

Caenorhabditis elegans (Animalia: Nematoda): grandes ideas para un animal pequeño.

HARISPE FRANCOLINO, MARÍA LAURA¹ & PEREIRA LARRONDE, ANA CAROLINA²

¹Profesorado Semipresencial, Instituto de Profesores “Artigas” (Montevideo, Uruguay), Centro Regional de Profesores del Sur (Atlántida, Uruguay), Consejo de Formación en Educación. ANEP. mlharispe@gmail.com

²Profesorado Semipresencial, Consejo de Formación en Educación. ANEP.

carolinapereiralarronde@gmail.com

Palabras claves: *organismo modelo, formación docente, bioensayos, genética.*

Resumen

Los organismos modelo son ampliamente utilizados en investigación científica. En este trabajo se exponen las características compartidas por los organismos modelo y se hace una revisión del proceso que llevó a convertir al gusano nemátodo *Caenorhabditis elegans* en uno de los organismos modelos de más referencia en la investigación científica. Se exponen a modo de ejemplo, tres líneas actuales de investigación científica desarrolladas a partir de *C.elegans*.

Las características que hacen de *C.elegans* un organismo modelo, el desarrollo de múltiples líneas de investigación a partir de este organismo y la existencia de un laboratorio de investigación en Uruguay en torno a este nemátodo, nos hacen pensar que *C. elegans* también puede ser un buen candidato para planificar y llevar adelante actividades relacionadas a la enseñanza de la Biología a nivel de la formación docente y de enseñanza media.

Introducción

El pasado mes de febrero tuvo lugar en el Institut Pasteur Montevideo el Primer Simposio Latinoamericano sobre *Caenorhabditis elegans* (Animalia: Nematoda) (Cuadro 1). El evento reunió a científicos latinoamericanos, europeos y norteamericanos durante tres días de intenso intercambio en torno a las principales líneas de investigación que actualmente se desarrollan en *C. elegans*. La inauguración del simposio contó con la presencia - videoconferencia mediante - del neurobiólogo estadounidense Martin Chalfie, quien en el año 2008 recibió el premio Nobel de Química por haber “iluminado” procesos in vivo en este organismo con la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) (Corsi *et al.*, 2015).

Con el propósito de acercar el mundo de la investigación a los ámbitos educativos, se invitó a participar del evento al Consejo de Formación Docente. Quienes allí estuvimos, presentamos en este trabajo una breve reseña de la génesis de *C. elegans* como organismo modelo, y de las características por las cuales se ha aludido a él como “el regalo que la naturaleza le hizo a la ciencia” (Brenner, 2002). Exponemos aquí también algunas de las principales líneas de investigación presentadas en el simposio, en particular aquellas que pueden ser de interés para abordar contenidos curriculares específicos en la enseñanza de la Biología. Se delinean finalmente algunas propuestas de enseñanza utilizando este modelo para la enseñanza de la genética, la fisiología y la ecología.

Los organismos modelo como estudio de casos

La utilización de organismos modelo es una estrategia epistémica propia de la biología contemporánea en su intento por comprender las características y los fenómenos propios de los seres vivos (Ankeny, 2006;

Ankeny&Leonelli, 2011). El estudio en profundidad de diversos fenómenos biológicos en organismos modelo se hace con la expectativa de que los datos y las teorías generadas puedan ser aplicadas a otros organismos más complejos o más difíciles de estudiar, que el propio modelo. Con algunas diferencias entre ellos, los organismos modelo comparten una serie de ventajas para la experimentación y la investigación científica: pueden ser mantenidos en el laboratorio sin elevados costos, tienen ciclos de vida cortos y se reproducen con facilidad, generando gran cantidad de descendencia en un breve lapso. Con excepciones, actualmente es aceptado que los organismos modelo deben ser asimismo genéticamente manipulables, usando enfoques genéticos directos (identificación de genes en base a fenotipos mutantes) y/o enfoques genéticos inversos (análisis funcional de genes de identidad molecular ya conocida) (Ankeny&Leonelli, 2011).

En la literatura científica la expresión "organismo modelo" no era de uso común hasta finales de la década de los años ochenta (Ankeny&Leonelli, 2011). A partir de ese momento, los llamados organismos modelo se han convertido en una piedra angular de la investigación en las ciencias biológicas, constituyendo no sólo una herramienta para la generación de datos y teorías sobre los fenómenos biológicos sino también un campo de prácticas para el desarrollo de nuevas técnicas (Ankeny, 2006). Entre los organismos modelo más utilizados en el ámbito de la investigación se encuentran una bacteria intestinal (*Escherichia coli*), la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el ratón doméstico (*Mus musculus*), el pez cebra (*Danio rerio*), y la planta herbácea (*Arabidopsis thaliana*).

Los organismos experimentales son utilizados como modelo en dos dimensiones fundamentales (Ankeny&Leonelli, 2011). Una de las dimensiones es el "alcance de representación"¹, el cual se refiere a cuán ampliamente pueden proyectarse los resultados obtenidos a partir de un organismo modelo particular en un grupo más amplio de organismos. La segunda dimensión, o "blanco de representación"², se refiere a cuáles son los fenómenos - entidades, conceptos, o procesos de interés para la investigación - que son explorados a través del uso de los organismos experimentales, ya sean procesos bioquímicos, genéticos, neurobiológicos o del desarrollo. Mientras que el blanco de representación describe las razones conceptuales por las

que los investigadores eligen un organismo modelo determinado, el alcance de representación define el rango de amplitud en el que los resultados obtenidos son trasladables a otros organismos (Ankeny&Leonelli, 2011).

Si bien la meta es lograr una comprensión de ciertos fenómenos biológicos compartidos por un grupo de seres vivos, o eventualmente todos ellos, es evidente que cualquier organismo seleccionado para la investigación puede resultar problemático en la medida en que su complejidad y/o atipicidad no pueden ser anticipadas *a priori* de su estudio. En relación a este potencial conflicto, se ha propuesto que la utilización en biología de los organismos modelo puede ser considerada, desde el punto de vista metodológico, como un *estudio de caso*, metodología ampliamente utilizada en las ciencias sociales, en particular en la educación, y en la medicina, y que se considera especialmente pertinente en la fase heurística del proceso de investigación (Yin, 2006). Los organismos modelo pueden ser vistos desde esta perspectiva como *casos* que median entre la teoría y la realidad, constituyendo herramientas que permiten disponer de un marco dentro del cual hacer preguntas (Ankeny, 2006). La teoría o pregunta a investigar constituiría el blanco de representación, mientras que el "mundo" que el modelo representa podría definirse en términos de su alcance de representación (Ankeny&Leonelli, 2011).

La génesis del modelo *Caenorhabditis elegans*

En los años siguientes a la determinación de la estructura en doble hélice del ADN y a la posterior dilucidación del código genético, muchos de los biólogos más activos en ese campo creían que los problemas más importantes de la biología molecular estaban ya resueltos, y que el siguiente desafío, "la última frontera" de la biología, sería la comprensión del sistema nervioso y de las bases genéticas del comportamiento animal. En ese contexto, fueron varios los grupos de investigación que se volcaron al estudio de las bases moleculares del comportamiento animal. Entre ellos estaba el liderado por Sydney Brenner (ver Cuadro 2), en el Laboratory of Molecular Biology (LMB) del instituto de investigación inglés Medical Research Council de Cambridge. Brenner buscaba un modelo animal cuya manipulación experimental resultara sencilla y que tuviera comportamientos y estructuras relativamente básicas, pero con una complejidad tal que pudiera considerarse representativo de los metazoarios. Tanto Brenner como la mayoría de los investigadores que le siguieron asumieron que a pesar de la simplicidad de *C. elegans*,

1 "Representational scope" (Ankeny&Leonelli, 2011).

2 "Representational target" (Ankeny&Leonelli, 2011).

este podía considerarse similar a otros animales más complejos en términos del control genético de la diferenciación celular, en particular del sistema nervioso (ver Cuadro 1). En ese contexto, Brenner lanzó lo que se conoció como “el proyecto gusano” (“the worm project”), un gran programa de investigación dirigido a sentar las bases para el posterior desarrollo de este nuevo desafío en el campo de la neurobiología: conectar la genética con el comportamiento (Ankeny, 2001). En líneas generales, el programa tenía como objetivo comprender la manera en que los genes especifican la estructura del sistema nervioso y a su vez, cómo la estructura de éste se relaciona con el comportamiento (Emmons, 2015). Para esto, se consideraba esencial lograr una descripción estructural del sistema nervioso tan detallada como fuera posible. Si bien la idea de estudiar la estructura no era nueva para la neurociencia, el enfoque tradicional de esta disciplina se basaba en estudios anatómicos y biofísicos. La originalidad de la propuesta de Brenner radicó en la combinación de un abordaje genético del tema – basado en mutantes que veían afectado su comportamiento – con una descripción del sistema nervioso hasta el nivel sináptico. El plan consistía en aislar mutantes con el comportamiento afectado y estudiar luego los cambios que se producían en su sistema nervioso (Emmons, 2015). Con esta estrategia, se busca la identificación y la caracterización de las secuencias de ADN – normalmente genes – que especifican una determinada característica o subyacen a un fenómeno biológico determinado. Dependiendo del caso en estudio, de las posibilidades que admite el modelo, y de las herramientas disponibles, los linajes mutantes sometidos a prueba pueden ser seleccionados de la naturaleza o ser generados experimentalmente.

En la primera etapa del “proyecto gusano”, junto con la selección del ejemplar silvestre, se generaron, mediante mutagénesis química, los primeros 300 individuos mutantes con distintas alteraciones fenotípicas. En los años posteriores se identificaron más de 100 genes responsables de estos fenotipos, distribuidos en los seis cromosomas de la especie. De estos ejemplares mutantes, Brenner y su equipo centraron su atención en aquellos que podían ser de utilidad en la investigación neurobiológica: los que presentaban alteraciones en el tamaño, en la morfología y/o en la movilidad; estos últimos fueron llamados también mutantes “descoordinados”. La segunda etapa del “proyecto gusano” estuvo centrada en conocer la estructura de su sistema nervioso y determinar con qué precisión pueden especificarse las células nerviosas y sus conexiones. La metodología de trabajo consistió

en la obtención de 8.000 micrografías electrónicas, tomadas en serie, de las conexiones neuronales de ejemplares silvestres del nemátodo y en la posterior reconstrucción tridimensional del sistema nervioso. Comparando el sistema nervioso de individuos genéticamente idénticos, se rescataron estructuras y conexiones que mostraban ser constantes de un individuo a otro. En base a esto, Brenner y su equipo hicieron una reconstrucción computacional de los datos obtenidos y elaboraron un sistema nervioso modélico. Este mapa general de conexiones neuronales, llamado “diagrama de cableado”, o conectoma en términos actuales (ver más adelante), constituyó un hito en la investigación biológica del siglo XX. Allí se describe el sistema nervioso del espécimen hermafrodita, con las 302 células nerviosas identificadas y sus casi 8000 conexiones, que incluyen 5.000 sinapsis químicas, 2.000 uniones neuromusculares y 600 uniones comunicantes (“gap”) (White *et al.*, 1986; Emmons, 2015). Como parte de este proyecto – y gracias a la transparencia del cuerpo de este nemátodo – fue posible cartografiar mediante observación directa el linaje de todas las células del organismo, desde el cigoto al adulto pluricelular. Este trabajo fue fundamental para el estudio del desarrollo y la organogénesis y permitió determinar el primer, y hasta el momento único, linaje celular de un organismo pluricelular, constituyendo otro de los grandes hitos de la biología moderna (Sulston&Horvitz 1977; Kimble&Hirsh 1979; Sulston *et al.* 1983).

Una vez que se disponía de mutantes afectados en el comportamiento y del mapa de conexiones neuronales, los esfuerzos se volcaron a establecer la correlación entre mutaciones genéticas y cambios estructurales en el sistema nervioso. La mayoría de los mutantes “descoordinados” aislados mostraron anomalías en el desarrollo o en el establecimiento de conexiones en las neuronas motoras; otros presentaron aberraciones en la formación del cordón nervioso central, o en la organización de alguna de las estructuras sensoriales (Emmons, 2015). Estos hallazgos apoyaron la visión de Brenner, de que la utilización de mutantes era una estrategia adecuada para identificar los genes que especificaban la estructura del sistema nervioso. Actualmente, se conocen 30 de los productos proteicos codificados por los genes que fueron identificados en estos mutantes. Ocho son componentes de las sinapsis y otras 11 proteínas se encuentran en todas las células y están implicadas en diversos aspectos de la estructura y fisiología celular, lo que constituye una contribución de los estudios en *C. elegans* a la biología celular en general y a la biología celular del sistema nervioso en particular (Emmons, 2015).

Los antecedentes descritos, conjuntamente con las características biológicas de *C. elegans*, posicionaron a este modelo como uno de los favoritos para estudiar muchos otros procesos celulares y del desarrollo. Los hallazgos realizados en este modelo han contribuido a la comprensión de los mecanismos genéticos moleculares conservados en varios grupos taxonómicos. Uno de los ejemplos más notables lo constituye la descripción de los mecanismos moleculares asociados con la muerte celular programada, apoptosis. Sydney Brenner, Robert Horvitz, John Sulston y otros, identificaron genes clave para la regulación de este proceso en *C. elegans*. Posteriormente se hallaron los genes homólogos correspondientes en otras especies, incluyendo los seres humanos. Así se demostró que las características morfológicas y bioquímicas básicas de la muerte celular programada, se conservan tanto en las plantas como en los animales (Corsi *et al.*, 2015). El abordaje genético que permite *C. elegans* hizo que, además de los genes que regulan la apoptosis (Hedgecock *et al.*, 1983; Ellis&Horvitz, 1986) se hayan descrito por primera vez en este nemátodo otros tantos genes, entre los que se cuentan los genes responsables de las vías de señalización Ras y Notch (Priess, 2005; Greenwald & Kovall, 2013; Sundaram, 2013), los que intervienen en la función sináptica (Gengyo-Ando *et al.*, 1993), en la longevidad (Kenyon *et al.*, 1993, Kimura *et al.*, 1997), y en la sincronización del desarrollo (los genes heterocrónicos) (Ambros & Horvitz, 1984). También en este modelo se identificó el primer ARN pequeño regulador, el microRNA (miRNA) codificado por el gen *lin-4* (Lee *et al.*, 1993).

Como se dijo anteriormente, los organismos modelo constituyen plataformas en las que se diseñan y desarrollan nuevas técnicas y herramientas de investigación. En *C. elegans*, se utilizó por primera vez la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) como reportero de la actividad celular. El gen de esta proteína, que emite color verde cuando absorbe luz ultravioleta o azul, fue aislado de la medusa *Aequorea victoria*. El biólogo estadounidense Martin Chalfie y su equipo vislumbraron el alto potencial que tendría su utilización como herramienta de marcaje celular. Dada la transparencia de las células de este nemátodo, se propusieron – y lograron – generar un gusano transgénico que expresara el gen GFP bajo el control de una secuencia reguladora cromosómica específica de células del sistema nervioso (Corsi *et al.*, 2015). Esta pequeña proteína soluble, de alrededor de 600 aminoácidos, presentaba entre otras ventajas el no ser tan destructiva como los métodos anteriores (tinción con

anticuerpos o hibridación “in situ”) para el marcaje de proteínas o ARN.

A fines de 1998 se anunció la secuenciación casi completa del genoma del gusano, que fue completada posteriormente. Esto marcó también un hito en la era genómica: fue el primer organismo pluricelular cuyo genoma fue completamente secuenciado (Ankeny, 2001). Con 100 millones de pares de bases, es cerca de 30 veces menor que el del ser humano, y contiene algo más de 20.000 genes codificantes de proteínas, de los cuales, aproximadamente el 38% tienen ortólogos en el genoma humano (Shaye&Greenwald, 2011)

***Caenorhabditis elegans* en Uruguay y en la región**

Debido a la génesis particular de este modelo de investigación, centralizado en el laboratorio de Brenner la comunidad de investigadores en “el gusano” se mantiene relativamente cohesionada, con una visión compartida sobre prácticas y conceptos fundamentales, y es a menudo considerada como un modelo de cooperación científica (Roberts, 1990; Pennisi, 1998). En América Latina, la utilización de *C. elegans* como organismo modelo comenzó hace unos 15 años, con algunos pocos esfuerzos independientes, principalmente en Argentina, México y Brasil. Hoy son más de 30 los laboratorios que trabajan en este modelo en nuestro continente y es probable que este número crezca.

En Uruguay el Laboratorio de Biología de Gusanos, dirigido por el Dr. Gustavo Salinas, es el único hasta el momento en el que se hace investigación en este modelo. Funciona como unidad mixta entre el Institut Pasteur de Montevideo y la Facultad de Química de la UdelaR. Las principales líneas de investigación de este laboratorio se centran en la caracterización de ciertas vías metabólicas presentes en *C. elegans* y helmintos parásitos, ausentes en mamíferos, y que pueden ser de interés para la generación de fármacos nematocidas. Utilizando a *C. elegans* como modelo, han puesto a punto bioensayos automatizados para la búsqueda e identificación de nematocidas.

Además del laboratorio uruguayo, muchos otros laboratorios latinoamericanos han desarrollado diversas líneas de investigación haciendo uso de *C. elegans* como organismo modelo. Varios de los hallazgos más relevantes de la investigación científica dentro de estas líneas fueron presentados en el simposio organizado en Montevideo. A modo de ejemplo se presenta un resumen de algunas de las áreas de investigación

compartidas en el simposio: 1) *C. elegans* como modelo neurobiológico, 2) *C. elegans* como modelo para el estudio de los ritmos circadianos, y 3) *C. elegans* como modelo en estudios toxicológicos.

***Caenorhabditis elegans* como modelo neurobiológico**

Uno de los mayores retos actuales de la Neurociencia es comprender la organización estructural y funcional de las neuronas en circuitos dinámicos que se modifican durante el desarrollo y el aprendizaje. El término conectoma, acuñado en 2005 (Hagmann, 2005; Sporns *et al.*, 2005), hace referencia a las conexiones neuronales en el cerebro de un animal. Puesto que el patrón de conexiones que se establecen en una red determina su funcionalidad (Hagmann, 2005), descifrar el conectoma del cerebro humano es uno de las mayores aspiraciones de los neurocientíficos, ya que el mismo subyace a los procesos cognitivos. Sin embargo, con más de 10^{11} neuronas y 10^{15} sinapsis que se establecen entre ellas - además de los cambios plásticos rápidos en las neuronas y sinapsis individuales - no es posible aún determinar el conectoma humano con una resolución a nivel celular (Sporns *et al.*, 2005; Sporns, 2013).

El trabajo pionero de Brenner y colaboradores en la década de los 70 permitió determinar el primer conectoma en un animal. A través de la reconstrucción tridimensional de su sistema nervioso se sentaron las bases sobre las que se erige el desafío actual de descifrar el conectoma humano (White *et al.*, 1986). Aunque para entender el funcionamiento de un circuito neural no basta con conocer los elementos que lo constituyen y las conexiones que se establecen entre sí, conocer el conectoma se considera una condición necesaria para comprender el procesamiento de la información en el circuito.

Desde las investigaciones que llevaron a determinar el conectoma de *C. elegans*, los avances científicos y tecnológicos han permitido establecer parcialmente la conectividad neuronal en cerebros más complejos (Livet *et al.*, 2007; Lichtman *et al.*, 2008, Kaiser, 2015). Sin embargo, aún no se ha logrado completar el conectoma a nivel celular del cerebro de un mamífero (Oh *et al.*, 2014).

Varias de las investigaciones presentadas en el simposio de febrero trataban de la neurobiología de este nemátodo. Entre éstas se destacan las referidas a las bases neuronales del dimorfismo sexual comportamental, que da lugar a respuestas diferentes a los mismos estímulos sensoriales del ambiente según se trate de un individuo macho o de uno hermafrodita.

Si bien existen varios estudios respecto de las estructuras nerviosas involucradas en el dimorfismo sexual en distintas especies, poco se sabe del mismo tanto a nivel de las neuronas individuales como del establecimiento de circuitos neuronales específicos vinculados al comportamiento dimórfico observado en *C. elegans* siendo un buen ejemplo para entender cómo, durante el desarrollo del cerebro, se establecen los patrones de conexiones neuronales sobre los que subyace el dimorfismo sexual. Estudios al respecto muestran diferencias entre los conectomas del hermafrodita y el macho de esta especie, en particular en las conexiones sinápticas de neuronas que han sido implicadas a través de estudios comportamentales en conductas específicas vinculadas al sexo. En etapas tempranas del desarrollo de los individuos, previamente a su maduración sexual, no se observan diferencias en las sinapsis que establecen estas neuronas entre machos y hermafroditas. Sin embargo, se ha puesto en evidencia que a través de un proceso posterior de modelado del sistema nervioso conocido como “poda sináptica” se establecen conexiones específicas entre estas neuronas (interneuronas y neuronas sensoriales) ligadas al sexo del animal y se han podido identificar parcialmente las bases moleculares de este proceso (Oren-Suissa *et al.*, 2016). Estos hallazgos en *C. elegans* son de especial importancia ya que, aunque el mecanismo de “poda sináptica” ha sido implicado en el modelado de los circuitos neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso de un animal, no existía evidencia de su participación en la generación de circuitos neuronales que exhiben dimorfismo sexual.

***Caenorhabditis elegans* como modelo para el estudio de los ritmos circadianos**

Los mecanismos que subyacen al comportamiento animal son determinados tanto por influencias externas como por los estados internos del propio animal, que afectan de forma específica a su sistema nervioso. En este sentido, *C. elegans* ha servido de modelo para entender algunas de las bases moleculares de comportamientos complejos entre los que se destacan los asociados a los ritmos circadianos.

Los ritmos circadianos constituyen fenómenos biológicos recurrentes con una periodicidad aproximada de 24 horas. Aunque los ritmos circadianos son endógenos con una frecuencia intrínseca estable en condiciones constantes de luz y de temperatura, ante cambios en los factores ambientales pueden sufrir ajustes de su periodo y fase al ciclo ambiental. La plasticidad ante

un sincronizador externo es una importante propiedad de estos ritmos. Varios son los modelos biológicos que se utilizan para la investigación sobre los procesos que subyacen a los ritmos circadianos, de modo de entender y descifrar los mecanismos moleculares por los que operan. Investigaciones recientes han propuesto a este nemátodo como un modelo útil en estudios de cronobiología. Para ello fue preciso caracterizar los ritmos circadianos en *C.elegans* identificando las variables involucradas (Migliori, 2011).

Caenorhabditis elegans exhibe ritmos circadianos con un periodo cercano a las 24 horas que pueden ser regulados a través del entrenamiento con ciclos de luz-oscuridad y temperatura, tanto en poblaciones de estos animales como en individuos únicos. En el laboratorio de Cronobiología de la Universidad de Quilmes, liderado por Diego Golombek, se han puesto en evidencia las principales características de estos ritmos a través del desarrollo de un sistema de bioluminiscencia que permite registrar las oscilaciones en la expresión génica de este nemátodo a lo largo del día (Goya *et al.*, 2016). Los resultados de estas investigaciones permiten comprender las características particulares del sistema circadiano en estudio y contribuyen en la búsqueda del oscilador molecular en este animal.

Caenorhabditis elegans como modelo para estudios toxicológicos

La evaluación analítica clásica de la calidad del agua, además de ser costosa, puede resultar una tarea muy compleja por el alto número de contaminantes posibles. Esto ha promovido el desarrollo de nuevas herramientas para evaluar la toxicidad del agua, entre las que se incluyen los bioensayos con animales simples, diseñados con criterios de valoración sensibles, fáciles de manipular y de bajo costo (Leung *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008). La valoración de la toxicidad del agua a través de bioensayos no solo es económicamente más ventajosa, sino que además permite analizar los efectos potencialmente tóxicos de los contaminantes presentes en la muestra y de su interacción sobre los seres vivos (efectos ecotoxicológicos, Truhaut, 1977). Además pueden ser utilizados en la detección de tóxicos indefinidos en la muestra que podrían pasar inadvertidos a través de las técnicas analíticas de calidad de aguas.

Las características particulares de *C. elegans* hacen que éste sea uno de los organismos modelo preferidos en este tipo de estudios (Leung *et al.*, 2008; Ávila *et al.*, 2012). Múltiples investigaciones han descrito diversos criterios de valoración sensibles para evaluar toxicidad

en este nemátodo (Dhawan *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2004; Höss *et al.*, 2013; Clavijo *et al.*, 2016). A partir de estos estudios, es posible evaluar la calidad del agua en ríos y arroyos a través de la variación de distintas respuestas del ciclo de vida de *C. elegans*, tales como el crecimiento, la fertilidad y la reproducción (Kronberg *et al.*). Probablemente la evaluación del crecimiento de este nemátodo en diferentes muestras de agua sea el parámetro de respuesta más sencillo de emplear en estos bioensayos. Existen múltiples evidencias experimentales que confirman la validez de los bioensayos con *C. elegans* como herramienta para evaluar la toxicidad del agua, a través de la determinación conjunta del crecimiento del animal y de los parámetros físico-químicos y bacteriológicos para distintas muestras de aguas. Estos resultados, junto al bajo costo del bioensayo, justifican su inclusión tanto en el monitoreo de rutina de la calidad del agua como en los estudios para evaluar la contaminación ambiental relacionada, por ejemplo, al uso extensivo de pesticidas.

Reflexiones finales: algunas ideas para la enseñanza de la Biología

En el año 2013, dentro del marco de las actividades del Departamento de Ciencias Biológicas, tuvo lugar en el Instituto de Profesores Artigas el curso “*Caenorhabditis elegans* como organismo modelo”. Dicho curso estuvo a cargo de Lucía Otero, Laura Romanelli y Gustavo Salinas, e incluyó algunas actividades experimentales que pueden ser replicadas en distintos laboratorios de enseñanza de nuestro país. La oportunidad de concurrir a este simposio sobre *C. elegans* nos invita a retomar este tipo de experiencias y reflexionar sobre las potencialidades de su uso en el aula a distintos niveles en la enseñanza de la Biología. Las razones por las que *C. elegans* podría ser un buen candidato para trabajar en el ámbito de la enseñanza son en buena medida las mismas que lo llevan a ser un organismo modelo para la investigación. La sencillez con que este animal puede manipularse permite el diseño de actividades que resultan relativamente económicas y fáciles de implementar. Es posible obtener grandes poblaciones de *C. elegans* cultivándolo en medio líquidos o en placas con medios sólidos en los que son alimentados con microorganismos. Para alcanzar el estado adulto, los huevos de *C. elegans* pasan por una etapa embrionaria y cuatro etapas larvales en las que se pueden observar rasgos característicos; el desarrollo puede demorar de 2 a 4 días dependiendo de la temperatura. En principio, es suficiente con disponer de lupas para observar, describir y comparar la morfología, el movimiento y

el tamaño de los distintos linajes o las características propias de cada una de estas etapas. Las cualidades particulares de este organismo, el conocimiento profundo de su biología y la disponibilidad de gran cantidad de recursos educativos existentes (Fong-Mei L. *et al.*, 2007), nos alientan a desarrollar y planificar dispositivos pedagógicos que incorporen actividades de laboratorio como herramientas para alcanzar los objetivos propios de la enseñanza de las ciencias, tanto en lo conceptual como en lo procedimental y actitudinal.

Una primera línea de actividades, de fácil instrumentación, consiste en que los estudiantes diseñen, ejecuten y analicen experimentos en los que se pongan a prueba y/o se evalúen los efectos de agentes químicos y/o físicos (radiación UV, alcohol, sustancias atrayentes o repelentes, etc) en la fisiología o el comportamiento de *C. elegans*³. Este tipo de actividades, diseñadas en el marco de un enfoque de la enseñanza de la ciencia basada en la indagación (Camaño A., 2012) promueve que los estudiantes desarrollen ideas y formas de trabajo propias de la actividad científica, incentivando su capacidad de investigar y construir su propio conocimiento en base a la formulación de preguntas, la recolección de datos, el razonamiento, el análisis y discusión de las pruebas.

El estudio de los ritmos circadianos en *C. elegans* podría definir otra serie de actividades a desarrollar en el aula. En este animal se han descrito varios ritmos circadianos a diferentes niveles entre los que se destacan la actividad locomotora (Herrero *et al.*, 2015; Simonetta *et al.*, 2009) y algunos procesos fisiológicos tales como la tasa de defecación, la tasa de bombeo faríngeo y la olfacción (Olmedo *et al.*, 2012; Saigusa *et al.*, 2002). Además se han estudiado los factores ambientales que pueden actuar como sincronizadores del reloj biológico en este nemátodo (Migliori, 2011). El ritmo circadiano en la actividad locomotora de *C. elegans* es una de las variables identificadas de más fácil acceso en el laboratorio. Es posible realizar la descripción completa de este ritmo circadiano a través del registro de la actividad locomotora del animal a lo largo del ciclo geofísico día/noche iluminando el campo de registro con luz infrarroja (Migliori, 2011). Este registro pone en evidencia las principales propiedades de cualquier ritmo circadiano: su naturaleza endógena - que hace que se mantenga en ausencia de factores/estímulos externos - y la influencia de la luz y la temperatura en su sincronización.

3 Algunas actividades de este tipo pueden consultarse en el sitio <http://brainu.org/>

Otra línea de propuestas, también de fácil implementación en nuestros centros educativos, hacen foco en la enseñanza de la genética y las conceptualizaciones fundamentales del dogma central de la biología molecular. La disponibilidad de acceso *on line* y de uso libre y gratuito de las herramientas de investigación *in silico* constituye una oportunidad para que los centros educativos conecten desde las aulas con los nuevos ámbitos metodológicos de la investigación genética: la utilización de aplicaciones bioinformáticas para la búsqueda de secuencias génicas, proteicas y datos de expresión en bases de datos biológicas. Bases de datos como la *WormBase* (que contiene información sobre la biología y el genoma de *C. elegans* y de otros gusanos relacionados) u otras más amplias como el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) incluyen la descripción de la estructura de los genes, su posición en el cromosoma, datos sobre patrones de expresión y la secuencias de la proteína correspondientes. La disponibilidad de linajes mutantes tan bien caracterizados en *C. elegans* permite diseñar actividades en las que se combine el análisis fenotípico de linajes mutantes con el análisis genético a nivel molecular. Experiencias de este tipo, fuertemente apoyadas en la búsqueda *in silico* de información biológica, están siendo implementadas a nivel de bachillerato en otros países (Giménez C., 2013; Viale, G *et al.* 2013) y también en nuestros institutos de formación docente en el marco de los cursos de verano. Con estas actividades, se consolidan una serie de conocimientos centrales de la *currícula* de biología, como la relación genotipo- fenotipo, el efecto de las mutaciones sobre la estructura y función de las proteínas y su incidencia en el fenotipo. Por último, creemos que se pueden planificar actividades prácticas en el contexto de la enseñanza de la ecología, haciendo valoraciones de toxicidad ambiental a través de bioensayos con *C. elegans*. En estos estudios se puede determinar de forma conjunta del crecimiento del animal y parámetros físico-químicos para distintas muestras de aguas (Nolla *et al.*, 2013) de modo de evaluar los efectos tóxicos del medio sobre un organismo entero.

Tener en nuestro país con un laboratorio que mantenga la colección de linajes de *C. elegans*, que cuente con la infraestructura requerida para su mantenimiento y experimentación, así como con un equipo humano con conocimiento profundo de la biología de este organismo es indudablemente un elemento clave para estas propuestas de enseñanza. Así, este pequeño animal transparente podría constituir otro puente entre el ámbito de la educación y el de la investigación científica en Uruguay.

CUADRO 1. *Caenorhabditis elegans* es un gusano nemátodo de vida libre que habita en los suelos de regiones templadas, alimentándose de bacterias y materia orgánica en descomposición. Su epíteto específico, *elegans*, obedece a la elegancia de los movimientos “peristálticos” de su cuerpo durante su desplazamiento. El adulto, de alrededor de 1 mm de longitud, está compuesto por 959 células somáticas y entre 1000 y 2000 células germinales. El cuerpo de *C. elegans* es transparente a lo largo de todo su ciclo de vida, lo que hace posible la observación de distintos procesos biológicos mediante microscopía óptica. Su ciclo de vida se completa en 3 o 4 días y en este corto tiempo cada individuo puede llegar a producir una progenie de alrededor de 300 individuos. En el laboratorio, los adultos pueden mantenerse con gran facilidad creciendo sobre el agar en placas de Petri y alimentándose con bacterias (*Escherichia coli*). Es además resistente a la congelación, lo que favorece su conservación por largos períodos de tiempo. Tiene dos formas sexuales que difieren ligeramente en aspecto y estructura: un hermafrodita suficiente y un macho que puede fecundar a los hermafroditas. Esto lo convierte en un excelente sistema genético, ya que los organismos pueden ser criados como linajes puros manteniendo aislados a los hermafroditas, o se pueden generar variantes genéticas, introduciendo nuevos alelos en los especímenes hermafroditas a través de la cruce controlada con machos mutantes.

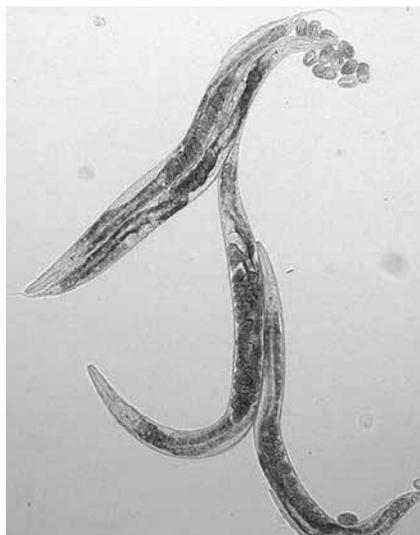


Figura recuperada de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:C_elegans_DIC_s.jpg

CUADRO 2. **Sydney Brenner** nació en el año 1927 en la ciudad de Germiston, en Sudáfrica. Sus padres fueron inmigrantes judíos que llegaron a ese país desde Europa Oriental. Su padre, de profesión zapatero, nació en Lituania, y su madre en Latvia. Brenner mostró un temprano gusto por la lectura e interés por las ciencias y creció en un entorno familiar y social que fue altamente estimulante de sus intereses e inquietudes.

A la edad de 15 años accedió a una beca para estudiar medicina en la Universidad de Witwatersrand, en Johannesburgo. Muy pronto entonces se integró al rico mundo de la investigación científica, incursionando en diversas áreas de la investigación biomédica, lo que terminó de definir su vocación y su futuro profesional. En 1952 llegó a la Universidad de Oxford, en Inglaterra, para hacer una tesis doctoral sobre la resistencia bacteriana a los bacteriófagos, bajo la dirección del fisicoquímico Cyril Norman Hinshelwood. Si bien posteriormente se referiría a su trabajo de tesis como algo poco trascendente, reconoce que tuvo el mérito de ponerlo en el camino de su verdadero interés, una disciplina que estaba surgiendo pero aún no tenía nombre: la biología molecular. En abril de 1953, pocos días antes de que se publicara el trabajo de James Watson y Francis Crick sobre la estructura en doble hélice de la molécula de ADN, viajó junto con algunos colegas a la Universidad de Cambridge para conocer en persona el posteriormente famoso modelo tridimensional de la molécula y a sus creadores. En su autobiografía se referirá a este episodio como el más decisivo de su vida científica, al tomar conciencia de que estaba siendo testigo de un hallazgo clave para la comprensión de uno de los principales problemas de la biología del momento. En los años posteriores, Brenner estrecharía vínculos y establecería una fecunda colaboración con Crick, con

quien compartirá su oficina en el Medical Research Council (MRC) durante 20 años. Brenner fue uno de los miembros del legendario club de caballeros científicos conocido como el "Club de la corbata del ARN", grupo fundado por James Watson y el físico ruso George Gamov y que reunía a matemáticos, físicos, biólogos y químicos, en torno al interés común de comprender los procesos por los que la secuencia lineal de nucleótidos del ADN especificaba la secuencia lineal de aminoácidos de las proteínas.

En 1961, junto con Francis Crick, Leslie Barnett y Richard Watts-Tobin (Crick *et al.*, 1961) publica en la revista Nature un trabajo titulado "General Nature of the Genetic Code for Proteins", en el que se explota de manera excepcional el enorme poder deductivo de la aproximación genética para determinar las principales características del código genético (Yanofsky, 2007). Entre otros trabajos fundamentales de esa etapa de su vida científica se cuentan: la existencia del ARN mensajero como una molécula intermediaria entre los genes y las proteínas (Brenner *et al.*, 1961), la demostración de la co-linearidad entre el gen y la proteína (Sarabhai *et al.*, 1964), y la deducción de los codones de terminación de cadena (Brenner *et al.*, 1965). En los años posteriores su foco de interés se centró en la búsqueda de un modelo que permitiera comprender el rol de los genes en la especificación de las estructuras complejas encontradas en los organismos superiores, en particular el sistema nervioso. La presencia de conexiones neuronales muy claramente definidas y conservadas entre distintos individuos en los invertebrados - especialmente en los nemátodos - indicó a Brenner que tales conexiones podrían estar determinadas genéticamente (Ankeny, 2001). En 1967, preparando una charla para la Junta de Investigación Biológica del MRC escribió una carta al médico que la coordinaba en la que informaba "He cambiado mis intereses de la genética molecular a un campo bastante vago del desarrollo y estructura del sistema nervioso" (Ankeny, 2001, la traducción es nuestra). En su charla, titulada "Biología Molecular y Sistema Nervioso", Brenner utilizó el trabajo de laboratorio aún preliminar sobre "el gusano" para mostrar cómo los organismos simples podrían ser utilizados para determinar el desarrollo preciso y la estructura de al menos partes del sistema nervioso. En relación con este proyecto, Brenner sostuvo que "...en principio, debería ser posible diseccionar la especificación genética del comportamiento de *C. elegans*, de la misma manera que se diseccionaron algunas vías biosintéticas bacterianas o el proceso de ensamblado del bacteriófago" (Ankeny, 2001, la traducción es nuestra). Este proyecto, llevado a cabo por John White, Eileen Southgate, J. Nichol Thomson y Brenner culminó en 1984, y sus resultados fueron publicados en 1986, su título corto es "La mente de un gusano" (White *et al.*, 1986). En este trabajo, se presentó un "sistema nervioso canónico" del hermafrodita, constituyéndose en un hito de la historia de la biología: el primer conectoma de un cerebro (ver texto principal). En el año 2002 Brenner recibe el Premio Nobel de Fisiología y Medicina junto con Robert Horvitz y John Sulston, en parte por la contribución de este proyecto al descubrimiento de los genes que orquestan las decisiones de desarrollo. Vive actualmente en Inglaterra.

Figura recuperada de <https://www.flickr.com/photos/universitatpompeufabra/13869585174>

Referencias bibliográficas

- Ambros, V., & Horvitz, H. R. (1984). Heterochronic mutants of the nematode. *Science*, 226, 409-416.
- Anderson, G. L., Cole, R. D., & Williams, P. L. (2004). Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5), 1235-1240.
- Ankeny, R. A. (2001). The natural history of *Caenorhabditis elegans* research. *Nature reviews. Genetics*, 2(6), 474-479.
- Ankeny, R. A. (2006) Wormy logic: model organisms as case-based reasoning. Working papers on the nature of evidence: how well do 'facts' travel?, 07/06. Department of Economic History, London School of Economics and Political Science, London, UK.
- Wormy logic: Model organisms as case-based reasoning.
- Ankeny, R. A., & Leonelli, S. (2011). What's so special about model organisms?. *Studies in History and Philosophy of Science Part A*, 42(2), 313-323.
- Avila, D., Helmcke, K., & Aschner, M. (2012). The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology. *Human & experimental toxicology*, 31(3), 236-243.
- Brenner, S., Jacob, F., & Meselson, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 190(4776), 576-581.

- Brenner, S., Stretton, A. O. W., & Kaplan, S. (1965). Genetic code: the 'nonsense' triplets for chain termination and their suppression. *Nature*, 206(4988), 994-998.
- Brenner, S. (2002). Nobel Lecture. (https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/brenner-lecture.pdf)
- Caamaño, A. (2012). ¿Cómo introducir la indagación en el aula? Los trabajos prácticos investigativos. *Alambique: didáctica de las ciencias experimentales*, 70, 83-91.
- Clavijo, A., Kronberg, M. F., Rossen, A., Moya, A., Calvo, D., Salatino, S. E.... Munarriz, E. R. (2016). The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. *Science of The Total Environment*, 569, 252-261.
- Crick, F. H., Barnett, L., Brenner, S., & Watts-Tobin, R. J. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192 (4809), 1227-1232.
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387-407.
- Dhawan, R., Dusenbery, D. B., & Williams, P. L. (1999). Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 58(7), 451-462.
- Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6), 817-829.
- Emmons, S. W. (2015). The beginning of connectomics: a commentary on White et al.(1986)'The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*'. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370(1666), 20140309.
- Fong-Mei Lu, Kevin W. Eliceiri, James Stewart & John G. White (2007) WormClassroom.org: An Inquiry-rich Educational Web Portal for Research Resources of *Caenorhabditis elegans*. *CBE Life Sci Educ*. Summer; 6(2): 98-108
- Gengyo-Ando, K., Kamiya, Y., Yamakawa, A., Kodaira, K. I., Nishiwaki, K., Miwa, J., & Hosono, R. (1993). The *C. elegans* unc-18 gene encodes a protein expressed in motor neurons. *Neuron*, 11(4), 703-711.
- Giménez, C. (2013). Les bases de dades moleculars. Un recurs per a l'ensenyament de la biologia a batxillerat. CB-CAT 21, 4-7. Recuperado de: http://carlosgimenez.info/documents/article_cbcat21.pdf
- Goya, M. E., Romanowski, A., Caldart, C. S., Bénard, C. Y., & Golombek, D. A. (2016). Circadian rhythms identified in *Caenorhabditis elegans* by in vivo long-term monitoring of a bioluminescent reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201605769.
- Greenwald, I. & Kovall, R. (2013) Notch signaling: genetics and structure, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.10.2
- Hagmann, P. (2005). *From diffusion MRI to brain connectomics*. PhD Thesis. École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausana, Suiza.
- Hedgecock, E. M., Sulston, J. E., & Thomson, J. N. (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 220(4603), 1277-1279.
- Herrero, A., Romanowski, A., Meelkop, E., Caldart, C. S., Schoofs, L., & Golombek, D. A. (2015). Pigment-dispersing factor signaling in the circadian system of *Caenorhabditis elegans*. *Genes, Brain and Behavior*, 14(6), 493-501.
- Kaiser, M. (2015). Neuroanatomy: connectome connects fly and mammalian brain networks. *Current Biology*, 25(10), R416-R418.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454), 461-464.
- Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., & Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277(5328), 942-946.
- Kronberg, M. F., Clavijo, A. M., Moya, A., Heredia, O., Pagano, E. A., & Munarriz, E. R. Utilización del nemátodo *Caenorhabditis elegans* en ensayos de toxicidad de muestras de agua.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Leung, M. C., Williams, P. L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K. J., Aschner, M., & Meyer, J. N. (2008). *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological sciences*, 106(1), 5-28.
- Livet, J., Weissman, T. A., Kang, H., Draft, R. W., Lu, J., Bennis, R. A., Sanes, J. R. y Lichtman, J. W. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 450(7166), 56.
- Lichtman, J. W., Sanes, J. R., & Livet, J. (2008). A technicolour approach to the connectome. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(6), 417.
- Migliori, M. L. (2011). Ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA Repositorio Institucional de Acceso Abierto <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/75>
- Migliori, M. L., Simonetta, S. H., Romanowski, A., & Golombek, D. A. (2011). Circadian rhythms in metabolic variables in *Caenorhabditis elegans*. *Physiology & behavior*, 103(3), 315-320.

- Migliori, M. L., Romanowski, A., Simonetta, S. H., Valdez, D., Guido, M., & Golombek, D. A. (2012). Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of pineal research*, 53(1), 38-46.
- Nolla, S., Olivera, R. & Lara, S. (2013) *Monitoreo de calidad de aguas y Educación ambiental no formal en el entorno del Cerp Norte*. Informe de avance, Proyecto de uso de sensores Plan Ceibal. (http://www.dfpd.edu.uy/ceerp/ceerp_norte/cn/Biologia/SN/index.html)
- Pennisi, E. (1998). Worming secrets from the *C. elegans* genome. *Science*, 282(5396), 1972-1974.
- Peterson, R. T., Nass, R., Boyd, W. A., Freedman, J. H., Dong, K., & Narahashi, T. (2008). Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology*, 29(3), 546-555.
- Priess, J. (2005) Notch signaling in the *C. elegans* embryo, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.4.1
- Oh, S. W., Harris, J. A., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., & Mortrud, M. T. (2014). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495), 207.
- Olmedo, M., O'Neill, J. S., Edgar, R. S., Valekunja, U. K., Reddy, A. B., & Merrow, M. (2012). Circadian regulation of olfaction and an evolutionarily conserved, nontranscriptional marker in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), 20479-20484.
- Oren-Suissa, M., Bayer, E. A., y Hobert, O. (2016). Sex-specific pruning of neuronal synapses in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 533 (7602), 206-211.
- Roberts, L. (1990). The worm project. *Science*, 248(4961), 1310-1314.
- Saigusa, T., Ishizaki, S., Watabiki, S., Ishii, N., Tanakadate, A., Tamai, Y., & Hasegawa, K. (2002). Circadian behavioural rhythm in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 12(2), R46-R47.
- Sarabhai, A. S., Stretton, A. O. W., Brenner, S., & Bolle, A. (1964). Co-linearity of the gene with the polypeptide chain. *Nature*, 201(4914), 13-17.
- Simonetta, S. H., Migliori, M. L., Romanowski, A., & Golombek, D. A. (2009). Timing of locomotor activity circadian rhythms in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 4(10), e7571.
- Shaye, D.D. & Greenwald, I. (2011). OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One*, 6(5), e20085.
- Sporns, O., Tononi, G., & Kötter, R. (2005). The human connectome: a structural description of the human brain. *PLoS computational biology*, 1(4), e42.
- Sporns, O. (2013). The human connectome: origins and challenges. *Neuroimage*, 80, 53-61.
- Sulston, J. E. & H. R. Horvitz (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 56: 110-156.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White, y J. N. Thomson (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 100: 64-119.
- Sundaram, M. V. (2013). Canonical RTK-Ras-ERK signaling and related alternative pathways (July 1, 2013), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.80.2.
- Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1(2), 151-173
- Viale, G., Grazioli, C., Fornari, M., Manzotti, P., & Bellora, L. (2013). Bioinformatic Gene Hunting. CusMiBio, Centre of the University and School of Milan for Bioscience Education. Recuperado de: <http://www.cusmibio.uni-mi.it/scaricare/huntbrca2.pdf>
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: the mind of a worm.
- Yanofsky, C. (2007). Establishing the triplet nature of the genetic code. *Cell*, 128(5), 815-818.
- Yin, R. K. (2006). Case study methods. En Green, J. L., Camilli, G. & Elmore, P. B. (Eds.), *Handbook of complementary methods in education research* (pp. 111-122). Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum Associates.

Recibido 31/08/2017 - Aceptado 10/10/2017