



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología



Análisis genético de la locomoción reversa en *Caenorhabditis elegans*

Opción de titulación
Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Licenciado En Biología

Presenta:

María de Jesús Guerrero Sánchez

Dirigido por:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Presidente

Firma

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse
Secretario

Firma

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
Vocal

Firma

Dr. Lenin David Ochoa de la Paz
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2014

RESUMEN

Caenorhabditis elegans es uno de los organismos modelo más usado para estudiar cómo los circuitos neuronales y los genes regulan el comportamiento, gracias a diversos atributos biológicos que permite el aislamiento y caracterización de mutantes genéticas. La locomoción reversa en *C. elegans* es muy importante ya que es una respuesta a estímulos aversivos, incrementa la posibilidad de supervivencia al permitirle evitar ambientes hostiles. Este comportamiento consiste en un movimiento donde el gusano recorre tres veces la longitud de su cuerpo hacia atrás, forma una omega y cambia de dirección. En este trabajo se realizó un análisis genético de la locomoción reversa. Mediante una mutagénesis química en la cepa silvestre Bristol N2 de *C. elegans*, se generó y seleccionó la mutante *buc-1* (*backing uncoordinated*) con la finalidad de identificar los genes que subyacen la locomoción reversa. La mutante presentó evidentes anomalías en la conducta de locomoción reversa e incidencia de machos de hasta el 1%. El cartografiado genético se realizó mediante el uso de marcadores moleculares y también se llevó a cabo una caracterización fenotípica mediante bioensayos de locomoción, fertilidad y alimentación, donde se observó que en algunos casos, la mutante *buc-1* desempeña tareas básicas con menor eficiencia que individuos silvestres. El análisis genético permitió descubrir que la mutación generada en *buc-1* se encuentra cerca del centrómero del cromosoma IV, por lo que los genes candidatos *unc-24* y *unc-8* se analizarán posteriormente, pues se localizan en sitios cercanos y provocan fallas locomotoras similares. Además, el fenotipo de *buc-1* podría ser consecuencia de la alteración de dos genes en desequilibrio ligado; uno que provoca el defecto en la locomoción reversa y otro que incrementa la incidencia de machos. Elucidar el gen afectado permitirá ampliar el conocimiento de la conducta de locomoción reversa en el nematodo *C. elegans*, así como generar información útil para estudios que la describan a niveles moleculares y celulares.

Palabras clave: *Caenorhabditis elegans*, locomoción reversa, mutagénesis, cartografiado genético.

SUMMARY

Caenorhabditis elegans is one of the most used model organisms to dissect how the neural circuits and genes regulate behavior, by biological attributes that permits isolation and characterization of genetic mutants. The backward locomotion in *C. elegans* is relevant because it is a response to aversive stimuli, which increases the chance of survival and allows the worm to avoid hostile environments. This behavior is a movement where the worm move three times the length of her body backwards, forms an omega and changes direction. In this work a genetic analysis of backward locomotion was performed. By chemical mutagenesis in the wild-type strain Bristol N2, the mutant *buc-1* (*backing uncoordinated*) was generated and selected, in order to identify the genes that underlie the backward behavior. The mutant showed obvious behavioral abnormalities in reverse locomotion and an incidence of males at a 1%. The gene mapping was performed by molecular markers (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). In addition, a phenotypic characterization was done by bioassays of locomotion, fertility and feed. These bioassays shown that *buc-1* performs basic tasks less efficiently than wild individuals. Genetic analysis led to the discovery that *buc-1* is located near the centromere of chromosome IV; therefore, the genes *unc-24* and *unc-8* are good candidates be *buc-1* based on their similar mutant behavior and gene map location. Furthermore, the phenotypes of *buc-1* may be a result of two linked genes; which cause the defect in reverse movement and the increase in the incidence of males. Elucidating the affected gene will expand the knowledge of the behavior of reverse locomotion in the nematode *C. elegans*, and generate useful information for studies that describe it at the molecular and cellular level.

Key words: *Caenorhabditis elegans*, backward locomotion, mutagenesis, genetic mapping.

DEDICATORIAS

A toda mi familia, que me apoyo durante los años de carrera y durante la elaboración de este trabajo.

A mis hermanos menores Alma y Andrés, que a su peculiar manera siempre me estuvieron dando ánimos de seguir adelante. Espero llegar a ser un buen ejemplo, para que ustedes cumplan sus objetivos.

A mi mamá, que estuvo conmigo cada uno de los días, desde que comenzó esta aventura. Gracias por tu paciencia, por regañarme y darme ánimos cuando era necesario

A mi papá, que siempre estuvo dándome ánimos y esperó pacientemente a conocer los resultados de este trabajo. Gracias papá, porque el orgullo que sentiste al tener una hija científica, me dio más fuerza y valor de cumplir esta meta.

A mi hermana mayor Berenice, que me apoyó incondicionalmente en todos los sentidos. Porque sin ti, esto no hubiera sido posible.

A Fausto, que siempre creyó en mí. Gracias por contagiarme ese entusiasmo y amor por la ciencia. Por darme la oportunidad de formar parte de tu equipo y por enseñarme a nunca rendirme.

AGRADECIMIENTOS

A Fausto, por darme la oportunidad de trabajar con él y al apoyo que me brindó durante este tiempo.

A Karina Acevedo, por siempre creer en mí y por su apoyo para revisar este trabajo. Tenías razón, lo veo ahora que terminé de reunir las piezas.

A Marco Sánchez y al Dr. Lenin Ochoa, por su tiempo para revisar y corregir este trabajo.

A Christian Robles, por compartirme sus conocimientos acerca del mantenimiento y manejo de los nematodos en laboratorio

A mi amiga Eunice, que siempre estuvo acompañándome en las jornadas experimentales y de escritura, en las buenas y en las malas. A mi amiga Zyanya, por su apoyo, su compañía y por siempre contarme sus sueños. A mis demás compañeros de generación titulados en el mismo laboratorio. A mi amiga Mara, que siempre estuvo dándome ánimos y mucho amor.

A todos los integrantes del laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva, en especial a Blanca Morales Guerrero, que siempre mostró disponibilidad en ayudarme con este trabajo.

A mi hermana Alma, que me ayudo con parte de los esquemas de locomoción.

A mis amigos de la vida, que aunque no entienden ni un poquito de lo que hago siempre me apoyaron.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
SUMMARY	2
DEDICATORIAS	3
AGRADECIMIENTOS	4
I. INTRODUCCIÓN	9
II. ANTECEDENTES	11
II.1 El nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	11
II.2 Nematodo <i>C. elegans</i> como modelo de estudio	13
II.2.1 <i>C. elegans</i> como modelo de estudio en genética y genética del comportamiento	14
II.3 Aproximaciones genéticas	16
II.4 Sistema locomotor y locomoción reversa en <i>C. elegans</i>	18
II.5 Locomoción reversa como conducta de escape en <i>C. elegans</i>	24
III. HIPOTESIS	27
IV. OBJETIVOS.....	28
V. MÉTODOS.....	29
V.1 Cepas	29
V.2 Cultivo y manipulación de nematodos	29
V.3 Mutagénesis química y aislamiento de mutantes	30
V.4 Limpieza del fondo genético y obtención de recombinantes	34
V.5 Técnicas moleculares	36
V.6 Caracterización genotípica	37
V.7 Caracterización fenotípica	39
V.8 Criopreservación de mutantes.....	43
VI. RESULTADOS.....	45
VI.1 Descripción de <i>buc-1</i>	47
VI.2 Caracterización genotípica	51
VI.2.1 Cartografiado genético	53
VI.3 Caracterización fenotípica	58

VII. DISCUSIONES	66
VII.1 Mutagénesis y aislamiento de mutantes.....	66
VII.2 Mutante <i>buc-1</i>	67
VIII. CONCLUSIONES	73
IX. PERSPECTIVAS	74
X. REFERENCIAS	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	12
Figura 2. Control neuronal de la locomoción hacia adelante y locomoción reversa.....	22
Figura 3. Diagrama de la locomoción reversa.	23
Figura 4. Respuestas de escape.....	26
Figura 5. Metodología para aislamiento de mutantes.....	33
Figura 6. Diagrama de cruzas genéticas	35
Figura 7. Representación gráfica de la faringe	42
Figura 8. Gusano L4 analizado en el programa ImageJ.....	43
Figura 9. Mutante <i>dumpy</i>	45
Figura 10. Mutante <i>roller</i>	45
Figura 11. Mutante denominada <i>Like-convulsions</i>	46
Figura 12. Mutante <i>buc-1</i>	47
Figura 13. Nematodos N2 Y <i>buc-1</i> en medio sólido.	48
Figura 14. Diagrama de locomoción reversa en mutante <i>buc-1</i>	49
Figura 15. Variantes fenotípicas de <i>buc-1</i>	50
Figura 16. Mutante <i>unc-8</i>	51
Figura 17. Mutantes <i>unc-29</i>	52
Figura 18. Cromosoma IV, recombinantes 23-44.	56
Figura 19. Cromosoma IV, recombinantes 1-22.	56
Figura 20. Cromosoma IV, recombinantes 45-57.	57
Figura 21. Locomoción o nado en medio líquido.	58
Figura 22. Locomoción de la mutante <i>buc-1</i> en medio líquido M9.	59
Figura 23. Fertilidad	60
Figura 24. Cantidad de larvas por placa.	61
Figura 25. Porcentaje de eclosión de huevos puestos.	62
Figura 26. Alimentación.....	62
Figura 27. Longitud de larvas L4.....	63
Figura 28. Individuos L4	63
Figura 29. Longitud de hermafroditas adultos de un día.	64
Figura 30. Individuos hermafroditas de un día.....	64
Figura 31. Individuos macho.	65
Figura 32. Longitud promedio de individuos macho.	65

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. PCR	36
Cuadro 2. SNPs seleccionados para cada cromosoma.	38
Cuadro 3. Porcentaje de genotipos por cromosoma.	53
Cuadro 4. Genotipos identificados en cada recombinante.	54
Cuadro 5. Genes de alta incidencia de machos (HIM)	72

I. INTRODUCCIÓN

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre que se distribuye en muchas partes del mundo, sobre todo en suelos templados nutridos pues se alimenta de bacterias. Dentro de esta especie hay individuos hermafroditas y machos que poseen 5 pares de cromosomas autosómicos y 1 par sexual, el cual es diploide (XX) en hermafroditas y haploide (X0) en machos. Estos últimos son poco comunes y se encuentran en una proporción del 0.1% dentro de una población, por lo que el estado sexual hermafroditico es predominante (Palikaras y Tavernarakis, 2013). Los individuos hermafroditas pueden autofertilizarse o ser fertilizados por los machos, ya que producen gametos femeninos y masculinos. Su ciclo de vida reproductivo se completa en 3 días y atraviesa por cuatro estadios larvarios (L1-L4), una vez que alcanza la madurez sexual puede vivir cerca de 15 días y poner hasta 300 huevos (Brenner 1974; Wood, 1988). También exhibe un amplio repertorio de comportamientos: conductas de locomoción, sensoriales, de supervivencia, reproductivas, comportamiento social, aprendizaje y memoria (De Bono y Maricq, 2005; Rankin, 2002). Dichos atributos facilitan la caracterización de mutantes genéticas y hacen al nematodo un modelo ideal para estudiar temas que van desde el desarrollo, el comportamiento, hasta los genes, su función y su regulación (De Bono y Maricq, 2005; Navarro, 2003; Jorgensen y Mango, 2002). Para cualquier organismo las conductas de escape son cruciales para la supervivencia (Pirri y Alkema, 2012). En *C.elegans*, la conducta de escape es traducida en un evento de locomoción reversa, el cual da inicio ante un estímulo aversivo; el animal retrocede con movimientos sinusoidales tres veces hacia atrás, acto seguido forma una omega que es iniciada por un giro brusco, para posteriormente cambiar de dirección y alejarse del estímulo nocivo (Donnelly, 2013). Este movimiento está regulado por las interneuronas comando AVA, AVD y AVE en un circuito estimulatorio y por la interneurona de la primera capa AIB en un circuito desinhibitorio (Piggot *et al*, 2011). Aunque la conducta de escape se ha estudiado mediante la estimulación mecánica en la parte anterior del gusano (*nose touch*) y resalta que el cese de los movimientos de la cabeza es indispensable para evitar un depredador o un ambiente nocivo, es posible que un defecto en

cualquiera de los elementos que conforman dicha respuesta de huida disminuya las probabilidades de supervivencia. Estos tipos de locomoción se exhiben en muchas especies de animales, sin embargo, pocos estudios han conducido a los mecanismos de la locomoción reversa directamente (Haspel *et al*, 2010). Las mutaciones son herramientas importantes para descifrar la función de un gen, y aunque el comportamiento es el resultado de diversos factores interactuantes, la especificación genética al igual que los otros, es un factor importante (Kutscher y Shaham, 2014). Se conoce muy poco acerca del control genético de esta conducta locomotora de ahí la importancia de su estudio, pues no se sabe si es controlada por un gen o un conjunto de ellos o como estos interactúan para generar dicha respuesta. Por eso, conocer el gen o genes que subyacen la conducta reversa contribuirá para el entendimiento de los procesos genéticos, moleculares y celulares en el nematodo *C. elegans* durante esta respuesta, así mismo, puede ser utilizada con fines de comparación con el genoma de otros organismos, incluido el humano.

II. ANTECEDENTES

II.1 El nematodo *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (Maupas, 1899) es un nematodo de vida libre que habita ambientes antropogénicos como compostas y suelos de jardines, camas de hongos en Europa, Asia, Norte América, Hawaii y Australia (Kiontke y Sudhaus, 2006). Pertenece a la familia Rhabditidae, es un gusano no segmentado y con forma cilíndrica que vive en el suelo y se alimenta de microorganismos como bacterias (Hall y Altun 2008). Mide cerca de 1mm de longitud y su ciclo de vida en laboratorio se completa en 3 días y medio a 20°C. Presenta dimorfismo sexual, los hermafroditas autofertilizantes 5AA+XX que producen tanto esperma como huevos y los machos 5AA+X0 (Brenner, 1974). La forma sexual predominante es hermafroditica ya que la frecuencia de machos en la población es sólo del 0.1-0.2%, es decir, que sólo un individuo de cada 500 ó 1000 será macho (Hodgkin *et al*, 1979). Por lo tanto, de manera general, las poblaciones se mantienen por autofecundación en los hermafroditas, que en condiciones óptimas llegan a poner hasta 300 huevos (Donald, 2002); sin embargo, en la presencia de machos hay apareamiento y llegan a poner hasta 1400 huevos (Anderson *et al*, 2010).

El ciclo de vida de *C. elegans* comprende una etapa embrionaria, cuatro etapas larvales (L1-L4) y la etapa adulta. La etapa embrionaria se da en dos fases: 150 minutos dentro del gusano y 9 horas fuera de él, hasta la eclosión. 36 horas pasarán hasta que el gusano alcance la etapa adulta con 959 células somáticas (www.Wormatlas.org) (**Figura 1**). De las células originadas durante la embriogénesis, 10% se dividen post-embrionariamente dando lugar a células epidérmicas, células musculares, neuronas y casi todas las estructuras reproductiva, (Kenyon, 1988; Riddle *et al*, 1997). Además, *C. elegans* posee una larva de resistencia que induce un estado diapausico facultativo denominada larva Dauer, que vive de 4 a 8 veces más que un adulto normal. Esta se induce a partir

del estadio larval L1 y una vez que han pasado las condiciones adversas continua con su desarrollo en etapa L4 (**Figura1**) (Hall y Altun, 2008).

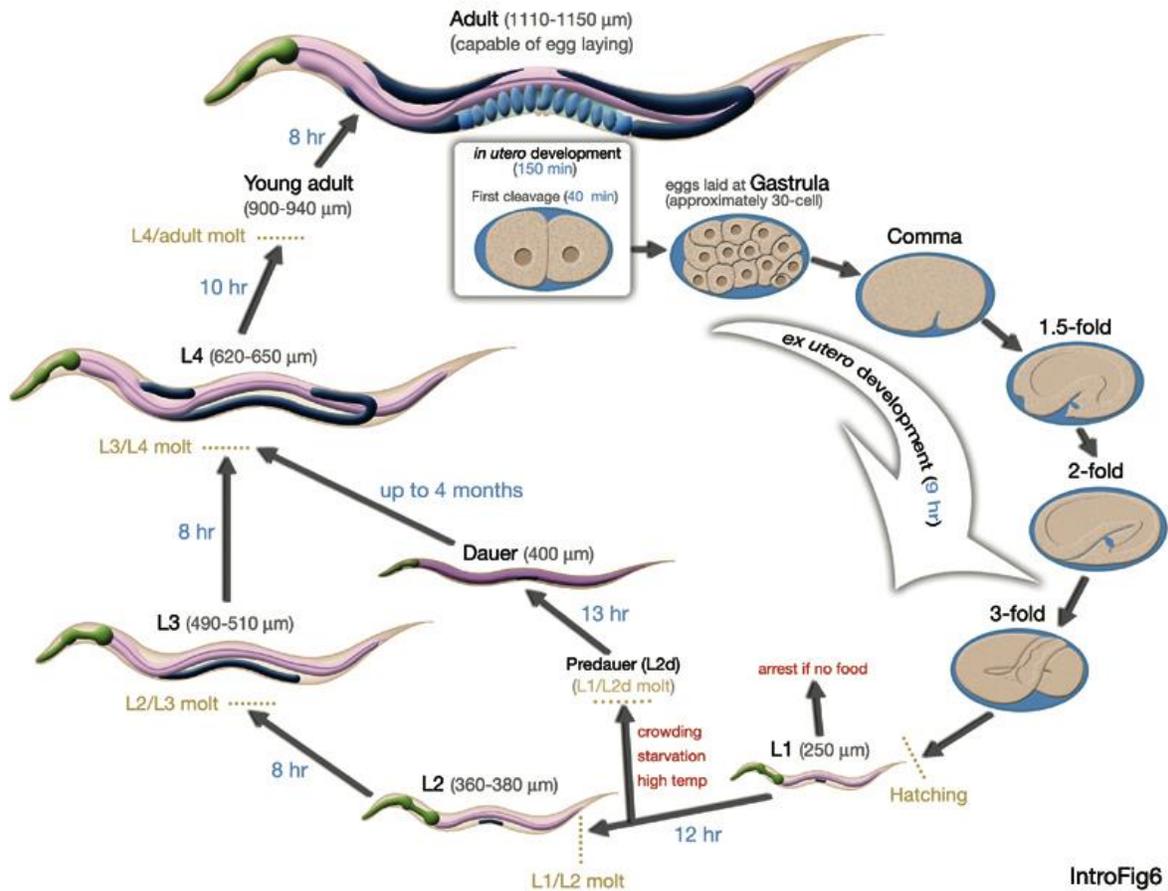


Figura 1. Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*.

Posee un periodo de desarrollo fuera del gusano y una vez que eclosiona, pasa por 4 estadios larvarios hasta alcanzar la etapa adulta. También tiene una larva de resistencia (Dauer) la cual se induce después de la etapa L1. La longitud de los gusanos en cada etapa se especifica al lado de los nombres en micrómetros. Imagen de Wormatlas:

<http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>

II.2 Nematodo *C. elegans* como modelo de estudio

En 1963, Brenner expresó a Max Perutz la inquietud sobre dilucidar los mecanismos genéticos y bioquímicos que regulan el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (Navarro, 2003). Sin embargo, él necesitaba un organismo que permitiera llevar a cabo estos estudios, por lo que en 1965 estableció al nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio para el desarrollo, el comportamiento, y las bases genéticas que los controlaban. El gusano poseía diversos atributos que los hacían viable para los estudios que Brenner pretendía: un ciclo de vida corto, tamaño pequeño, fácil cultivo en laboratorio, autofertilización hermafroditica, pero también la habilidad para reproducirse con machos, genoma pequeño, simplicidad anatómica, la transparencia de su cuerpo, y la constancia del número y posición celular (Brenner, 1974; De Bono y Maricq, 2005; Riddle *et al*, 1997).

Mucho escepticismo surgió entonces, ya que se pensaba que *C. elegans* poseía pocos rasgos morfológicos y conductuales que se veían reflejado en pocas características visibles, por lo mismo, pensaban que sería muy difícil distinguir la función de los genes mediante fenotipos mutantes (Riddle *et al*, 1997). Posteriormente Brenner (1974), publicó "*The genetics of Caenorhabditis elegans*" donde aisló cerca de 300 mutantes con defectos morfológicos y conductuales y encontró más de 100 loci distribuidos en los seis cromosomas. Con esto despejó las dudas sobre los atributos que el nematodo exhibía y su funcionalidad para estudios genéticos y del desarrollo. Desde entonces, el nematodo se ha convertido en uno de los modelos más utilizados en dichas áreas, en consecuencia, el conocimiento que se ha generado ha permitido que su uso se extienda a otras disciplinas.

II.2.1 *C. elegans* como modelo de estudio en genética y genética del comportamiento

C. elegans es el primer organismo multicelular que reunió a investigadores de la Universidad de Washington y del centro Sanger en Cambridge U.K. para formar el “*The Caenorhabditis elegans Sequencing Consortium*”, con la finalidad de secuenciar el genoma del nematodo. Ellos pensaban que completar la secuencia del genoma daría base para conocer la relación entre genes y brindarían herramientas para experimentación futura, pues conocer la secuencia completa y sus elementos permitiría la comparación e interpretación de otros genomas, incluyendo el del humano. En consecuencia de esto y de los trabajos originados a partir de entonces, ahora se sabe que el genoma del gusano comprende un total de 97 millones de bases y contiene 19,099 genes, de los cuales se predice que 16,260 codifican para proteínas. También se sabe que en promedio hay un gen por cada 5kb y contienen hasta 5 intrones. El mismo consorcio analizó el conjunto de proteínas disponibles de *C. elegans* y lo comparó con el conjunto proteínico de las especies *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens* esto con la finalidad de resaltar diferencias entre estos. Ellos observaron más similitudes entre proteínas del nematodo con el humano que con las demás especies (Pennisi, 1998; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Por lo que la idea de comparar los hallazgos en el genoma de *C. elegans* con el de otras especies, entre ellos el humano, no era tan descabellada.

En *C. elegans* el aislamiento de mutantes genéticas es fácil debido a su pequeño tamaño, corto tiempo de generación y a su estilo de vida hermafrodítico, ya que la autofertilización lleva automáticamente a la segregación de mutantes recesivas en la forma homocigota (Kenyon, 1988). Además, a pesar de que el sistema nervioso del nematodo se considera simple, pues sólo posee 302 neuronas, todas ellas han sido identificadas y localizadas por microscopía electrónica, y su rol puede probarse por ablación, pues el cuerpo del gusano es transparente (Bounoutas y Chalfie, 2007). También contiene genes para la mayoría de los componentes

moleculares del cerebro en vertebrados, por lo tanto provee un modelo del sistema nervioso de todos los animales (Hodgkin, 1998). Pues se sabe que al igual que en otros organismos, las neuronas del nematodo forman sinapsis, sintetizan, empaquetan y liberan neurotransmisores como acetilcolina, GABA, glutamato, serotonina, dopamina y neuropéptidos para la comunicación celular; mismos que después activan canales iónicos para transmitir la señal a su destino (Rankin, 2002).

El comportamiento, en términos de complejidad, integra múltiples entradas para coordinar una respuesta conductual, y por esto el sistema nervioso relativamente simple del nematodo provee de una oportunidad para investigar mediante la generación de mutantes el cómo se integra esta información a nivel de genes, moléculas y neuronas. Es bien sabido que entender el comportamiento en mamíferos es un desafío muy grande, sin embargo, en ambos, mamíferos y *C. elegans* las conductas son facilitadas o inhibidas por la actividad de productos de genes únicos (De Bono, 2003). El nematodo *C. elegans* es un modelo muy atractivo para el estudio de esta área pues exhibe un amplio repertorio de comportamientos que pueden estudiarse a nivel conductual, neuronal y genético; por ejemplo: conductas de locomoción, sensoriales (olor, temperatura, toque, señales osmóticas), de supervivencia (forrajeo, alimentación, defecación y formación de larva Dauer), reproductivas (puesta de huevos, cópula), comportamiento social, aprendizaje y memoria, ya que son fáciles de caracterizar mediante mutantes genéticas (De Bono y Maricq, 2005; Rankin, 2002). Entre los comportamientos estudiados podemos contar el de alimentación social mediado por agregación. De Bono y Bargmann (1998) encontraron que cambios en el gen *npr-1* determinaba si una cepa se agregaba o no y lo probaron mediante experimentos de pérdida de función, además encontraron, que todas las cepas que exhiben dichas conductas de agregación codifican fenilalanina en la posición 215 de la proteína NPR-1, a diferencia de las solitarias, que codifican valina. Otro ejemplo es durante la puesta de huevos donde el nematodo posee periodos de actividad e inactividad. Shyn *et al*, (2003) encontraron que la serotonina actúa como un modulador de los músculos de la vulva para incrementar el intervalo y

alterar el patrón temporal de la puesta de huevos, mediante las proteínas codificadas por los genes *goa-1* y *egl-30* que podrían actuar como reguladores en la acción del neurotransmisor. Estos ejemplos evidencian que todos los procesos involucrados en la generación de una conducta se originan por la integración de la interacción génica, de sus productos y a nivel neurológico. *C. elegans* da la oportunidad de evaluar dichas interacciones con un menor grado de complejidad ya que a diferencia de los mamíferos que representan distintas áreas cerebrales que actúan juntas para coordinar una respuesta, con el nematodo se puede utilizar genética directa para investigar a nivel de moléculas y neuronas, pues la conducta puede ser facilitada o inhibida por la alteración de la actividad de los productos de un único gen (De Bono, 2003; Rankin, 2002).

II.3 Aproximaciones genéticas

Las mutaciones son los ingenieros de la selección natural (Kutscher y Shaham,2014). En el nematodo *C. elegans*, las mutaciones puntuales espontaneas, duplicación de genes y deleciones surgen cada 2×10^{-8} , 3.4×10^{-7} y 2.2×10^{-7} , por gen, por generación, respectivamente. Entre las causas se encuentran los errores de reparación y replicación del ADN, demanda oxidativa endógena e insultos ambientales(Kutscher y Shaham,2014). Las técnicas de genética clasica y genética inversa son herramientas muy poderosas pues permiten identificar, caracterizar y entender genes involucrados en procesos biológicos y estructuras conocidas (Gengyo-Ando y Mitani, 2000). Entre todos los métodos para generación de mutantes, la mutagénesis química provee la forma más sencilla de inducir mutaciones en la línea germinal del nematodo; sin embargo, la frecuencia de mutaciones es diferente dependiendo del mutágeno utilizado. Esto es importante de considerar, ya que la posibilidad de identificar una mutante, está en función del número de gametos o genomas haploides examinados. Primero, los animales (Parentales P0) deben exponerse a un mutágeno con la finalidad de generar mutaciones en las células germinales

femeninas o masculinas. El Etil metanosulfonato (EMS) es el químico más utilizado en el nematodo por ser rápido y potente, es un agente alquilante que agrega un grupo etilo a las guaninas para formar O⁶-etilguanina. De esta forma, provoca que la guanina se ancle erróneamente con timina en las subsecuentes replicaciones, de tal manera que la mutagénesis se sesga hacia las transiciones G/C a A/T, que frecuentemente conduce a codones de paro. Cuando se usa el EMS a 50mM, presenta una frecuencia de 2.5×10^{-3} mutaciones/gene/generación, por tanto, necesitan analizarse por lo menos 2500 genomas haploides para encontrar una mutación de interés (Shaham, 2007; Kutscher y Shaham, 2014).

Una vez realizada la mutagénesis, los gusanos son colocados en una placa de agar y se crecen durante dos generaciones para producir mutantes homocigotas recesivas. Mediante esta aproximación, Brenner identificó 619 mutantes con fenotipos visibles, sobre todo con mutaciones no coordinadas, es decir, defectos en locomoción (Jorgensen y Mango, 2002). Después de una mutagénesis, la siguiente aproximación genética es el cartografiado genético. En este trabajo se utilizaron los polimorfismos de un único nucleótido (SNP), que son marcadores moleculares de gran potencial para cartografiar mutaciones derivadas en organismos modelos como *Caenorhabditis elegans* (Wicks et al, 2001). Estos marcadores no causan fenotipo, lo que permite medir una mutación de interés en un fondo fenotípico normal, además, muchos SNPs pueden evaluarse simultáneamente sin preocuparse acerca de las interacciones genéticas entre ellos (Davis y Hammarlund, 2006). Para el cartografiado se toma provecho de los polimorfismos de las secuencias de ADN, entre la cepa N2 y la cepa CB4856. Posee dos ventajas principales: primero que no provocan fenotipo como otros marcadores y segundo que son mucho más densos que cualquier otro (Davis et al, 2005). Los dos pasos básicos para el mapeo con SNP son: 1) Recombinar animales mutantes sobre una cepa polimórfica, generalmente CB4856; y 2) el linaje entre la mutante y uno o más SNPs es utilizado para posicionar a la mutante sobre un cromosoma relativo (Davis y Hammarlund, 2006).

Actualmente pocos genes han sido clonados y caracterizados a nivel molecular, por eso, el objetivo futuro de la investigación que se lleva a cabo en el mundo es elucidar que papel desempeñan los genes en los procesos biológicos. Cabe mencionar que cerca de un tercio de los genes descritos en *C. elegans*, tienen contraparte en mamíferos, por lo que entender la función que desempeñan en el nematodo, ayudara a determinar que función desempeñan en animales más complejos (Jorgensen y Mango, 2002).

II.4 Sistema locomotor y locomoción reversa en *C. elegans*

La locomoción es uno de los comportamientos más prominentes en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, además de que es la base de la mayoría de las conductas que este exhibe (sensoriales, apareamiento, sociales etc.). Dentro del repertorio de conducta locomotora incluye arrastrarse (*crawling*) en superficies sólidas y el nado o coleteo (*thrashing*) en medio líquido, por otro lado, *nose touch* (estimulación mecánica en la parte anterior de cuerpo), *harsh touch* (estimulación mecánica fuerte en la parte anterior del cuerpo) y *gentle touch* (estimulación suave), que provocan que el gusano despliegue locomoción reversa (Altun y hall, 2011; Kaplan, 1996).

Las neuronas del nematodo se clasifican en cuatro categorías: motoneuronas, que hacen contacto con las células musculares; neuronas sensoriales, que tienen especializaciones sensoriales; interneuronas, que reciben y envían sinapsis a otras neuronas; y las neuronas polimodales que llevan a cabo una o más funciones (Altun y Hall, 2011). De las 302 neuronas que tiene un individuo hermafrodita adulto, 113 son motoras y controlan el *crawling* y el *thrashing*. De esas 113, 75 inervan 79 músculos de la pared del cuerpo: 16 del cuello y 63 del cuerpo. Dichas motoneuronas se dividen en ocho clases: AS, DA, DB, DD, VA, VB, VC. Cuatro clases inervan los músculos ventrales VA, VB, VD Y VC, y cuatro clases a los músculos dorsales DA, DB, DD, AS (Altun y Hall, 2011; De Bono y

Maricq, 2005; Haspel et al, 2010). Las motoneuronas clase A, B y AS son colinérgicas y estimuladoras. Las tipo D secretan ácido γ -aminobutírico (GABA), inhibitorias y post-sinápticas y motoneuronas VC inervan músculos vulvares (Altun y Hall, 2011).

La locomoción de *C. elegans* consiste en desplazarse (arrastrándose) hacia adelante con reversas espontáneas, mismas que pueden ser afectadas por diversas variables como la humedad, gravedad y mecanoestimulación (Zhao et al, 2003). Estos tipos de locomoción se exhiben en muchas especies de animales, sin embargo, pocos estudios han conducido a los mecanismos moleculares de la locomoción reversa directamente (Haspel et al, 2010).

Las motoneuronas VB, DB son inervadas por las interneuronas PVC y AVB, que se activan durante la locomoción hacia adelante. De igual manera, las interneuronas AVD y AVA inervan a las motoneuronas DA y VA en la locomoción reversa (**Figura 2 A**) (De Bono y Maricq, 2005; Haspel et al 2010; Pirri y Alkema, 2012).

La conducta reversa que desempeña el gusano, le brinda la oportunidad de evitar una variedad de estímulos nocivos como alta osmolaridad, algunos olores, metales, alcaloides y detergentes, mismos que son sentidos por distintas neuronas, sin embargo, la neurona sensorial ASH es común para todos ellos (Altun y Hall, 2011). En la **Figura 2B** se observa un diagrama donde se especifica las neuronas sensoriales activas mediante distintos estímulos, así como las interneuronas o neuronas comando y las motoneuronas activadas. También se observa una imagen de un individuo hermafrodita donde se muestran las neuronas sensoriales involucradas en la locomoción hacia adelante y la locomoción reversa.

Durante la locomoción hacia adelante o forrajeo, el gusano despliega un movimiento reversa que puede ser espontáneo o inducido, con la finalidad de cambiar la locomoción en dirección opuesta a su curso original (Piggot et al, 2011). En el caso de que la reversa sea inducida por un toque en la parte anterior

del cuerpo, el movimiento lateral de la cabeza cesa y el animal retrocede con movimientos sinusoidales; acto seguido se forma un omega que es iniciado por un giro brusco y el animal cambia de dirección (**Figura 3**) (Donnelly, 2013). En particular las interneuronas comando AVA, AVD Y AVE son esenciales para la iniciación de las reversas ya que la ablación de AVA y AVD deja a los gusanos incapaces de realizar dicho movimiento. Las interneuronas comando reciben señales directas de neuronas sensoriales e indirectas de interneuronas corriente arriba (primera y segunda capa de interneuronas) que envían señales de salida a motoneuronas ventrales-cordales tipo A/AS que conduce a las reversas (Piggot et al, 2011). Hasta hace unos cuantos años solo se conocía que el circuito estimulador antes mencionado, sin embargo, quedaba la duda, si este era responsable de todos los eventos de locomoción reversa. Los mismos autores encontraron un modelo desinhibitorio, totalmente independiente del estimulador, donde la interneurona de la primera capa AIB es la reguladora del circuito. AIB forma sinapsis densas con la interneurona de la segunda capa RIM que a su vez suprime la iniciación de reversas durante la locomoción hacia adelante. Una vez que AIB inhibe a RIM, hay locomoción reversa. Este patrón dual de regulación motora se ha visto en mamíferos, lo que sugiere que sistemas nerviosos con distinta morfología y de animales distantemente relacionados pueden adoptar estrategias similares para una salida motora (Piggot et al, 2011). Los modelos estimulador y desinhibitorio se describieron mediante experimentos en nematodos en libre desplazamiento y con reversas espontáneas, sin embargo, las reversas también son consecuencia de estímulos sensoriales que se procesan de manera distinta. El *nose touch*, es sentido por las neuronas ASH, OLQ y FLP que son las primeras que envía sinapsis a las interneuronas AIB, AVA y también a AVD y AVE, es decir, compromete ambos circuitos, por lo tanto ambos forman la vía primaria por la cual el gusano inicia reversas para evitar estímulos mecánicos (*nose touch*). Por otro lado, cuando hay choque osmótico los gusanos emplean el circuito estimulador como vía primaria, pues el desinhibitorio es ocupado para suprimir movimientos de la cabeza. Sin embargo, en caso de ser necesario, el circuito RIM puede usarse como emergencia para iniciación de locomoción

reversa, por lo que reclutan neuronas para suprimir el movimiento de cabeza, esto con la finalidad de facilitar un eficiente escape de ambientes con alta osmolaridad (Piggot et al, 2011). Seis neuronas sensoriales son las que sensan la conducta locomotora más estudiada, estímulo mecánico suave (*gentle touch*): ALML, ALMR, PLML, PLMR, AVM Y PVR y entre los factores de transcripción importantes y que se ha visto son necesarios para la producción de estas neuronas sensoriales se encuentran *lin-32*, *vab-15*, *unc-86*, *mec-2*, *mec-3* y *mec-8*. En cuando a proteínas requeridas para la mecanocepción se encuentran MEC-4, MEC10 que codifican un canal de sodio epitelial de degenerinas y proteínas codificadas por *mec-6*, *mec-2* y *unc-24* para formar el canal que es esencial para la transducción del estímulo mecánico ligero (Bounoutas y Chalfie, 2007).

La conducta reversa se ha estudiado indirectamente mediante los estímulos antes mencionados o el estímulo mecánico suave (*gentle touch*) y aunque esto ha generado mucha información acerca de la comunicación que existe en el sistema nervioso del nematodo, aún hace falta estudiar más sobre los genes que subyacen esta conducta.

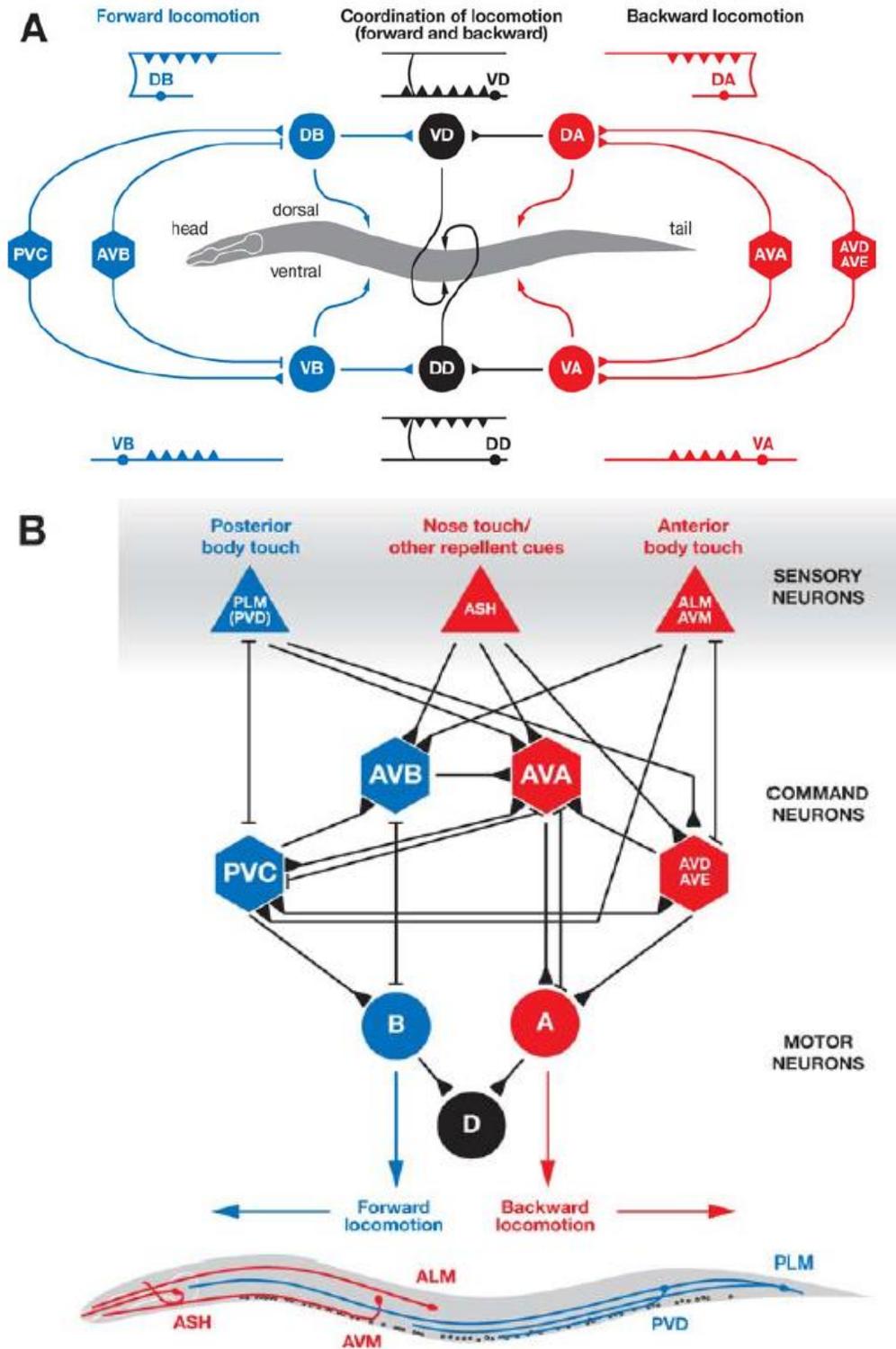


Figura 2. Control neuronal de la locomoción hacia adelante y locomoción reversa.

A) Conectividad entre interneuronas (hexágonos) y motoneuronas (círculos). Los triángulos indican sinapsis química y las barras uniones gap. Los paneles superiores e inferiores representan cuerpos celulares de las neuronas motoras (Pequeños círculos), procesos neurales (líneas) y sinapsis (triángulos). **B)** Circuitos que controlan la locomoción reversa y hacia adelante (diagrama superior). Morfología de neuronas sensoriales. Azul y rojo involucradas en locomoción hacia adelante y reversa, respectivamente. Figura tomada de: De Bono y Maricq (2005).

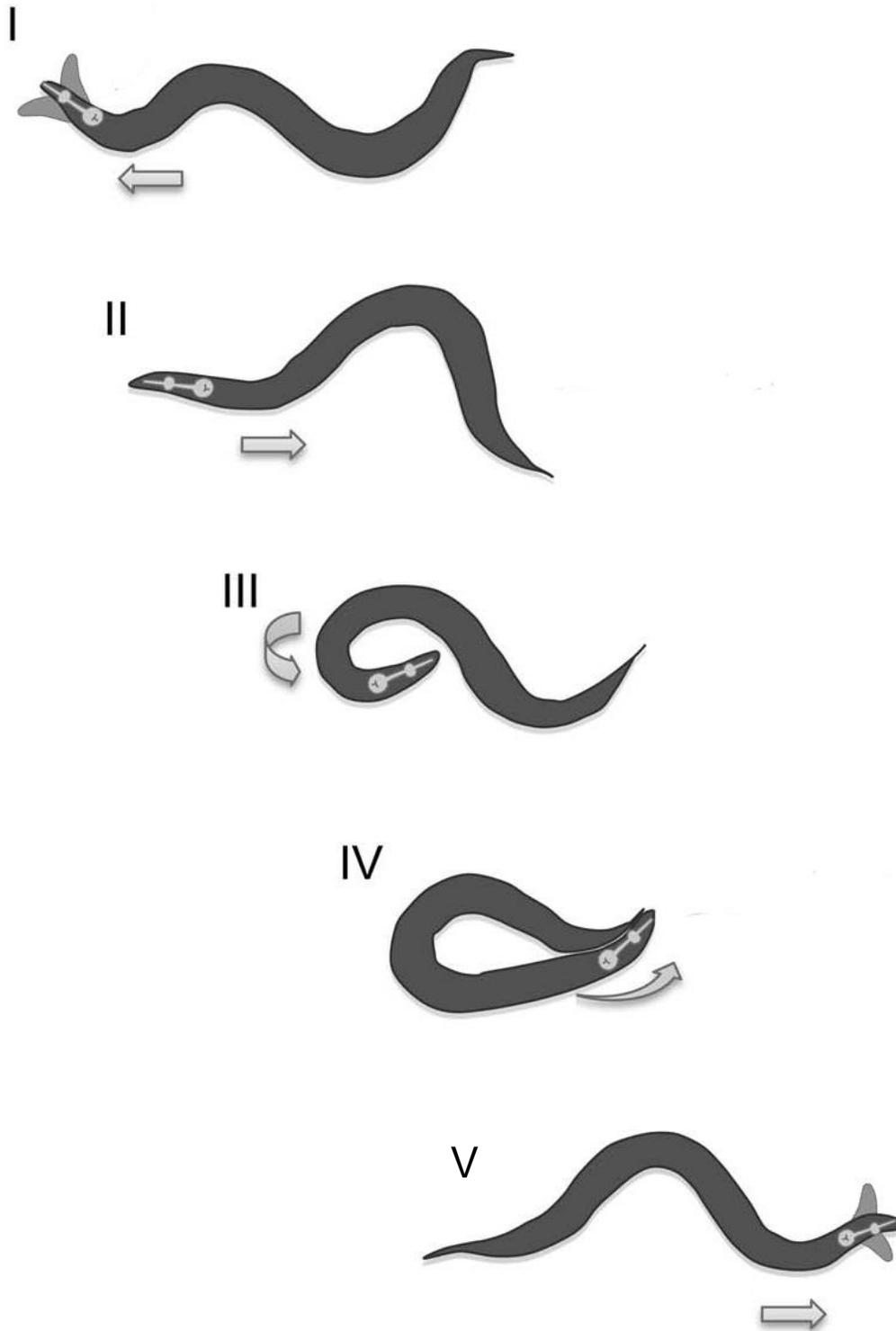


Figura 3. Diagrama de la locomoción reversa.

El movimiento reversa consta de cuatro elementos: I) Sensar el estímulo. En caso de *nose touch*, el gusano detiene el movimiento de la cabeza. II) Tres reversas hacia atrás en forma sinusoidal. III) hace un giro brusco. IV) forma un omega para dar la vuelta, lo que resulta en un giro de 180°. Todo esto en respuesta a un estímulo, ya sea mecánico, sensorial o de manera espontánea. Finalmente, V) Se desplaza hacia adelante, en dirección opuesta a la original. Figura adaptada de: Donnelly et al. 2013).

II.5 Locomoción reversa como conducta de escape en *C. elegans*

Para cualquier organismo las conductas de escape son cruciales para la supervivencia. Uno de los principales lemas que guía la conducta de los organismos es “comer, pero no ser comido” dice Pirri y Alkema (2012), sin embargo, el forrajeo incrementa el riesgo de depredación, por lo tanto, el animal enfrenta el reto y trata de salir vivo ante una confrontación con el depredador. Se han observado respuestas de escape en diversos organismos (**Figura 4**). En el cangrejo de río, un toque en la cola del cangrejo induce fuertes flexiones abdominales que son espacial y temporalmente controlados para propulsar al animal a través del agua, lejos del estímulo (Edwards *et al*, 1999). En el molusco tritonia, un estímulo mecánico inicia una serie de flexiones corporales ventrales y dorsales coordinadas que lo hacen nadar lejos del depredador (Mongeluzi y Frost, 2000). En la carpa dorada, un estímulo lateral causa contracción coordinada de músculos agonistas y antagonistas para cambiar de dirección y alejarse del estímulo (Foreman y Eaton, 1993). Por último, en *Drosophila*, un fuerte estímulo visual, provoca que la mosca extienda sus patas y se impulsa hacia atrás para volar lejos (Card y Dickinson, 2008).

Entre los principales depredadores del nematodo *Caenorhabditis elegans* se encuentran los ácaros nematofagos, colémbolos, osos de agua, nematodo nematofagos como *Pristiounchus pacificus* y hongos carnívoros de la familia Orbiliales (Pirri y Alkema, 2012). Las conductas de escape deben ser rápidas, robustas y utilizar estructuras neuronales dedicadas a dicha tarea, pues estas le permiten al animal alejarse de estímulos aversivos. *C. elegans* se desplaza por la propagación de ondas sinusoidales a lo largo de todo su cuerpo, además, esta locomoción se acompaña por rápidos movimientos exploratorios de la cabeza (Maguire *et al*, 2011). Ya sea espontaneo o mediante un estímulo, el nematodo despliega un movimiento reversa que consta de la propagación de ondas sinusoidales y contracciones de los músculos ventrales-dorsales a lo largo del cuerpo, da la vuelta formando un omega y cambia de dirección, coordinado con la

supresión del movimiento de la cabeza (solo con estímulo mecánico anterior) (Donnelly et al, 2013; Pirri y Alkema 2012; Zhao et al, 2003). Aunque la conducta de escape se ha estudiado como respuesta al estímulo mecánico, y resalta que el cese de los movimientos de la cabeza es indispensable para evitar un depredador o un ambiente nocivo, es evidente que cuando el gusano posee un defecto en cualquiera de los elementos que conforman dicha respuesta de huida, la probabilidad de supervivencia disminuirá. Maguire et al, (2011) realizaron estudios con el hongo nematofago *Drechlerella doedycoides*, ya que se mencionó anteriormente como uno de los principales depredadores para el nematodo. Algunos de estos hongos poseen estructuras trampa como redes o ramas adhesivas, anillos constrictores o no constrictores a lo largo de las hifas para capturar a los nematodos. Cuando un gusano pasa a través del anillo, la fricción que provoca sobre la hifa induce que las células del hongo se inflen, en consecuencia estas atrapan al nematodo, para posteriormente penetran su cutícula y digerirlo. Ellos observaron que larvas L3 y L4, que tienen un diámetro más parecido al del anillo del hongo, son los que más frecuentemente caen en la trampa. También realizaron análisis con mutantes defectivas en la supresión del movimiento de cabeza (*tdc-1*: $49 \pm 10\%$; *lgc-55*: $60 \pm 6\%$), y vieron que dicha respuesta es crucial para la supervivencia. Así mismo, analizaron una mutante que puede moverse hacia adelante y suprimir los movimientos de la cabeza con normalidad, pero que tiene defectos en la locomoción reversa (*unc-4*: $59 \pm 7\%$), observaron que escapaba con menor frecuencia, por tanto, la coordinación en el movimiento reversa, también es esencial (Maguire et al, 2011).

Gusanos del clado Eurhabditis, que habitan en el suelo y están muy relacionados a *C. elegans*, despliegan una respuesta de escape similar. Por otro lado, se ha visto que varias especies del clado Pleiorhabditis, que viven en asociación con insectos, fallan en la coordinación de movimientos corporales y de la cabeza durante su respuesta de escape, lo que sugiere que dichos movimientos pudieron evolucionar por presiones selectivas (Pirri y Alkema, 2012). Análisis filogenéticos sugieren que la morfología de las trampas pudieron haber evolucionado de anillos no constrictores, lo que da la posibilidad de pensar que la supresión del

movimiento de cabeza podría ser resultado de una carrera evolutiva entre el nematodo y el hongo (Maguire et al, 2011). Finalmente cabe mencionar, que se han encontrados hongos que usaban anillos trampa conservados en ámbar de 100 millones de años de edad, lo que podría indicar que en caso de existir una relación depredador-presa, es muy ancestral.

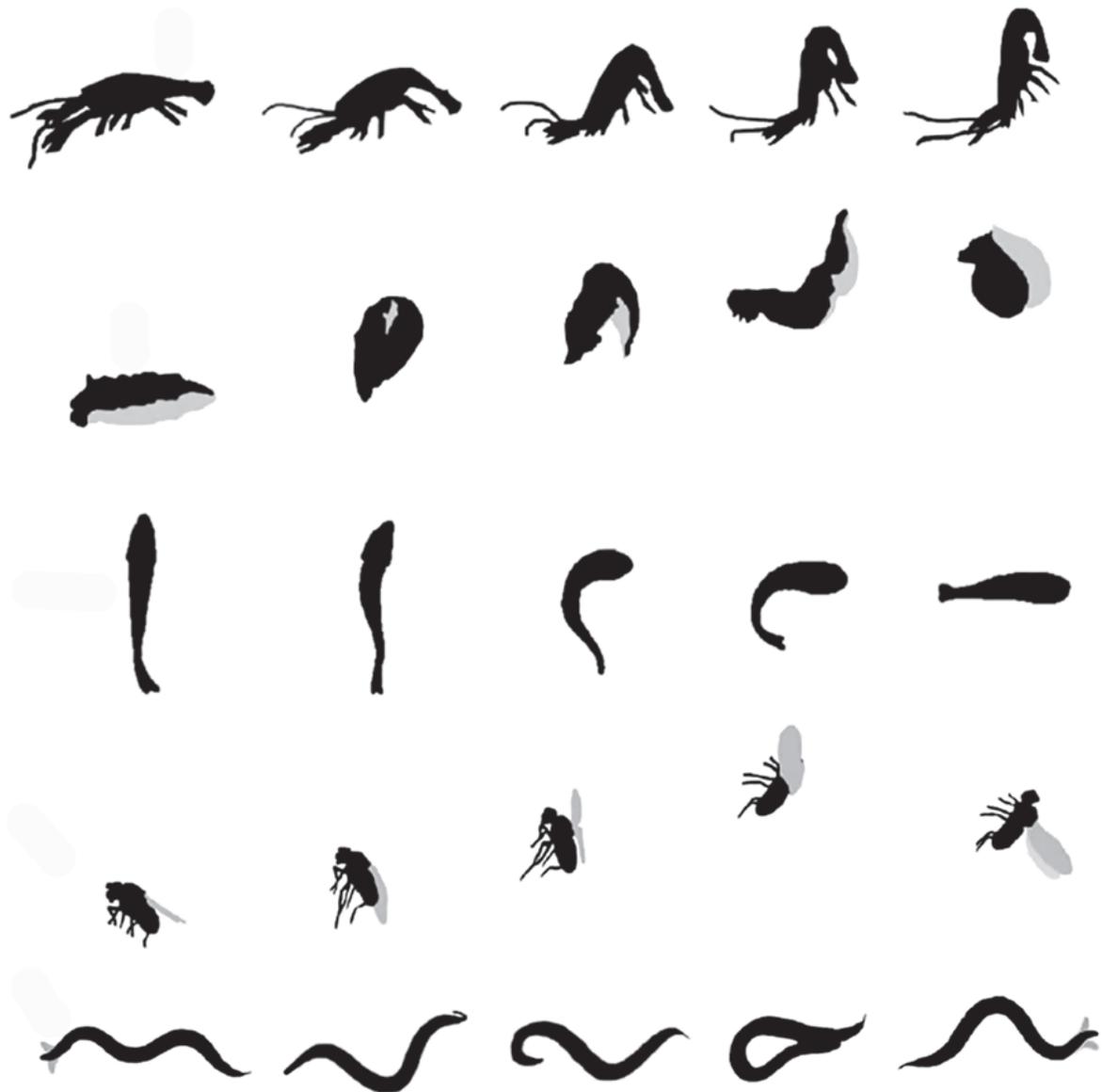


Figura 4. Respuestas de escape.

Siluetas de animales en respuesta de escape. De superior a inferior: Cangrejo de río, molusco nudibranchio *Tritonia*, carpa dorada, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*. Figura de: (Pirri y Alkema, 2012)

III. HIPOTESIS

Existen genes relacionados a la conducta reversa, que al ser mutagenizados mediante el químico EMS, provocarán defectos que se reflejarán en la locomoción del nematodo *C. elegans*. Esto permitirá conocer los genes que subyacen la conducta reversa mediante el cartografiado de una mutante genética aislada.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar cuáles genes subyacen la conducta reversa en el nematodo *Caenorhabditis elegans*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar al menos una mutante genética para la conducta reversa mediante mutagénesis química con EMS
- Localizar el cromosoma y el gen o genes afectados en la mutagénesis por medio de marcadores moleculares SNP.
- Determinar las diferencias en locomoción, alimentación y fertilidad de la mutante en comparación con la cepa silvestre N2, mediante bioensayos para dichas actividades.

V. MÉTODOS

La experimentación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, en el periodo Enero del 2013 a Octubre del 2014.

V.1 Cepas

A lo largo de la experimentación se utilizaron las cepas silvestres Bristol (N2), CB4856 y CB193 (*unc-29*, alelo e193, mutante resistente a levamisol), todas pertenecientes a la especie *Caenorhabditis elegans* y que se obtuvieron a través del Caenorhabditis Genetics Center (<http://www.cgc.cbs.umn.edu/>).

V.2 Cultivo y manipulación de nematodos

Para el mantenimiento de todos los nematodos se revisó el protocolo especificado en el wormbook por Stiernagle (2006), y se llevó a cabo de acuerdo a lo siguiente:

Para el crecimiento de los nematodos se utilizó el medio NGM (Nematode Growth Medium, por sus siglas en inglés). Para preparar un litro de dicho medio se utilizan 3gr de NaCl, 2.5gr de Peptona y 17gr de agar bacteriológico que se colocan en un frasco de vidrio tipo Schott del doble del volumen y se afora con agua destilada. Este preparado se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 15 psi y posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente. Enseguida se le añaden 25ml de buffer KPO_4 1M pH 6.0 (108.3 g KH_2PO_4 , 35.6 g K_2HPO_4 , H_2O para 1 litro), 1ml de CaCl 1M, 1ml de $MgSO_4$ 1M y 1ml de colesterol en etanol (5mg/ml sin autoclave), para finalmente vaciar en placas de Petri de 6cm bajo condiciones estériles.

Al día siguiente, una vez que las placas han secado y perdido humedad, se inocula sobre la superficie del agar 180 μ l de bacteria *Escherichia coli* cepa OP50,

principal fuente de alimento para los nematodos en laboratorio y que se caracteriza por tener un crecimiento limitado (Stiernagle,2006). Después de un día de crecimiento y reposo a temperatura ambiente, las placas pueden ser utilizadas. El medio para crecer y mantener *E. coli* OP50 es denominado 2xTY y contiene 16gr de Triptona, 10gr de extracto de levadura y 5 gr de NaCl para un litro. El preparado se esteriliza por autoclave y una vez frío se almacena a 4°C al igual que los stocks.

Para la manipulación de nematodos se elaboró un asa especial con una pipeta Pasteur de vidrio a la cual se le adaptó un alambre de platino. Debido al tamaño de *C. elegans*, las observaciones se llevaron a cabo en microscopios ópticos y estereoscópicos.

V.3 Mutagénesis química y aislamiento de mutantes

La mutagénesis se llevó a cabo mediante el uso de etil metanosulfonato (EMS) con el protocolo utilizado en el laboratorio de Herman (http://www.k-state.edu/hermanlab/protocols/ems_mutagenesis.htm) con modificaciones. Se realizaron tres mutagénesis en distintas fechas, la primera se llevó a cabo el 26 de abril de 2013, la segunda el 17 de junio de 2013 y la última el 27 de junio del mismo año. Se transfirieron placas por duplicado con 3, 4, y 6 gusanos L4 de la cepa N2. Estos se dejaron crecer y que alcanzaran la madurez sexual simultáneamente con la finalidad de sincronizar el crecimiento de su progenie, de esta manera obtuvieron numerosos individuos aptos para la mutagénesis. Cabe señalar que en el protocolo original sólo se utilizan 10 individuos, sin embargo, en pruebas preliminares se observó que la mayoría de los individuos no soportaba el tratamiento, por lo que se optó por usar poblaciones completas de organismos sincronizados, con la finalidad de garantizar tener individuos sobrevivientes. Una vez que se tenían los organismos a someter, se procedió con los siguientes pasos:

- 1- Se transfirieron los individuos de cada placa a tubos Eppendorf de 2 ml. Para esto, la placa se lavó con buffer M9 (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g

NaCl, 1 ml 1 M MgSO₄, H₂O para 1 litro. Esterilizar con autoclave) y con una pipeta Pasteur de vidrio el contenido de la placa se transfirió al tubo Eppendorf.

- 2- Se agregó 1ml de M9 a cada tubo y se mezcló por inversión durante 30 segundos.
- 3- Posteriormente se dejó formar un pellet de gusanos (cerca de 5 minutos) y se decantó el buffer M9. Se tuvo cuidado de no perder el pellet de gusanos. En caso de que el proceso de decantación fuera difícil, se extrajo el sobrenadante con una pipeta.
- 4- Se realizó un segundo lavado. Para esto se repitieron los pasos 2 y 3.
- 5- Se resuspendió el pellet de gusanos en 2ml de buffer M9.
- 6- Acto seguido, en la campana se preparó una solución 0.1 M de EMS (Sigma #M0880), mediante la adición de 20 µl de EMS líquido a 2ml de buffer M9 para cada tubo de gusanos sometidos a mutagénesis. La solución se agitó gentilmente hasta que el líquido oleoso quedó totalmente disuelto.
- 7- Los 2 ml de solución EMS se añadieron cuidadosamente a la suspensión de nematodos (concentración final de EMS 0.05M). Las muestras se taparon cuidadosamente y se dejaron reposar por 4 horas a temperatura ambiente.
- 8- Una vez transcurridas las 4 horas y que finalizó el tiempo de exposición al mutágeno, los nematodos se lavaron dos veces con buffer M9 tal como se realizó en el paso 3.
- 9- Los gusanos de cada tubo se transfirieron a placas de NGM con *E. coli* OP50. Para esto, con una pipeta Pasteur de vidrio se tomó el medio M9 restante de cada tubo y que contenía los nematodos, mismo que enseguida se vertió a la periferia de la mancha de alimento en la placa de agar.
- 10- Se dejó que los gusanos reposaran de 15 a 20 minutos y enseguida se verificó si habían sobrevivido al procedimiento. En la mayoría de los casos se dejó reposar hasta 12 horas, momento hasta el cual se observaron individuos activos.

Es importante resaltar que el EMS es un potente mutágeno, por lo que se tuvo cuidado de utilizar guantes y bata de laboratorio en todo momento, además de que el procedimiento se llevó a cabo en una campana de extracción. Cabe mencionar que todos los materiales utilizados en el proceso de mutagénesis se inactivaron con una solución de NaOH 0.1 mM, 20% w/v Na₂S₂O₃ tiosulfato de Sodio, durante 24 horas y posteriormente desechados de acuerdo a lo establecido por el comité de manejo de desechos de la FCN.

Para la selección de mutantes se siguió el protocolo de Jorgensen y Mango (2002) con algunas modificaciones. Una vez que se encontraron individuos P0 activos (individuos sometidos a mutagénesis), estos se transfirieron a placas nuevas con alimento (**Figura 5**), sin embargo, a diferencia de los autores referidos, nosotros transferimos de 5 a 10 gusanos P0 por placa en 38 placas totales, lo que dependió del número de individuos sobrevivientes al proceso de mutagénesis. Dejamos que cumplieran su ciclo reproductivo, que en condiciones del laboratorio donde se realizó la experimentación se cumplía en 4 días ya que las placas se almacenaban a 18°C.

De la generación F1 (Progenie de P0), se tomaron un total de 745 individuos los cuales se transfirieron a 149 placas en grupos de 5. Se dejó crecer por los siguientes 3 días y se obtuvo la generación F2, de los cuales se aislaron y transfirieron gusanos individuales a placas de agar para obtener la generación F3. En la generación F3 se realizaron cuidadosas observaciones, ya que es en esta donde se podían encontrar mutantes homocigotas recesivas, de interés para este estudio.

Las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio estereoscópico LABOMED (CZM4) pues las mutantes se seleccionaron por inspección, todas se tomaban en cuenta, sin embargo, se puso énfasis en aquellas que mostraban defectos en la locomoción reversa o en cualquiera de sus elementos. Debido a que el objetivo principal fue aislar animales con defecto en la locomoción reversa, se utilizó el asa de platino para realizar un toque en la parte anterior del cuerpo, esto con la finalidad de que el animal hiciera reversa y de esta manera poder

darnos cuenta si tenía defecto en dicha conducta. También se aislaron aquellos individuos que mostraban anomalía en tamaño o forma.

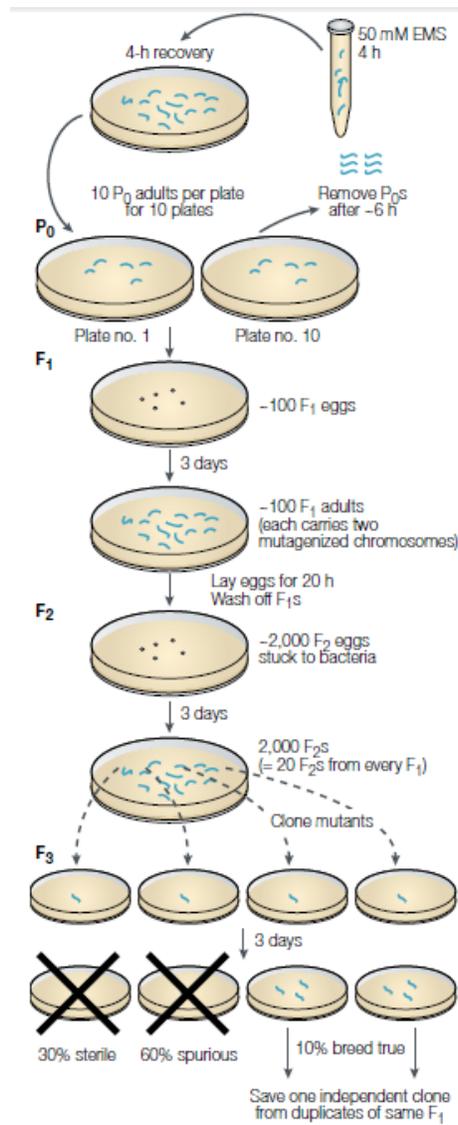


Figura 5. Metodología para aislamiento de mutantes.

Se describe el proceso que se debe seguir en cada generación para la búsqueda de mutantes después de la mutagénesis con EMS. Por lo general, después de la generación F₃ se pueden encontrar las mutantes homocigotas Figura de Jorgensen y Mango (2012).

Cada vez que se identificaba un individuo con probable anomalía en la locomoción reversa, se aislaba y se analizaba su progenie, esto con la finalidad de observar si el fenotipo se conservaba en la siguiente generación. En caso de que el fenotipo extraño se perdiera, se consideraba como un falso positivo y se desechaban. Por

otra parte, en el caso donde el fenotipo de interés se conservó, se aislaron distintos individuos en placas independientes y se mantuvieron por varias generaciones, esto nos permitió asegurarnos de que el fenotipo mutante no se perdiera a través del tiempo y que los organismos siguieran fértiles.

V.4 Limpieza del fondo genético y obtención de recombinantes

Una vez que se aisló y se verificó la fertilidad de la cepa mutante, se procedió a limpiar el fondo genético, esto con el objetivo de eliminar todas aquellas mutaciones adicionales que se pudieran presentar acompañando a la mutación causante del fenotipo de interés. Para esto se realizaron cruzas genéticas donde machos de la cepa N2 se reprodujeron con hermafroditas de la cepa mutante. Se utilizó esta cepa ya que en ella se realizó la mutagénesis.

Cabe destacar que la frecuencia de machos en la progenie de un hermafrodita silvestres es de 1 por cada 500 individuos (Hodgkin *et al*, 1979) y para cada crusa se ocupó de al menos 7 machos por individuo hermafrodita. Debido a esto, y para obtener un mayor número de machos se realizó la técnica de choque térmico donde 10 individuos en etapa L4 se transfirieron a placas de agar, las cuales se incubaron de 4-6 horas a 30 °C. Incubar a esta temperatura provoca que el porcentaje de machos en la población se incremente hasta en un 30%, debido a la no disyunción del cromosoma X durante la meiosis.

Una vez obtenidos los machos, se aislaron 7 u 8 para cada crusa y se colocaron en una placa de agar con alimento. Ahí mismo se transfirió un hermafrodita mutante juvenil L4, garantizando así su virginidad y que la progenie resultante sea producto del apareamiento entre individuos de las distintas cepas. En la **Figura 6** se aprecia un diagrama general de las cruzas realizadas. La progenie F1 fue heterocigota, por lo que expresó fenotipo silvestre, la F2 presentó la proporción 3:1, donde $\frac{3}{4}$ de la población exhibió fenotipo silvestre y $\frac{1}{4}$ fenotipo mutante. Individuos mutantes F2 se aislaron y por autofecundación se obtuvo la progenie F3. En este punto se consideró que el fondo genético se había limpiado una vez y se denominó *buc-1* OX1. La crusa se volvió a repetir como se mencionó

anteriormente, sólo que en esta ocasión se utilizó a *buc-1* OX1 como parental. Ya que se obtuvo la F3 mutante se denominó *buc-1* OX2 y a partir de esta se obtuvieron las recombinantes y se realizaron los experimentos para la descripción fenotípica.

Para la obtención de recombinantes se llevaron a cabo las cruzas como en la **Figura 6** y al igual que se describió anteriormente con la cepa N2, sin embargo, en esta ocasión se utilizó a machos de la cepa silvestre CB4856 y hermafroditas mutantes *buc-1* OX2 como parentales. De la progenie heterocigota F1 se aislaron un total de 57 individuos con fenotipo silvestre los cuales se colocaron en placas individuales. Tras la autofecundación se observó la proporción 3:1 en la generación F2, de donde se aisló un individuo mutante por placa y se transfirió a una nueva, lo que dio un total de 57 individuos mutantes. Una vez que estos se autofecundaron y tuvieron progenie (F3), se llevó a cabo la extracción de ADN.

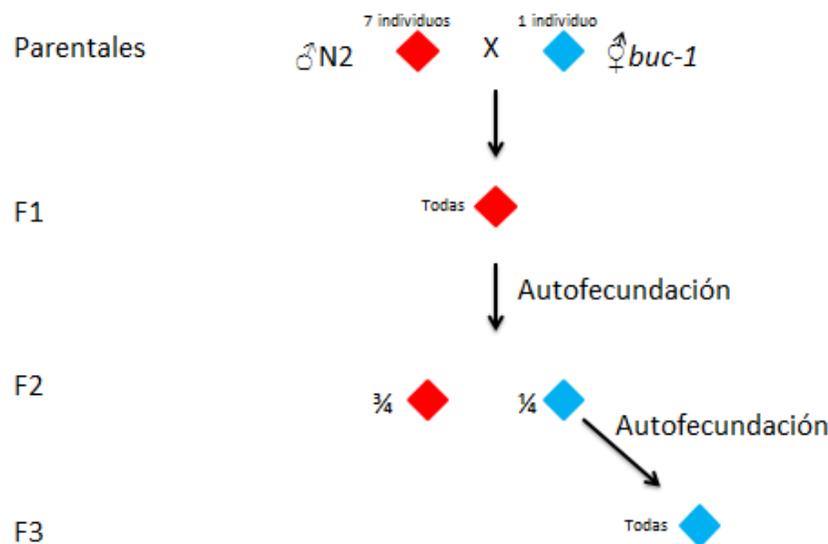


Figura 6. Diagrama de cruzas genéticas

Diagrama de las cruzas realizadas para la limpieza del fondo genético y obtención de recombinantes, usando a N2 y CB4856 como parentales respectivamente. Se puede observar como en la generación F2, 1/4 de la progenie presenta el fenotipo mutante

V.5 Técnicas moleculares

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo de Wicks y colaboradores (2001). En tubos para PCR se añadieron alícuotas de 50µl de SWELB (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% NP-40, 0.45% Tween 20, 0.01% gelatina) con proteinasa K (PK) a 100µg/ml dentro de estos se transfirieron 20 gusanos de la generación F3. Se realizó una muestra para cada recombinante aislada y para las cepas CB4856 y N2, las cuales se utilizaron como controles. Acto seguido todas las muestras se congelaron a -80°C durante 10 minutos y se descongelaron a temperatura ambiente, esto con la finalidad de romper la cutícula del nematodo y obtener el ADN, este paso se repitió 3 veces. Después se incubaron a 65°C durante 1 hora, tiempo en el que la Proteinasa K activa degradó las proteínas que se encontraban en las muestras (Shukla, 2009), seguidos por 15 minutos a 95°C para desactivarla, finalmente se almacenaron a 4°C. Para la amplificación por PCR se utilizó el protocolo sugerido para la *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Las soluciones se prepararon en tubos con alícuotas totales de 12.5µl con los componentes especificados en el **Cuadro 1**.

Componentes	Volumen
10X buffer PCR sin MgCl ₂	1.25µl
10mM de mezcla de Dntp	0.25µl
50mM de MgCl ₂	0.375µl
Primer mix (10µM) Forward	0.3125µl
Primer mix (10µM) Reverse	0.3125µl
DNA templete	1.25µl
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0.25µl
Agua grado molecular	8.5 µl

Cuadro 1. PCR

Proporción de reactivos utilizados para la amplificación de ADN por PCR para recombinantes de *buc-1*

Se seleccionó un SNP por cromosoma y de estos se adquirieron oligonucleótidos que se utilizaron para los PCR (**Cuadro 2**). Las muestras se colocaron en el termociclador y para desnaturalizar el ADN se incubaron a 94°C por 3 minutos, enseguida se programaron 35 ciclos a 94°C, 45seg; 58°C(T_M de los oligonucleótidos), 30 seg; 72°C, 60 seg. Adicionalmente se incubaron a 72°C por 10 minutos y se mantuvo la reacción a 4°C después del ciclo. Posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su uso.

La digestión se realizó con las enzimas de restricción mencionadas en el **Cuadro 2** para cada cromosoma. A cada reacción de PCR se le agregaron 10 µl de buffer de digestión (3µl NE buffer 10X, 1µl BSA 100x, 5.5µl de agua y 0.5µl de enzima) y se dejaron incubar según la temperatura y tiempo específico para cada una. Finalmente les añadió 1µl de buffer de carga y se corrieron electroforesis en geles de agarosa al 2% (0.8gr de agarosa en buffer TBE 1X, para 40 ml), a 100V, durante 45 minutos.

V.6 Caracterización genotípica

Con la finalidad de verificar si la mutante ya estaba descrita se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica sobre fenotipos que pudieran parecerse a la denominada mutante *buc-1*. Nombre que se le acuñó debido a su deficiencia en la locomoción reversa, “*backing uncoordinated*” por su nombre en inglés y 1 por ser la primera mutante que nosotros encontramos con dichas características. Se prestó especial atención en las mutantes no coordinadas, ya que son estas las que muestran defecto en el movimiento sinusoidal que desempeña el animal sobre la superficie de agar, en el movimiento de cabeza, en las revesas espontaneas o estimuladas (Brenner, 1974).

Las plataformas informáticas utilizadas para la búsqueda de videos fueron:

C. *elegans* Behavioural database: <http://wormbehavior.mrc-lmb.cam.ac.uk/> , C. *elegans* Behavioural database: <https://www.youtube.com/user/wormbehavior>, y Wormbase: <http://www.wormbase.org/#01-23-6>

Cromosoma	SNP	Posición en el cromosoma cM	Secuencia 5'	Secuencia 3'	Pb amplificadas por PCR	Enzima para digestión	Temperatura/ tiempo de incubación	Fragmentos generados en N2	Fragmentos generados en CB4856
I	K04F10	0.92	atcattctccagg ccacgttac	ctgaactagtcg aacaaccccc	594	NdeI	37°C/16 hrs	594	294,300
II	T13C2	0.08	tccacactatttc ctcgtg	gagcaatcaag aaccggatc	495	DraI	37°C/16 hrs	299,125,70	369,125
III	C08C3	-0.55	gtaaatttcgggc tcccatg	aaaagtgagctc atgtccg	843	ApoI	37°C/16 hrs	517, 222,102	739, 104
IV	E03H12	1.38	ccaacaaccta cagaaaatgc	aagatattcatgc gtcgtagtc	584	DraI	37°C/16 hrs	455,71,57	283,172,71,5 7
V	VC5	-1.46	gtgctaattccag aatgatcc	tagtgttcatagc atcccattg	512	DraI	37°C/16hrs	432,79	297,135,79
X	F45E1	-0.83	gggaaaatatag gaatctgtgg	aaattgcctgcta ccgtaac	776	EcoRI	37°C/5-15min	516,259	776

Cuadro 2. SNPs seleccionados para cada cromosoma. También se muestran las enzimas de restricción utilizadas para la digestión así como la temperatura necesaria, además de los fragmentos generados para cada cepa.

Las cepas que presentaron aparente similitud fenotípica en locomoción reversa a *buc-1* se solicitaron al *Caenorhabditis Genetics Center* con la finalidad de hacer pruebas que permitieran evaluar la locomoción y de esta forma verificar si se trataba de alelos mutantes del mismo gen.

Para *unc-29* (CB193), una de las cepas encontradas en el *C. elegans* Behavioural database se llevó a cabo una prueba de complementación genética, con la finalidad de conocer si la mutación de esta cepa y la de *buc-1* eran alelos de un mismo gen o si se encuentran en genes distintos. Para esto, se llevaron a cabo 8 cruces de machos mutantes *buc-1* (7 individuos) por un individuo hermafrodita *unc-29* (CB193) para la prueba de complementación genética. Tras cuatro días de incubación se obtuvo la progenie y se pudo analizar el fenotipo. En las pruebas de complementación genética, si los genes complementan, es decir, si son alelos de genes distintos, cada uno funcionará independiente al otro, de manera que juntos expresarán el fenotipo silvestre. Por otro lado, si la prueba no complementa, quiere decir que las mutaciones afectan la misma función y el fenotipo que se presentará en la progenie será mutante, por lo tanto, se consideran alelos de un mismo gen (Brenner, 1974 y Lewin, 1993).

V.7 Caracterización fenotípica

Además del análisis genético se realizó un análisis fenotípico que permitiera caracterizar a *buc-1*. Cuando se realizó la búsqueda bibliográfica, se encontró que la mayoría de las mutantes sólo se encuentran descritas a nivel de sistema nervioso y genético. Sin embargo, cuando se buscan mutantes con la finalidad de comparación fenotípica, la información es muy limitada. Es por esto que se pretendió no solo dar un análisis genético si no también aportar un poco de información fenotípica, que brinden la posibilidad de generar información que podría ser útil en estudios posteriores. El análisis fenotípico incluyó lo siguiente:

Descripción del fenotipo: para la descripción del fenotipo se realizó observación directa en el microscopio estereoscópico. Se observó cómo la mutante desempeñaba la locomoción reversa espontánea y estimulada con el asa de platino. También se revisó si presentaba todos los elementos de dicho tipo de locomoción y además si este se mostraba en todas las etapas larvarias, tanto en machos como hermafroditas. Se describió el fenotipo general y las variantes exhibidas en la población.

Para realizar un análisis más a fondo, se llevaron a cabo una serie de pequeños experimentos tomando a la cepa silvestre N2 como control y referencia, esto con la finalidad de definir la eficacia de la mutante en tareas básicas como el movimiento, desplazamiento, alimentación y reproducción.

Experimento de coleteo: la finalidad de este experimento fue comparar la habilidad motriz durante el nado o thrashing entre distintas cepas de *C. elegans*. Se ocupó de la cepa silvestre N2 como referencia y la cepa *unc-29* como comparación para establecer el número de coleteos en la mutante *buc-1*.

Siguiendo el protocolo descrito por Hart (2006) con algunas modificaciones, se picaron 10 animales en etapa 4 de placas con alimentos para cada cepa, los cuales se transfirieron a nuevas placas y se dejaron crecer hasta el día siguiente que se convirtieron en adultos. El experimento se llevó a cabo el mismo día para cada cepa y a temperatura ambiente (23°C en laboratorio).

Para el experimento se utilizaron cajas de 24 pozos en los que se agregó 500µl de medio M9. En cada pozo se colocó un gusano y se dejó reposar por 30 segundos. Enseguida, en un cronometro se estableció un minuto durante el cual se contabilizó el número de coleteos (cada que la parte detrás de la faringe llega a una curva máxima) que desempeñaba el nematodo, esto con ayuda de un contador manual. Se repitieron los mismos pasos para cada uno de los 10 gusanos de cada cepa.

Experimento de fertilidad y viabilidad: el objetivo de este análisis fue verificar la fertilidad de la mutante así como la viabilidad de los huevos, es decir, de cuántos

de los huevos puestos eclosionaron larvas. Cada experimento constó de 5 réplicas para la cepa silvestre N2 que se utilizó como control y 5 para *buc-1* con n=10 para cada una. Un día antes del experimento se picaron 50 gusanos en etapa L4 para N2 y *buc-1*, estos se dejaron crecer una noche a 18°C y para el día siguiente ya eran adultos. Una vez que los adultos estaban grávidos se transfirieron a 5 placas con alimento con 10 gusanos cada una, y se dejaron durante dos horas con el objetivo de que pusieran huevos durante ese lapso de tiempo. Transcurrido este, los adultos se retiraron de las placas y se contabilizó el número de huevos puestos con ayuda de un contador manual. Después las placas se dejaron incubando a 18°C hasta el día siguiente, pues el tiempo de desarrollo embrionario se cumple en aproximadamente 14 horas y hasta entonces eclosionan las larvas, que de igual manera se contaron. Dicho procedimiento se realizó para ambas cepas de manera simultánea. En este experimento también se pudo observar el tiempo de desarrollo de la mutante y mediante el conteo total de las poblaciones en las placas se pudo estimar el porcentaje de machos para la mutante *buc-1*.

Alimentación: con este experimento se pretendió analizar si la eficiencia de alimentación de la mutante *buc-1* era igual o difería a la de la cepa silvestre N2. En *C. elegans* la actividad de la faringe está correlacionada con la ingesta de alimento (Raizen et al, 2012), el nematodo toma partículas bacterianas suspendidas en medio líquido, las cuales son atrapadas por la faringe y transportadas al bulbo terminal o posterior, donde se reducen a partículas finas y es pasado al lumen del intestino (Altun and Hall, 2009). Todo esto se da por dos movimientos: el bombeo donde hay una contracción simultanea de los músculos del corpus, istmo anterior y bulbo terminal que provoca la succión de las bacterias suspendidas en líquido, seguidos por una contracción y relajación que expelle el líquido sin expulsar las bacterias; el segundo movimiento es la contracción peristáltica del itsmo posterior que lleva el alimento del corpus al bulbo terminal (Avery y You, 2012). En la **Figura 7** se puede observar la estructura de la faringe, donde se aprecia que el corpus comprende al procorpus y metacorpus. También se puede observar el bulbo posterior, que es una estructura de mayor tamaño por lo que puede visualizarse mediante un microscopio estereoscópico.

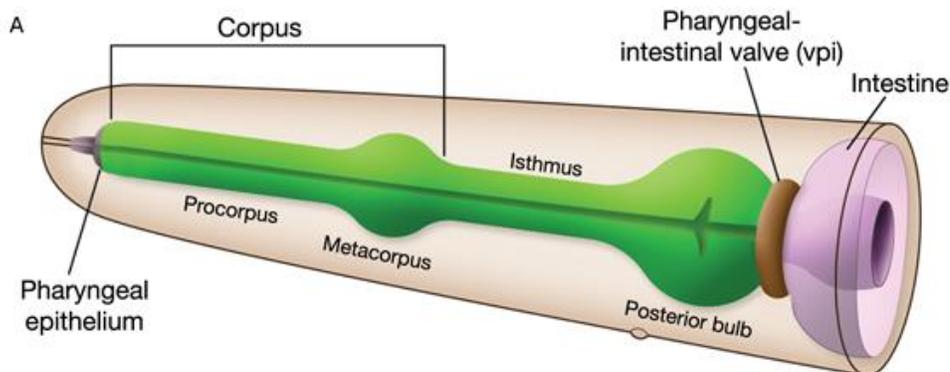


Figura 7. Representación gráfica de la faringe

El metacorus es también llamado bulbo anterior y el bulbo posterior es también denominado bulbo terminal. Imagen de Altun y Hall (2009).

Un ciclo completo de contracción y relajación del corpus y el bulbo posterior es denominado como “bombeo”, y según Raizen et al, (2012), una forma de medir la alimentación en *C.elegans* es cuantificando el número de bombeos en un minuto. Para esto, un día antes se picaron 70 gusanos L4 de cada cepa, los cuales se repartieron en dos placas de agar con 35 individuos cada una. Se incubaron hasta el día siguiente a 18°C y una vez que eran adultos, se llevó a cabo el experimento. De cada placa se analizaron 25 individuos al azar mientras se alimentaban, un total de 50 individuos para cada cepa. En ellos se contabilizó el número de bombeos durante 30 segundos con un contador manual, dicha movimiento es fácil de visualizar en el bulbo posterior de la faringe debido al tamaño que posee y al molino que se encuentra dentro y que es muy visible en el estereoscopio.

Mediciones: Para determinar si existe diferencia en el tamaño de la mutante *buc-1* respecto a la cepa silvestre N2, se realizaron preparaciones para el microscopio mediante una solución de agarosa al 2% con la cual se hizo una capa sobre el portaobjetos, se le añadió una gota de buffer con levamisol 0.8mM y dentro de ella se pusieron los nematodos, después se colocó el portaobjetos y se observó al microscopio. Se utilizó el objetivo de 4X y se tomaron fotografías mediante el programa Scope Image 9.0, posteriormente las fotos se analizaron con el programa ImageJ, donde se utilizaron líneas segmentadas para obtener la longitud

total de los gusanos (**Figura 4**). Esto se realizó entre adultos hermafroditas de un día, machos y gusanos en etapa L4 de ambas cepas.



Figura 8. Gusano L4 analizado en el programa ImageJ.

Se puede observar como líneas segmentadas se unen para medir la longitud total del gusano tomando en cuenta la posición del cuerpo.

V.8 Criopreservación de mutantes

Se llevó a cabo el protocolo de criopreservación y recuperación de stocks de *C. elegans* esto con la finalidad de preservar las cepas mutantes utilizadas en este trabajo, en especial la cepa *buc-1* que se generó y aisló a partir de la mutagénesis realizada y por tanto sólo se encuentra disponible en el laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva de esta universidad, de ahí la importancia de su conservación. También se congelaron las derivadas *buc-1 ox1* y *buc-1 ox2*.

Para cada cepa se prepararon 4 placas con tres gusanos adultos, estas se incubaron por tres o más días según la condición de las placas, ya que lo ideal es congelar cuando el alimento esté a punto de terminarse y dentro de la población haya en su mayoría individuos en etapa larvaria L1 y L2, debido a que estos son lo

que toleran mejor la congelación. Con la finalidad de coleccionar los gusanos, una vez que las placas estuvieron listas, se lavaron con 1.5 ml de solución para congelar (5.8gr NaCl, 50ml de 1M KH₂PO₄ pH 6.0, 240ml glicerol, 710ml, 300µl 1M MgSO₄, 710 ml Agua destilada estéril, para un litro), se dejaron reposar durante un minuto y enseguida la solución se coleccionó y depositó en un criotubo de 1.8ml. Los criotubos se colocaron entre gradillas de unicel para evitar un cambio repentino de temperatura y evitar así el rompimiento de cutícula de los gusanos y se almacenaron a -80°C. Para comprobar que las cepas criopreservadas fueron viables, se descongeló una muestra por cada cepa y se sembró en placas de agar. En caso de que el proceso resultara negativo, se volvieron a congelar 4 muestras por cepa (Stiernagle, 2006).

VI. RESULTADOS

Se analizaron 1490 genomas haploides de individuos F1, progenie de los parentales P0 sometidos a mutagénesis. Tras obtener por autofecundación las generaciones F2 y F3 tal como se especifica en la **Figura 6** se prosiguió a la búsqueda de mutantes. Como se esperaba, se tuvieron que analizar una gran cantidad de genomas haploides para poder encontrar una mutante de interés. En su mayoría, los individuos analizados se eliminaron por ser falsos positivos, ya que el fenotipo no perduraba en las siguientes generaciones. De todas las placas analizadas se aislaron cinco mutantes: la primera de ellas fue *dumpy*, mutante ya descrita que se caracteriza por que los individuos son de menor longitud y más anchos que los silvestres. Es una mutación recesiva y tienes distintos grados de severidad (**Figura 9**) (Brenner, 1974).



Figura 9. Mutante *dumpy*



Figura 10. Mutante *roller*

La segunda mutante aislada y también ya descrita fue *lon* (Long: largo), en la que los individuos se distinguen por ser un poco más delgados y cerca del 50% más largos que animales tipo silvestre (Brenner, 1974). *roller* (*rol*), tercera mutante aislada posee un fenotipo muy llamativo pues el animal describe una forma de herradura y gira sobre su propio eje longitudinal mientras se desplaza (**Figura 10**) (Fay, 2006). La cuarta mutante era desconocida, esta se denominó como *like-convulsion* (**Figura 11**) ya que tenía un estado permanente de espasmos a lo largo de todo su cuerpo, lo que limitaba su desplazamiento. No fue posible aislarla ya

que perdió fertilidad y no se lograron obtener individuos aptos para congelación o extracción de ADN que permitiera conocer qué tipo de daño presentaba. Muy probablemente se trataba de una mutante no coordinada (*unc*), ya que algunas de estas presentan un fenotipo muy parecido, “Kinker”, el cual exhibe espasmos musculares poco característicos que causan la pérdida del movimiento sinusoidal liso o la postura del cuerpo (Herndon y Hall, 2009). Todas estas mutantes fueron excluidas del estudio; las primeras dos porque no estaban relacionadas a la locomoción, la tercera debido a que ya está descrita y la denominada *like-convulsions* por no ser fértil.



Figura 11. Mutante denominada *Like-convulsions*

Posteriormente se encontró un individuo mutante que exhibía un evidente defecto en la locomoción reversa, lo que más llamó la atención en él, es que a diferencia de los individuos silvestres realizaba el movimiento de reversa con un ángulo más agudo y por lo general con mayor número de ondulaciones hacia atrás. Además, mostraba una variante en la formación del omega, pues el animal describía varias veces una figura parecida al símbolo de infinito, para posteriormente seguir con su desplazamiento (**Figura 12**). Este individuo mutante fue el único que se encontró con el fenotipo de interés, situación por la que se aisló, se mantuvo en el laboratorio y se reprodujo por autofecundación al menos por 10 generaciones. Esto nos permitió comprobar la fertilidad de la mutante y que el fenotipo se

mantenía igual a través del tiempo. Esto fue importante ya que como se mencionó anteriormente otras mutantes observadas perdían el fenotipo tras la autofecundación, como es el caso de *roller* y algunos individuos aislados que exhibían un incremento en la cantidad de reversas. Debido a las características que poseía se le denominó con *buc-1* (*backing uncoordinated*).



Figura 12. Mutante *buc-1*

Incluso en reposo, la postura del cuerpo observada en adultos y larvas de estadios tempranos es distinta a la de la cepa silvestre N2.

VI.1 Descripción de *buc-1*

La mutante presenta el mismo número de etapas larvarias y se desarrolla en el mismo tiempo que la cepa silvestre. Esto se comprobó, ya que al sincronizar animales para experimentación, ambas cepas, *buc-1* y N2, alcanzaban la etapa adulta al mismo tiempo. Asimismo se observó que la mutante pone una cantidad menor de huevos, en consecuencia, tarda más días en igualar en cantidad a una población silvestre. Algo interesante es que la mutante muestra una incidencia de

machos que va desde el 0.8-1% de la población, muy diferente de la cepa silvestre que apenas muestra 0.1% de machos.

El defecto locomotor de la mutante *buc-1* no solo es evidente durante el movimiento reversa, si no que puede distinguirse aunque el nematodo no se esté desplazando. La diferencia radica en que el gusano adopta una posición corporal con la formación de ondas y a veces enroscamientos, tal como se muestra en la **Figura 13**. En la misma figura también se observa una fotografía de individuos N2, en la que se puede ver como estos no exhiben curvaturas tan pronunciadas. Por otra parte, se ha observado que individuos *buc-1* no muestran defecto en el desplazamiento hacia adelante y responden con aparente normalidad al estimular con un toque. También que se desplazan con menor velocidad que la cepa silvestre y que organismos en todas las etapas larvarias exhiben el fenotipo.



Figura 13. Nematodos N2 Y *buc-1* en medio sólido.

De lado izquierdo se observan individuos N2 y del lado derecho, mutantes *buc-1*. Son muy evidentes las diferencias que hay entre las cepas en cuanto a la posición del cuerpo mientras se desplazan en medio sólido. También se puede ver que larvas pequeñas de *buc-1* exhiben el defecto locomotor.

La conducta de locomoción reversa en *buc-1* por estímulo o espontánea se lleva a cabo de la siguiente forma:

El gusano se desplaza hacia atrás dos veces formando un ángulo muy agudo con su cuerpo hasta el grado de que la parte posterior tiene contacto con la parte

anterior. Enseguida desde la parte posterior del cuerpo del gusanos se forma un enroscamiento que sigue en una vuelta que conlleva a la formación de una figura parecida al simbolo de infinito, y que se repite en promedio 2.96 veces, todo esto, mientras se desplaza hacia atrás. Enseguida se detiene por un momento muy breve y prosigue con su desplazamiento hacia adelante ya que ha cambiado de dirección (**Figura 14**).



Figura 14. Diagrama de locomoción reversa en mutante *buc-1*.

Cuando inicia la locomoción reversa, el gusano se desplaza hacia atrás con una menor amplitud de onda, provocando que la parte posterior del gusano tenga contacto con la parte anterior. Enseguida, en lugar de formar la figura de un omega, describe un símbolo de infinito repetidas veces y después de que cambia de dirección, sigue con su desplazamiento hacia adelante.

Se han observado dos variantes en el movimiento reversa de la mutante *buc-1*. La primera de ellas no lleva a cabo los primeros movimientos de reversa, simplemente al intentar llevar a cabo el movimiento de retroceso, de manera inmediata se forma una enroscadura o enrollamiento de la parte posterior del cuerpo, permanece un momento en dicha posición y después se desplaza hacia adelante, deshaciendo de esta forma la enroscadura formado (**Figura 15 A**). En la segunda variante, sucede de la misma forma, sólo que antes de proseguir con su desplazamiento hacia adelante, desenrolla la parte posterior de su cuerpo mediante el movimiento de la misma hacia afuera y después continúa con su locomoción hacia adelante. (**Figura 15 B**).

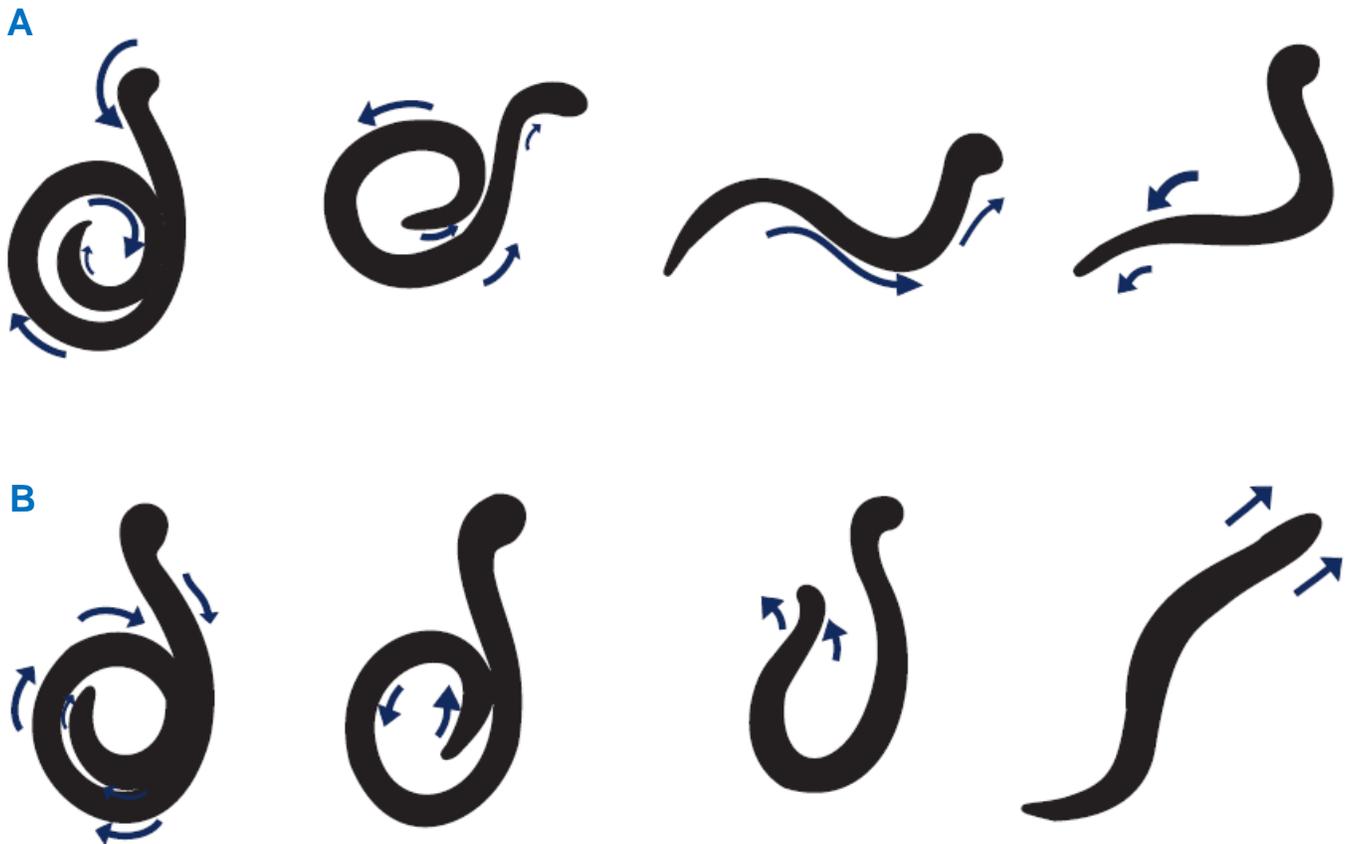


Figura 15. Variantes fenotípicas de *buc-1*

La diferencia entre las variantes radica en cómo el gusano deshace el enroscamiento formado con la parte posterior de su cuerpo, para después cambiar de dirección. A) se deshace al desplazarse hacia adelante. B) Desenrolla su cola mediante el movimiento de la misma hacia afuera y después continúa con su locomoción hacia adelante.

VI.2 Caracterización genotípica

Una vez aislada la mutante *buc-1*, se prosiguió a realizar una búsqueda bibliográfica de cepas mutantes en *C. elegans* que mostraran fenotipos similares. Se analizaron los videos de Yemini *et al.*, (2013) así como la base de datos del wormbase (www.wormbase.com), donde se encontró que *unc-8*, *unc-24* y *unc-29* poseían algunas características fenotípicas similares a *buc-1*, mismas que nos permitieron elegirlos como genes candidatos para alojar la mutación inducida en la mutagénesis.

La mutante *unc-8* provoca severa incoordinación debido a un alelo semidominante (**Figura 16**). El gen se expresa en varias neuronas sensoriales, interneuronas y motoneuronas, codifica una subunidad de un canal DEG/ENaC sensible a amilorida y su fenotipo se caracteriza porque el cuerpo del nematodo asume forma helicoidal cuando se intenta mover (Nektarios *et al.*, 1997).



Figura 16. Mutante *unc-8*

.Imagen tomada del video de SugimotoLab disponible en:
<http://www.youtube.com/watch?v=l47H2VYPC6o>

El gen *unc-24* es esencial para una locomoción normal ya que codifica una proteína que contiene un dominio parecido a la estomatina, este se expresa en neuronas receptoras del toque y en neuronas del cordón ventral. Mutantes para este gen presentan revesas incrementada, locomoción variante y formación de omegas variantes durante la locomoción reversa (Barnes *et al*, 1996).

El gen *unc-29* se requiere para locomoción y puesta de huevos normal (**Figura 17**). Codifica una subunidad de un receptor de acetilcolina que regula la velocidad de reacción del neurotransmisor en las uniones neuromusculares y en el sistema nervioso. También confiere resistencia a levamisol y se expresa en la pared muscular (Brenner, 1974; Mongan *et al*, 2002).

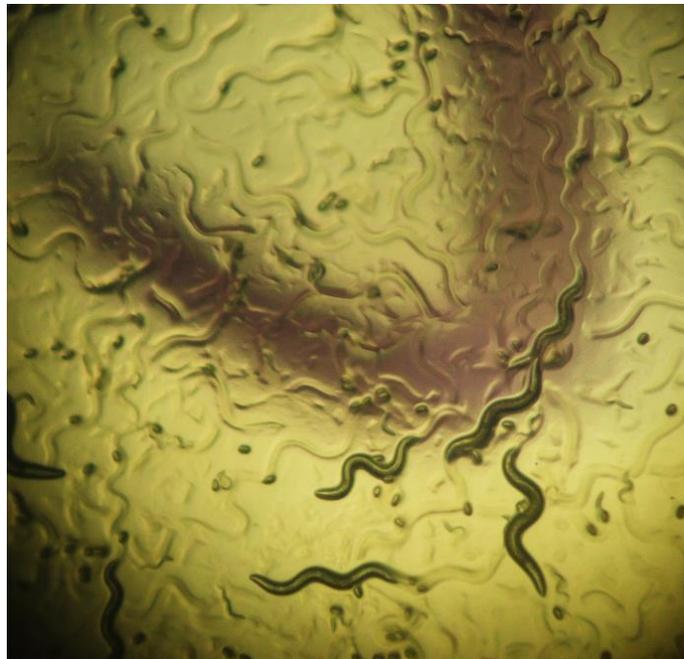


Figura 17. Mutantes *unc-29*

Su locomoción es variante respecto a individuos de la cepa silvestre N2 y mutantes *buc-1*

Debido a que la única cepa disponible en laboratorio era CB193 (*unc-29* alelo e193), se llevaron a cabo cruces para prueba de complementación genética con la mutante *buc-1*. La progenie para la prueba tuvo fenotipo silvestre, lo que indica que hubo una complementación de alelo mutante con alelo silvestre entre las

cepas, por lo tanto, la mutación que causa el fenotipo de *buc-1*, se encuentra en un gen diferente a *unc-29*. Esta prueba permitió descartar a *unc-29* como gen candidato.

VI.2.1 Cartografiado genético

N2 y CB4856 poseen polimorfismos genéticos que permite diferenciarlas, de tal manera que cuando se hacen cruces, hay recombinación y esta es detectable mediante el patrón de corte generado en cada cepa por las enzimas utilizadas en la digestión, después de la amplificación con los SNPs. Así mismo, es posible identificar aquellas zonas donde no hay recombinación y prevalece el genotipo de la cepa donde se realizó la mutagenesis (N2). Por ello, en los geles de agarosa se observan tres distintos patrones de restricción que corresponden a genotipo N2 (N), CB4856(C) y heterocigotos (H) que muestran ambos patrones, N2 y CB4856.

Una vez que se amplificaron las 57 recombinantes para cada SNP seleccionado por cromosoma, se obtuvo el patrón de restricción que se visualiza en el **Cuadro 4**.

En el **Cuadro 3**, se observa el porcentaje de genotipos N2, CB4856 y heterocigotos para cada cromosoma, tomando en cuenta todas las recombinantes utilizadas. En el cromosoma I, se observa que la mayoría de las recombinantes resultó ser heterocigota y sólo el 31.57% mostró genotipo N2.

	Cromosoma I	Cromosoma II	Cromosoma III	Cromosoma IV	Cromosoma V	Cromosoma X
Genotipo/SNP	K04F10(0.92)	T13C2(0.08)	C08C3(-0.55)	E03H12(1.38)	VC5(-1.46)	F45E1 (-0.83)
N2	31.57%	17.54%	21.05%	77.19%	31.57%	12.28%
CB4856	8.77%	29.82%	33.33%	0.00%	17.54%	19.29%
Heterocigotos	52.63%	50.87%	43.85%	22.80%	45.61%	42.10%
NA	7.01%	1.75%	1.75%	0.00%	5.26%	26.31%

Cuadro 3. Porcentaje de genotipos por cromosoma.

Los porcentajes se obtuvieron tomando en cuenta todas las recombinantes. (NA) son aquellas muestras que no amplificaron. Entre paréntesis se especifica la posición génica en cM (centiMorgans)

Recombinante	Cromosoma I K04F10(0.92)	Cromosoma II T13C2(0.08)	Cromosoma III C08C3(-0.55)	Cromosoma IV E03H12(1.38)	Cromosoma V VC5(-1.46)	Cromosoma X F45E1(-0.83)
1	H	N	H	N	N	C
2	H	C	H	N	H	C
3	H	N	N	N	N	H
4	N	C	H	H	H	H
5		H	H	N	C	C
6	H	H	H	N	N	
7		C	C	H	H	C
8		C	C	N	H	C
9		H	H	N	H	H
10	H	H	H	N	H	N
11	N	N	N	N	H	C
12	C	H	H	N	N	C
13	H	H	C	H	C	C
14	N	C	H	N	N	H
15	N	H	C	N	N	N
16	C	H	N	H	H	H
17	H	H	H	H	H	C
18	N	H	H	N	H	H
19	H	H	N	H	H	H
20	N	H	C	N	C	H
21	H	H	H	H	H	H
22	H	N	N	H	H	H
23	H	H	C	N	N	H
24	H	H	H	N	N	N
25	N	C	C	H	N	N
26	H	H	C	H	H	H
27	N	H	N	N	H	H
28	N	C	H	H	C	H
29	N	H		N	H	H
30	H	C	N	H	H	N
31	N	N	H	H	N	
32	N	H	C	N	C	
33	H	H	C	N	H	
34	H	H	C	N	C	
35	H	C	H	N	H	C
36	H	C	H	N	H	
37	N	N	N	N	H	
38	H	C	H	N	H	H
39	H	H	N	N	C	
40	N	N	H	N	N	
41	H	N	H	N	N	
42	H	H	C	N	N	H
43	H	C	H	N	C	
44	C	H	H	N	N	
45	H	N	N	N	H	H
46	H	C	H	N	C	H
47	N	C	C	N	H	
48	H	H	H	N	N	N
49	H	H	C	N	H	H
50	H	N	C	N	H	
51	C	H	C	N		
52	C	C	H	N	N	C
53	N	H	N	N		H
54	N	C	C	N	C	H
55	N	C	C	N	N	H
56	H		N	N	N	H
57	H	H	C	N		C

Cuadro 4. Genotipos identificados en cada recombinante.

El genotipo se determinó de acuerdo a patrón de restricción visualizados en los geles de agarosa. (N) genotipo N2; (C) genotipo CB4856; (H) genotipo heterocigoto. Los espacios en blanco corresponden a muestras que no amplificaron. En negritas se encuentra especificado el cromosoma y el SNP utilizado para el mismo.

Para el cromosoma II,III,V y X, se obtuvo un porcentaje de recombinantes con genotipo N2 de 17.54%, 21.05%, 31.57% y 12.28%, respectivamente. Por otro lado, en el cromosoma 4, el porcentaje de recombinantes con genotipo N2 fue mayor, alcanzado el 77.19%, y aunque también se encontró que 22.80% eran heterocigotos, no se encontró ninguna recombinante con genotipo CB4856.

Cuando se utilizan SNP para cartografiar genes, se evalúa el porcentaje de genotipos en las recombinantes para determinar si una mutación está ligada al SNP o no lo está. De tal manera que se puede considerar que una mutación no está ligada al SNP, si es que las recombinantes muestran un porcentaje igual o menor al 50% en el genotipo N2, que es donde se llevó a cabo la mutagenéesis. Por tal motivo, si se encuentra un enriquecimiento cercano al 100% en el genotipo N2 entre las recombinantes, indica que la mutación está en ese cromosoma y muy ligada al SNP (Davis *et al*, 2005). Por esta razón, y observando las proporciones encontradas para el cromosoma IV, se puede aserir que el defecto responsable del fenotipo de la mutante *buc-1* se encuentra en dicho cromosoma y muy cercano al SNP E03H12 (1.38cM).

En la **Figura 18, 19 y 20** se aprecian los geles de agarosa realizados para las 57 recombinantes con el SNP E03H12 del cromosoma IV. En cada gel, la primera columna está ocupada por la escalera de 1 Kb, mientras que en la segunda y tercera columna se agregaron los controles N2 y CB4856 donde se observan los fragmentos generados en cada cepa, tras la digestión. Como ejemplos para la determinación de genotipo podemos ver en la **Figura 18**. Se aprecia que el genotipo de la recombinante 3 es N2, ya que al compararlo con el control N2, corresponden totalmente. De igual manera, vemos que la recombinante 7 presenta tanto los fragmentos de N2 y CB4856, por tanto, es designada como genotipo heterocigoto. Analizando las tres figuras podemos distinguir que 44 de las 57 recombinantes presentan genotipo N2, y el resto son heterocigotas, evidenciando de esta forma, que la mutación generada en *buc-1*, se encuentra en el cromosoma IV, muy cerca del centromero.

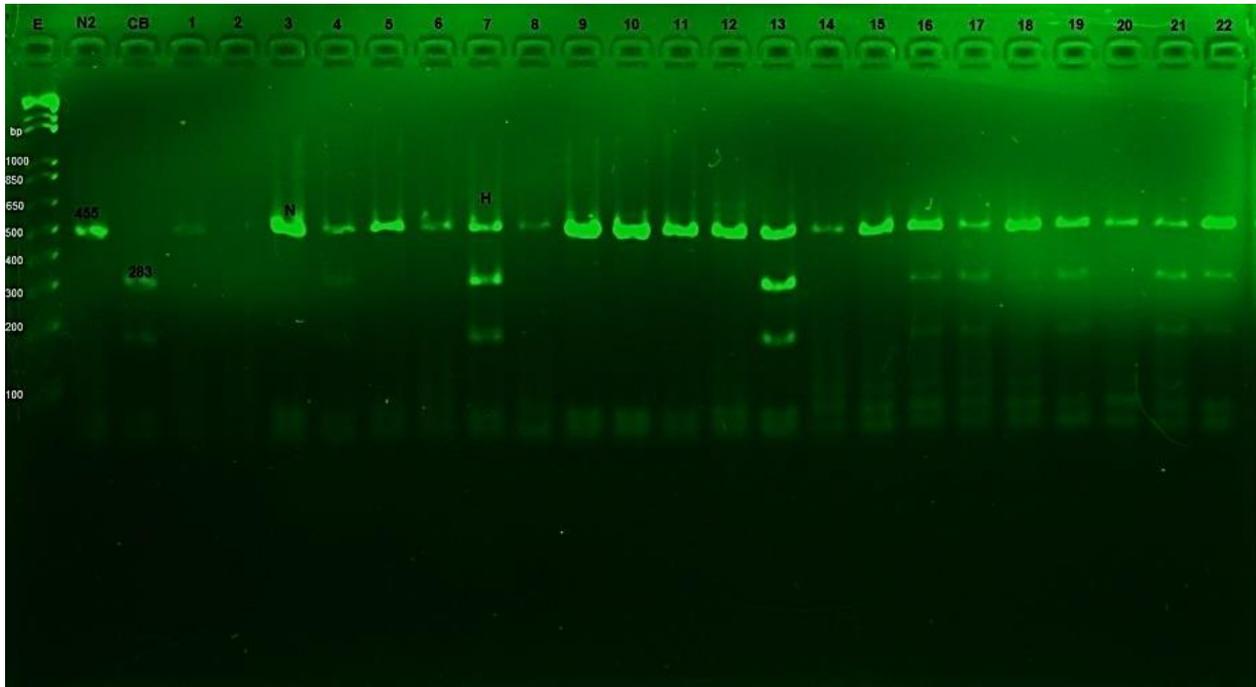


Figura 19. Cromosoma IV, recombinantes 1-22.

N2 y CB son muestras control de las cepas silvestres. En este gel de agarosa al 2%, 14 de las recombinantes presentan genotipo N2. Esto es más evidente debido a los fragmentos de mayor tamaño generados en cada cepa.

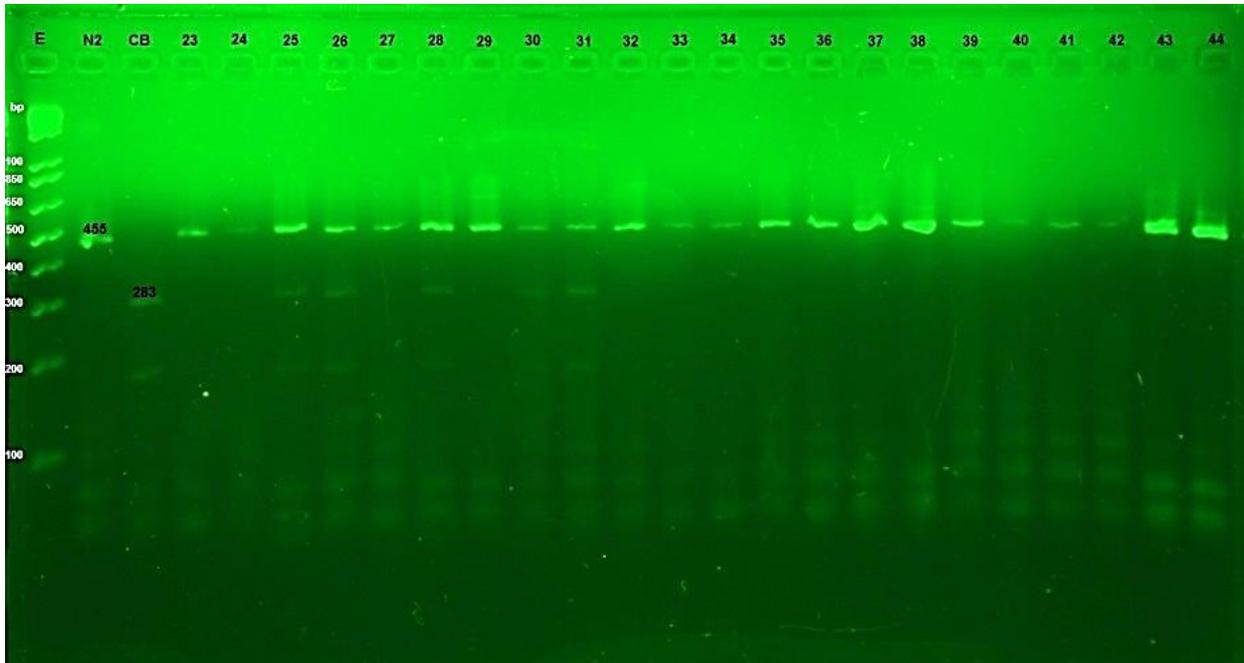


Figura 18. Cromosoma IV, recombinantes 23-44.

N2 y CB son muestras control de las cepas silvestres. En este gel de agarosa al 2.5%, 17 de las 22 recombinantes presentan genotipo N2. Esto es más evidente debido a los fragmentos de mayor tamaño generados en cada cepa.

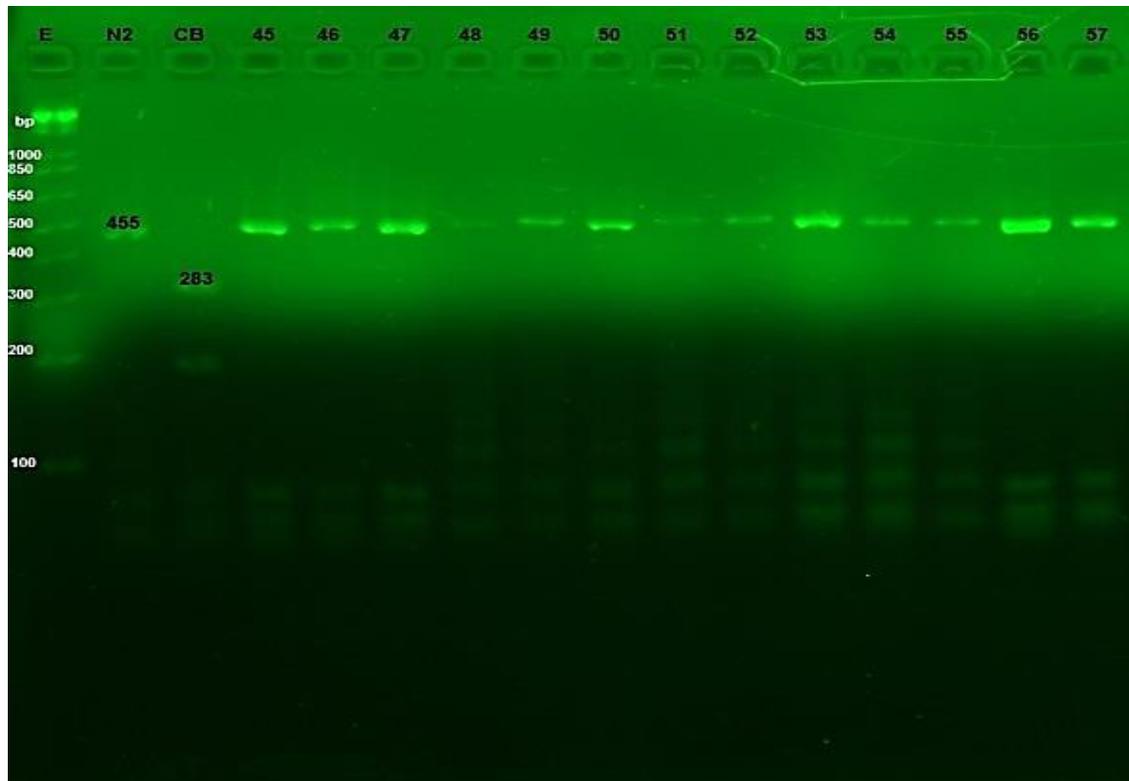


Figura 20. Cromosoma IV, recombinantes 45-57.

N2 y CB son muestras control de las cepas silvestres. En este gel de agarosa al 2.5%, todas las recombinantes presentan genotipo N2. El fragmento de 455pb en N2, es muy evidente.

VI.3 Caracterización fenotípica

Locomoción en medio líquido (nado):

Las diferencias fenotípicas en el nado entre la cepa mutante *buc-1* y la cepa silvestre N2 son muy evidentes. Mientras que la cepa silvestre nada con mucha mayor velocidad desempeñando un promedio de 212.8 coleteos por minuto, *buc-1* ox2 alcanza a realizar solamente 49.2 coleteos. En este experimento también se realizó una comparación con la cepa *unc-29* cuyos individuos realizaron 27.9 coleteos por minuto y fenotípicamente también era diferente. La prueba de ANOVA mostró diferencias significativas entre cepas ($p=3.06 \times 10^{-21}$) y con la prueba post hoc se determinó que existía diferencia significativa entre todas ellas con $p=9.42822 \times 10^{-14}$ entre N2 y *buc-1*; $p=1.48131 \times 10^{-06}$ entre *buc-1* y *unc-29*; y $p=9.94613 \times 10^{-15}$ entre la cepa N2 y *unc-29*. Mediante estas pruebas se puede asentar que la mutante *buc-1* se mueve en medio líquido M9 con menor eficacia que la cepa silvestre N2, y que es diferente a la no coordinada *unc-29*, lo que permitió descartarlo como gen candidato (**Figura 21**).

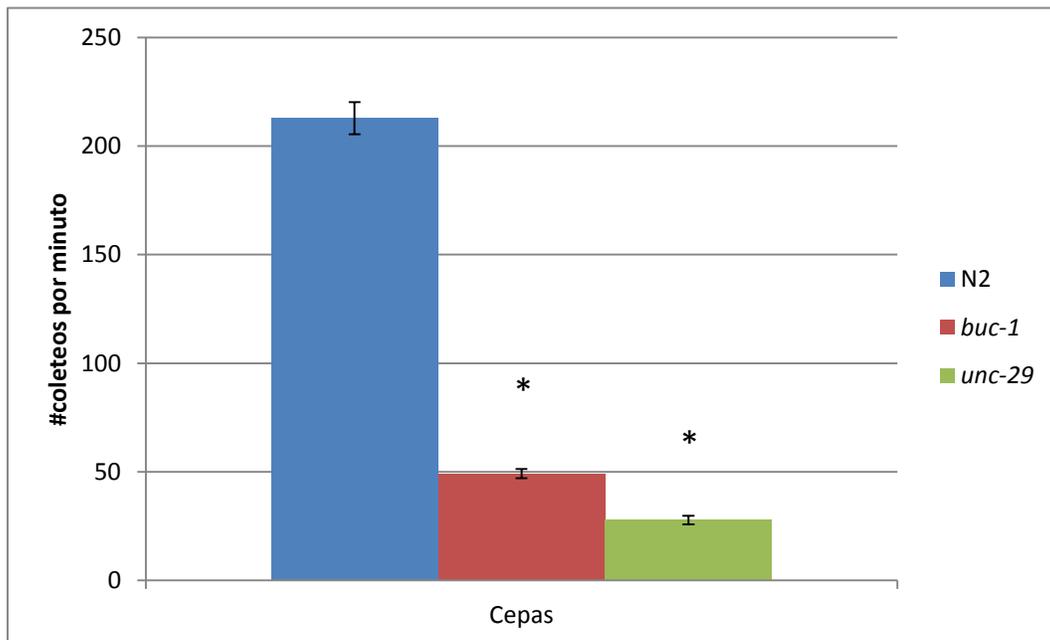


Figura 21 Locomoción o nado en medio líquido.

Se contabilizó el número de coleteos o *thrashing* en cada cepa, durante un minuto. En todos los casos se observaron diferencias significativas.

La forma de locomoción no es igual en ambas cepas, ya que el fenotipo de *buc-1 ox2* es muy característico, inclusive en medio líquido. Mientras que N2 realiza los movimientos ondulatorios dorso-ventrales a gran velocidad, la mutante desempeña dichas ondas con un ángulo más pronunciado y con una velocidad menor. Además, en las mutantes puede distinguirse la formación de un enroscamiento que se extienden desde la parte anterior del cuerpo a la posterior y viceversa, tal como se muestra en la **Figura 22**, movimiento (B) de anterior-posterior y (C) de posterior-anterior).



Figura 22. Locomoción de la mutante *buc-1* en medio líquido M9.

Resolución 1280x720píxeles. (A) Coleteo de individuos silvestres N2 (WT) (B) El gusano se enrosca desde la parte anterior del cuerpo a la posterior. (C) El gusano se enrosca de la parte posterior hacia la anterior.

En la secuencia **A** se observa el coleteo de individuos silvestres de la cepa N2. Toda la secuencia de imágenes 1-4 se completa en 0.23 segundos y corresponde a dos coleteos; el primer coleteo se muestra en la imagen 1 y 2, y se completa en 0.06 segundos, mientras que el segundo coleteo (recuadro 3 y 4) se realiza en 0.1 segundos. En la secuencia **B (mutante *buc-1*)** todo el movimiento se completa en 2.14 segundos, y permanece más tiempo entre la postura de enroscado del recuadro 2 y 3, con 1.53 segundos en dicha posición. Por otro lado, en la secuencia de imágenes **C (*buc-1*)**, el movimiento se completa en 1.5 segundos y de igual manera, el gusano permanece más tiempo enroscado como se muestra en los recuadros 1, 2 y 3 con 1.1 segundos en esa posición.

Fertilidad y viabilidad

En la prueba de fertilidad se observó que la mutante *buc-1* pone menor número de huevos que los individuos silvestres de la cepa N2. En la **Figura 23** se puede apreciar la cantidad de huevos que pone un gusano por hora, cuyo promedio es de 4.97 para N2 y 1.98 huevos para *buc-1*. La prueba de T, arrojó una $p=0.002373069$, lo que indica que hay diferencias significativas, y efectivamente la mutante es menos fértil, con base en el número de huevos que pone respecto a la cepa silvestre N2.

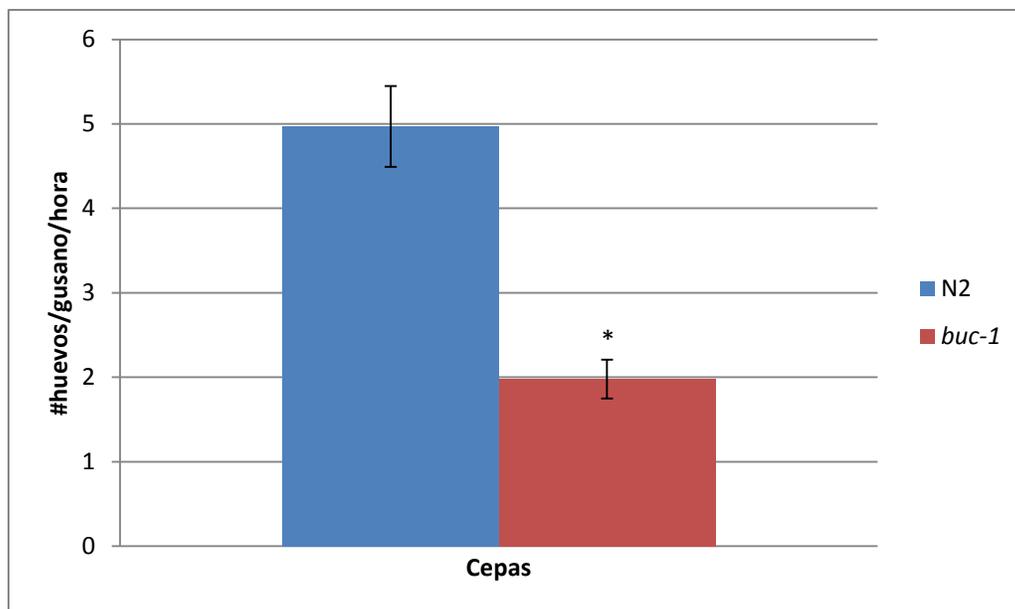


Figura 23. Fertilidad

Se contabilizó el número de huevos puestos por individuo en una hora. Se observaron diferencias significativas de la cepa mutante *buc-1*, respecto a la silvestre N2.

Para medir la viabilidad, es decir, cuántos de los huevos puestos habían eclosionado, se contabilizó el número de larvas. Como se esperaba, tomando en cuenta el número de huevos registrados, se observó que en las placas de la mutante *buc-1* había menor cantidad de larvas respecto a la cepa silvestre ($p=2.60491E-05$) mostrando diferencias significativas (**Figura 24**). Sin embargo, considerando sólo el número de huevos puestos por cepa y comparándolo con el número de eclosionados en la misma, encontramos que *N2* posee el 103.3% de eclosión y *buc-1* el 74.3 % pero sin diferencias significativas ($p=0.068227489$)(**Figura 25**).

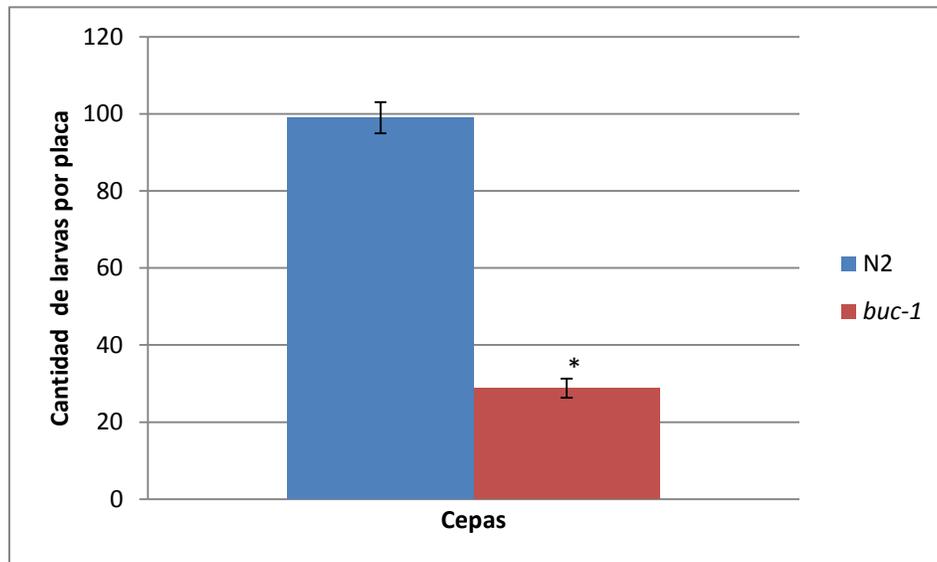


Figura 24. Cantidad de larvas por placa.

El número de larvas mutantes es significativamente menor a comparación de las larvas silvestres

El porcentaje en *N2* excede el 100% debido a que el número de huevos contados fue menor a la cantidad de larvas encontradas, esto pasó por que en ocasiones los gusanos ponen sus huevos en la orilla de la placa y no son visibles. Finalmente con este experimento podemos aseverar que, pese a que *buc-1* es menos fértil que *N2*, no hay diferencia en la viabilidad de los huevos puestos y que la mayoría de estos eclosionarán y crecerán hasta individuos adultos.

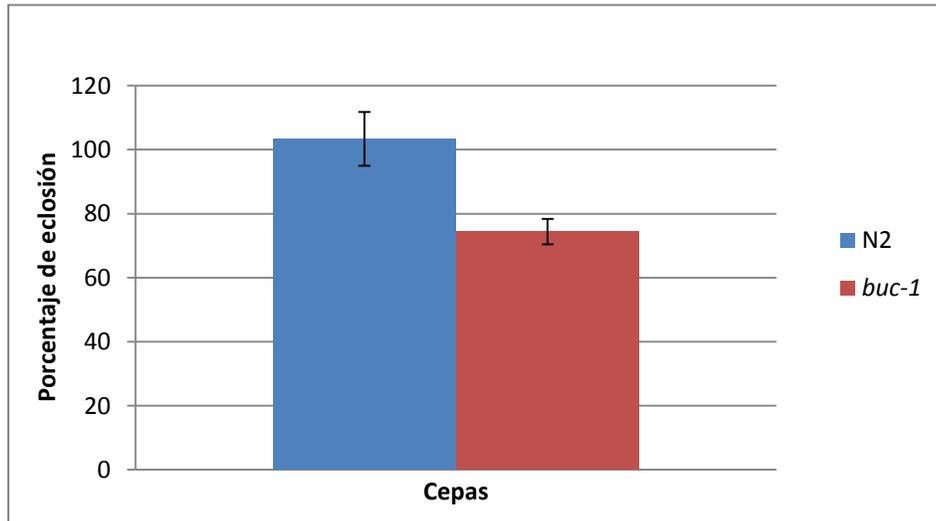


Figura 25. Porcentaje de eclosión de huevos puestos.

Aunque se observa una diferencia en los porcentajes entre las cepas, estos no son estadísticamente significativos

Alimentación

Cuando se midió la alimentación mediante el conteo de bombeos (ciclo de contracción-relajación de la faringe), se observó que la mutante presenta un promedio de 165.76 bombeos en 30 segundos a diferencia de la cepa silvestre N2 con 157.18 bombeos. El análisis estadístico mostró que las diferencias son significativas ($p= 0.00001257$). Esto nos indica, que por alguna razón, la mutante está consumiendo mayor cantidad de alimento, probablemente como consecuencia del defecto causado por la mutación.

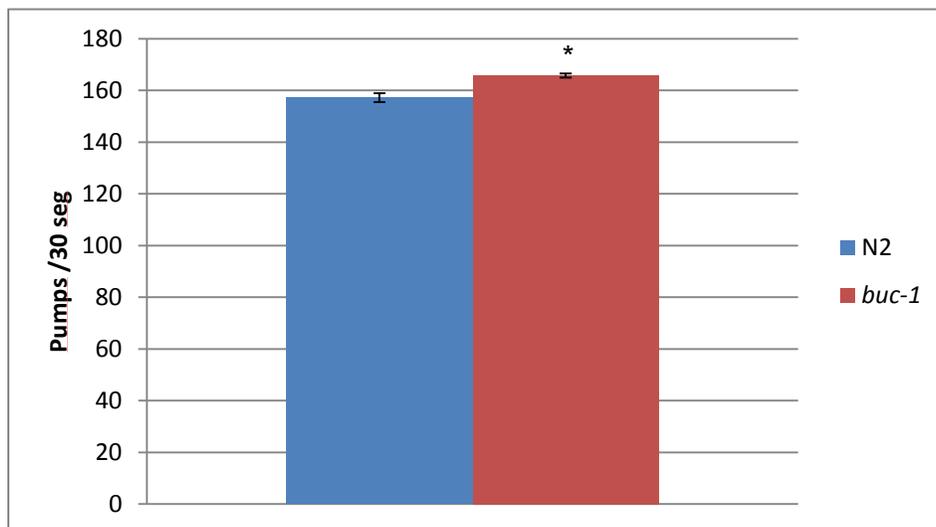


Figura 26. Alimentación.

Se contabilizó el número de ciclos de contracción-relajación de la faringe (bombeos). Hay diferencias estadísticamente significativas entre las cepas.

Mediciones

Con las medidas obtenidas a través del programa ImageJ, se pudo determinar la longitud de individuos de ambas cepas. En promedio los gusanos en etapa larvaria 4 de la cepa N2 midieron 0.74 milímetros y los individuos *buc-1* de la misma etapa 0.63mm (**Figura 27**). El análisis estadístico mostró que hay diferencias significativas entre ellos ($p=0.0000072191$), por lo tanto, podemos afirmar que los individuos de la cepa mutante *buc-1* en etapa L4, son mas pequeños que los de la cepa silvestre. En la **Figura 28**, se observan fotografías a la misma escala y en individuos de la misma edad, en ellas se aprecia la diferencia de tamaño.

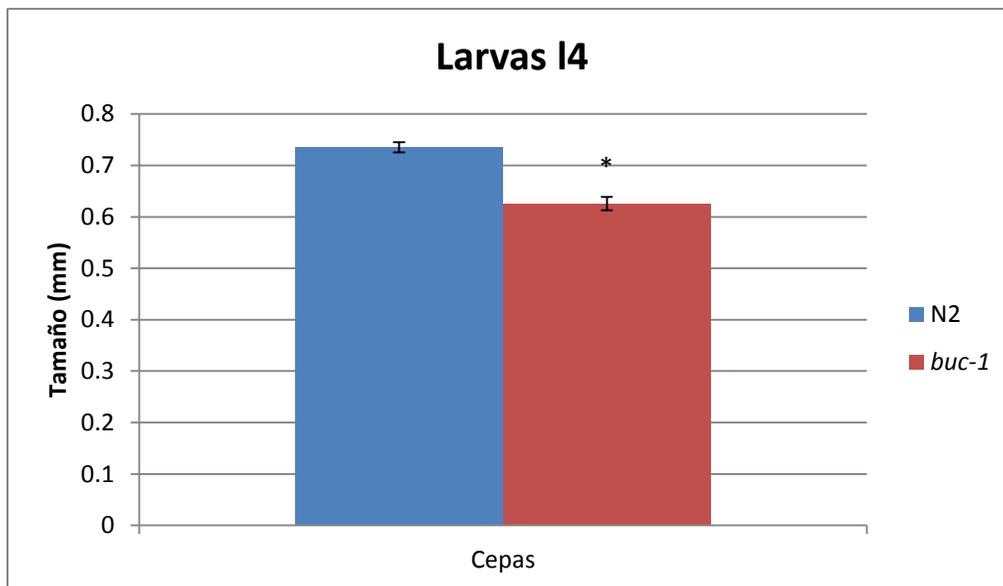


Figura 27. Longitud de larvas L4.

Los gusanos *buc-1* son de menor longitud que los de N2.

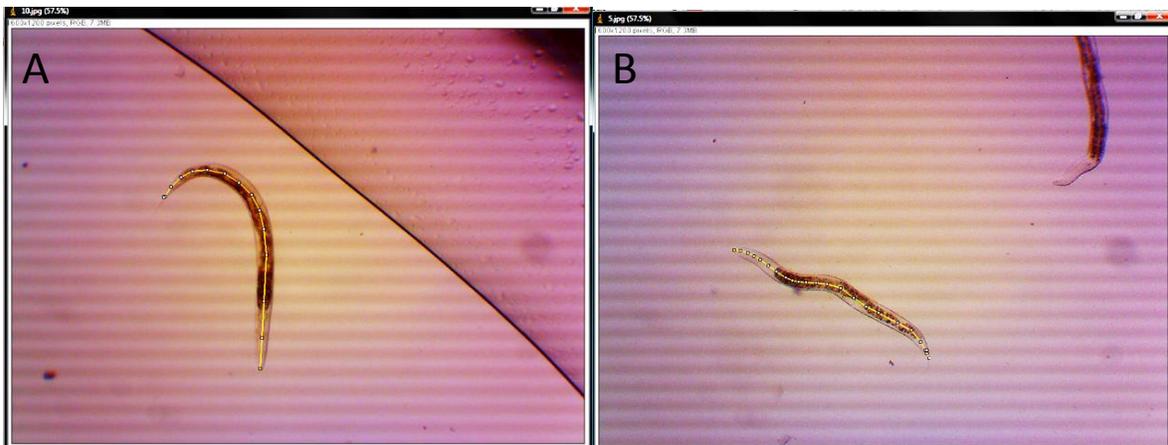


Figura 28. Individuos L4

Fotografías analizadas con el programa ImageJ. (A) individuo silvestre N2. (B) Individuo mutante *buc-1*

En los hermafroditas adultos de un día también se observaron diferencias significativas ($p=1.493e-14$). Los individuos silvestres de la cepa N2, alcanzaron una longitud promedio de 0.9mm, mientras que los mutantes *buc-1* resultaron ser mas pequeños con 0.77mm de longitud (**Figura 29**). En la Figura, se observan fotografías de individuos hermafroditas analizados, y en ellas se distingue la diferencia de tamaño que hay entre las cepas.

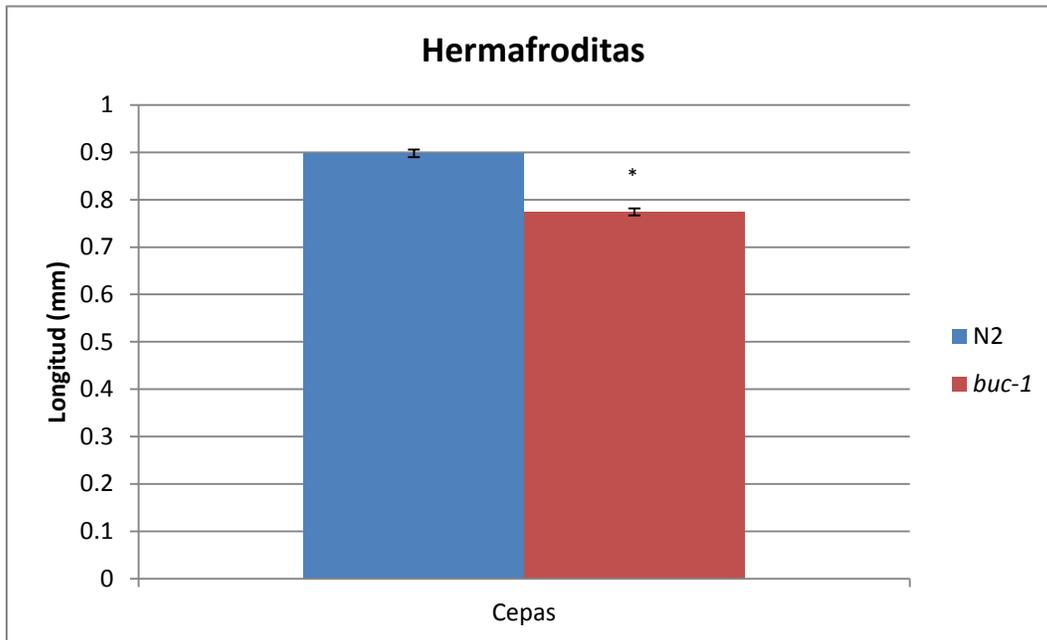


Figura 29. Longitud de hermafroditas adultos de un día.

Los individuos de la cepa mutante *buc-1* son significativamente más pequeños que los individuos N2.

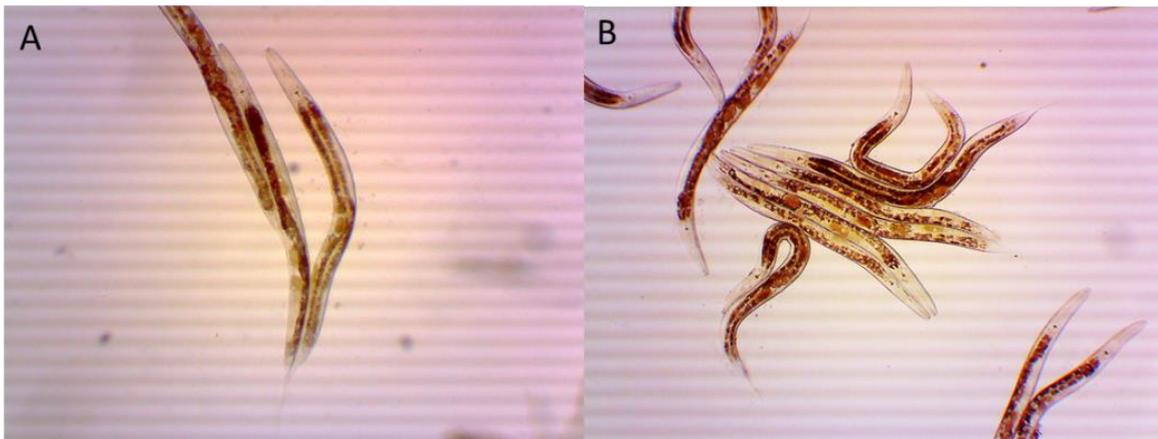


Figura 30. Individuos hermafroditas de un día.

(A) hermafroditas silvestres N2. (B) hermafroditas mutantes *buc-1*.

En la longitud de machos silvestres y mutantes también se observaron diferencias significativas ($p=0.001033985$). La longitud promedio alcanzada por machos N2 fue de 0.61mm, mientras que los machos *buc-1* alcanzaron los 0.54mm. Estos datos nos permiten decir que los machos mutantes son significativamente de menor longitud que los silvestres (**Figura 31**). En la **Figura 32** se observan dos individuos macho analizados, además puede distinguirse la diferencia de tamaño.

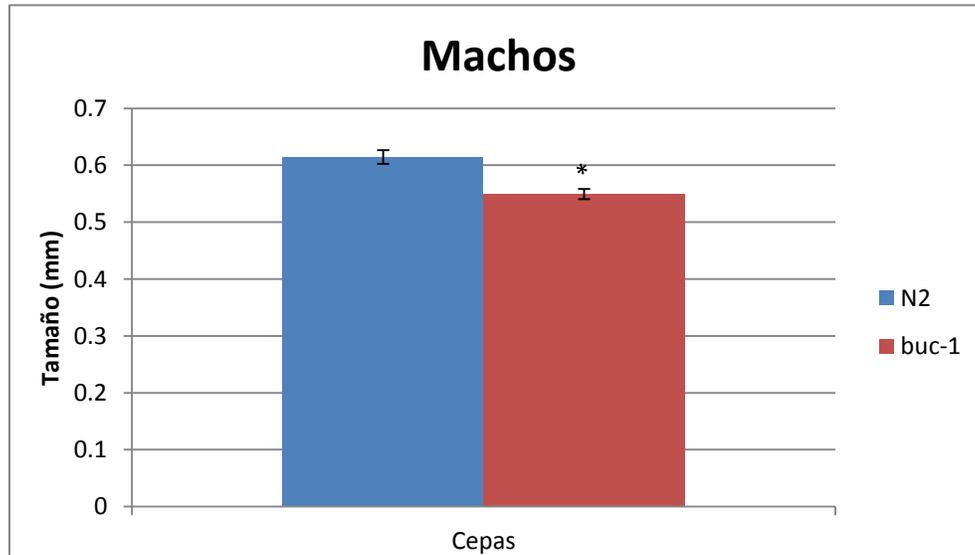


Figura 32. Longitud promedio de individuos macho.

Los individuos de cepa mutante *buc-1* son significativamente más pequeños que los individuos silvestres

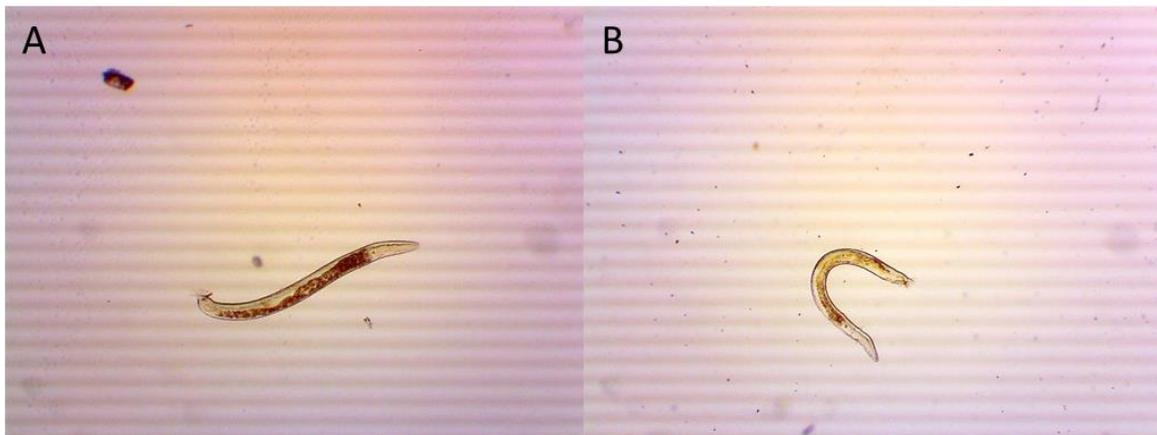


Figura 31. Individuos macho.

(A) Macho silvestre N2. (B) Macho mutante *buc-1*

VII. DISCUSIONES

VII.1 Mutagénesis y aislamiento de mutantes

Varios procesos de mutagénesis se tuvieron que llevar a cabo, ya que algunos de los pasos del protocolo, como el tener que agitar durante 4 horas, resultaba muy violento para los nematodos, razón por la cual, no salían con vida del proceso. Una vez que se modificó la metodología, se obtuvieron individuos viables para el aislamiento de mutantes. Como se esperaba, se tuvieron que analizar un gran número de genomas haploides para lograr aislar una mutante. Sin embargo, a diferencia de lo que Shaham (2007) y Kutscher y Shaham (2014) presentan, acerca de que se necesitaban analizar 2500 genomas haploides para aislarla, en este trabajo se encontró una mutación analizando un total de 1490 genomas haploides de la generación F1. Esto podría sugerir, que las modificaciones realizadas en el protocolo de mutagénesis causaron que aumentara la eficiencia de los efectos del químico utilizado o simplemente, que un mayor número de gusanos sobrevivieron al proceso, por tanto, incrementaba la posibilidad de encontrar mutantes genéticas.

Como se mencionó en resultados, otras cuatro mutantes fueron aisladas y posteriormente descartadas. Una de ellas, la mutante denominada “*like-convulsion*” apareció dos veces en distinta temporalidad y en placas independientes durante el tiempo que duro la observación para el aislamiento de mutantes. Las placas donde se encontraron pertenecían a la generación F3 o posterior, por lo que no se trataba de una mutación heterocigota dominante o semidominante. Es posible que la mutante fuera fértil mientras se encontraba en estado heterocigótico, pero una vez que se autofecundó y la conformación genética de la progenie resultó homocigota, le causó infertilidad y letalidad. Muy probablemente se trataba de una mutante no coordinada con fenotipo paralizante o kinker, pues exhibía espasmos musculares y falta de movimiento (www.wormbase.org). Las otras mutantes *roller*, *dumpy* y *lon*, recuperaron el fenotipo silvestre en la siguiente generación, esto podría deberse a mutaciones en

estructuras somáticas inducidas por el EMS que se repararon después de la autofertilización (Brenner, 1974). Por otro lado, muchos individuos que exhibían defectos en la locomoción reversa se aislaron, particularmente aquellos que mostraban incremento en la cantidad de reversas, sin embargo, su progenie exhibía locomoción reversa normal, por tanto, se descartaban como falsos positivos. Es probable que el incremento en las reversas se debiera a la plasticidad en el procesamiento de la información sensorial según Zhao et al, (2003), y no tanto un defecto locomotor causado por una mutación, por lo mismo, es que después no se repetía dicha conducta en el mismo individuo, ni en su progenie.

La selección de mutantes genéticas que tuvieran parecido fenotípico a *buc-1* presentó dificultad, esto debido a que las bases de datos de mutantes genéticas cuentan con descripciones fenotípicas muy generales, lo que dificulta la comparación y selección. Es por eso que la búsqueda se enfocó en las mutantes no coordinadas (*unc*), ya que son estas las que poseen defectos locomotores. Revisando en la base de datos del wormbase se encontró que la clase *unc*, tiene 111 genes, los cuales están distribuidos en los seis cromosomas (http://www.wormbase.org/resources/gene_class/unc#01--10). Por lo que en un inicio, a través de la inspección y únicamente por las características fenotípicas que exhiben se escogieron los genes *unc-8* y *unc-29*, como posibles candidatos para estar afectados y causar a *buc-1*.

VII.2 Mutante *buc-1*

Mediante el cartografiado genético y de acuerdo al porcentaje de genotipos N2 (77.19%), encontramos que la mutación en *buc-1* se localiza en el cromosoma IV cerca del centrómero, muy cercano al SNP E03H12 (1.38cM). El porcentaje de heterocigotos para este cromosoma fue de 22.80% mientras que no hubo ni un solo individuo con genotipo CB4856, lo que nos indica, que al menos en esta

zona, la mayoría de las recombinantes mutantes *buc-1* con fondo genético N2, no recombinó con CB4856. Davis y Hammarlund (2006) dicen que cuando se cartografía una mutación en un fondo genético Bristol N2, utilizando a la cepa CB4856 para generar recombinación, una proporción observada cercana al 100% en el genotipo Bristol N2, indica que la mutación está muy ligada al SNP evaluado. Por el contrario, si la proporción es menor al 50% la mutación no se encuentra en ese cromosoma. Ninguno otro SNP mostró la proporción esperada de genotipos N2. Una vez identificado el cromosoma afectado, buscamos mutantes en el cromosoma IV que reportaran el fenotipo reversa no coordinado (*backing uncoordinated*), sin embargo, de 18 genes que reportan el fenotipo, ninguno se encuentra en ese cromosoma. Curiosamente, los genes candidatos seleccionados en un principio, están en el cromosoma IV; *unc-8* se encuentra a 3.29 ± 0.001 cM del centrómero y *unc-24* a 3.51 ± 0.004 cM. Aún no se ha comprobado si alguno de estos genes resultó afectado durante la mutagénesis; sin embargo, dada la similitud fenotípica que muestra con *buc-1*, se puede especular acerca de las estructuras o procesos afectados en el sistema nervioso, tomando en cuenta, las funciones que dichos genes desempeñan en *C. elegans*.

El gen *unc-8* se expresa en las neuronas sensoriales FLP y ASH, en interneuronas y en motoneuronas. Mutaciones en este gen causan defectos en la amplitud y longitud de la onda sinusoidal que describe mientras se mueve a través de *E. coli*, en la placa de agar. En *C. elegans* se identificó como un alelo semidominante que causa severa incoordinación y codifica una subunidad de un canal iónico epitelial de sodio de la familia de las degenerinas (DEG/ENac), también puede formar un canal con la degenerina DEL-1 y expresarse en motoneuronas ventrales-cordales (Tavernarakis, 1997). Se cree que *unc-8* es un potencial candidato para sensar la propiocepción, ya que se expresa en varias neuronas incluyendo las motoneuronas VA y VB las cuales poseen regiones de procesos largos e indiferenciados que pueden actuar como receptores del estiramiento (Bounoutas y Chalfie, 2007). Aun no se sabe cuáles de todas las neuronas que expresan *unc-8* son las que median la coordinación de la locomoción, ya que son muchas las involucradas; sin embargo, entre una de las posibilidades son las motoneuronas DD

y VD que utilizan GABA como su neurotransmisor, ya que se ha observado que mutantes *unc-25* que fallan a sintetizar GABA exhiben una amplitud reducida en la onda, cuando se mueven (Tavernarakis, 1997). Por otro lado Altun y Hall (2011) reportan que las neuronas VCN regulan el movimiento ondulatorio característico del animal, estas hacen sinapsis con motoneuronas de los cuadrantes musculares ventrales y dorsales, restringiendo las flexiones dorsales ventrales del cuerpo. Cuando un musculo dorsal se activa, el musculo ventral es recíprocamente inhibido y viceversa. Dicha coordinación muscular resulta en que el gusano se desplaza hacia adelante por la propagación de contracciones y relajaciones a lo largo del cuerpo. Por tanto, cuando un grupo muscular, ya sea ventral o dorsal se activa por motoneuronas colinérgicas, el grupo opuesto es inhibido o relajado por motoneuronas GABAérgicas. Algo que podría estar pasando con *buc-1*, es que cuando sucede el movimiento reversa mediante la contracción-relajación de los músculos ventrales y dorsales para el desplazamiento, uno de los neurotransmisores podría estar jugando un papel importante. En el caso de que se tratara de GABA, podría ser que el neurotransmisor está tardando en inhibir al grupo muscular contrario, ya sea por liberación tardía, o por retraso en el procesamiento de la señal, provocando que la contracción se sesgue hacia un grupo muscular, favoreciendo la formación de la enroscadura de la parte posterior del cuerpo durante la reversa. También, y aunque aún no se muestra en resultados ya que los bioensayos de desplazamiento en medio sólido no se han concluido, *buc-1* exhibe una onda sinusoidal con longitud y amplitud de diferente al silvestre; en consecuencia, las distancias recorridas son muy variables entre las cepas, esto como reflejo de la velocidad con que se mueve, la amplitud y longitud de las ondas sinusoidales que describe y la duración de las reversas. Como se mencionó anteriormente, *C. elegans* se mueve por la flexión de su cuerpo en una onda sinusoidal, misma que puede ser afectada por varias mutaciones que se cree interfieren también con la propiocepción, la capacidad de detectar el cuerpo con relación al posicionamiento y estiramiento, uno de esos genes es *trp-4* que se expresa en neuronas dopaminérgicas. Se ha visto que el defecto puede rescatarse

expresando TRP-4 en neuronas DVA, lo que sugiere que estas neuronas DVA sensan el estiramiento del cuerpo.

En los bioensayos fenotípicos también se observaron diferencias significativas en cuanto al incremento en el número de bombeos (ciclo de contracción-relajación de los bulbos de la faringe) que exhibe *buc-1*, respecto a la cepa silvestre N2. El sistema nervioso de la faringe está compuesto por 20 neuronas de 14 tipos diferentes. Tres de esas 14 son esenciales: M4, MC que controla cuando la contracción inicia y M3 que controla cuando termina. Estas utilizan acetilcolina, glutamato y serotonina. Cada bombeo corresponde a un potencial de acción en los músculos de la faringe producido por la activación secuencial de cinco canales iónicos: un nicotínico (acetilcolina) activado por MC; un canal de calcio activado por voltaje de bajo umbral; un canal de calcio de umbral alto; un canal de cloro activado por glutamato activado por M3; y un canal de potasio activado por voltaje. Muchas mutantes se han caracterizado en cuanto a regulación de la alimentación, y la mayoría de ellas muestran contracciones más lentas en la faringe, sin embargo, la mutante *eat-11* que es hipersensible al agonista colinérgico arecolina, provocando que incremente la contracción muscular de la faringe (Avery, 1993)

Puede que alguno de las estructuras o mecanismos mencionados esté afectado en la mutante *buc-1*; sin embargo, también puede ser que no es que esté afectado una estructura como tal, por ejemplo un canal iónico o una proteína de membrana, si no que sea un componente corriente arriba, como la síntesis de algún neurotransmisor que sea esencial para la coordinación de la locomoción a distintos niveles. Para explicar el fenotipo de *buc-1*, se tendría que encontrar un componente cuya mutación afecte todo un conjunto de características locomotoras que se originan como respuesta a la interacción de los elementos del sistema nervioso y muscular. Tendrían que explicar los defectos en la formación de la onda sinusoidal del cuerpo mientras se desplaza hacia atrás; el probable defecto en la señal de paro durante la locomoción reversa, ya que en algunos casos, la duración de este movimiento se alarga; la velocidad de desplazamiento; el número de bombeos en la faringe; el menor número de huevos y larvas contabilizadas en los

experimentos de fertilidad; así como el menor tamaño que poseen los individuos *buc-1*.

Por otro lado, aparentemente independiente a la locomoción, una característica importante en *buc-1* es que la incidencia de machos alcanza hasta el 1%, a diferencia de la cepa silvestre N2 que presenta sólo 0.1%. Esto llevó a cuestionar si las mutantes ya descritas y que presentan no coordinación, también exhiben alta incidencia de machos. Saber esto podría indicar, si defectos en locomoción y la no disyunción del cromosoma X para generar machos se llevan a cabo por un mecanismo en común y que podría estar afectado en mutantes no coordinadas de manera general. Se realizó una búsqueda del fenotipo “*high incidence of males*”, y de los 61 genes que provocan el fenotipo, sólo la mutante *unc-86* (Cromosoma III: -0.36 ± 0.002 cM, alelos: e1416 y e1507), muestra alta incidencia de machos <http://www.wormbase.org/species/all/phenotype/WBPhenotype:0001175#01256--10-25>). Esto permite pensar, que de manera general, las mutantes no coordinadas en efecto presentan defectos locomotores, pero no alta incidencia de machos. Este resultado llevó a formular otra pregunta: ¿El fenotipo de *buc-1* es consecuencia de una mutación en un gen único?. Revisamos los otros 60 genes para ver si alguno de ellos estaba cerca del centrómero del cromosoma IV, y si coincidía con el fenotipo de locomoción reversa defectiva además de la alta incidencia de machos. Del total analizados, 12 se encuentran en el cromosoma IV cerca del centrómero. Siete de ellos se descartaron debido a ciertas características fenotípicas: *him-8* (e1489, tm611) por ser dumpy (cortos y anchos) y letales; *moc-3*, por tener la vulva protuberante; *lin-1*, por tener multivulvas y en su mayoría reventadas; *zim-3*, por ser letal y esteril; *dpy-26* (n198 y n199), por ser dumpy; *emb-26*, por tener fenotipo *lon* (largo); y *him-6*, por tener machos estériles. Dichas características fenotípicas no coinciden con el fenotipo de la mutante *buc-1*, de ahí que se hayan eliminado, sin embargo, siempre existe la posibilidad que la mutación en un alelo diferente, pueda causar un fenotipo diferente al de los otros alelos. Los genes que no se descartaron se muestran en el **Cuadro 5**, todos ellos se encuentran muy cerca del centrómero y poseen características interesantes, que podrían explicar parte del fenotipo de *buc-1*.

Con sólo una mutante no coordinada exhibiendo alta incidencia de machos (*unc-86*) y que todas las mutantes que exhiben alta incidencia de machos no muestran incoordinación; de tal manera que se puede proponer que el fenotipo de *buc-1* es causado por dos genes independientes que fueron afectados durante la mutagénesis. Rankin (2002) dice que en *C. elegans* se ha visto que la mayoría de las mutaciones en un gen conducen a un fenotipo específico, a diferencia de otros organismos cuyos genes exhiben efectos pleiotrópicos, por lo que es factible pensar que en el caso de *buc-1* dos mutaciones cercanas pudieron suceder. Por lo tanto, también se propone que dichos genes se encuentran en desequilibrio de ligamiento, ya que antes de generar las recombinantes para el cartografiado genético, se realizaron cruza con N2 para eliminar todas aquellas mutaciones que no tuvieran que ver con defectos en la locomoción reversa. A pesar de esto, el fenotipo de incidencia de machos no pudo eliminarse de *buc-1*, lo que sugiere que se encuentran muy cercanos uno de otro, en consecuencia, el gen que causa el

Cromosoma IV

Gen	Alelo	Posición	Fenotipo
<i>zim-2</i>	tm574	4.62±0.003cM	HIM, letalidad embrionaria
<i>htp-2</i>	tm2543	3.20±0.00cM	HIM
<i>zim-1</i>	tm1813	4.62±0.002cM	HIM, letalidad embrionaria
<i>eri-5</i>	mg392	- 7.53±0.031cM	HIM, espermatogénesis defectuosa en hermafroditas
<i>him-3</i>	e1147	3.27±0.002cM	HIM, letalidad embrionaria, fertilidad reducida en machos
<i>him-3</i>	e1256	3.27±0.002cM	HIM, letalidad embrionaria, falla en la puesta de huevos, fertilidad reducida en el macho
<i>him-8</i>	me4	4.64±0.001cM	HIM, localización de proteínas subcelulares variantes
<i>him-8</i>	mn253	4.64±0.001cM	HIM, localización de proteínas subcelulares variantes

Cuadro 5. Genes de alta incidencia de machos (HIM)

fenotipo, no se pudo segregar independientemente.

Por lo tanto, si *buc-1* se encuentra en alguno de los genes candidatos seleccionadas (*unc-8* y *unc-24*), se podría especular que genes están ligados. En caso de que la mutación se encontrara en el gen *unc-8* ($3.29 \pm 0.001 \text{cM}$) podría estar ligado a *him-3* o en menor probabilidad a *htp-2*. De la misma forma, si la mutación se encontrará en *unc-24* ($3.51 \pm 0.004 \text{cM}$), podrían estar ligados los mismos genes. Si la mutación se encontrará en un gen distinto y cercano al centrómero como se piensa, cualquiera de los genes del **Cuadro 5** podrían ser responsables de la alta incidencia de machos. Esto permitiría explicar el fenotipo completo de *buc-1*, por un lado el defecto en la locomoción reversa y por otro la alta incidencia de machos. También, si estos expresan letalidad embrionaria, o defecto en la puesta de huevos (*him-3* e1256) como se menciona en los fenotipos (**Cuadro 5**), podría explicar el hecho de que en el experimento de fertilidad, se observaron menor número de huevos y larvas respecto a la cepa silvestre.

VIII. CONCLUSIONES

La mutagénesis con etil metanolsulfonato (EMS) generó varios individuos mutantes, sin embargo sólo uno de ellos presentó defectos en el comportamiento de locomoción reversa de interés (*buc-1*).

Mediante el análisis con 6 marcadores moleculares SNP en 56 recombinantes mutantes, se encontró que la mutación está en el cromosoma IV cerca del centrómero, esto por la proporción de genotipos N2 encontrados en ese cromosoma (77.19%).

El gen *unc-29* se descartó ya que aunque poseía similitudes fenotípicas, se comprobó que no era igual a *buc-1* mediante una prueba de complementación genética y caracterización fenotípica.

Los bioensayos de locomoción permitieron comparar la mutante con la cepa silvestre N2. Por eso, se pudo determinar que *buc-1* desempeña con menor eficiencia el coleteo en medio líquido M9 y que su fertilidad es menor, si lo

analizamos en el contexto de número de huevos puestos. Sin embargo, casi todos los huevos puestos, eclosionan. También se observó que exhibe un mayor número de ciclos de contracción-relajación en la faringe, estadísticamente significativo respecto a N2.

Las características fenotípicas totales de *buc-1* podrían estar determinadas por la mutación de dos genes independientes. Un gen expresaría la alta incidencia de machos y otro sería responsable del defecto en la locomoción reversa. Entre los genes candidatos causantes de la incidencia de machos se encuentran: *zim-2*, *htp-2*, *zim-1*, *eri-5*, *him-3* y *him-8*, que también podrían explicar la menor cantidad de huevos observada en *buc-1*, por el fenotipo de letalidad embrionaria.

Más aproximaciones son necesarias para encontrar el gen afectado en *buc-1*, una de ellas sería por la implementación de SNP entre las zonas de potencial localización de la mutante. También sería interesante realizar experimentos que nos permitieran conocer cuáles son los procesos neuronales afectados, para tratar de entender las funciones de los genes. Este trabajo representa un primer paso para descubrir que genes están relacionados al control de una conducta de mucha relevancia ecológica, como es el escape. Conocer el gen, generará información importante que podrá utilizarse en estudios acerca de las estructuras y procesos neuronales y moleculares que subyacen a la conducta reversa.

IX. PERSPECTIVAS

Un cartografiado más fino, así como aproximaciones moleculares más específicas son necesarios para encontrar que gen fue afectado durante la mutagénesis. Para tratar de develar esto, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes candidatos (*unc-8* y *unc-24*) y secuenciarlos. Una vez que se encuentren los genes afectados, se podrá especular más acerca de las funciones que estos tienen y que procesos fueron afectados. Algo que ya no realizaremos pero que también sería interesante, es realizar estudios que abarquen características fisiológicas y bioquímicas y moleculares y no solo el área genética.

X. REFERENCIAS

- Alexander Bounoutas & Martin Chalfie. Touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* (2007) 454:691–702
- Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2009. Alimentary System, Pharynx. In *WormAtlas*. [doi:10.3908/wormatlas.1.3](https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.3)
- Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2011. Nervous system, general description. In *WormAtlas*. [doi:10.3908/wormatlas.1.18](https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.18)
- Anderson JI, Morran L, and Phillips P. 2010. Outcrossing and the Maintenance of Males within *C. elegans* Populations. *Journal of Heredity* 2010:101(Supplement 1):S62–S74
- Avery Leon. 1993. The Genetics of Feeding in *Caenorhabditis elegans*. Genetics Society of America. 133:897-917.
- Avery, L. and You, Y.J 2012. *C. elegans* feeding. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.150.1 <http://www.wormbook.org>.
- Barnes, T M Jin, Y Horvitz, H R Ruvkun, G Hekimi, S. 1996. The *Caenorhabditis elegans* behavioral gene *unc-24* encodes a novel bipartite protein similar to both erythrocyte band 7.2 (stomatin) and nonspecific lipid transfer protein. *Journal of neurochemistry*. 67:46-57.
- Brenner S. 1974. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.
- Card G, Dickinson M. 2008. Performance trade-offs in the flight initiation of *Drosophila*. *J Exp Biol*, 211:341-353.
- Davis M, Hammarlund M, Harrach T, Hullett P, Olsen S and Erik M Jorgensen. 2005. Rapid single nucleotide polymorphism mapping in *C. elegans*. *BMC Genomics*, 6:118
- Davis W. and Hammarlund M. 2006. Single-nucleotide polymorphism mapping: Methods and Applications. *Method in Molecular Biology*, Human Press Inc, Totowa, NJ, T vol 351(4):75-92
- De Bono and Maricq. 2005. Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annu. Rev. Neurosci.* 2005. 28:451–501

- De Bono M and Bargmann C. 1998. Natural Variation in a Neuropeptide Y Receptor Homolog Modifies Social Behavior and Food Response in *C. elegans*. *Cell*. Vol 94, 679-689
- De Bono, Mario. 2003. *Molecular Approaches to Aggregation Behavior and Social Attachment*. Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
- Donald, L. 2002. *The Biology of Nematodes*. CRC Press. 760pp
- Donnelly JL, Clark C, Leifer A, Pirri JK, Haburcak M, Francis M, Samuel A and Alkema M. 2003. Monoaminergic Orchestration of Motor Programs in a Complex *C. elegans* Behavior. *PLOS Biology*. 11(4):1-17.
- Edwards DH, Heitler WJ, Krasne FB. 1999. Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish. *Trends Neurosci*, 22:153-161.
- Foreman MB, Eaton RC. 1993. The direction change concept for reticulospinal control of goldfish escape. *J Neurosci*, 13:4101-4113.
- Gengyo-Ando K. y Mitani S. 2000. Characterization of Mutations Induced by Ethyl Methanesulfonate, UV and Trimethylpsoralen in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269, 64–69 (2000)
- Hall D., y Altun Z. 2008. *C. elegans atlas*. CSHLPRESS. 348pp
- Hart, Anne C., ed. Behavior. 2006. *WormBook*, ed The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.87.1, <http://www.wormbook.org>.
- Haspel, O'Donovan, and Hart. 2010. Motoneurons Dedicated to Either Forward or Backward Locomotion in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience*, 30(33):11151–11156
- Herndon, L.A. and Hall, D.H. 2009. Glossary K. In *WormAtlas*
- Jonathan Hodgkin, H. Robert Horvitz, and Sydney Brenner. 1979. Nondisjunction Mutants of the Nematode CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics*. 91(1): 67–94.
- Jorgensen Erik and Mango Susan. 2002. The Art and Design of Genetic Screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews* Vol. 3

- Kaplan J. 1996. Sensory signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Current opinion in Neurobiology*. 6(4):494-9
- Kenyon, Cynthia. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*; Jun 10, 1988; 240, 4858; Research Library pg. 1448
- Kiontke, K. and Sudhaus, W. 2006. Ecology of *Caenorhabditis* species. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook doi/10.1895/wormbook.1.37 <http://www.wormbook.org>.
- Kutscher L. M., and Shaham, S. 2014. Forward and reverse mutagenesis in *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.167.1, <http://www.wormbook.org>.
- Lewin Benjamin. 1993. *Genes*. Reverte, volume 1. Pp.66-68
- Maguire, Clark C, Nunnarni J, Pirri J, and Alkema M. 2001. The *C. elegans* touch response facilitates escape from predacious fungi. *Current Biology*. 21(15): 1326–1330.
- Maupas, E. (1899). La mue et l'enkystement chez les nématodes. *Archives de Zoologie et Experimentale*, 7, 563-628
- Mongan, Jones N, Smith A, Sansom A, Sattelle M and David B. 2002. Novel alpha7-like nicotinic acetylcholine receptor subunits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 11:1162-71
- Mongeluzi DL and Frost WN. 2000. Deshabituation of the Tritonia Escape Swim. *Learning & Memory*, 7:43-47, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Navarro G.R.E. 2003. El nematode *Caenorhabditis elegans* como de modelo de estudio del desarrollo. *Mensaje Bioquimico*. Vol.XXVI 157-168
- Palikaras K and Tavernarakis N. 2013. *Caenorhabditis elegans* (Nematode). In: Stanley Maloy and Kelly Hughes, editors. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 2nd edition, Vol 1. San Diego: Academic Press, p. 404–408.
- Pennisi E. 1998. Worming secrets from the *C. elegans* Genome. *Science*. Vol282:1972-1974
- Piggott J, Liu Jie, Feng Zhaoyang, Wescott Seth and Xu X Z Shawn. 2011. The Neural Circuits and Synaptic Mechanisms Underlying Motor Initiation in *C. elegans*. *cell*, vol, 147, 922-33

- Pirri J.K. and Alkema M. 2012. The neuroethology of *C. elegans* escape. *Current Opinion in Neurobiology*, 22:187-193
- Raizen D., Song B., Trojanowski N. and You Y 2012. Methods for measuring pharyngeal behaviors. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.154.1, <http://www.wormbook.org>. feeding
- Rankin. 2002. from gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature reviews* VOLUME 3: 622-630.
- Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess.1997. *C. elegans* II. 2nd edition editors. Cold Spring Harbor (NY).
- Shaham S. 2007. Counting Mutagenized Genomes and Optimizing Genetic Screen in *Caenorhabditis elegans*. *Plos One*. 2(11): e1117.
- Shukla A.N. 2009.chemistry of enzymes. Discovery publishing house pvt. Ltd. Sachin Printers, Delhi. 237-239pp.
- Shyn, S.I., Kerr, R., and Schafer, W.R. (2003). Serotonin and Go modulate functional states of neurons and muscles controlling *C. elegans* egg-laying behavior. *Curr. Biol*. 13, 1910–1915.
- Stiernagle, T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.
- Tavernarakis N.,Shreffler W.,Wang, S and Driscoll M. 1997. *unc-8*, a DEG/ENaC family member, encodes a subunit of a candidate mechanically gated channel that modulates *C. elegans* locomotion. *Neuron*. 18:107-119
- The *C. elegans* sequencing consortium. 1998. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans* : A Platform for Investigating Biology. *Science*. vol282:2012-2018
- Wicks S. R., Yeh R. T.,Gish W. R., Waterston R. H. and Plasterk, R H. 2001. Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using high density polymorphism map. *Nature Genetics*. 28(2):160-164.
- Wood William B. 1988. Introduction to *C. elegans* Biology. CSH Monographs Vol. 17. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Pp: 1-16
- Yemini E,Kerr R.A. and Schafer W.R.2014. Preparation of samples for Single-Worm Tracking. *Cold Spring Harb Protoc*.

Zhao B, Khare P, Feldman L, and Dent J.2003. Reversal Frequency in *Caenorhabditis elegans* Represents an Integrated Response to the State of the Animal and Its Environment. *The Journal of Neuroscience*. 23(12):5319–5328