organización, la morfología de las comisuras no sufre cambios más allá de los propios del escalado por durante el crecimiento. Dado que las comisuras son defectuosas ya en la etapa temprana L1 (antes de la reorganización), podemos inferir que este déficit específico en el neurodesarrollo de las motoneuronas GABAérgicas no es consecuencia de una reorganización deficiente durante las primeras etapas larvales. Adicionalmente a esto, todas las clases de defectos que observamos estaban presentes también en neuronas VDs, las cuales no atraviesan procesos de remodelación sináptica³³⁸⁻³⁴⁰. Si bien los eventos de reorganización no permiten explicar el efecto diferencial de *daf-18* sobre el sistema GABAérgico, existen otros indicios que sugieren diferencias significativas en el desarrollo de ambos grupos de neuronas. En particular, ciertas mutaciones en *C. elegans* parecen repercutir sobre el sistema GABAérgico, sin afectar al colinérgico. Un ejemplo de esto son las mutaciones en el gen de la integrina neuronal *ina-1*, ortólogo de ITGA6 (subunidad alfa 6 de integrina en humanos), las que afectan notoriamente la morfología de las comisuras GABAérgicas sin afectar a las colinérgicas²³⁷. En relación con esto, al igual que con mutaciones en *PTEN*, se ha relacionado la presencia de mutaciones en las integrinas neuronales con defectos en el neurodesarrollo en mamíferos³⁴¹. Es interesante destacar que la vía de señalización PI3K/AKT/FOXO y la señalización de integrinas están interrelacionadas³⁴². Esta observación abre la posibilidad de que uno de los mecanismos por los cuales los mutantes *daf-18* presentan defectos en el neurodesarrollo GABAérgico involucre alteraciones en la expresión y/o función de las integrinas. En el mismo sentido, las mutaciones en *eel-1* (ortólogo del gen humano HUWE1) o en las subunidades del Complejo Promotor de la Anafase (APC), conducen a alteraciones funcionales y del desarrollo en las neuronas GABAérgicas, pero no en las neuronas colinérgicas, a pesar de su expresión en ambos tipos neuronales^{343,344}. Las consecuencias fenotípicas selectivas de estas mutaciones, sugieren la existencia de mecanismos compensatorios o redundantes en las neuronas colinérgicas que pueden no estar presentes en las neuronas GABAérgicas; o bien de mecanismos diferenciales que orquestan su desarrollo de manera distintiva. Cualquiera sea el caso, su estudio podría ser

relevante para la comprensión de los TEA y otros trastornos, proporcionando valiosa información sobre los mecanismos fundamentales del desarrollo del SN.

Mecanismos dependientes de DAF-16

Un aspecto destacado de los resultados obtenidos en nuestros ensayos genéticos es la información mecanística subyacente a los defectos morfológicos provocados por la pérdida de *daf-18*, en particular la actividad autónoma de DAF-16. Esto es llamativo, ya que los defectos en el SN de mutantes en *PTEN* muchas veces guardan relación con la hiperactivación de la vía mTOR^{176,228,345}. Por ejemplo, las migraciones aberrantes y neuronas ectópicas observadas en modelos murinos condicionales para *PTEN* pueden ser prevenidas mediante el uso de inhibidores de mTORC1 como rapamicina^{346,347}. La vía de mTOR desempeña un papel fundamental en el crecimiento, la proliferación y la migración de todas las células; por lo tanto, se considera esencial para el desarrollo de un organismo. La pérdida total de componentes clave de la vía es letal durante el desarrollo embrionario en mamíferos³⁴⁸. Sin embargo, además de su papel en la modulación de mTOR para regular el crecimiento del axón, PTEN desempeña un papel directo e independiente de mTOR en la regulación del crecimiento, ramificación y colapso axonal al modular los niveles de PIP3. El axón necesita, para crecer, una acumulación de PIP3 en el cono de crecimiento, lo cual se logra mediante el secuestro de PTEN lejos de la membrana mediante su fosforilación. De forma inversa, inhibidores del crecimiento como algunas semaforinas reclutan PTEN en su conformación activa al sitio de crecimiento^{162,349}. Un ejemplo de esto es la semaforina Sema4D, que se une a Plexina-B1 para desfosforilar a PTEN mediante R-Ras GAP, dejando a PTEN de forma activa. En el mismo sentido, Plexina-B1 también inhibe a la quinasa CK2 α previniendo la inactivación de PTEN¹⁶³. Sin embargo, a pesar de los múltiples mecanismos vinculados o no con la vía de TOR, nuestros resultados sugieren, como ya lo hemos destacado varias veces, que los fenotipos observados en animales *daf-18* son particularmente dependientes de la disminución de la actividad de DAF-16 en las neuronas afectadas. Este factor de transcripción parece tener roles críticos en el desarrollo del SN, y cada vez se documenta más evidencia al respecto. Por ejemplo, en roedores, la disminución de la actividad de FOXO durante el desarrollo temprano reproduce características neuropatológicas similares a aquellas encontradas en pacientes con TEA, como un aumento en el tamaño del cerebro y el grosor cortical^{350,351}. FOXO posee un rol autónomo en el crecimiento axonal de neuronas granulares cerebelosas en ratas³⁵². Más aún, se ha determinado que la actividad autónoma de DAF-16 en las neuronas motoras GABAérgicas de *C. elegans* es clave para el crecimiento axonal durante la regeneración³⁵³. Nuestros experimentos de rescate sugieren fuertemente que la vía AGE-1/DAF-18/AKT-1 modula el desarrollo de las neuronas motoras GABAérgicas al actuar autónomamente

en estas células. En el mismo sentido, como ya hemos mencionado previamente, la actividad autónoma de DAF-16 coordina el crecimiento axonal en las interneuronas AIYs⁶⁹, mientras que la actividad en la hipodermis modula la migración neuronal de las HSNs en *C. elegans*¹⁸⁷. Nuestros hallazgos resaltan el papel crucial de DAF-16 en el neurodesarrollo, y la necesidad de determinar la mecánica molecular subyacente. En este sentido, una posible conexión entre FOXO y el neurodesarrollo podría encontrarse en los procesos que regulan la autofagia. Se han reportado evidencias de mecanismos deficientes de autofagia en la neurogénesis de ratones deficientes en FOXO, lo que conduce a defectos morfológicos²⁴³. En *C. elegans*, se ha demostrado que una actividad reducida de DAF-16 regula negativamente la autofagia³⁵⁴. Por otro lado, la reducción de FOXO induce un aumento de la apoptosis neuronal durante el desarrollo embrionario en peces cebra (*Danio rerio*)³⁵⁵. En este contexto, cada vez hay más evidencia que respalda la idea de una conexión entre la señalización anormal de la autofagia, la apoptosis y los defectos en el neurodesarrollo^{356,357}. Otro mecanismo potencial podría involucrar a la quinasa activadora de p21 (PAK1), un gen *target* río abajo de FOXO que también modula el neurodesarrollo^{187,358}. La pérdida de PAK1 en ratones suprime selectivamente la señalización GABAérgica³⁵⁹. Dado que nuestros experimentos sugieren la participación de DAF-16 en desarrollo de las células GABAérgicas, es posible que PAK-1 desempeñe un papel importante en la morfogénesis GABAérgica al actuar autónomamente en estas neuronas motoras. En este punto, es importante aclarar que no se ha reportado la expresión de PAK-1 en motoneuronas GABAérgicas de animales L4 según la base de datos Cengen (<https://cengen.shinyapps.io/CengenApp/>). No obstante, aún es posible que PAK-1 tenga una expresión transitoria en estas células durante las etapas larvales tempranas.

Resulta evidente, de todo esto, que la vía PI3K/AKT/FOXO desempeña roles fundamentales en el neurodesarrollo, y aún queda un extenso camino por recorrer para desentrañar los mecanismos moleculares que la misma regula. Profundizar en estos procesos no solo ampliará nuestra comprensión básica del neurodesarrollo, sino que también podrá ofrecer nuevas estrategias terapéuticas para abordar trastornos relacionados.

Aplicaciones terapéuticas del β HB

Otros asuntos que resultan interesantes para explorar en mayor profundidad a futuro, son aquellos relativos al potencial terapéutico del β HB. Múltiples líneas de evidencia que involucran varios modelos animales, desde *C. elegans* hasta mamíferos, sugieren que existe un período sensible, generalmente temprano en el desarrollo, donde las intervenciones farmacológicas o genéticas son más efectivas para mitigar las consecuencias de los defectos del neurodesarrollo⁹.

Sin embargo, también existe evidencia reciente que muestra que ciertos defectos del neurodesarrollo pueden mejorar con intervenciones durante la edad adulta³⁶⁰. Nuestros resultados demuestran que el β HB puede rescatar los fenotipos defectuosos de animales *daf-18* solo cuando la exposición ocurre durante un período crítico temprano. La eficacia limitada del β HB en etapas posteriores del desarrollo, sumado al hecho de que la exposición de por vida a este cuerpo cetónico no resulta indispensable para mejorar los defectos observados, sugiere que el papel de DAF-16 en el mantenimiento de la funcionalidad GABAérgica no es tan relevante. Por otro lado, el hecho de que muchos de los defectos observados en estas neuronas podrían encontrarse presentes antes de que el β HB entre en contacto con el animal podría explicar la incapacidad del mismo en prevenir una gran parte de las alteraciones detectadas. Relativo a esto, uno de los resultados más llamativos fue la incapacidad del β HB de prevenir los defectos encontrados en las neuronas como las AIYs y las HSNs, las cuales también son afectadas por la pérdida de *daf-18* y la consecuente disminución de actividad de DAF-16. En el caso de las AIYs, este fenómeno podría tener una explicación en la cutícula del huevo, la cual es permeable a agua y oxígeno e impermeable a la mayoría de los metabolitos. El desarrollo de las interneuronas AIYs es estereotipado y ocurre en etapas embrionarias muy tempranas. Los somas de las AIYs se hacen visibles alrededor de 360 minutos después de la fertilización, y el crecimiento de las neuritas comienza aproximadamente 50 minutos más tarde, con el cono de crecimiento extendiéndose desde el lado anterior de la célula. El crecimiento de las neuritas continúa hasta que alcanzan la línea media dorsal, concluyendo alrededor de los 490 minutos post fertilización. Posteriormente, las neuritas AIYs continúan creciendo en tamaño, alcanzando una longitud final de aproximadamente 13 μ m entre los 550 y 840 minutos después de la fertilización, escalando acorde al crecimiento del animal⁶⁹. Si los defectos en estas neuronas se producen antes de que el β HB tenga contacto efectivo con el embrión, resulta lógico que el mismo sea ineficaz para prevenir los mismos. Sin embargo, en el caso de las HSNs, el crecimiento de los axones comienza tiempo después de la eclosión del huevo. Específicamente, el mismo sucede durante las etapas L2 y L3, y es guiado por las células epiteliales de la vulva en desarrollo y los procesos del cordón nervioso ventral (procesos PVP y PVQ). Las células precursoras de la vulva guían los procesos emergentes de las HSNs ventralmente. También organizan los dos procesos de las HSNs para que se unan al cordón nervioso ventral en dos fascículos separados e inducen su desfasciculación del cordón nervioso ventral y su ramificación en la vulva¹⁸⁸. Sería conveniente evaluar si algunos de los procesos involucrados en el guiado de los axones de las HSNs no se encuentran comprometidos por mutaciones en *daf-18/daf-16*, lo cual podría explicar la incapacidad del β HB en prevenir estos defectos.

Por otro lado, es importante destacar que el β HB fue capaz de prevenir algunos de los fenotipos de los mutantes *daf-18* solamente de forma parcial, sin lograr una reversión total. En este punto, si la baja permeabilidad de la cutícula del huevo está obstaculizando el contacto del β HB con el embrión, es interesante mencionar que se conocen mutaciones que aumentan la permeabilidad de los huevos al afectar genes con roles críticos en el desarrollo de sus diferentes capas. La mutación *perm-1*, por ejemplo, se caracteriza por generar una alta permeabilidad sin afectar significativamente el desarrollo del animal^{361,362}. Animales *perm-1* y otros mutantes se utilizan a menudo para investigar la introducción de diferentes compuestos temprano en el desarrollo³⁶³. Sería interesante explorar la capacidad de penetración del β HB en estas cepas, y evaluar a su vez el potencial de prevenir más defectos en las poblaciones neuronales afectadas por la pérdida de *daf-18*.

Por último, es altamente probable, como mencionamos anteriormente, que el β HB esté cambiando la expresión de muchos genes río debajo de *daf-16*. Por lo tanto, sería oportuno analizar a futuro el perfil de expresión génica en neuronas GABAérgicas de animales *daf-18* tras la administración de β HB mediante técnicas de vanguardia como el secuenciamiento de ARN (RNAseq).

Observaciones finales

En muchos pacientes con epilepsia, se ha demostrado que las DCs controlan las convulsiones y reducen los problemas de comportamiento, al tiempo que mejoran las anomalías conductuales en individuos con TEA. Aunque los mecanismos exactos que subyacen a los efectos clínicos de las DCs no se comprenden completamente, se ha correlacionado su eficacia con un aumento en la señalización de GABA³⁶⁴⁻³⁶⁶. En este punto, no obstante, vale la pena recordar que estas dietas pueden conducir a estados fisiológicos complejos, con numerosos componentes activos, y que el β HB es solo uno de ellos. Por lo tanto, no es nuestra intención postular al β HB como un tratamiento efectivo contra el TEA, ni disponemos evidencias que respalden su uso como terapia en humanos con estas afecciones. No existen reportes de los efectos que pueda llegar a tener la suplementación de los mismos durante el desarrollo en seres humanos, ni de los beneficios o efectos adversos que puedan aportar. El uso de *C. elegans* como modelo en neurociencias (y como modelo en biomedicina en general) es una herramienta invaluable para el mayor entendimiento del SN y los procesos biológicos generales, para el estudio de distintas enfermedades, y para realizar investigaciones preliminares en búsqueda de tratamientos efectivos. Sin embargo, se trata de un organismo filogenéticamente distante con los humanos, por lo que no es posible extrapolar de forma simple los resultados obtenidos.

Si los beneficios de este tipo de dietas tienen su origen en los CCs, podría existir la posibilidad de obtener dichos beneficios mediante la suplementación directa de β HB sin la necesidad de implementar dietas complejas. Por lo tanto, es fundamental explorar en mayor profundidad los cambios metabólicos y dietéticos que resultan de este tipo de estrategias, y sus efectos sobre el organismo. Por otro lado, como ya fue mencionado varias veces, los TEA pueden estar originados por un enorme abanico de eventos, de los cuales las mutaciones en el gen de *PTEN* representan solamente un pequeño porcentaje. Entender las consecuencias subyacentes a estas mutaciones puede, no obstante, representar avances significativos para la comprensión de los TEA, ya que diversos mecanismos podrían ser comunes o convergentes entre las distintas etiologías. Dado que la vía de PI3K/AKT está altamente conservada en los animales, este estudio proporciona información universalmente relevante sobre cómo las alteraciones en esta vía conducen a defectos del neurodesarrollo y los mecanismos subyacentes a los efectos positivos de las DCs en estos trastornos.

Conclusión general

En la presente tesis, hemos realizado un abordaje básico al estudio de las mutaciones de *PTEN* en el contexto de desarrollo de trastornos del neurodesarrollo. Para esto, utilizamos al nematode *C. elegans* como modelo de estudio debido a las enormes ventajas que representa el mismo en biomedicina. En estos animales, la mutación del gen *daf-18* (homólogo de *PTEN*) produce defectos comportamentales y de morfología neuronal compatibles con un modelo de desequilibrio de los sistemas excitatorios/inhibitorios. Estos defectos se dan durante el neurodesarrollo y parecen depender de la consecuente menor actividad del factor de transcripción DAF-16 (homólogo de FOXO de mamíferos). En este aspecto, hemos abordado la temática de las DCs como potencial herramienta terapéutica. Una de las características subyacentes a esta y otras estrategias alimentarias es la producción de CCs, entre los cuales el más importante en abundancia es el β HB. Muchos autores apuntan a estos compuestos como los responsables de los beneficios observados en dichas dietas. Como estrategia, hemos estudiado los efectos que produce la suplementación del CC β HB en *C. elegans*, observando que el mismo es capaz de atenuar los fenotipos asociados a la pérdida de función de *daf-18*. El compuesto es eficaz en aminorar parcialmente algunos defectos que dicha mutación origina durante el desarrollo temprano de una manera dependiente de DAF-16 (Fig. 43). La suplementación tardía del β HB no resulta en beneficios evidentes. Este estudio representa un

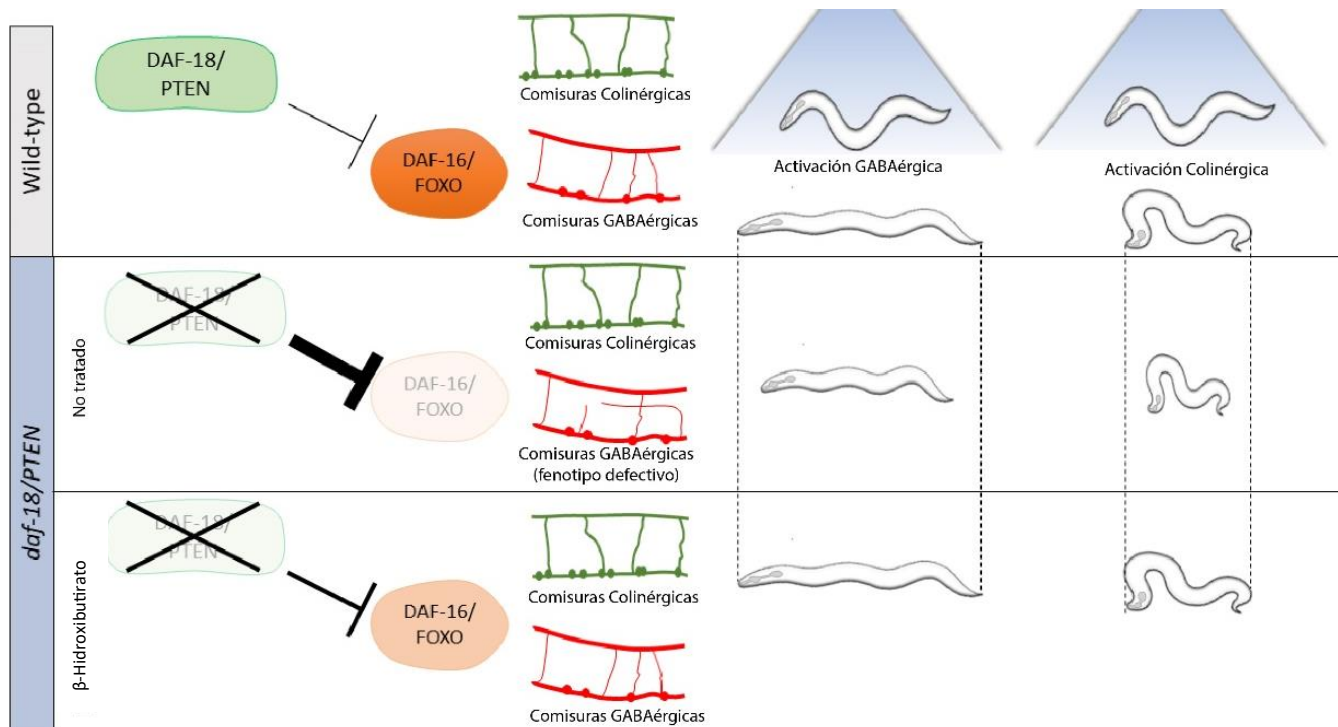


Figura 43. Resumen gráfico representando los principales hallazgos del presente trabajo.

punto de partida para el abordaje del estudio de estrategias terapéuticas para los DND. Estudios adicionales serán necesarios para el desarrollo de terapias efectivas, tanto para el TEA como también para otros DND.

Bibliografía

- 1 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).
- 2 Ludwig, P. E., Reddy, V. & Varacallo, M. in *StatPearls* (StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC., 2024).
- 3 Chakraborty, R., Vijay Kumar, M. J. & Clement, J. P. Critical aspects of neurodevelopment. *Neurobiol Learn Mem* **180**, 107415, doi:10.1016/j.nlm.2021.107415 (2021).
- 4 Bessa, C., Maciel, P. & Rodrigues, A. J. Using *C. elegans* to decipher the cellular and molecular mechanisms underlying neurodevelopmental disorders. *Mol Neurobiol* **48**, 465-489, doi:10.1007/s12035-013-8434-6 (2013).
- 5 LeBlanc, J. J. & Fagiolini, M. Autism: a "critical period" disorder? *Neural Plast* **2011**, 921680, doi:10.1155/2011/921680 (2011).
- 6 Martin, B. S. & Huntsman, M. M. Pathological Plasticity in Fragile X Syndrome. *Neural Plasticity* **2012**, 275630, doi:<https://doi.org/10.1155/2012/275630> (2012).
- 7 Meredith, R. M. Sensitive and critical periods during neurotypical and aberrant neurodevelopment: A framework for neurodevelopmental disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **50**, 180-188, doi:<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.12.001> (2015).
- 8 Kroon, T., Sierksma, M. C. & Meredith, R. M. Investigating mechanisms underlying neurodevelopmental phenotypes of autistic and intellectual disability disorders: a perspective. *Front Syst Neurosci* **7**, 75, doi:10.3389/fnsys.2013.00075 (2013).
- 9 Meredith, R. M. Sensitive and critical periods during neurotypical and aberrant neurodevelopment: a framework for neurodevelopmental disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **50**, 180-188, doi:10.1016/j.neubiorev.2014.12.001 (2015).
- 10 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).
- 11 Gidziela, A. *et al.* A meta-analysis of genetic effects associated with neurodevelopmental disorders and co-occurring conditions. *Nature Human Behaviour* **7**, 642-656, doi:10.1038/s41562-023-01530-y (2023).
- 12 Owen, M. J., O'Donovan, M. C., Thapar, A. & Craddock, N. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Br J Psychiatry* **198**, 173-175, doi:10.1192/bjp.bp.110.084384 (2011).
- 13 Glatt, S. J., Faraone, S. V. & Tsuang, M. T. in *Schizophrenia* (eds Stephen J. Glatt, Stephen V. Faraone, & Ming T. Tsuang) 0 (Oxford University Press, 2019).
- 14 Bougeard, C., Picarel-Blanchot, F., Schmid, R., Campbell, R. & Buitelaar, J. Prevalence of Autism Spectrum Disorder and Co-morbidities in Children and Adolescents: A Systematic Literature Review. *Front Psychiatry* **12**, 744709, doi:10.3389/fpsyt.2021.744709 (2021).
- 15 Yan, X. *et al.* Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children and Adolescents in the United States from 2021 to 2022. *J Autism Dev Disord*, doi:10.1007/s10803-024-06390-7 (2024).
- 16 Zeidan, J. *et al.* Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res* **15**, 778-790, doi:10.1002/aur.2696 (2022).
- 17 Hirota, T. & King, B. H. Autism Spectrum Disorder: A Review. *Jama* **329**, 157-168, doi:10.1001/jama.2022.23661 (2023).

- 18 *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5™*. 5th edition. edn,
(American Psychiatric Publishing, a division of American Psychiatric Association, 2013).
- 19 Park, H. R. *et al.* A Short Review on the Current Understanding of Autism Spectrum
Disorders. *Exp Neurobiol* **25**, 1-13, doi:10.5607/en.2016.25.1.1 (2016).
- 20 Leblond, C. S. *et al.* Operative list of genes associated with autism and
neurodevelopmental disorders based on database review. *Mol Cell Neurosci* **113**,
103623, doi:10.1016/j.mcn.2021.103623 (2021).
- 21 Aishworiya, R., Valica, T., Hagerman, R. & Restrepo, B. An Update on
Psychopharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. *Neurotherapeutics*
19, 248-262, doi:10.1007/s13311-022-01183-1 (2022).
- 22 Okoye, C. *et al.* Early Diagnosis of Autism Spectrum Disorder: A Review and Analysis of
the Risks and Benefits. *Cureus* **15**, e43226, doi:10.7759/cureus.43226 (2023).
- 23 Rawsthorne, H., Calahorra, F., Holden-Dye, L., V, O. C. & Dillon, J. Investigating autism
associated genes in *C. elegans* reveals candidates with a role in social behaviour. *PLoS
One* **16**, e0243121, doi:10.1371/journal.pone.0243121 (2021).
- 24 Willsey, A. J. & State, M. W. Autism spectrum disorders: from genes to neurobiology.
Curr Opin Neurobiol **30**, 92-99, doi:10.1016/j.conb.2014.10.015 (2015).
- 25 Stessman, H. A., Bernier, R. & Eichler, E. E. A genotype-first approach to defining the
subtypes of a complex disease. *Cell* **156**, 872-877, doi:10.1016/j.cell.2014.02.002
(2014).
- 26 Ichtchenko, K. *et al.* Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell*
81, 435-443, doi:10.1016/0092-8674(95)90396-8 (1995).
- 27 Naisbitt, S. *et al.* Shank, a Novel Family of Postsynaptic Density Proteins that Binds to
the NMDA Receptor/PSD-95/GKAP Complex and Cortactin. *Neuron* **23**, 569-582,
doi:10.1016/S0896-6273(00)80809-0 (1999).
- 28 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).
- 29 Khoja, S., Haile, M. T. & Chen, L. Y. Advances in neurexin studies and the emerging role
of neurexin-2 in autism spectrum disorder. *Front Mol Neurosci* **16**, 1125087,
doi:10.3389/fnmol.2023.1125087 (2023).
- 30 Laumonnier, F. *et al.* X-linked mental retardation and autism are associated with a
mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* **74**,
552-557, doi:10.1086/382137 (2004).
- 31 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).
- 32 Leblond, C. S. *et al.* Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders:
a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet* **10**, e1004580,
doi:10.1371/journal.pgen.1004580 (2014).
- 33 Durand, C. M. *et al.* Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein
SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* **39**, 25-27,
doi:10.1038/ng1933 (2007).
- 34 Thomas, S. D., Jha, N. K., Ojha, S. & Sadek, B. mTOR Signaling Disruption and Its
Association with the Development of Autism Spectrum Disorder. *Molecules* **28**,
doi:10.3390/molecules28041889 (2023).
- 35 Bernier, R. *et al.* Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in
development. *Cell* **158**, 263-276, doi:10.1016/j.cell.2014.06.017 (2014).
- 36 Campbell, D. B. *et al.* A genetic variant that disrupts MET transcription is associated
with autism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16834-16839,
doi:10.1073/pnas.0605296103 (2006).
- 37 Skelton, P. D., Stan, R. V. & Luikart, B. W. The Role of PTEN in Neurodevelopment. *Mol
Neuropsychiatry* **5**, 60-71, doi:10.1159/000504782 (2020).

- 38 Butler, M. G. *et al.* Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet* **42**, 318-321, doi:10.1136/jmg.2004.024646 (2005).
- 39 Varga, E. A., Pastore, M., Prior, T., Herman, G. E. & McBride, K. L. The prevalence of PTEN mutations in a clinical pediatric cohort with autism spectrum disorders, developmental delay, and macrocephaly. *Genet Med* **11**, 111-117, doi:10.1097/GIM.0b013e31818fd762 (2009).
- 40 Zhou, J. & Parada, L. F. PTEN signaling in autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurobiol* **22**, 873-879, doi:10.1016/j.conb.2012.05.004 (2012).
- 41 Yehia, L., Keel, E. & Eng, C. The Clinical Spectrum of PTEN Mutations. *Annu Rev Med* **71**, 103-116, doi:10.1146/annurev-med-052218-125823 (2020).
- 42 Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Research* **46**, D1062-D1067, doi:10.1093/nar/gkx1153 (2018).
- 43 Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Scott, A. F. & Hamosh, A. OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships. *Nucleic Acids Res* **47**, D1038-d1043, doi:10.1093/nar/gky1151 (2019).
- 44 Romussi, S., Giunti, S., Andersen, N. & De Rosa, M. J. C. elegans: a prominent platform for modeling and drug screening in neurological disorders. *Expert Opin Drug Discov* **19**, 565-585, doi:10.1080/17460441.2024.2329103 (2024).
- 45 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).
- 46 Brenner, S. The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics* **77**, 71-94, doi:10.1093/genetics/77.1.71 (1974).
- 47 Giunti, S., Andersen, N., Rayes, D. & De Rosa, M. J. Drug discovery: Insights from the invertebrate Caenorhabditis elegans. *Pharmacol Res Perspect* **9**, e00721, doi:10.1002/prp2.721 (2021).
- 48 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).
- 49 Hodgkin, J. A. & Brenner, S. Mutations causing transformation of sexual phenotype in the nematode Caenorhabditis elegans. *Genetics* **86**, 275-287 (1977).
- 50 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).
- 51 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).
- 52 Waterston, R. & Sulston, J. The genome of Caenorhabditis elegans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10836-10840, doi:10.1073/pnas.92.24.10836 (1995).
- 53 The, C. e. S. C. Genome Sequence of the Nematode C. elegans: A Platform for Investigating Biology. *Science* **282**, 2012-2018, doi:10.1126/science.282.5396.2012 (1998).
- 54 Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805, doi:10.1126/science.8303295 (1994).
- 55 Miller lii, D. M. *et al.* Two-Color GFP Expression System for C. elegans. *BioTechniques* **26**, 914-921, doi:10.2144/99265rr01 (1999).
- 56 Heppert, J. K. *et al.* Comparative assessment of fluorescent proteins for in vivo imaging in an animal model system. *Mol Biol Cell* **27**, 3385-3394, doi:10.1091/mbc.E16-01-0063 (2016).
- 57 Chung, S. H., Sun, L. & Gabel, C. V. In vivo neuronal calcium imaging in C. elegans. *J Vis Exp*, doi:10.3791/50357 (2013).

- 58 White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. & Brenner, S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **314**, 1-340, doi:10.1098/rstb.1986.0056 (1986).
- 59 Cook, S. J. *et al.* Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature* **571**, 63-71, doi:10.1038/s41586-019-1352-7 (2019).
- 60 Han, M. & Sternberg, P. W. *let-60*, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction, encodes a ras protein. *Cell* **63**, 921-931, doi:10.1016/0092-8674(90)90495-z (1990).
- 61 Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. & Tabtiang, R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**, 461-464, doi:10.1038/366461a0 (1993).
- 62 Bargmann, C. I. & Horvitz, H. R. Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* **7**, 729-742, doi:10.1016/0896-6273(91)90276-6 (1991).
- 63 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).
- 64 Sherman, D. & Harel, D. Deciphering the underlying mechanisms of the pharyngeal pumping motions in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **121**, e2302660121, doi:10.1073/pnas.2302660121 (2024).
- 65 Trojanowski, N. F., Raizen, D. M. & Fang-Yen, C. Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system. *Sci Rep* **6**, 22940, doi:10.1038/srep22940 (2016).
- 66 Philbrook, A. *et al.* Neurexin directs partner-specific synaptic connectivity in *C. elegans*. *eLife* **7**, e35692, doi:10.7554/eLife.35692 (2018).
- 67 Gao, L. *et al.* Shank promotes action potential repolarization by recruiting BK channels to calcium microdomains. *eLife* **11**, e75140, doi:10.7554/eLife.75140 (2022).
- 68 Tomioka, M. *et al.* The insulin/PI 3-kinase pathway regulates salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* **51**, 613-625, doi:10.1016/j.neuron.2006.07.024 (2006).
- 69 Christensen, R., de la Torre-Ubieta, L., Bonni, A. & Colón-Ramos, D. A. A conserved PTEN/FOXO pathway regulates neuronal morphology during *C. elegans* development. *Development* **138**, 5257-5267, doi:10.1242/dev.069062 (2011).
- 70 Sebastián, G., María Gabriela, B., María José De, R. & Diego, R. The ketone body β -hydroxybutyrate rescues GABAergic defects in *C. elegans* *daf-18/PTEN* mutants. *bioRxiv*, 2023.2004.2006.535850, doi:10.1101/2023.04.06.535850 (2023).
- 71 de Souza, N., Vallier, L. G., Fares, H. & Greenwald, I. SEL-2, the *C. elegans* neurobeachin/LRBA homolog, is a negative regulator of *lin-12*/Notch activity and affects endosomal traffic in polarized epithelial cells. *Development* **134**, 691-702, doi:10.1242/dev.02767 (2007).
- 72 Hukema, R. K., Rademakers, S. & Jansen, G. Gustatory plasticity in *C. elegans* involves integration of negative cues and NaCl taste mediated by serotonin, dopamine, and glutamate. *Learn Mem* **15**, 829-836, doi:10.1101/lm.994408 (2008).
- 73 Schmeisser, K., Fardghassemi, Y. & Parker, J. A. A rapid chemical-genetic screen utilizing impaired movement phenotypes in *C. elegans*: Input into genetics of neurodevelopmental disorders. *Exp Neurol* **293**, 101-114, doi:10.1016/j.expneurol.2017.03.022 (2017).
- 74 Vohra, M., Lemieux, G. A., Lin, L. & Ashrafi, K. The beneficial effects of dietary restriction on learning are distinct from its effects on longevity and mediated by depletion of a neuroinhibitory metabolite. *PLOS Biology* **15**, e2002032, doi:10.1371/journal.pbio.2002032 (2017).

- 75 Mullen, G. P. *et al.* The *Caenorhabditis elegans* snf-11 Gene Encodes a Sodium-dependent GABA Transporter Required for Clearance of Synaptic GABA. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 3021-3030, doi:10.1091/mbc.e06-02-0155 (2006).
- 76 Gyurkó, M. D., Csermely, P., Sőti, C. & Steták, A. Distinct roles of the RasGAP family proteins in *C. elegans* associative learning and memory. *Scientific Reports* **5**, 15084, doi:10.1038/srep15084 (2015).
- 77 Steger, K. A., Shtonda, B. B., Thacker, C., Snutch, T. P. & Avery, L. The *C. elegans* T-type calcium channel CCA-1 boosts neuromuscular transmission. *Journal of Experimental Biology* **208**, 2191-2203, doi:10.1242/jeb.01616 (2005).
- 78 Katidou, M., Tavernarakis, N. & Karagogeos, D. The contactin RIG-6 mediates neuronal and non-neuronal cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **373**, 184-195, doi:10.1016/j.ydbio.2012.10.027 (2013).
- 79 Mack, H. I. D., Zhang, P., Fonslow, B. R. & Yates, J. R. The protein kinase MBK-1 contributes to lifespan extension in daf-2 mutant and germline-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)* **9**, 1414-1432, doi:10.18632/aging.101244 (2017).
- 80 McDiarmid, T. A. *et al.* Systematic phenomics analysis of autism-associated genes reveals parallel networks underlying reversible impairments in habituation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 656-667, doi:10.1073/pnas.1912049116 (2020).
- 81 Delaney, C. E., Chen, A. T., Graniel, J. V., Dumas, K. J. & Hu, P. J. A histone H4 lysine 20 methyltransferase couples environmental cues to sensory neuron control of developmental plasticity. *Development* **144**, 1273-1282, doi:10.1242/dev.145722 (2017).
- 82 Lee, H.-C. *et al.* Depletion of mboa-7, an enzyme that incorporates polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol (PI), impairs PI 3-phosphate signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells* **17**, 748-757, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01624.x> (2012).
- 83 Di Rocco, M. *et al.* *Caenorhabditis elegans* provides an efficient drug screening platform for GNAO1-related disorders and highlights the potential role of caffeine in controlling dyskinesia. *Hum Mol Genet* **31**, 929-941, doi:10.1093/hmg/ddab296 (2022).
- 84 Ye, D. *et al.* Modeling neurodevelopmental disorder-associated hAGO1 mutations in C. elegans Argonaute ALG-1. *bioRxiv*, 2023.2004.2006.535748, doi:10.1101/2023.04.06.535748 (2023).
- 85 Aoyagi, K. *et al.* A Gain-of-Function Mutation in NALCN in a Child with Intellectual Disability, Ataxia, and Arthrogryposis. *Hum Mutat* **36**, 753-757, doi:10.1002/humu.22797 (2015).
- 86 AlAbdi, L. *et al.* Loss-of-function variants in MYCBP2 cause neurobehavioural phenotypes and corpus callosum defects. *Brain* **146**, 1373-1387, doi:10.1093/brain/awac364 (2023).
- 87 Weimer, R. M. *et al.* Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants. *Nat Neurosci* **6**, 1023-1030, doi:10.1038/nn1118 (2003).
- 88 van der Voet, M. *et al.* NuMA-related LIN-5, ASPM-1, calmodulin and dynein promote meiotic spindle rotation independently of cortical LIN-5/GPR/Gα. *Nature Cell Biology* **11**, 269-277, doi:10.1038/ncb1834 (2009).
- 89 Kleine-Kohlbrecher, D. *et al.* A functional link between the histone demethylase PHF8 and the transcription factor ZNF711 in X-linked mental retardation. *Mol Cell* **38**, 165-178, doi:10.1016/j.molcel.2010.03.002 (2010).
- 90 Melkman, T. & Sengupta, P. Regulation of chemosensory and GABAergic motor neuron development by the *C. elegans* Aristaless/Arx homolog alr-1. *Development* **132**, 1935-1949, doi:10.1242/dev.01788 (2005).

- 91 Suthakaran, N. *et al.* O-GlcNAc transferase OGT-1 and the ubiquitin ligase EEL-1 modulate seizure susceptibility in *C. elegans*. *PLoS One* **16**, e0260072, doi:10.1371/journal.pone.0260072 (2021).
- 92 Abay-Nørgaard, S., Attianese, B., Boreggio, L. & Salcini, A. E. Regulators of H3K4 methylation mutated in neurodevelopmental disorders control axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **147**, doi:10.1242/dev.190637 (2020).
- 93 Uehara, T. *et al.* Pathogenetic basis of Takenouchi-Kosaki syndrome: Electron microscopy study using platelets in patients and functional studies in a *Caenorhabditis elegans* model. *Scientific Reports* **9**, 4418, doi:10.1038/s41598-019-40988-7 (2019).
- 94 Locke, C. J., Williams, S. N., Schwarz, E. M., Caldwell, G. A. & Caldwell, K. A. Genetic interactions among cortical malformation genes that influence susceptibility to convulsions in *C. elegans*. *Brain Res* **1120**, 23-34, doi:10.1016/j.brainres.2006.08.067 (2006).
- 95 Liu, Q., Hollopeter, G. & Jorgensen, E. M. Graded synaptic transmission at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 10823-10828, doi:10.1073/pnas.0903570106 (2009).
- 96 Williams, S. N., Locke, C. J., Braden, A. L., Caldwell, K. A. & Caldwell, G. A. Epileptic-like convulsions associated with LIS-1 in the cytoskeletal control of neurotransmitter signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet* **13**, 2043-2059, doi:10.1093/hmg/ddh209 (2004).
- 97 Zhu, B. *et al.* Functional analysis of epilepsy-associated variants in STXBP1/Munc18-1 using humanized *Caenorhabditis elegans*. *Epilepsia* **61**, 810-821, doi:<https://doi.org/10.1111/epi.16464> (2020).
- 98 Locke, C. J. *et al.* Pharmacogenetic analysis reveals a post-developmental role for Rac GTPases in *Caenorhabditis elegans* GABAergic neurotransmission. *Genetics* **183**, 1357-1372, doi:10.1534/genetics.109.106880 (2009).
- 99 Stawicki, T. M., Zhou, K., Yochem, J., Chen, L. & Jin, Y. TRPM channels modulate epileptic-like convulsions via systemic ion homeostasis. *Curr Biol* **21**, 883-888, doi:10.1016/j.cub.2011.03.070 (2011).
- 100 Li, C. *et al.* UBR7 functions with UBR5 in the Notch signaling pathway and is involved in a neurodevelopmental syndrome with epilepsy, ptosis, and hypothyroidism. *The American Journal of Human Genetics* **108**, 134-147, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.11.018> (2021).
- 101 Cox, G. N., Laufer, J. S., Kusch, M. & Edgar, R. S. Genetic and Phenotypic Characterization of Roller Mutants of CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* **95**, 317-339, doi:10.1093/genetics/95.2.317 (1980).
- 102 Ambros, V. Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**, 428-433, doi:[https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00108-8) (2000).
- 103 Vanfleteren, J. R. & Braeckman, B. P. Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*☆. *Neurobiology of Aging* **20**, 487-502, doi:[https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00087-1](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00087-1) (1999).
- 104 Uno, M. & Nishida, E. Lifespan-regulating genes in *C. elegans*. *npj Aging and Mechanisms of Disease* **2**, 16010, doi:10.1038/npjamd.2016.10 (2016).
- 105 Yen, C. A. & Curran, S. P. Methods for Assessing Fertility in *C. elegans* from a Single Population. *Methods Mol Biol* **2144**, 91-102, doi:10.1007/978-1-0716-0592-9_8 (2020).
- 106 Mei, X. & Singson, A. W. The molecular underpinnings of fertility: Genetic approaches in *Caenorhabditis elegans*. *Advanced Genetics* **2**, e10034, doi:<https://doi.org/10.1002/ggn2.10034> (2021).
- 107 Blanco, M. G. *et al.* Diisopropylphenyl-imidazole (DII): A new compound that exerts anthelmintic activity through novel molecular mechanisms. *PLoS Negl Trop Dis* **12**, e0007021, doi:10.1371/journal.pntd.0007021 (2018).

- 108 Blaxter, M. L. *et al.* A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* **392**, 71-75, doi:10.1038/32160 (1998).
- 109 Corsi, A. K., Wightman, B. & Chalfie, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **200**, 387-407, doi:10.1534/genetics.115.176099 (2015).
- 110 Kimble, J. & Hirsh, D. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **70**, 396-417, doi:10.1016/0012-1606(79)90035-6 (1979).
- 111 Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. & Thomson, J. N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119, doi:10.1016/0012-1606(83)90201-4 (1983).
- 112 Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, 1-11, doi:10.1895/wormbook.1.101.1 (2006).
- 113 Byerly, L., Cassada, R. C. & Russell, R. L. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol* **51**, 23-33, doi:10.1016/0012-1606(76)90119-6 (1976).
- 114 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).
- 115 Ward, S. & Carrel, J. S. Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **73**, 304-321, doi:10.1016/0012-1606(79)90069-1 (1979).
- 116 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).
- 117 Frézal, L. & Félix, M.-A. *C. elegans* outside the Petri dish. *eLife* **4**, e05849, doi:10.7554/eLife.05849 (2015).
- 118 Schulenburg, H. & Félix, M. A. The Natural Biotic Environment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **206**, 55-86, doi:10.1534/genetics.116.195511 (2017).
- 119 Albertson, D. G. & Thomson, J. N. The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**, 299-325, doi:10.1098/rstb.1976.0085 (1976).
- 120 Dimov, I. & Maduro, M. F. The *C. elegans* intestine: organogenesis, digestion, and physiology. *Cell Tissue Res* **377**, 383-396, doi:10.1007/s00441-019-03036-4 (2019).
- 121 Shaye, D. D. & Greenwald, I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One* **6**, e20085, doi:10.1371/journal.pone.0020085 (2011).
- 122 Culetto, E. & Sattelle, D. B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* **9**, 869-877, doi:10.1093/hmg/9.6.869 (2000).
- 123 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).
- 124 Walsh, J. D., Boivin, O. & Barr, M. M. What about the males? the *C. elegans* sexually dimorphic nervous system and a CRISPR-based tool to study males in a hermaphroditic species. *J Neurogenet* **34**, 323-334, doi:10.1080/01677063.2020.1789978 (2020).
- 125 Jarrell, T. A. *et al.* The connectome of a decision-making neural network. *Science* **337**, 437-444, doi:10.1126/science.1221762 (2012).
- 126 Ward, S., Thomson, N., White, J. G. & Brenner, S. Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* **160**, 313-337, doi:10.1002/cne.901600305 (1975).
- 127 Wang, C. *et al.* (eLife Sciences Publications, Ltd, 2024).
- 128 Moerman, D. G. & Fire, A. in *C. elegans II* (eds D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer, & J. R. Priess) (Cold Spring Harbor Laboratory Press

Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1997).

- 129 Dixon, S. J. & Roy, P. J. Muscle arm development in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **132**, 3079-3092, doi:10.1242/dev.01883 (2005).
- 130 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).
- 131 Haspel, G., O'Donovan, M. J. & Hart, A. C. Motoneurons dedicated to either forward or backward locomotion in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **30**, 11151-11156, doi:10.1523/jneurosci.2244-10.2010 (2010).
- 132 Pierce-Shimomura, J. T. *et al.* Genetic analysis of crawling and swimming locomotory patterns in *C. elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 20982-20987, doi:10.1073/pnas.0810359105 (2008).
- 133 Chalfie, M. *et al.* The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **5**, 956-964, doi:10.1523/jneurosci.05-04-00956.1985 (1985).
- 134 Harbinder, S. *et al.* Genetically targeted cell disruption in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13128-13133, doi:10.1073/pnas.94.24.13128 (1997).
- 135 Gendrel, M., Atlas, E. G. & Hobert, O. A cellular and regulatory map of the GABAergic nervous system of *C. elegans*. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.17686 (2016).
- 136 Pereira, L. *et al.* A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *Elife* **4**, doi:10.7554/eLife.12432 (2015).
- 137 White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. & Brenner, S. The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**, 327-348, doi:10.1098/rstb.1976.0086 (1976).
- 138 Tolstenkov, O. *et al.* Functionally asymmetric motor neurons contribute to coordinating locomotion of *Caenorhabditis elegans*. *eLife* **7**, e34997, doi:10.7554/eLife.34997 (2018).
- 139 Fay, D. Genetic mapping and manipulation: chapter 1--Introduction and basics. *WormBook*, 1-12, doi:10.1895/wormbook.1.90.1 (2006).
- 140 Anderson, J. L., Morran, L. T. & Phillips, P. C. Outcrossing and the maintenance of males within *C. elegans* populations. *J Hered* **101 Suppl 1**, S62-74, doi:10.1093/jhered/esq003 (2010).
- 141 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).
- 142 Cáceres Ide, C., Valmas, N., Hilliard, M. A. & Lu, H. Laterally orienting *C. elegans* using geometry at microscale for high-throughput visual screens in neurodegeneration and neuronal development studies. *PLoS One* **7**, e35037, doi:10.1371/journal.pone.0035037 (2012).
- 143 Steck, P. A. *et al.* Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* **15**, 356-362, doi:10.1038/ng0497-356 (1997).
- 144 DeSpensa, T., Jr. *et al.* PTEN mutations in autism spectrum disorder and congenital hydrocephalus: developmental pleiotropy and therapeutic targets. *Trends Neurosci* **44**, 961-976, doi:10.1016/j.tins.2021.08.007 (2021).
- 145 Lee, Y.-R., Chen, M. & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 547-562, doi:10.1038/s41580-018-0015-0 (2018).
- 146 Liu, J. *et al.* The regulation of PTEN: Novel insights into functions as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Cell Physiol* **238**, 1693-1715, doi:10.1002/jcp.31053 (2023).
- 147 Hopkins, B. D., Hodakoski, C., Barrows, D., Mense, S. M. & Parsons, R. E. PTEN function: the long and the short of it. *Trends Biochem Sci* **39**, 183-190, doi:10.1016/j.tibs.2014.02.006 (2014).

- 148 Chen, C. Y., Chen, J., He, L. & Stiles, B. L. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 338, doi:10.3389/fendo.2018.00338 (2018).
- 149 Maehama, T. & Dixon, J. E. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* **9**, 125-128, doi:10.1016/s0962-8924(99)01519-6 (1999).
- 150 Sulis, M. L. & Parsons, R. PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol* **13**, 478-483, doi:10.1016/s0962-8924(03)00175-2 (2003).
- 151 Bonneau, D. & Longy, M. Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mutat* **16**, 109-122, doi:10.1002/1098-1004(200008)16:2<109::Aid-humu3>3.0.Co;2-0 (2000).
- 152 Li, J. *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947, doi:10.1126/science.275.5308.1943 (1997).
- 153 Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960-976, doi:10.1016/j.cell.2017.02.004 (2017).
- 154 Papadopoli, D. *et al.* mTOR as a central regulator of lifespan and aging. *F1000Res* **8**, doi:10.12688/f1000research.17196.1 (2019).
- 155 Song, M. S. *et al.* Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* **144**, 187-199, doi:10.1016/j.cell.2010.12.020 (2011).
- 156 Fricano-Kugler, C. J. *et al.* Nuclear Excluded Autism-Associated Phosphatase and Tensin Homolog Mutations Dysregulate Neuronal Growth. *Biol Psychiatry* **84**, 265-277, doi:10.1016/j.biopsych.2017.11.025 (2018).
- 157 Howitt, J. *et al.* Ndfip1 regulates nuclear Pten import in vivo to promote neuronal survival following cerebral ischemia. *J Cell Biol* **196**, 29-36, doi:10.1083/jcb.201105009 (2012).
- 158 Bassi, C. *et al.* Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. *Science* **341**, 395-399, doi:10.1126/science.1236188 (2013).
- 159 Shen, W. H. *et al.* Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* **128**, 157-170, doi:10.1016/j.cell.2006.11.042 (2007).
- 160 Torres, J. & Pulido, R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* **276**, 993-998, doi:10.1074/jbc.M009134200 (2001).
- 161 Arevalo, M. A. & Rodríguez-Tébar, A. Activation of casein kinase II and inhibition of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75NTR inhibit glycogen synthase kinase-3 β and stimulate axonal growth. *Mol Biol Cell* **17**, 3369-3377, doi:10.1091/mbc.e05-12-1144 (2006).
- 162 Chadborn, N. H. *et al.* PTEN couples Sema3A signalling to growth cone collapse. *J Cell Sci* **119**, 951-957, doi:10.1242/jcs.02801 (2006).
- 163 Oinuma, I., Ito, Y., Katoh, H. & Negishi, M. Semaphorin 4D/Plexin-B1 stimulates PTEN activity through R-Ras GTPase-activating protein activity, inducing growth cone collapse in hippocampal neurons. *J Biol Chem* **285**, 28200-28209, doi:10.1074/jbc.M110.147546 (2010).
- 164 Torres, J. *et al.* Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem* **278**, 30652-30660, doi:10.1074/jbc.M212610200 (2003).
- 165 Trotman, L. C. *et al.* Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* **128**, 141-156, doi:10.1016/j.cell.2006.11.040 (2007).
- 166 Nguyen, H. N. *et al.* Mechanism of human PTEN localization revealed by heterologous expression in Dictyostelium. *Oncogene* **33**, 5688-5696, doi:10.1038/onc.2013.507 (2014).
- 167 Cheung, L. W. *et al.* High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov* **1**, 170-185, doi:10.1158/2159-8290.Cd-11-0039 (2011).

- 168 Luongo, F. *et al.* PTEN Tumor-Suppressor: The Dam of Stemness in Cancer. *Cancers (Basel)* **11**, doi:10.3390/cancers11081076 (2019).
 - 169 Bonneau, D. & Longy, M. Mutations of the human PTEN gene. *Human Mutation* **16**, 109-122, doi:[https://doi.org/10.1002/1098-1004\(200008\)16:2<109::AID-HUMU3>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1098-1004(200008)16:2<109::AID-HUMU3>3.0.CO;2-0) (2000).
 - 170 Álvarez-García, V., Tawil, Y., Wise, H. M. & Leslie, N. R. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. *Semin Cancer Biol* **59**, 66-79, doi:10.1016/j.semcancer.2019.02.001 (2019).
 - 171 Yehia, L. & Eng, C. in *GeneReviews*(®) (eds M. P. Adam *et al.*) (University of Washington, Seattle
- Copyright © 1993-2024, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved., 1993).
- 172 Pilarski, R. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: A Clinical Overview. *Cancers (Basel)* **11**, doi:10.3390/cancers11060844 (2019).
 - 173 Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P. P. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* **19**, 348-355, doi:10.1038/1235 (1998).
 - 174 Clipperton-Allen, A. E. & Page, D. T. Pten haploinsufficient mice show broad brain overgrowth but selective impairments in autism-relevant behavioral tests. *Hum Mol Genet* **23**, 3490-3505, doi:10.1093/hmg/ddu057 (2014).
 - 175 Clipperton-Allen, A. E. & Page, D. T. Decreased aggression and increased repetitive behavior in Pten haploinsufficient mice. *Genes Brain Behav* **14**, 145-157, doi:10.1111/gbb.12192 (2015).
 - 176 Kwon, C. H. *et al.* Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron* **50**, 377-388, doi:10.1016/j.neuron.2006.03.023 (2006).
 - 177 Backman, S. A. *et al.* Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* **29**, 396-403, doi:10.1038/ng782 (2001).
 - 178 Fraser, M. M. *et al.* Pten Loss Causes Hypertrophy and Increased Proliferation of Astrocytes In vivo. *Cancer Research* **64**, 7773-7779, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2487 (2004).
 - 179 Kwon, C. H. *et al.* Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* **29**, 404-411, doi:10.1038/ng781 (2001).
 - 180 van Diepen, M. T. & Eickholt, B. J. Function of PTEN during the formation and maintenance of neuronal circuits in the brain. *Dev Neurosci* **30**, 59-64, doi:10.1159/000109852 (2008).
 - 181 Ogg, S. & Ruvkun, G. The C. elegans PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol Cell* **2**, 887-893, doi:10.1016/s1097-2765(00)80303-2 (1998).
 - 182 Gil, E. B., Malone Link, E., Liu, L. X., Johnson, C. D. & Lees, J. A. Regulation of the insulin-like developmental pathway of *Caenorhabditis elegans* by a homolog of the PTEN tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2925-2930, doi:10.1073/pnas.96.6.2925 (1999).
 - 183 Chen, J., Tang, L. Y., Powell, M. E., Jordan, J. M. & Baugh, L. R. Genetic analysis of daf-18/PTEN missense mutants for starvation resistance and developmental regulation during *Caenorhabditis elegans* L1 arrest. *G3 (Bethesda)* **12**, doi:10.1093/g3journal/jkac092 (2022).
 - 184 Malaney, P., Pathak, R. R., Xue, B., Uversky, V. N. & Davé, V. Intrinsic disorder in PTEN and its interactome confers structural plasticity and functional versatility. *Sci Rep* **3**, 2035, doi:10.1038/srep02035 (2013).

- 185 Mihaylova, V. T., Borland, C. Z., Manjarrez, L., Stern, M. J. & Sun, H. The PTEN tumor suppressor homolog in *Caenorhabditis elegans* regulates longevity and dauer formation in an insulin receptor-like signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7427-7432, doi:10.1073/pnas.96.13.7427 (1999).
- 186 Suzuki, Y. & Han, M. Genetic redundancy masks diverse functions of the tumor suppressor gene PTEN during *C. elegans* development. *Genes Dev* **20**, 423-428, doi:10.1101/gad.1378906 (2006).
- 187 Kennedy, L. M., Pham, S. C. & Grishok, A. Nonautonomous regulation of neuronal migration by insulin signaling, DAF-16/FOXO, and PAK-1. *Cell Rep* **4**, 996-1009, doi:10.1016/j.celrep.2013.07.045 (2013).
- 188 Garriga, G., Guenther, C. & Horvitz, H. R. Migrations of the *Caenorhabditis elegans* HSNs are regulated by egl-43, a gene encoding two zinc finger proteins. *Genes Dev* **7**, 2097-2109, doi:10.1101/gad.7.11.2097 (1993).
- 189 Mori, I. & Ohshima, Y. Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **376**, 344-348, doi:10.1038/376344a0 (1995).
- 190 de Bono, M. & Maricq, A. V. Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annu Rev Neurosci* **28**, 451-501, doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144259 (2005).
- 191 Ishihara, T. *et al.* HEN-1, a secretory protein with an LDL receptor motif, regulates sensory integration and learning in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **109**, 639-649, doi:10.1016/s0092-8674(02)00748-1 (2002).
- 192 Hobert, O. *et al.* Regulation of Interneuron Function in the *C. elegans* Thermoregulatory Pathway by the *ttx-3* LIM Homeobox Gene. *Neuron* **19**, 345-357, doi:[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80944-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80944-7) (1997).
- 193 Rubenstein, J. L. & Merzenich, M. M. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* **2**, 255-267, doi:10.1034/j.1601-183x.2003.00037.x (2003).
- 194 Sohal, V. S. & Rubenstein, J. L. R. Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* **24**, 1248-1257, doi:10.1038/s41380-019-0426-0 (2019).
- 195 Coghlan, S. *et al.* GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms. *Neurosci Biobehav Rev* **36**, 2044-2055, doi:10.1016/j.neubiorev.2012.07.005 (2012).
- 196 Cellot, G. & Cherubini, E. GABAergic signaling as therapeutic target for autism spectrum disorders. *Front Pediatr* **2**, 70, doi:10.3389/fped.2014.00070 (2014).
- 197 Gogolla, N. *et al.* Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *J Neurodev Disord* **1**, 172-181, doi:10.1007/s11689-009-9023-x (2009).
- 198 Chao, H.-T. *et al.* Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* **468**, 263-269, doi:10.1038/nature09582 (2010).
- 199 Robertson, C. E. & Baron-Cohen, S. Sensory perception in autism. *Nat Rev Neurosci* **18**, 671-684, doi:10.1038/nrn.2017.112 (2017).
- 200 Horder, J. *et al.* Reduced subcortical glutamate/glutamine in adults with autism spectrum disorders: a [(1)H]MRS study. *Transl Psychiatry* **4**, e364, doi:10.1038/tp.2014.7 (2014).
- 201 Nelson, S. B. & Valakh, V. Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron* **87**, 684-698, doi:10.1016/j.neuron.2015.07.033 (2015).
- 202 Lee, E., Lee, J. & Kim, E. Excitation/Inhibition Imbalance in Animal Models of Autism Spectrum Disorders. *Biol Psychiatry* **81**, 838-847, doi:10.1016/j.biopsych.2016.05.011 (2017).
- 203 Richmond, J. Synaptic function. *WormBook*, 1-14, doi:10.1895/wormbook.1.69.1 (2005).

- 204 Haucke, V., Neher, E. & Sigrist, S. J. Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nature Reviews Neuroscience* **12**, 127-138, doi:10.1038/nrn2948 (2011).
- 205 Thapliyal, S. & Babu, K. in *Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules* (eds Kausik Chattopadhyay & Subhash C. Basu) 185-196 (Springer Singapore, 2018).
- 206 Oh, K. H. & Kim, H. Aldicarb-induced Paralysis Assay to Determine Defects in Synaptic Transmission in *Caenorhabditis elegans*. *Bio Protoc* **7**, doi:10.21769/BioProtoc.2400 (2017).
- 207 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).
- 208 Lewis, J. A., Wu, C. H., Berg, H. & Levine, J. H. The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **95**, 905-928, doi:10.1093/genetics/95.4.905 (1980).
- 209 Fleming, J. T. *et al.* *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J Neurosci* **17**, 5843-5857, doi:10.1523/jneurosci.17-15-05843.1997 (1997).
- 210 Rand, J. B. Acetylcholine. *WormBook*, 1-21, doi:10.1895/wormbook.1.131.1 (2007).
- 211 Culetto, E. *et al.* The *Caenorhabditis elegans* *unc-63* Gene Encodes a Levamisole-sensitive Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit *. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 42476-42483, doi:10.1074/jbc.M404370200 (2004).
- 212 Richmond, J. E., Davis, W. S. & Jorgensen, E. M. UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nat Neurosci* **2**, 959-964, doi:10.1038/14755 (1999).
- 213 Deisseroth, K. Optogenetics. *Nat Methods* **8**, 26-29, doi:10.1038/nmeth.f.324 (2011).
- 214 Yizhar, O., Fenno, L. E., Davidson, T. J., Mogri, M. & Deisseroth, K. Optogenetics in neural systems. *Neuron* **71**, 9-34, doi:10.1016/j.neuron.2011.06.004 (2011).
- 215 Zhang, F., Aravanis, A. M., Adamantidis, A., de Lecea, L. & Deisseroth, K. Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems. *Nat Rev Neurosci* **8**, 577-581, doi:10.1038/nrn2192 (2007).
- 216 Fukuyama, M., Rougvié, A. E. & Rothman, J. H. *C. elegans* DAF-18/PTEN mediates nutrient-dependent arrest of cell cycle and growth in the germline. *Curr Biol* **16**, 773-779, doi:10.1016/j.cub.2006.02.073 (2006).
- 217 Liu, J. *et al.* Insulin activates the insulin receptor to downregulate the PTEN tumour suppressor. *Oncogene* **33**, 3878-3885, doi:10.1038/onc.2013.347 (2014).
- 218 McDiarmid, T. A. *et al.* CRISPR-Cas9 human gene replacement and phenomic characterization in *Caenorhabditis elegans* to understand the functional conservation of human genes and decipher variants of uncertain significance. *Dis Model Mech* **11**, doi:10.1242/dmm.036517 (2018).
- 219 Wittes, J. & Greenwald, I. Genetic analysis of DAF-18/PTEN missense mutants for the ability to maintain quiescence of the somatic gonad and germ line in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae. *G3 (Bethesda)* **12**, doi:10.1093/g3journal/jkac093 (2022).
- 220 Jin, Y., Jorgensen, E., Hartwig, E. & Horvitz, H. R. The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-25* encodes glutamic acid decarboxylase and is required for synaptic transmission but not synaptic development. *J Neurosci* **19**, 539-548, doi:10.1523/jneurosci.19-02-00539.1999 (1999).
- 221 Vashlishan, A. B. *et al.* An RNAi screen identifies genes that regulate GABA synapses. *Neuron* **58**, 346-361, doi:10.1016/j.neuron.2008.02.019 (2008).
- 222 Chaya, T. *et al.* A *C. elegans* genome-wide RNAi screen for altered levamisole sensitivity identifies genes required for muscle function. *G3 (Bethesda)* **11**, doi:10.1093/g3journal/jkab047 (2021).

- 223 Huang, Y. C. *et al.* Gain-of-function mutations in the UNC-2/CaV2 α channel lead to excitation-dominant synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* **8**, doi:10.7554/eLife.45905 (2019).
- 224 Lin, K., Dorman, J. B., Rodan, A. & Kenyon, C. daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* **278**, 1319-1322, doi:10.1126/science.278.5341.1319 (1997).
- 225 Ogg, S. *et al.* The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **389**, 994-999, doi:10.1038/40194 (1997).
- 226 Gami, M. S., Iser, W. B., Hanselman, K. B. & Wolkow, C. A. Activated AKT/PKB signaling in *C. elegans* uncouples temporally distinct outputs of DAF-2/insulin-like signaling. *BMC Dev Biol* **6**, 45, doi:10.1186/1471-213x-6-45 (2006).
- 227 Paradis, S., Ailion, M., Toker, A., Thomas, J. H. & Ruvkun, G. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **13**, 1438-1452, doi:10.1101/gad.13.11.1438 (1999).
- 228 Huang, W. C., Chen, Y. & Page, D. T. Genetic Suppression of mTOR Rescues Synaptic and Social Behavioral Abnormalities in a Mouse Model of Pten Haploinsufficiency. *Autism Res* **12**, 1463-1471, doi:10.1002/aur.2186 (2019).
- 229 Dhaliwal, N. K. *et al.* Synergistic hyperactivation of both mTORC1 and mTORC2 underlies the neural abnormalities of PTEN-deficient human neurons and cortical organoids. *Cell Rep* **43**, 114173, doi:10.1016/j.celrep.2024.114173 (2024).
- 230 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).
- 231 Schultheis, C., Brauner, M., Liewald, J. F. & Gottschalk, A. Optogenetic analysis of GABAB receptor signaling in *Caenorhabditis elegans* motor neurons. *J Neurophysiol* **106**, 817-827, doi:10.1152/jn.00578.2010 (2011).
- 232 Fang-Yen, C., Alkema, M. J. & Samuel, A. D. Illuminating neural circuits and behaviour in *Caenorhabditis elegans* with optogenetics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**, 20140212, doi:10.1098/rstb.2014.0212 (2015).
- 233 Pokala, N. & Glater, E. E. Using Optogenetics to Understand Neuronal Mechanisms Underlying Behavior in *C. elegans*. *J Undergrad Neurosci Educ* **16**, A152-a158 (2018).
- 234 Tsukada, Y. & Mori, I. Optogenetics in *Caenorhabditis elegans*. *Adv Exp Med Biol* **1293**, 321-334, doi:10.1007/978-981-15-8763-4_20 (2021).
- 235 Hwang, H. *et al.* Muscle contraction phenotypic analysis enabled by optogenetics reveals functional relationships of sarcomere components in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports* **6**, 19900, doi:10.1038/srep19900 (2016).
- 236 Liewald, J. F. *et al.* Optogenetic analysis of synaptic function. *Nat Methods* **5**, 895-902, doi:10.1038/nmeth.1252 (2008).
- 237 Oliver, D. *et al.* Integrins Have Cell-Type-Specific Roles in the Development of Motor Neuron Connectivity. *J Dev Biol* **7**, doi:10.3390/jdb7030017 (2019).
- 238 White, J. G., Albertson, D. G. & Anness, M. A. Connectivity changes in a class of motoneurone during the development of a nematode. *Nature* **271**, 764-766, doi:10.1038/271764a0 (1978).
- 239 Albertson, D. G., Sulston, J. E. & White, J. G. Cell cycling and DNA replication in a mutant blocked in cell division in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **63**, 165-178, doi:[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(78\)90122-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(78)90122-7) (1978).
- 240 Walthall, W. W., Li, L., Plunkett, J. A. & Hsu, C. Y. Changing synaptic specificities in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*: differentiation of the DD motoneurons. *J Neurobiol* **24**, 1589-1599, doi:10.1002/neu.480241204 (1993).

- 241 Tissenbaum, H. A. DAF-16: FOXO in the Context of *C. elegans*. *Curr Top Dev Biol* **127**, 1-21, doi:10.1016/bs.ctdb.2017.11.007 (2018).
- 242 Deng, Z., Zhou, X., Lu, J.-H. & Yue, Z. Autophagy deficiency in neurodevelopmental disorders. *Cell & Bioscience* **11**, 214, doi:10.1186/s13578-021-00726-x (2021).
- 243 Schäffner, I. *et al.* FoxO Function Is Essential for Maintenance of Autophagic Flux and Neuronal Morphogenesis in Adult Neurogenesis. *Neuron* **99**, 1188-1203.e1186, doi:10.1016/j.neuron.2018.08.017 (2018).
- 244 McLaughlin, C. N., Nechipurenko, I. V., Liu, N. & Broihier, H. T. A Toll receptor-FoxO pathway represses Pavarotti/MKLP1 to promote microtubule dynamics in motoneurons. *J Cell Biol* **214**, 459-474, doi:10.1083/jcb.201601014 (2016).
- 245 Osterwalder, M. *et al.* Enhancer redundancy provides phenotypic robustness in mammalian development. *Nature* **554**, 239-243, doi:10.1038/nature25461 (2018).
- 246 Spitz, F. & Furlong, E. E. M. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics* **13**, 613-626, doi:10.1038/nrg3207 (2012).
- 247 Hobert, O. PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. *Biotechniques* **32**, 728-730, doi:10.2144/02324bm01 (2002).
- 248 Schade, M. A., Reynolds, N. K., Dollins, C. M. & Miller, K. G. Mutations that rescue the paralysis of *Caenorhabditis elegans* ric-8 (synembryn) mutants activate the G alpha(s) pathway and define a third major branch of the synaptic signaling network. *Genetics* **169**, 631-649, doi:10.1534/genetics.104.032334 (2005).
- 249 Reyes, E. & Pizarro, L. Rol de la terapia farmacológica en los trastornos del espectro autista. *Revista Médica Clínica Las Condes* **33**, 387-399, doi:<https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2022.07.002> (2022).
- 250 Baribeau, D. & Anagnostou, E. Novel treatments for autism spectrum disorder based on genomics and systems biology. *Pharmacol Ther* **230**, 107939, doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107939 (2022).
- 251 Ozlu, C., Bailey, R. M., Sinnott, S. & Goodspeed, K. D. Gene Transfer Therapy for Neurodevelopmental Disorders. *Dev Neurosci* **43**, 230-240, doi:10.1159/000515434 (2021).
- 252 Lovaas, O. I. Behavioral treatment and normal educational and intellectual functioning in young autistic children. *J Consult Clin Psychol* **55**, 3-9, doi:10.1037//0022-006x.55.1.3 (1987).
- 253 Reichow, B., Hume, K., Barton, E. E. & Boyd, B. A. Early intensive behavioral intervention (EIBI) for young children with autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst Rev* **5**, Cd009260, doi:10.1002/14651858.CD009260.pub3 (2018).
- 254 Gitimoghaddam, M., Chichkine, N., McArthur, L., Sangha, S. S. & Symington, V. Applied Behavior Analysis in Children and Youth with Autism Spectrum Disorders: A Scoping Review. *Perspect Behav Sci* **45**, 521-557, doi:10.1007/s40614-022-00338-x (2022).
- 255 Simonoff, E. *et al.* Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **47**, 921-929, doi:10.1097/CHI.0b013e318179964f (2008).
- 256 Feroe, A. G. *et al.* Medication Use in the Management of Comorbidities Among Individuals With Autism Spectrum Disorder From a Large Nationwide Insurance Database. *JAMA Pediatr* **175**, 957-965, doi:10.1001/jamapediatrics.2021.1329 (2021).
- 257 Levy, S. E. *et al.* Autism spectrum disorder and co-occurring developmental, psychiatric, and medical conditions among children in multiple populations of the United States. *J Dev Behav Pediatr* **31**, 267-275, doi:10.1097/DBP.0b013e3181d5d03b (2010).

- 258 Williams, K., Wheeler, D. M., Silove, N. & Hazell, P. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst Rev*, Cd004677, doi:10.1002/14651858.CD004677.pub2 (2010).
- 259 Potter, L. A. *et al.* A Randomized Controlled Trial of Sertraline in Young Children With Autism Spectrum Disorder. *Front Psychiatry* **10**, 810, doi:10.3389/fpsyt.2019.00810 (2019).
- 260 Rai, D. *et al.* Sertraline for anxiety in adults with a diagnosis of autism (STRATA): study protocol for a pragmatic, multicentre, double-blind, placebo-controlled randomised controlled trial. *Trials* **25**, 37, doi:10.1186/s13063-023-07847-3 (2024).
- 261 Hutchinson, J. *et al.* The Effects of Risperidone on Cognition in People With Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Cureus* **15**, e45524, doi:10.7759/cureus.45524 (2023).
- 262 Mano-Sousa, B. J. *et al.* Effects of Risperidone in Autistic Children and Young Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Neuropharmacol* **19**, 538-552, doi:10.2174/1570159x18666200529151741 (2021).
- 263 Hirsch, L. E. & Pringsheim, T. Aripiprazole for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst Rev* **2016**, Cd009043, doi:10.1002/14651858.CD009043.pub3 (2016).
- 264 Maneeton, N. *et al.* Aripiprazole in acute treatment of children and adolescents with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Neuropsychiatr Dis Treat* **14**, 3063-3072, doi:10.2147/ndt.S174622 (2018).
- 265 Perry, R. *et al.* Long-term efficacy of haloperidol in autistic children: continuous versus discontinuous drug administration. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **28**, 87-92, doi:10.1097/00004583-198901000-00016 (1989).
- 266 Anderson, L. T. *et al.* Haloperidol in the treatment of infantile autism: effects on learning and behavioral symptoms. *Am J Psychiatry* **141**, 1195-1202, doi:10.1176/ajp.141.10.1195 (1984).
- 267 Cortese, S. *et al.* Comparative efficacy and tolerability of medications for attention-deficit hyperactivity disorder in children, adolescents, and adults: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Psychiatry* **5**, 727-738, doi:10.1016/s2215-0366(18)30269-4 (2018).
- 268 Sallee, F. R. The role of alpha2-adrenergic agonists in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Postgrad Med* **122**, 78-87, doi:10.3810/pgm.2010.09.2204 (2010).
- 269 Beversdorf, D. Q. The Role of the Noradrenergic System in Autism Spectrum Disorders, Implications for Treatment. *Semin Pediatr Neurol* **35**, 100834, doi:10.1016/j.spen.2020.100834 (2020).
- 270 Uddin, M. S. *et al.* Emerging promise of sulforaphane-mediated Nrf2 signaling cascade against neurological disorders. *Sci Total Environ* **707**, 135624, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135624 (2020).
- 271 Masood, W., Annamaraju, P., Khan Suheb, M. Z. & Uppaluri, K. R. in *StatPearls* (StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC., 2024).

- 272 Zhu, H. *et al.* Ketogenic diet for human diseases: the underlying mechanisms and potential for clinical implementations. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 11, doi:10.1038/s41392-021-00831-w (2022).
- 273 D'Andrea Meira, I. *et al.* Ketogenic Diet and Epilepsy: What We Know So Far. *Front Neurosci* **13**, 5, doi:10.3389/fnins.2019.00005 (2019).
- 274 Ruan, Y. *et al.* Ketogenic diet for epilepsy: an overview of systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition* **76**, 1234-1244, doi:10.1038/s41430-021-01060-8 (2022).

- 275 Simeone, T. A., Simeone, K. A. & Rho, J. M. Ketone Bodies as Anti-Seizure Agents. *Neurochem Res* **42**, 2011-2018, doi:10.1007/s11064-017-2253-5 (2017).
- 276 Neal, E. G. *et al.* The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* **7**, 500-506, doi:10.1016/s1474-4422(08)70092-9 (2008).
- 277 Imdad, K. *et al.* The Metabolic Role of Ketogenic Diets in Treating Epilepsy. *Nutrients* **14**, doi:10.3390/nu14235074 (2022).
- 278 Varesio, C. *et al.* Ketogenic Dietary Therapies in Patients with Autism Spectrum Disorder: Facts or Fads? A Scoping Review and a Proposal for a Shared Protocol. *Nutrients* **13**, doi:10.3390/nu13062057 (2021).
- 279 Albers, J. *et al.* Assessing the feasibility of using the ketogenic diet in autism spectrum disorder. *J Hum Nutr Diet* **36**, 1303-1315, doi:10.1111/jhn.13115 (2023).
- 280 Veech, R. L. *et al.* Ketone bodies mimic the life span extending properties of caloric restriction. *IUBMB Life* **69**, 305-314, doi:10.1002/iub.1627 (2017).
- 281 Dorling, J. L., Martin, C. K. & Redman, L. M. Calorie restriction for enhanced longevity: The role of novel dietary strategies in the present obesogenic environment. *Ageing Res Rev* **64**, 101038, doi:10.1016/j.arr.2020.101038 (2020).
- 282 Green, C. L., Lamming, D. W. & Fontana, L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 56-73, doi:10.1038/s41580-021-00411-4 (2022).
- 283 Lee, S. H. & Min, K. J. Caloric restriction and its mimetics. *BMB Rep* **46**, 181-187, doi:10.5483/bmbrep.2013.46.4.033 (2013).
- 284 Bales, C. W. & Kraus, W. E. Caloric Restriction: IMPLICATIONS FOR HUMAN CARDIOMETABOLIC HEALTH. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention* **33** (2013).
- 285 Weiss, E. P. & Fontana, L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **301**, H1205-H1219, doi:10.1152/ajpheart.00685.2011 (2011).
- 286 Meynet, O. & Ricci, J.-E. Caloric restriction and cancer: molecular mechanisms and clinical implications. *Trends in Molecular Medicine* **20**, 419-427, doi:10.1016/j.molmed.2014.05.001 (2014).
- 287 Lü, W., Yu, T. & Kuang, W. Effects of dietary restriction on cognitive function: a systematic review and meta-analysis. *Nutritional Neuroscience* **26**, 540-550, doi:10.1080/1028415X.2022.2068876 (2023).
- 288 Shakoor, H. *et al.* Effect of Calorie Restriction and Exercise on Type 2 Diabetes. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* **42**, 109-126, doi:10.2478/prilozi-2021-0010 (2021).
- 289 Leonov, A. *et al.* Caloric restriction extends yeast chronological lifespan via a mechanism linking cellular aging to cell cycle regulation, maintenance of a quiescent state, entry into a non-quiescent state and survival in the non-quiescent state. *Oncotarget* **8**, 69328-69350, doi:10.18632/oncotarget.20614 (2017).
- 290 Edwards, C. *et al.* D-beta-hydroxybutyrate extends lifespan in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)* **6**, 621-644, doi:10.18632/aging.100683 (2014).
- 291 Lin, A. L., Zhang, W., Gao, X. & Watts, L. Caloric restriction increases ketone bodies metabolism and preserves blood flow in aging brain. *Neurobiol Aging* **36**, 2296-2303, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.012 (2015).
- 292 Edwards, C., Copes, N. & Bradshaw, P. C. D-β-hydroxybutyrate: an anti-aging ketone body. *Oncotarget* **6**, 3477-3478, doi:10.18632/oncotarget.3423 (2015).
- 293 Nelson, A. B., Queathem, E. D., Puchalska, P. & Crawford, P. A. Metabolic Messengers: ketone bodies. *Nat Metab* **5**, 2062-2074, doi:10.1038/s42255-023-00935-3 (2023).

- 294 Hwang, C. Y. *et al.* Molecular Mechanisms for Ketone Body Metabolism, Signaling Functions, and Therapeutic Potential in Cancer. *Nutrients* **14**, doi:10.3390/nu14224932 (2022).
- 295 Newman, J. C. & Verdin, E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metab* **25**, 42-52, doi:10.1016/j.tem.2013.09.002 (2014).
- 296 Al Aboud, N. M., Tupper, C. & Jialal, I. in *StatPearls* (StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC., 2024).
- 297 Zhang, L., Lu, Q. & Chang, C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol* **1253**, 3-55, doi:10.1007/978-981-15-3449-2_1 (2020).
- 298 Hamilton, J. P. Epigenetics: principles and practice. *Dig Dis* **29**, 130-135, doi:10.1159/000323874 (2011).
- 299 Shimazu, T. *et al.* Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* **339**, 211-214, doi:10.1126/science.1227166 (2013).
- 300 Li, B. *et al.* β -Hydroxybutyrate inhibits histone deacetylase 3 to promote claudin-5 generation and attenuate cardiac microvascular hyperpermeability in diabetes. *Diabetologia* **64**, 226-239, doi:10.1007/s00125-020-05305-2 (2021).
- 301 Xu, K., Dai, X. L., Huang, H. C. & Jiang, Z. F. Targeting HDACs: a promising therapy for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* **2011**, 143269, doi:10.1155/2011/143269 (2011).
- 302 Ferber, E. C. *et al.* FOXO3a regulates reactive oxygen metabolism by inhibiting mitochondrial gene expression. *Cell Death Differ* **19**, 968-979, doi:10.1038/cdd.2011.179 (2012).
- 303 Link, W. Introduction to FOXO Biology. *Methods Mol Biol* **1890**, 1-9, doi:10.1007/978-1-4939-8900-3_1 (2019).
- 304 Xie, Z. *et al.* Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine β -Hydroxybutyrylation. *Mol Cell* **62**, 194-206, doi:10.1016/j.molcel.2016.03.036 (2016).
- 305 Newman, J. C. & Verdin, E. β -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annu Rev Nutr* **37**, 51-76, doi:10.1146/annurev-nutr-071816-064916 (2017).
- 306 Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Hofer, S. J. & Kroemer, G. Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metab* **29**, 592-610, doi:10.1016/j.cmet.2019.01.018 (2019).
- 307 Miyauchi, T. *et al.* Up-regulation of FOXO1 and reduced inflammation by β -hydroxybutyric acid are essential diet restriction benefits against liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 13533-13542, doi:10.1073/pnas.1820282116 (2019).
- 308 Gómora-García, J. C. *et al.* Effect of the Ketone Body, D- β -Hydroxybutyrate, on Sirtuin2-Mediated Regulation of Mitochondrial Quality Control and the Autophagy-Lysosomal Pathway. *Cells* **12**, doi:10.3390/cells12030486 (2023).
- 309 Tullet, J. M. DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future. *Biogerontology* **16**, 221-234, doi:10.1007/s10522-014-9527-y (2015).
- 310 Honda, Y. & Honda, S. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb j* **13**, 1385-1393 (1999).
- 311 Yamaguchi, T. *et al.* Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression. *Genes Dev* **24**, 455-469, doi:10.1101/gad.552310 (2010).
- 312 Jacob, C. *et al.* HDAC1 and HDAC2 control the transcriptional program of myelination and the survival of Schwann cells. *Nat Neurosci* **14**, 429-436, doi:10.1038/nn.2762 (2011).
- 313 Yamada, T., Zhang, S. J., Westerblad, H. & Katz, A. β -Hydroxybutyrate inhibits insulin-mediated glucose transport in mouse oxidative muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E364-373, doi:10.1152/ajpendo.00142.2010 (2010).

- 314 Kim, D. H. *et al.* Anti-inflammatory action of β -hydroxybutyrate via modulation of PGC-
1 α and FoxO1, mimicking calorie restriction. *Aging (Albany NY)* **11**, 1283-1304,
doi:10.18632/aging.101838 (2019).
- 315 McDaniel, S. S., Rensing, N. R., Thio, L. L., Yamada, K. A. & Wong, M. The ketogenic diet
inhibits the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Epilepsia* **52**, e7-11,
doi:10.1111/j.1528-1167.2011.02981.x (2011).
- 316 Okuyama, T. *et al.* The ERK-MAPK pathway regulates longevity through SKN-1 and
insulin-like signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **285**, 30274-30281,
doi:10.1074/jbc.M110.146274 (2010).
- 317 Tullet, J. M. A. *et al.* The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative
stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. *Aging Cell* **16**, 1191-
1194, doi:10.1111/accel.12627 (2017).
- 318 Edwards, C. B., Copes, N., Brito, A. G., Canfield, J. & Bradshaw, P. C. Malate and
fumarate extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **8**, e58345,
doi:10.1371/journal.pone.0058345 (2013).
- 319 Williams, D. S., Cash, A., Hamadani, L. & Diemer, T. Oxaloacetate supplementation
increases lifespan in *Caenorhabditis elegans* through an AMPK/FOXO-dependent
pathway. *Aging Cell* **8**, 765-768, doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00527.x (2009).
- 320 Chin, R. M. *et al.* The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP
synthase and TOR. *Nature* **510**, 397-401, doi:10.1038/nature13264 (2014).
- 321 Schor, I. E., Rascovan, N., Pelisch, F., Alló, M. & Kornblihtt, A. R. Neuronal cell
depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative
splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4325-4330, doi:10.1073/pnas.0810666106
(2009).
- 322 Roberts, G. C., Gooding, C., Mak, H. Y., Proudfoot, N. J. & Smith, C. W. Co-
transcriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic Acids Res* **26**,
5568-5572, doi:10.1093/nar/26.24.5568 (1998).
- 323 de la Mata, M. *et al.* A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol*
Cell **12**, 525-532, doi:10.1016/j.molcel.2003.08.001 (2003).
- 324 Fong, N. *et al.* Pre-mRNA splicing is facilitated by an optimal RNA polymerase II
elongation rate. *Genes Dev* **28**, 2663-2676, doi:10.1101/gad.252106.114 (2014).
- 325 Dujardin, G. *et al.* How slow RNA polymerase II elongation favors alternative exon
skipping. *Mol Cell* **54**, 683-690, doi:10.1016/j.molcel.2014.03.044 (2014).
- 326 Marasco, L. E. *et al.* Counteracting chromatin effects of a splicing-correcting antisense
oligonucleotide improves its therapeutic efficacy in spinal muscular atrophy. *Cell* **185**,
2057-2070.e2015, doi:10.1016/j.cell.2022.04.031 (2022).
- 327 Richmond, J. E. & Jorgensen, E. M. One GABA and two acetylcholine receptors function
at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci* **2**, 791-797, doi:10.1038/12160
(1999).
- 328 Richmond, J. E. Electrophysiological recordings from the neuromuscular junction of *C.*
elegans. *WormBook*, 1-8, doi:10.1895/wormbook.1.112.1 (2006).
- 329 Di, J. *et al.* The role of GABAergic neural circuits in the pathogenesis of autism
spectrum disorder. *Int J Dev Neurosci* **80**, 73-85, doi:10.1002/jdn.10005 (2020).
- 330 Crutel, V. *et al.* Bumetanide Oral Liquid Formulation for the Treatment of Children and
Adolescents with Autism Spectrum Disorder: Design of Two Phase III Studies (SIGN
Trials). *J Autism Dev Disord* **51**, 2959-2972, doi:10.1007/s10803-020-04709-8 (2021).
- 331 Pretzsch, C. M. *et al.* Effects of cannabidiol on brain excitation and inhibition systems; a
randomised placebo-controlled single dose trial during magnetic resonance
spectroscopy in adults with and without autism spectrum disorder.
Neuropsychopharmacology **44**, 1398-1405, doi:10.1038/s41386-019-0333-8 (2019).
- 332 Fusar-Poli, L. *et al.* Cannabinoids for People with ASD: A Systematic Review of
Published and Ongoing Studies. *Brain Sci* **10**, doi:10.3390/brainsci10090572 (2020).

- 333 Estrada-Valencia, R. *et al.* The Endocannabinoid System in *Caenorhabditis elegans*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **184**, 1-31, doi:10.1007/112_2021_64 (2023).
- 334 Rademacher, S. & Eickholt, B. J. PTEN in Autism and Neurodevelopmental Disorders. *Cold Spring Harb Perspect Med* **9**, doi:10.1101/cshperspect.a036780 (2019).
- 335 Rodríguez-Escudero, I. *et al.* A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes. *Hum Mol Genet* **20**, 4132-4142, doi:10.1093/hmg/ddr337 (2011).
- 336 Hasle, N., Matreyek, K. A. & Fowler, D. M. The Impact of Genetic Variants on PTEN Molecular Functions and Cellular Phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med* **9**, doi:10.1101/cshperspect.a036228 (2019).
- 337 Hallam, S. J. & Jin, Y. lin-14 regulates the timing of synaptic remodelling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **395**, 78-82, doi:10.1038/25757 (1998).
- 338 Mulcahy, B. *et al.* Post-embryonic remodeling of the *C. elegans* motor circuit. *Curr Biol* **32**, 4645-4659.e4643, doi:10.1016/j.cub.2022.09.065 (2022).
- 339 Cuentas-Condori, A. & Miller Rd, D. M. Synaptic remodeling, lessons from *C. elegans*. *J Neurogenet* **34**, 307-322, doi:10.1080/01677063.2020.1802725 (2020).
- 340 Sulston, J. E. & White, J. G. Regulation and cell autonomy during postembryonic development of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **78**, 577-597, doi:[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90353-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90353-X) (1980).
- 341 Wu, X. & Reddy, D. S. Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacol Ther* **134**, 68-81, doi:10.1016/j.pharmthera.2011.12.008 (2012).
- 342 Moreno-Layseca, P. & Streuli, C. H. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix Biol* **34**, 144-153, doi:10.1016/j.matbio.2013.10.011 (2014).
- 343 Giles, A. C. & Grill, B. Roles of the HUWE1 ubiquitin ligase in nervous system development, function and disease. *Neural Dev* **15**, 6, doi:10.1186/s13064-020-00143-9 (2020).
- 344 Kowalski, J. R. *et al.* The Anaphase-Promoting Complex (APC) ubiquitin ligase regulates GABA transmission at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Mol Cell Neurosci* **58**, 62-75, doi:10.1016/j.mcn.2013.12.001 (2014).
- 345 Cupolillo, D. *et al.* Autistic-Like Traits and Cerebellar Dysfunction in Purkinje Cell PTEN Knock-Out Mice. *Neuropsychopharmacology* **41**, 1457-1466, doi:10.1038/npp.2015.339 (2016).
- 346 Getz, S. A., DeSpenza, T., Jr., Li, M. & Luikart, B. W. Rapamycin prevents, but does not reverse, aberrant migration in Pten knockout neurons. *Neurobiol Dis* **93**, 12-20, doi:10.1016/j.nbd.2016.03.010 (2016).
- 347 Zhou, J. *et al.* Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice. *J Neurosci* **29**, 1773-1783, doi:10.1523/jneurosci.5685-08.2009 (2009).
- 348 Takei, N. & Nawa, H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Front Mol Neurosci* **7**, 28, doi:10.3389/fnmol.2014.00028 (2014).
- 349 Henle, S. J., Carlstrom, L. P., Cheever, T. R. & Henley, J. R. Differential role of PTEN phosphatase in chemotactic growth cone guidance. *J Biol Chem* **288**, 20837-20842, doi:10.1074/jbc.C113.487066 (2013).
- 350 Khundrakpam, B. S., Lewis, J. D., Kostopoulos, P., Carbonell, F. & Evans, A. C. Cortical Thickness Abnormalities in Autism Spectrum Disorders Through Late Childhood, Adolescence, and Adulthood: A Large-Scale MRI Study. *Cereb Cortex* **27**, 1721-1731, doi:10.1093/cercor/bhx038 (2017).
- 351 Paik, J. H. *et al.* FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* **5**, 540-553, doi:10.1016/j.stem.2009.09.013 (2009).
- 352 Powell, S. K., Rivas, R. J., Rodriguez-Boulan, E. & Hatten, M. E. Development of polarity in cerebellar granule neurons. *J Neurobiol* **32**, 223-236, doi:10.1002/(sici)1097-4695(199702)32:2<223::aid-neu7>3.0.co;2-a (1997).

- 353 Byrne, A. B. *et al.* Insulin/IGF1 signaling inhibits age-dependent axon regeneration. *Neuron* **81**, 561-573, doi:10.1016/j.neuron.2013.11.019 (2014).
- 354 Palmisano, N. J. & Meléndez, A. Autophagy in *C. elegans* development. *Dev Biol* **447**, 103-125, doi:10.1016/j.ydbio.2018.04.009 (2019).
- 355 Peng, K. *et al.* Knockdown of FoxO3a induces increased neuronal apoptosis during embryonic development in zebrafish. *Neurosci Lett* **484**, 98-103, doi:10.1016/j.neulet.2010.07.068 (2010).
- 356 Stavoe, A. K., Hill, S. E., Hall, D. H. & Colón-Ramos, D. A. KIF1A/UNC-104 Transports ATG-9 to Regulate Neurodevelopment and Autophagy at Synapses. *Dev Cell* **38**, 171-185, doi:10.1016/j.devcel.2016.06.012 (2016).
- 357 Collier, J. J. *et al.* Developmental Consequences of Defective ATG7-Mediated Autophagy in Humans. *N Engl J Med* **384**, 2406-2417, doi:10.1056/NEJMoa1915722 (2021).
- 358 de la Torre-Ubieta, L. & Bonni, A. Transcriptional regulation of neuronal polarity and morphogenesis in the mammalian brain. *Neuron* **72**, 22-40, doi:10.1016/j.neuron.2011.09.018 (2011).
- 359 Xia, S., Zhou, Z. & Jia, Z. PAK1 regulates inhibitory synaptic function via a novel mechanism mediated by endocannabinoids. *Small GTPases* **9**, 322-326, doi:10.1080/21541248.2016.1228793 (2018).
- 360 Kepler, L. D., McDiarmid, T. A. & Rankin, C. H. Rapid assessment of the temporal function and phenotypic reversibility of neurodevelopmental disorder risk genes in *Caenorhabditis elegans*. *Dis Model Mech* **15**, doi:10.1242/dmm.049359 (2022).
- 361 González, D. P. *et al.* CBD-1 organizes two independent complexes required for eggshell vitelline layer formation and egg activation in *C. elegans*. *Dev Biol* **442**, 288-300, doi:10.1016/j.ydbio.2018.08.005 (2018).
- 362 Olson, S. K., Greenan, G., Desai, A., Müller-Reichert, T. & Oegema, K. Hierarchical assembly of the eggshell and permeability barrier in *C. elegans*. *Journal of Cell Biology* **198**, 731-748, doi:10.1083/jcb.201206008 (2012).
- 363 Carvalho, A. *et al.* Acute drug treatment in the early *C. elegans* embryo. *PLoS One* **6**, e24656, doi:10.1371/journal.pone.0024656 (2011).
- 364 Cantello, R. *et al.* Ketogenic Diet: Electrophysiological Effects on the Normal Human Cortex. *Epilepsia* **48**, 1756-1763, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01156.x> (2007).
- 365 Calderón, N., Betancourt, L., Hernández, L. & Rada, P. A ketogenic diet modifies glutamate, gamma-aminobutyric acid and agmatine levels in the hippocampus of rats: A microdialysis study. *Neurosci Lett* **642**, 158-162, doi:10.1016/j.neulet.2017.02.014 (2017).
- 366 Yudkoff, M., Daikhin, Y., Horyn, O., Nissim, I. & Nissim, I. Ketosis and brain handling of glutamate, glutamine, and GABA. *Epilepsia* **49 Suppl 8**, 73-75, doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01841.x (2008).