

**BECAS** IBEROAMÉRICA

 **Santander**  
UNIVERSIDADES

 **MÁSTER EN  
INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA**  
Escuela de Doctorado  
Universidad de Valladolid



---

# **Universidad de Valladolid**

## **EsDUVa**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

FACULTAD DE MEDICINA: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
y Fisiología.

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

### **Caracterización de las cepas mutantes DA464 y DA1426 como modelo de investigación de enfermedades cardíacas.**

**CARIDAD MARINES RIVERO VAZQUEZ**

Directoras: Dra. Rosalba I Fonteriz García

Dra. Mayte Montero Zoccola

Valladolid, 2021

## Abreviaturas

CGC.....	Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota, USA
<i>C. elegans</i> .....	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CL.....	Bucle citoplasmático
CT.....	Carboxilo terminal
CX40.....	Conexina 40
CX43.....	Conexina 43
CX45.....	Conexina 45
D1.....	Día 1 adulto
D5.....	Día 5 adulto
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
DNC.....	Cordón nervioso dorsal
DRG.....	Ganglio de la raíz dorsal
E1.....	Pico 1 de excitación
E2.....	Pico 2 de excitación
<i>E. coli</i> OP50.....	Cepa de Escherichia coli
ECV.....	Enfermedades cardiovasculares
EFG.....	Electrofaringeograma
EPSP.....	Potencial postsináptico excitatorio
FA.....	Fibrilación auricular
FuDR.....	5-fluoro-2'-desoxiuridina
GAP.....	proteínas activadoras de trifosfatasa de guanosina
GFP.....	Proteína verde fluorescente
HF.....	Head First
IPSPS.....	Potenciales postsinápticos inhibitorios
ISO.....	Isoproterenol
K <sup>+</sup> .....	Potasio
Kv.....	Canal de potasio dependiente de voltaje
L1.....	Estadio larvario 1
L2.....	Estadio larvario 2
L3.....	Estadio larvario 3
L4.....	Estadio larvario 4
LNCJ.....	Lipofuscinosis neuronal ceroida juvenil
M1/S1.....	Dominio transmembrana 1
M4/S4.....	Dominio transmembrana 4
M6/S6.....	Dominio transmembrana 6
NGM.....	Nematode Growth Medium
NT.....	Extremo amino terminal
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
PAG.....	Ganglio preanal
R1.....	Pico 1 de relajación
R2.....	Pico 2 de relajación
RPM.....	Revoluciones por minutos
RVG.....	Ganglio retrovesicular
TF.....	Tail first
U. S. ....	Unidades de superficie
VNC.....	Cordón nervioso ventral

Palabras claves: *Caenorhabditis elegans*, electrofaringeograma, DA464, DA1426, enfermedades cardiovasculares

# Índice

Resumen.....	2
<b>1. Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Enfermedades cardiovasculares.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Etiología de la enfermedad.....	3
1.1.2 Canales de Potasio (K <sup>+</sup> ).....	3
1.1.3 <i>KCNF-1</i> .....	4
1.1.4 <i>GJA5</i> .....	5
<b>1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i>.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Modelo de investigación.....	5
1.2.2 Ciclo de vida y desarrollo.....	6
1.2.3 Sistema Muscular.....	7
1.2.4 Sistema Nervioso.....	7
1.2.5 Faringe.....	8
1.2.5 Potencial de acción faríngeo.....	9
1.2.6 Electrofaringeograma (EFG).....	10
1.2.7 Cepas utilizadas en este estudio.....	10
<b>1.3 Hipótesis.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Objetivos.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>12</b>
2.1 Recursos materiales.....	12
2.2 Cepas.....	12
2.3 Preparación de las placas de agar y el <i>E. coli</i> OP50.....	12
2.4 Preparación de las placas de agar con FuDR.....	13
2.5 Sincronización de huevos.....	13
2.6 Fertilidad.....	14
2.7 Curva de mortalidad.....	14
2.8 Electrofaringeograma.....	15
<b>3. Resultados.....</b>	<b>16</b>
3.1 Comparativa del desarrollo de <i>C. elegans</i> N2, DA464 y DA1426 post eclosión.....	16
3.2 Fertilidad.....	17
3.3 Mortalidad.....	18
3.4 Electrofaringeograma.....	19
<b>4. Discusión.....</b>	<b>25</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>27</b>
Referencia Bibliográficas.....	28
Anexo.....	I

## Resumen

Las enfermedades cardíacas son la principal causa de muerte a nivel mundial y el principal factor de riesgo son las mutaciones genéticas. La fibrilación auricular y el síndrome de LQT, son causados por alteraciones en la conexina 40 y en canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje. Las cepas DA464 y DA1426 de *C. elegans*, permiten el estudio de estas enfermedades respectivamente. En el trabajo de fin de máster se ha estudiado el desarrollo, la fertilidad, la esperanza de vida, las afectaciones del bombeo faríngeo y el efecto de fármacos en el bombeo faríngeo de las cepas mutantes en comparación con la cepa control N2. Los nematodos DA464 tuvieron un desarrollo y una fertilidad similar al control, sin embargo, son más pequeños y la esperanza de vida es un 24% menor que el control. No presentaron alteraciones en el bombeo faríngeo y el tratamiento con isoproterenol 100 µM empeora el fenotipo. La cepa DA1426 presentó un desarrollo más lento respecto al control y son más pequeños. La tasa de reproducción de la cepa mutante fue menor en los 3 primeros días, comparada con la de los N2 y la esperanza de vida es un 9% menor que la cepa control. Los nematodos DA1426 presentaron marcadas diferencias en el bombeo faríngeo y el tratamiento con isoproterenol 100 µM no rescata el fenotipo.

## Abstract

Heart diseases are the leading cause of death worldwide and the main risk factor is genetic mutations. Atrial fibrillation and LQT syndrome are caused by alterations in connexin 40 and voltage-gated K<sup>+</sup> channels. The *C. elegans* strains DA464 and DA1426 allow studying both diseases, respectively. In this master's dissertation, the development, fertility, life expectancy, and alterations, the effects of drugs on pharyngeal pumping of the mutant strains have been studied and compared to the control strain N2. The DA464 nematodes presented a similar development and fertility compared to the control; nevertheless, they were smaller and the life expectancy was 24% less than the control. They did not present alterations in pharyngeal pumping and treatment with 100 µM isoproterenol worsens the phenotype. On the other hand, the DA1426 strain showed a slower development compared to the control, and they were smaller. The reproduction rate of the mutant strain was lower than the one presented by the N2 strain during the first 3 days. Moreover, the life expectancy was 9% lower than the control strain. DA1426 nematodes showed remarkable differences in pharyngeal pumping and treatment with 100 µM isoproterenol did not rescue the phenotype.

# 1. Introducción

## 1.1 Enfermedades cardiovasculares

### 1.1.1 Etiología de la enfermedad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las enfermedades cardiovasculares (ECV) como un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Las ECV son enfermedades crónicas que a lo largo de los años evolucionan gradualmente. Durante mucho tiempo éstas son asintomáticas y los primeros síntomas aparecen cuando la enfermedad está avanzada, aunque en algunos casos la muerte súbita puede ser el primer síntoma (1).

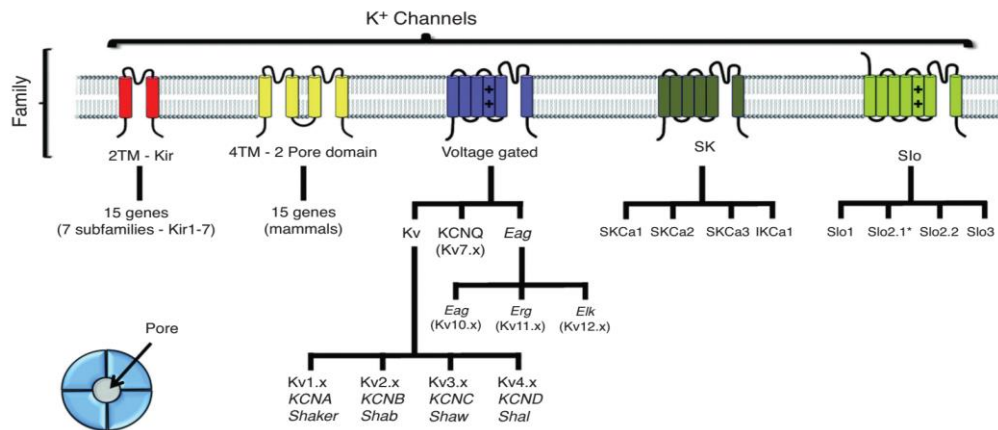
La principal causa de defunción a nivel mundial son las ECV, responsables del 16% del total de muertes en el mundo (2). En 2017, constituyen la principal causa de muerte en España con un 29%, teniendo una incidencia de 263 personas por cada 100.000 habitantes (3). Se estima que para el 2030, 23,6 millones de personas morirán por ECV, con una tendencia a disminuir la mortalidad y la incidencia en el sur de Europa. (4).

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia cardíaca sostenida más común, se caracteriza por actividades eléctricas rápidas y erráticas en el miocardio auricular. Esto provoca un deterioro de la contractilidad de las aurículas promoviendo la formación de coágulos y apoplejía trombótica (5). Existen factores genéticos que juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad, tal es el caso de genes que codifican para proteínas estructurales, factores de transcripción, uniones de proteínas activadoras de trifosfatasa de guanosina (GAP), entre otros. Los canales de unión GAP se localizan en los miocitos y son los encargados de la rápida propagación de los potenciales de acción en el miocardio auricular (6). Las proteínas de unión GAP que se localiza en las aurículas cardíacas son la conexina 40 (CX40), la conexina 43 (CX43) y la 45 (Cx45), las dos primeras se expresan en los miocitos auriculares (7) y permiten la formación de las uniones GAP. La mutación en cualquiera de las dos proteínas, provoca que el potencial de acción se propague más lento y que haya una mayor vulnerabilidad a las arritmias producidas en las aurículas (6).

El síndrome de QT largo (LQT), se define por ser una enfermedad autosómica recesiva hereditaria caracterizado por trastornos heterogéneos electrofisiológicos cardíacos. Esta anomalía se manifiesta en el electrocardiograma como una prolongación del intervalo QT y existe una repolarización retardada del potencial de acción de los cardiomiocitos. Una de las principales causas de esta enfermedad es la presencia de mutaciones en canales de potasio dependientes de voltaje (8).

### 1.1.2 Canales de Potasio (K<sup>+</sup>)

Los canales de K<sup>+</sup> comenzaron a evolucionar desde que comenzó la vida y se encuentran en casi todas las células vivas, incluyendo las bacterias (9). Las principales funciones de estos canales son: el establecimiento del potencial de membrana, la participación en la actividad eléctrica y dinámica de las neuronas, en la modulación de la respuesta inmune y en el control de la función intestinal (10). Sus diversas funciones son posibles debido a su gran diversidad, que incluye 12 familias bien conservadas como se muestra en la Figura 1. La principal característica entre todas las familias es que presentan una secuencia conservada denominada dominio P que forma el filtro selectivo de K<sup>+</sup> (11). Los canales de K<sup>+</sup> tienen una estructura simétrica o semi-simétrica y requieren 4 dominios P por canal.



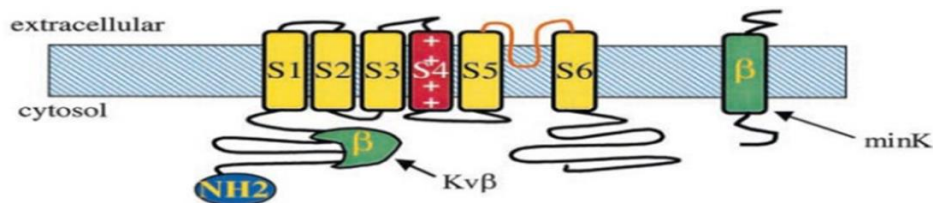
**Figura 1:** Familias de canales de  $K^+$  (9).

Los canales de  $K^+$  activados por voltaje son la clase más numerosa de canales con 6 hélices transmembrana. Esta familia está compuesta por 36 genes, que se encuentran divididos en dos tipos de miembros: estructurales y funcionales. Los estructurales están compuestos por los Kv: KCNA (Familia Kv1), KCNB (Kv2), KCNC (Kv3), KCND (Kv4), KCNQ (Kv7), KCNH (Kv10, Kv11, Kv12, EAG y ERG). Los miembros funcionales son los modificadores de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje: KCNF (Kv5), KCNG (Kv6), KCNV (Kv8) y KCNS (Kv9) (9).

En el nematodo se expresan 70 genes que codifican canales de potasio, de los más de 19.000 genes del genoma. Este número de genes es elevado para un animal con un pequeño sistema nervioso de tan solo 302 neuronas. Muchos de estos canales se expresan no solo en neuronas sino también en otros tipos de células (10).

### 1.1.3 KCNF-1

El gen *kcnf-1* se expresa en humanos, se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 2 y codifica para proteínas de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv). En la Figura 2 se muestra la estructura de la proteína, que está formada por seis dominios transmembranas (S1-S6). El S4 es característico de los canales dependientes de voltaje ya que forma parte del sensor de voltaje, muestra seis residuos cargados positivamente y presenta un residuo hidrofóbico H5 que entra y sale de la membrana desde el exterior. El lazo S5 y S6 tienen la secuencia típica de un canal iónico selectivo de potasio (14). Este gen es un ortólogo del gen *exp-2* expresado en *C. elegans*.



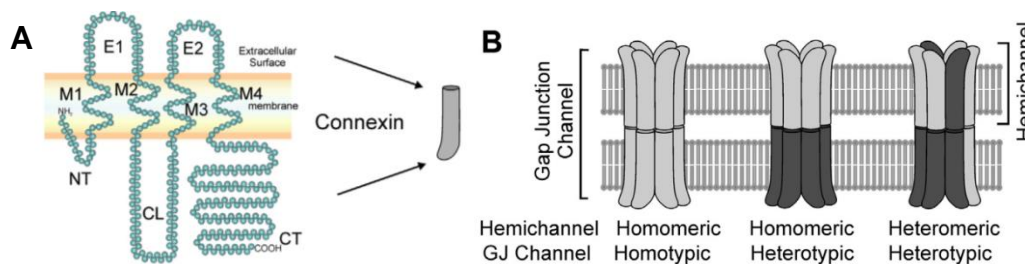
**Figura 2:** Estructura de *kcnf-1*. Figura modificada de Tamargo, 2003 (15).

El *exp-2* al igual que *kcnf-1*, codifica para una subunidad Kv que actúa como un rectificador anómalo, que tiene propiedades anómalas. La cinética de este canal es claramente diferente a la de la familia Kv, donde se muestra una activación dependiente de voltaje relativamente rápida. Sin embargo, en *exp-2* se observa una activación más lenta y una rápida inactivación al finalizar la fase de meseta (13, 16). Estas propiedades

cinéticas hacen que este canal se asemeje al canal HERG aunque estructuralmente no estén relacionados, estas evidencias indican que el mecanismo de rectificación hacia adentro ha evolucionado de forma independiente en dos canales con la misma función pero estructuralmente diferentes (16, 17).

#### 1.1.4 GJA5

El gen *gja5* se expresa en humanos y se encuentra localizado en el cromosoma 1 y la proteína codificada es la CX40, que es un componente de las uniones GAP. En la Figura 3 se muestra la estructura de la conexina, que está formada por cuatro dominios transmembrana (M1-M4), dos dominios extracelulares (E1-E2), un bucle citoplasmático (CL), el extremo amino terminal (NT) y el extremo carboxilo terminal (CT). Seis conexinas idénticas o diferentes se oligomerizan para formar los hemicanales, que se unen y forman las uniones GAP (18, 19). La CX40 está formada por hemicanales heteroméricos, dando lugar a uniones GAP heterotípicas (20).



**Figura 3:** A: Topología de la conexina en la membrana plasmática. B: Canales de uniones GAP y su nomenclatura (20).

Este gen se expresa en células endoteliales, en células vasculares del músculo liso coronario, en los cardiomiocitos auriculares y en el sistema de conducción cardíaca (21). Los polimorfismos en CX40 afectan la expresión de conexina o la función del canal de unión GAP, aumentando la susceptibilidad a la fibrilación auricular (FA) (22). También, se han relacionado con la FA las mutaciones somáticas y de la línea germinal dentro de las regiones codificantes del gen CX40 (23). A pesar de que este gen no se encuentra conservado en *C. elegans*, esta enfermedad se puede estudiar en este modelo animal. Esto es debido a que en *C. elegans* se expresa el gen *eat-5*, donde los polipéptidos codificados son componentes estructurales de uniones GAP, análogas a las conexinas de vertebrados (24).

## 1.2 *Caenorhabditis elegans*

### 1.2.1 Modelo de investigación

El *Caenorhabditis elegans*, es un nematodo de vida libre que en la década de los 60 fue establecido por Sydney Brenner como un modelo animal en la investigación (25). Debido a la secuenciación completa de su genoma en 1998 (26) y a que presenta proteínas, genes y vías homologas con el ser humano, es un modelo de investigación que se utiliza en diferentes campos como: la genética, la toxicología y la neurociencia entre otros (27).

Las características bioquímicas y biológicas del nematodo le permiten estar en ventaja respecto a otros modelos de animales. Dentro de éstas destacan el corto tiempo de reproducción y de vida, 3 días y 3 semanas respectivamente, la temperatura a la que se desarrolla (20 °C), la capacidad de autofecundación, la longitud del cuerpo (1 mm), la facilidad de mantenimiento en el laboratorio y la dieta con *E. coli* OP50 (28). La transparencia de su cuerpo permite el uso de proteínas fluorescentes en estudios “in vivo”, facilitando la identificación de mutaciones, o la detección de los niveles de  $Ca^{2+}$  en las neuronas, entre otros. También, presentan dimorfismo sexual donde el 99% son

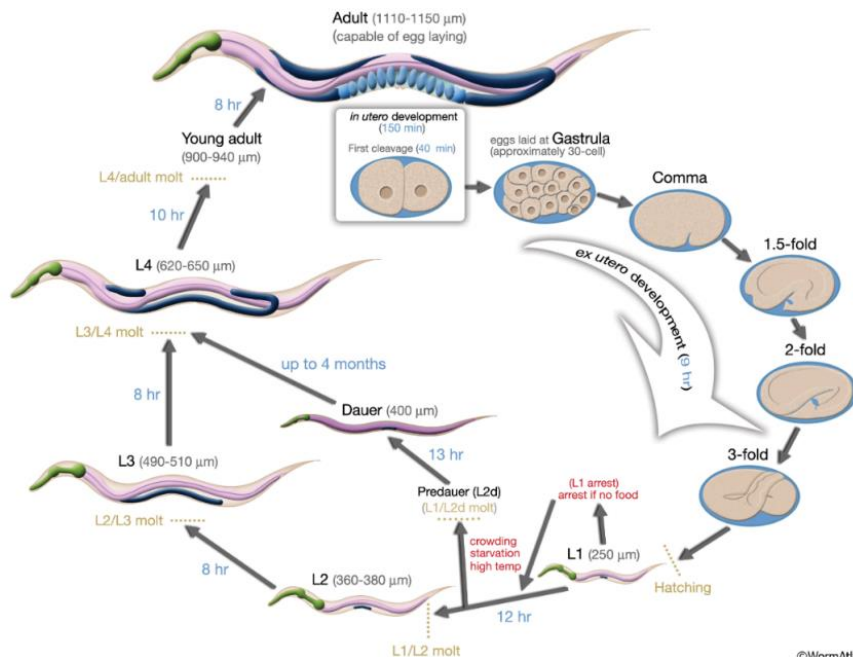
hermafroditas y el 1% machos y su gran capacidad de reproducción (200-300 huevos) permiten la producción de individuos a gran escala en un corto período de tiempo (29).

### 1.2.2 Ciclo de vida y desarrollo

El ciclo de desarrollo de *C. elegans* comienza por la embriogénesis con un tiempo de 16 horas seguido de cuatro fases larvárias. Durante la embriogénesis el huevo está cubierto por una capa impermeable que permite al embrión su desarrollo independiente de la madre y que consta de 24 células (29). Las cuatro fases larvárias que van desde L1 hasta L4, se diferencian fácilmente debido a sus características. El paso de una fase a otra está determinado por un período de inactividad o letargo en el que se reemplaza la cutícula vieja por una nueva (Figura 4) (30):

- Fase L1: Se caracteriza por tener una longitud de 250  $\mu\text{m}$  y un tiempo de duración de aproximadamente 12 horas. Debido a su pequeño tamaño no se pueden identificar los órganos.
- Fase L2: Tiene un tamaño de 360  $\mu\text{m}$  aproximadamente, tienen una mayor complejidad interna, con un tiempo de duración de 8 horas aproximadamente.
- Fase L3: Presentan un tamaño de 500  $\mu\text{m}$  aproximadamente con un tiempo de duración de 8 horas. En esta etapa las estructuras internas presentan una alta diferenciación.
- Fase L4: Tienen un tamaño de aproximadamente 650  $\mu\text{m}$ , se caracteriza por presentar una media luna blanca a mitad del cuerpo. El tiempo de duración es de 10 horas aproximadamente.

Posterior a las fases larvárias, el nematodo sigue desarrollándose hasta llegar a adulto pasando previamente por adulto joven. En estado adulto es donde alcanza su mayor tamaño llegando a medir aproximadamente 1 mm. Una característica relevante del nematodo es que durante la fase larvaria L1 si hay situaciones de estrés como altas temperaturas o falta de alimento, el *C. elegans* pasa a un estado Dauer. Es un estado de resistencia en que el tamaño del cuerpo y la movilidad se encuentran disminuidos, además tienen una cutícula diferente. Esta fase le brinda resistencia durante aproximadamente 4 meses. Una vez que se reanudan las condiciones normales pasa a la fase larvaria 4 y continúa hacia adulto joven (31).



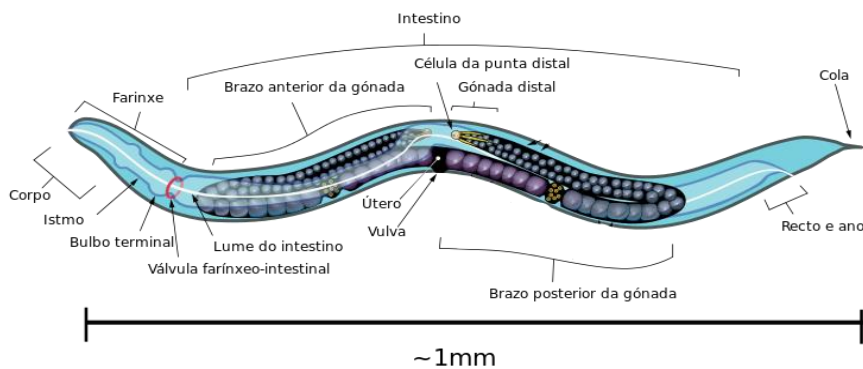
**Figura 4:** Representación del ciclo de vida del *C. elegans* (32).



### 1.2.3 Sistema Muscular

El *C. elegans* está formado por tejidos bien definidos como los músculos estriados y no estriados (Figura 5). Los músculos no estriados están formados por un músculo depresor anal, un esfínter anal, 2 músculos estomatointestinales, 8 músculos vulvares y uterinos, 10 células de la vaina gonadal contráctil y 20 células musculares faríngeas (33).

Sin embargo, se han llevado a cabo la mayoría de los estudios en los músculos estriados. Está formado por 95 células musculares de la pared del cuerpo, y es equivalente al músculo esquelético en los vertebrados. Estos músculos forman tubos concéntricos donde la capa más externa es la epidermis y en ella se encuentran las bandas de músculos que controlan el movimiento. La contracción y relajación de las células musculares conducen a un movimiento sinusoidal (33, 34).

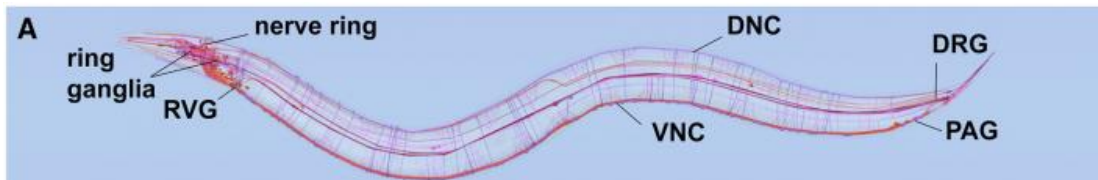


**Figura 5:** Músculos principales del *C. elegans* (35).

### 1.2.4 Sistema Nervioso

El sistema nervioso de los nematodos está bien caracterizado y es funcional y estructuralmente similar al de los humanos. Estas características hacen que sea el modelo preferido para estudios de toxicidad del desarrollo neurológico (36). Está formado por 302 neuronas en hermafroditas adultos y 384 en el adulto macho, a su vez se encuentra dividido en 56 células gliales y 118 clases morfológicamente diferentes (37). Además, es el único organismo en que se ha determinado todas las neuronas y las principales interacciones entre ellas están bien caracterizadas (38).

Los cuerpos celulares de las neuronas se localizan en: unos ganglios en la cabeza, en el cordón ventral y en la cola (29). Las sinapsis de las neuritas se establecen en cuatro áreas: el anillo nervioso (rodea la faringe), el cordón nervioso ventral (VNC), el cordón nervioso dorsal (DNC) y el neuropilo de la cola, como se muestra en la Figura 6 (39).



**Figura 6:** Anatomía del sistema nervioso de *C. elegans*, donde se identifican los principales nervios y ganglios. Los principales tractos nerviosos incluyen el VNC, DNC y el anillo nervioso. Los ganglios principales incluyen el ganglio anular, el ganglio retrovesicular (RVG), el ganglio preanal (PAG) y el ganglio de la raíz dorsal (DRG). Imagen modificada de Corsi et al., 2015 (29).

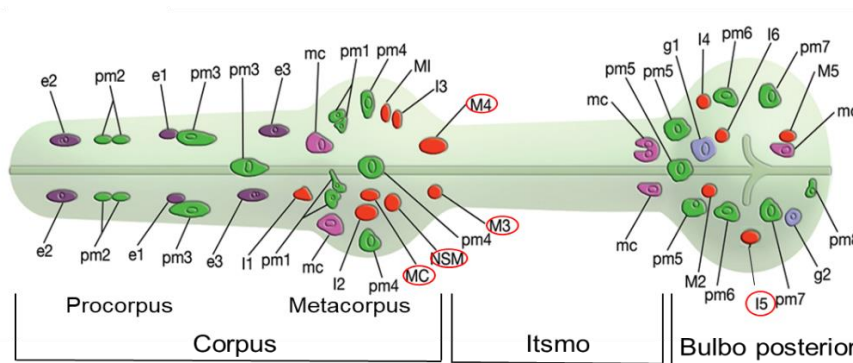
El genoma del nematodo se caracteriza por carecer de genes que codifican para canales de sodio dependientes de voltaje (38), por lo que en las neuronas es característico no encontrar potenciales de acción dependientes de sodio (40). No obstante, se han identificado corrientes de potasio y de calcio sensibles a voltaje y a pesar de que las

neuronas carecen de canales de sodio dependientes de voltaje éstas señalizan adecuadamente (41).

### 1.2.5 Faringe

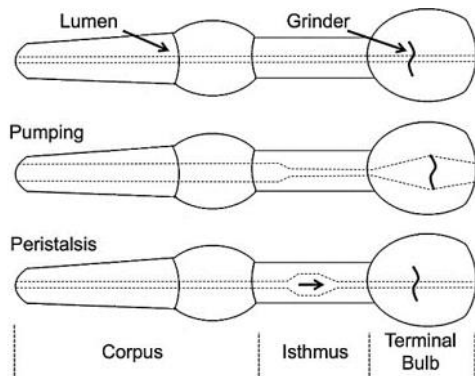
La faringe está formada por 95 células que se dividen en siete tipos distintos, su anatomía se encuentra muy detallada gracias a los estudios ultraestructurales de Donna Allbertson (42). Es un órgano neuromuscular lineal bilobulado que va desde la boca hasta el intestino y se encuentra rodeado por una membrana basal. Este órgano está dividido en tres secciones, de anterior a posterior: el procorpus y metacorpus que forman el corpus, el istmo y el bulbo terminal como se muestra en la Figura 7 (43).

El nematodo se alimenta mediante el bombeo faríngeo y el peristaltismo del istmo. El bombeo faríngeo es una contracción rítmica del cuerpo, el istmo anterior y el bulbo terminal, seguida de una relajación (44). El mismo se encuentra regulado intrínsecamente por las motoneuronas MC y M3, M4, I5 y NSM y extrínsecamente por las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP) que conecta el circuito faríngeo con el sistema nervioso (Figura 7) (45). El peristaltismo del istmo es una onda peristáltica de relajación del istmo posterior que se produce después de completada la relajación principal, y ocurre cada cuatro bombeos (44).



**Figura 7: A: Estructura y neuronas faríngeas. Imagen modificada del Worm Atlas.**

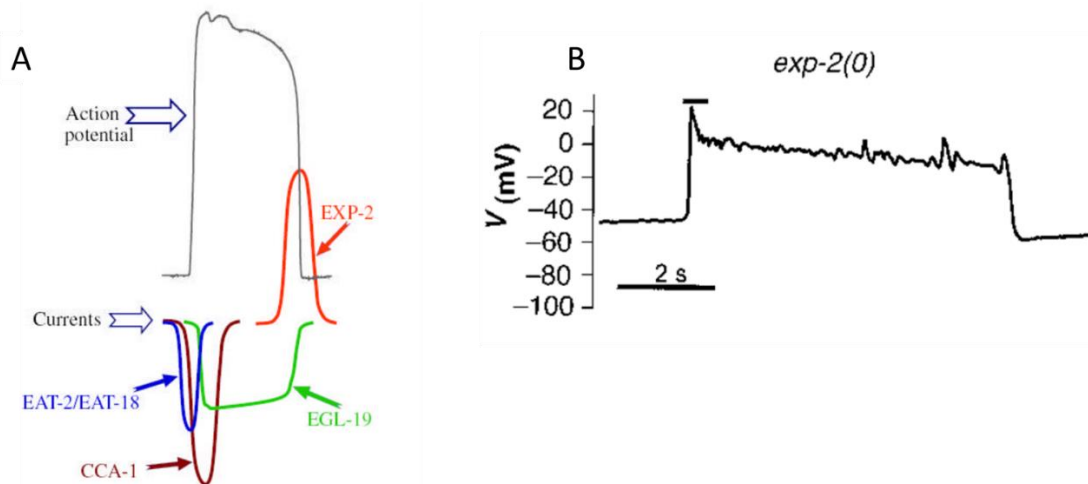
En la Figura 8 se muestra cómo el bombeo faríngeo comienza con la contracción casi simultánea del cuerpo y el bulbo terminal, que atrae el alimento bacteriano a la luz faríngea, seguida de la contracción del istmo anterior. Posteriormente, estos músculos comienzan a relajarse empezando por la boca, así se evita que la comida retroceda. El cuerpo se relaja antes que el istmo, permitiendo que las bacterias se queden en el istmo anterior (46, 47). La contracción de los músculos de la faringe se desarrolla en tiempos ligeramente diferentes, esto permite el transporte efectivo de los alimentos hasta el intestino (48). Las contracciones de propagación del istmo posterior conocidas como peristalsis, permiten que las bacterias sean transportadas desde el istmo anterior al bulbo terminal. En el bulbo terminal se encuentra el triturador o “grinder”, que son tres placas cuticulares que trituran las bacterias y así su contenido es impulsado al intestino (49).



**Figura 8:** Movimientos que realiza la faringe de *C. elegans* (50).

### 1.2.5 Potencial de acción faríngeo

El potencial de acción en la faringe de *C. elegans* comienza con una activación de la neurona MC que, a través de los receptores nicotínicos de acetilcolina *eat-2/eat-18*, provoca un potencial postsináptico excitatorio (EPSP) entre +20 y +30 mV. La despolarización desencadena la activación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T *cca-1*, dando lugar a una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que se inactiva rápidamente y que conduce a una rápida despolarización. La activación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L *egl-19* a los +10mV permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  despolarizando aún más la faringe, provocando la contracción de la misma y manteniendo la despolarización durante la fase de meseta. Mientras que *egl-9* se inactiva lentamente debido a una dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la membrana se va repolarizando. La activación de la neurona M3 durante la contracción provoca potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSP), que a través del canal *avr-15*, acelera la repolarización. Una vez que se alcanza el umbral para la recuperación de *exp-2* de la inactivación, se genera una corriente de salida que provoca una rápida repolarización de la membrana y la finalización del potencial de acción (Figura 9) (12). Mutaciones específicas en las proteínas que regulan el potencial de acción faríngeo traen consigo modificaciones en el mismo. Específicamente, una mutación en *exp-2* con pérdida de función conlleva a un aumento de la duración del potencial de acción (Figura 9) (13).



**Figura 9:** Modelo de un potencial de acción faríngeo. A: Potencial de acción faríngeo de la cepa control N2. B: Potencial de acción faríngeo de la cepa mutante *exp-2* con pérdida de función. Imagen modificada de Shtonoda B, 2005 y Davis M, 1999 (12, 13).

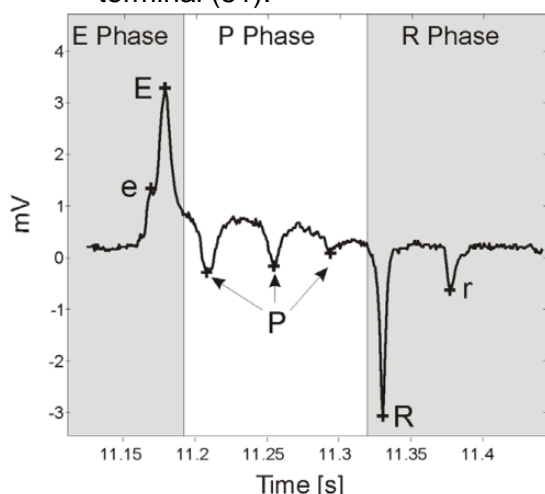
### 1.2.6 Electrofaringeograma (EFG)

La faringe de los nematodos se establece como un sistema modelo para el estudio de las redes neuronales, tanto por su simplicidad como por su facilidad para el análisis conductual y eléctrico (51). Este órgano es, en ciertos aspectos, similar al corazón de los vertebrados e invertebrados. Ambos están formados por células musculares que generan un bombeo a lo largo de toda la vida (50). El bombeo faríngeo es regulado por las neuronas motoras faríngeas que dirigen la contracción y relajación sincrónica de las células musculares faríngeas. Las motoneuronas MC y M3 controlan la faringe, MC actúa como marcapaso, regulando la rápida activación de la frecuencia de bombeo y M3 libera glutamato facilitando la relajación.

Durante el bombeo del músculo faríngeo se puede medir la actividad eléctrica mediante el EFG, que da información detallada sobre las características de este proceso (51). Existen varios métodos de registrar un EFG, uno de ellos es a través del sistema Nemamatrix, que contiene una cámara Screenchip que posee electrodos externos que detectan el cambio de voltaje debido al intercambio de iones subyacentes al potencial de acción faríngeo (37).

En la Figura 10 se representa un registro de EFG de un solo bombeo faríngeo, que se compone de tres fases:

- Fase E: representa la fase de excitación, constituida por dos picos que se corresponden con la contracción de la faringe (52). El primer pico pequeño E1 (en la figura e+) describe la actividad de la motoneurona MC y el segundo pico E2 (en la Figura 7 E+), más grande que el primero, corresponde a la despolarización del músculo (51).
- Fase P: corresponde a una fase de meseta, que está formada por tres picos negativos. Esto indica la despolarización y contracción del músculo mediado por la activación de la motoneurona M3 que libera glutamato (51).
- Fase R: corresponde a la fase de relajación, que está caracterizada por la presencia de dos picos negativos. El primer pico grande R1 (en la figura R+) está asociado a la relajación y repolarización del corpus y el segundo pico, más pequeño que el primero corresponde a la repolarización del músculo del bulbo terminal (51).



**Figura 10:** Señal típica de un EFG, donde se muestran las tres fases (53).

### 1.2.7 Cepas utilizadas en este estudio

La cepa DA464 de *C. elegans* presenta una mutación en el gen *eat-5*, que se caracteriza por contracciones no sincronizadas del corpus y del bulbo terminal. Esta característica está determinada por proteínas que se expresan en las células musculares faríngeas.

Las mismas forman parte de las uniones GAP que son necesarias para la contracción y el acoplamiento eléctrico entre diferentes partes de la faringe (24).

Un rasgo significativo de la cepa DA464 es que la restricción calórica debido a la asincronía de las contracciones no afecta a la esperanza de vida de los nematodos, aunque se desconoce el mecanismo por el que esta mutación no alarga la vida. Sin embargo, es posible que el defecto en la alimentación que provoca la mutación, no sea lo suficientemente importante como para afectar a la duración de la vida (54).

La otra cepa que se ha utilizado en este trabajo es la DA1426 que presenta una mutación heterocigótica recesiva de pérdida de función en el gen *exp-2*. Dicha mutación se caracteriza por una deleción de toda la hélice transmembrana S5, que pierde el filtro de selectividad de K<sup>+</sup> en el lado correcto de la membrana(13). El *exp-2* está involucrado en la duración y forma del potencial de acción, concretamente en el aumento del mismo hasta 6 s (12).

Estos nematodos se identifican por tener movimiento de cabezas hiperactivos y problemas en la expulsión y puesta de huevos. Además, los picos E del EFG están muy reducidos y hay bombeos largos (12). Este gen se expresa en los músculos faríngeos, músculos entéricos y neuronas sensoriales en los ganglios de la cabeza y la cola (10).

### 1.3 Hipótesis

La revisión bibliográfica sobre mutaciones en *C. elegans* que provoquen enfermedades cardiovasculares, destaca que el síndrome LQT y la FA son causados por mutaciones en los genes *exp-2* y *eat-5*, respectivamente (23). El estudio de dichas cepas permite realizar una aproximación a la fisiopatología de estas dos enfermedades en humanos.

### 1.4 Objetivos

**General:** El objetivo general de este estudio es ver las principales diferencias que existen entre las cepas de estudio DA464 y DA1426 respecto a la cepa control N2.

**Específicos:** Para poder abordar el objetivo general se han planteados los siguientes objetivos específicos:

- Estudio del desarrollo.
- Estudio de la fertilidad.
- Determinación de la esperanza de vida.
- Estudio de las alteraciones en el bombeo faríngeo
- Estudio de efectos de fármacos en el bombeo faríngeo.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Recursos materiales

#### Reactivos:

10% Tween 20, Bio-Rad (16624040)

Agar, Calbiochen (12177-1Kg)

Agarosa de alta gelificación (imagen), Fisher (BP 164-100)

Agua desionizada

Clorhidrato de serotonina, Alfa-Aesar (B21263)

Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), Merck (A935182914)

Cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ), EMSURE (K49437804743)

Colesterol, SIGMA-Aldrich (C8503-25G)

Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Sigma-Aldrich (S0876-1KG)

Fosfato de hidrógeno dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), MERCK (A0026704927)

Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Sigma-Aldrich (P5655-500G)

FuDR (5'-fluoro-2'-deoxiuridina), Sigma

Hidróxido de sodio, Merck (B794198108)

Isoproterenol, Sigma, (105H0224)

Lejía comercial, 40g/L hipoclorito de sodio

Peptona bacteriológica, PRONADISA (1616,00)

Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ), Sigma-Aldrich (M2643-500G)

Tampón M9, se añaden los siguientes reactivos a una concentración final de:

- $\text{NaCl}$  0,085 mM
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02 mM
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,04 mM
- $\text{MgSO}_4$  1 mM
- 1 L agua desionizada

Tampón Fosfato 1M, se añaden los siguientes reactivos a una concentración final de:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,80 mM
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,20 mM
- 1 L agua desionizada

#### Materiales:

Pipeta Pasteur de vidrio 230-250, Deltalab (81901)

Placas de Petri 90 mm  $\varnothing$  y 35 mm  $\varnothing$ , Deltalab (200201)

ScreenChip40/ ScreenChip60, NemaMetrix (SCC40/SCC60)

Pipetas estériles 5, 25 y 50 mL, Coster (18619001)

### 2.2 Cepas

Para el desarrollo del estudio realizado en el presente trabajo se han utilizado tres líneas de *C. elegans*, dos líneas mutantes (DA464 y DA1426) proporcionadas por el Caenorhabditis Genetics Center (CGC), Massachuset, USA y la línea de control N2-Bristol.

### 2.3 Preparación de las placas de agar y el *E. coli* OP50

El medio óptimo para el crecimiento de los nematodos son las placas de agar NGM (Nematode Grow Medium), sembradas con *E. coli* OP50 que es el alimento de los

mismos. Estas placas se conservan a 20°C que es la temperatura óptima para el crecimiento del nematodo (55).

Para la preparación de las placas de agar se realiza el siguiente protocolo:

1. En botellas de 500 mL se añaden los siguientes reactivos a una concentración final de:
  - NaCl 51,3 mM
  - Agar 8,5 g/L
  - Peptona bacteriológica 1,3 g/L
2. Se disuelven en 250 mL de agua desionizada.
3. La disolución se esteriliza en una autoclave a 120°C durante dos horas aproximadamente.
4. Se baja la temperatura a 60°C en baño María durante 15 minutos como mínimo.
5. En un ambiente aséptico, a cada botella se añade los siguientes reactivos a una concentración final de:
  - Disolución colesterol/etanol 0,005 mg/mL
  - CaCl<sub>2</sub> 1 mM
  - MgSO<sub>4</sub> 1 mM
  - Tampón fosfato 25 mM
6. La preparación se agita y se añade 10 mL de la misma en placas de Petri de 90 mm ø (placas de mantenimiento).
7. Se deja solidificar durante 24 horas en un ambiente aséptico.
8. Una vez solidificado, se añade 250 µL de *E. coli* OP50 en el medio de la placa.

#### **Preparación del *E. coli* OP50:**

1. En la cabina de flujo laminar en un tubo de cultivo se añade entre 2 y 4 mL de medio de cultivo 2xYT.
2. Con una micropipeta se toma una colonia de *E.coli*.
3. La colonia se resuspende en el medio de cultivo.
4. Durante 24 horas y a 37 °C se cultivan en el agitador a 255 RPM.
5. El volumen contenido en el tubo de cultivo se pasa a un frasco de 100 mL que contienen aproximadamente 50mL de medio de cultivo 2xYT.

#### **2.4 Preparación de las placas de agar con FuDR**

Para poder desarrollar los ensayos de mortalidad y EFG, es necesario que los nematodos se encuentren en el mismo estadio de desarrollo, es decir que estén sincronizados. Debido a la rápida reproducción y desarrollo de los mismos es muy difícil diferenciar entre el adulto y la progenie. El FuDR es un inhibidor de la timidilato sintasa que detiene la síntesis de ADN, bloqueando la división celular de los huevos que pongan los adultos, sin afectar a los adultos ya que el FuDR no afecta a las células ya divididas (56). La preparación de las placas de agar con FuDR siguen el mismo protocolo que la preparación de las placas de agar NGM, la diferencia radica en los pasos 5 y 6:

5. Además de añadir todos los reactivos una vez que está esterilizado el medio, se añade FuDR para tener una concentración de 15 µM.
6. La preparación se agita y se transfiere 4 mL de la misma a placas de Petri de 35 mm ø (placas de mortalidad).

#### **2.5 Sincronización de huevos**

Para los ensayos que se van a realizar es necesario tener muchos nematodos que tengan los mismos días de vida. Para ello se realiza una sincronización de huevos por

tratamiento con lejía/NaOH. Los gusanos adultos son degradados por la lejía/NaOH pero los huevos resisten este tratamiento. El protocolo es el siguiente:

1. Se seleccionan las placas con gusanos adultos debido a que retienen los huevos en su interior cuando no hay comida.
2. A las placas seleccionadas se añaden 2 mL de tampón M9.
3. Los nematodos son recogidos con una pipeta Pasteur de vidrio y se depositan en un eppendorf.
4. Se centrifuga a 2000 rpm x 1 minuto.
5. Se retira el sobrenadante dejando 100 µL aproximadamente.
6. El sedimento se resuspende con:
  - 150 µL de una disolución de NaOH 5 mM/lejía comercial (2:1) (la disolución tiene que ser fresca)
  - 250 µL de tampón M9
7. Cada 2 minutos y durante 10 minutos, se agita 20 segundos el eppendorf en el vórtex. Al finalizar, debe quedar una mezcla homogénea debido a la rotura de los nematodos.
8. Se centrifuga a 8000 rpm x 1 minuto
9. Se retira el sobrenadante dejando aproximadamente 100 µL.
10. Se añade 1 mL de tampón M9, se resuspende el sedimento en el vórtex.
11. Se centrifuga a 8000 rpm x 1 minuto.
12. Se retira el sobrenadante dejando aproximadamente 100 µL.
13. El sedimento se resuspende bien y con ayuda de la lupa se añaden las gotas necesarias en las placas de NGM sembradas con *E. coli* OP50.
14. Se deja secar y posteriormente se introduce la placa en la incubadora a 20°C, en posición invertida.

## 2.6 Fertilidad

Los estudios de fertilidad se realizan tanto en las líneas mutantes como en el control de *C. elegans*. En placas de mantenimiento se transfiere 1 nematodo en el estadio L4 (se caracteriza por presentar la media luna en la mitad del gusano), esto se realiza en 5 placas por línea de *C. elegans*.

Durante 5 días consecutivos, los nematodos se van cambiando a placas nuevas, siguiendo el mismo patrón de 1 nematodo por placa. Tanto las placas nuevas como las precedentes, se mantienen a una temperatura de 20°C. Las larvas de cada placa que vienen de los huevos puestos por un solo gusano se cuentan y se anotan en una plantilla. A los datos obtenidos se les realiza un test ANOVA y se obtienen las curvas de fertilidad con el programa SPSS.

## 2.7 Curva de mortalidad

Se estimó la esperanza de vida de los distintos nematodos desde día 1 adulto (D1) hasta la muerte. Para realizar este ensayo es necesario previamente haber sincronizados los nematodos. Para cada curva de mortalidad se utilizan 10 placas de mortalidad (35 mm ø, 15 µM FuDR) por cepa y se realiza el siguiente protocolo:

1. Se pican entre 10-15 nematodos en estadio joven adulto de día 1 (D1) y se transfieren a las placas de mortalidad.
2. Las placas se incuban a 20°C.
3. Los nematodos se cuentan todos los días hasta que se mueren, anotando en una plantilla vivos, muertos y censurados (gusanos que se van de la placa o tienen protusión de vulva). Se considera un nematodo muerto cuando deja de



mover la cabeza y se encuentra estático en posición de media luna o en forma de palillo. Cuando mueren se retiran de la placa.

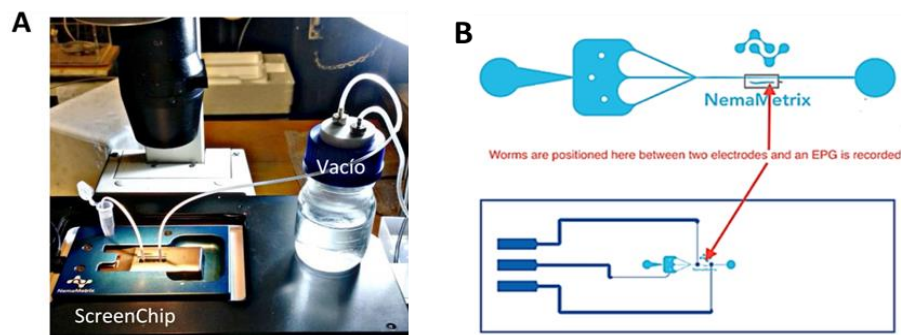
Los datos se introducen en el programa Origin 8.5, se realiza la prueba de Kaplan-Meier y Log Rank obteniéndose las curvas de mortalidad en el programa SPSS.

## 2.8 Electrofaringeograma

Los EFGs se han realizado con nematodos adultos a día 5 (D5) para todas las condiciones. Previamente, se sincronizan los huevos y una vez que estén en estadio adulto de día 1, D1, se pasan a placas de mortalidad, evitando así la contaminación con las larvas.

Para realizar el EFG se realiza el siguiente protocolo:

1. En la placa con nematodo adultos D5, se adiciona 1 mL de Tampón M9 + Tween 0,1 % (elimina las bacterias que puede haber en las placas).
2. Los nematodos se recogen con una pipeta pasteur de vidrio y se depositan en un eppendorf dejando reposar hasta que se forme el sedimento.
3. Se retira el sobrenadante con cuidado para mantener en el eppendorf los nematodos.
4. Se añade 1 mL de tampón M9, se voltea 10 veces y se deja reposar hasta que formen un sedimento
5. El sobrenadante es retirado con cuidado y se realizan otros 3 lavados con tampón M9.
6. Se retira el sobrenadante con cuidado y se adiciona 1 mL de la disolución de Serotonina 2,3 mM en tampón M9. La serotonina es un activador del bombeo endógeno de la faringe (57).
7. Se voltea 10 veces, se deja que forme el sedimento y se retira el sobrenadante.
8. Se añade 1 mL de la disolución Serotonina 2,3 mM en tampón M9 y se deja reposar durante 15 minutos.
9. Los nematodos se introducen en la cámara ScreenChip Cartidge de Namametrix, con la ayuda de una bomba de vacío, que se coloca sobre un microscopio invertido (Figura 11).



**Figura 11.** Montaje del equipo para realizar los EFG. A: se muestra el momento de meter los gusanos en la ScreenChip, mediante una bomba de vacío. B: se muestra una imagen de la ScreenChip, donde se puede observar el capilar donde debe estar el gusano para realizar la medida

10. Los EFG se registran en el programa NemAcquire y para cada nematodo se realiza un registro del bombeo faríngeo de 3 minutos. Es importante saber la posición del nematodo en la cámara ya que cambian los registros obtenidos si está de cabeza o de cola.
11. Los nematodos se descartan después de 2 horas de ser recogidos de la placa, debido a que entran en restricción calórica.

### 3. Resultados

#### 3.1 Comparativa del desarrollo de *C. elegans* N2, DA464 y DA1426 post eclosión.

En la Anexo 1 se observa el desarrollo de las cepas de estudio, se realizaron fotografías 4 días consecutivos a la eclosión de los huevos. Las fotografías se tomaron con una cámara acoplada a la lupa binocular Leica, con una magnificación de 50X.

En las imágenes del día 1 y 2 se puede observar que las cepas de estudio presentan un desarrollo similar respecto a la cepa control N2. Sin embargo, la cepa DA1426 presenta un tamaño menor respecto a la cepa control. En el día 3 del estudio se destacan marcadas diferencias entre las cepas. Tanto la cepa DA464 como la cepa control N2, tienen un comportamiento muy similar, ya que su desarrollo es más rápido que el de los nematodos DA1426. En las imágenes correspondientes al día 3 se observa, además, cómo en las placas de las cepas DA464 y N2 existen nematodos que presentan la media luna (señalada con una flecha roja) en la mitad de su cuerpo, característico del estadio L4. No obstante, también hay presencia de huevos (señalados con un círculo rojo), indicando que hay nematodos en fase adulta. A día 4 todos los nematodos se encuentran en estadio adulto y en todas las cepas se puede observar la presencia de progenie que se encuentran en fase L1.

	N2	DA464	DA1426
Día 1 post-eclosión	L1	L1	L1
Día 2 post-eclosión	L2/L3	L2/L3	L2/L3
Día 3 post-eclosión	L4/Adulto	L4/Adulto	L4
Día 4 post-eclosión	Adulto	Adulto	Adulto

**Tabla 1:** Resumen del desarrollo de las cepas N2, DA464 y DA1426.

Como se observa en la Anexo 1, a día 2 después de la eclosión de los huevos, existe una diferencia de tamaño entre los nematodos en estudio y el nematodo control. Para corroborar si esta diferencia es significativa se mide la superficie de 20 nematodos por cepas, asumiendo que existe una correlación entre el área y el volumen de cada nematodo. No es posible medir el volumen de los mismos ya que en el laboratorio no se cuenta con la herramienta necesaria para poder llevarlo a cabo.

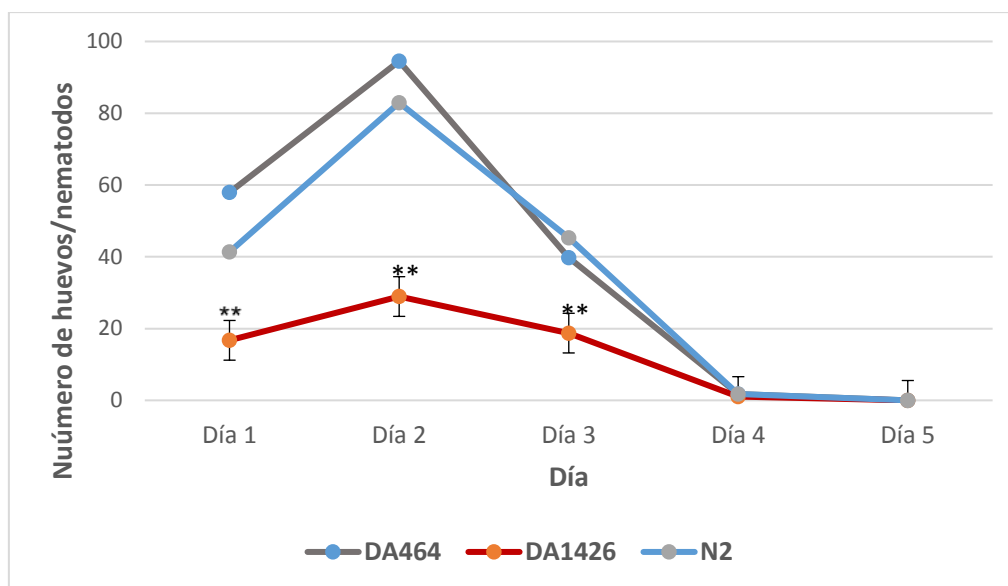
Día 2	N2	DA464	DA1426
N	20	20	20
Superficie (mm <sup>2</sup> )	<b>0,88</b>	<b>0,75</b>	<b>0,26</b>
p-valor	-	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,01</b>

**Tabla 2:** Área de los nematodos N2, DA464 y DA1426.

La cepa DA1426 presenta un retraso de horas de desarrollo, respecto a la cepa DA464 y a la cepa control N2 (Tabla 1), mientras los nematodos DA464 tienen un desarrollo normal. Además, los DA1426 tienen una superficie menor respecto a la cepa control, siendo estadísticamente significativa (Tabla 2). La cepa DA464 tiene una superficie menor respecto a los nematodos N2, que es estadísticamente significativa.

### 3.2 Fertilidad

Se realizaron 15 rondas por cada cepa. En la Figura 12 y en la Tabla 3 se puede observar el comportamiento de los nematodos en estudio.



**Figura 12:** Curvas de fertilidad realizadas con los promedios de los experimentos. Asterisco: \*\*  $p < 0,01$ .

Días	Cepas	Promedio de huevos/nematodo	Error estándar	p-valor
1	N2	41	8,59	-
	DA464	58	11,23	>0,05
	<b>DA1426</b>	<b>17</b>	<b>2,34</b>	<b>&lt;0,01</b>
2	N2	83	8,40	-
	DA464	95	8,17	>0,05
	<b>DA1426</b>	<b>29</b>	<b>3,30</b>	<b>&lt;0,01</b>
3	N2	45	5,45	-
	DA464	40	6,75	>0,05
	<b>DA1426</b>	<b>19</b>	<b>2,07</b>	<b>&lt;0,01</b>
4	N2	2	0,30	-
	DA464	2	0,30	>0,05
	DA1426	1	0,25	>0,05
5	N2	0	0,12	-
	DA464	0	0,13	>0,05
	DA1426	0	0,13	>0,05
Total de huevos	N2	171	38,18	-
	DA464	195	44,31	>0,05
	<b>DA1426</b>	<b>66</b>	<b>13,44</b>	<b>&lt;0,01</b>

**Tabla 3:** Estudio estadístico de la fertilidad.

Las curvas de fertilidad como se observa en la Figura 12 y Tabla 3, muestran como en los dos primeros días de adulto, la cepa DA464 tiene una tendencia a aumentar, aunque no es estadísticamente significativa respecto al control N2. Sin embargo, esta tendencia

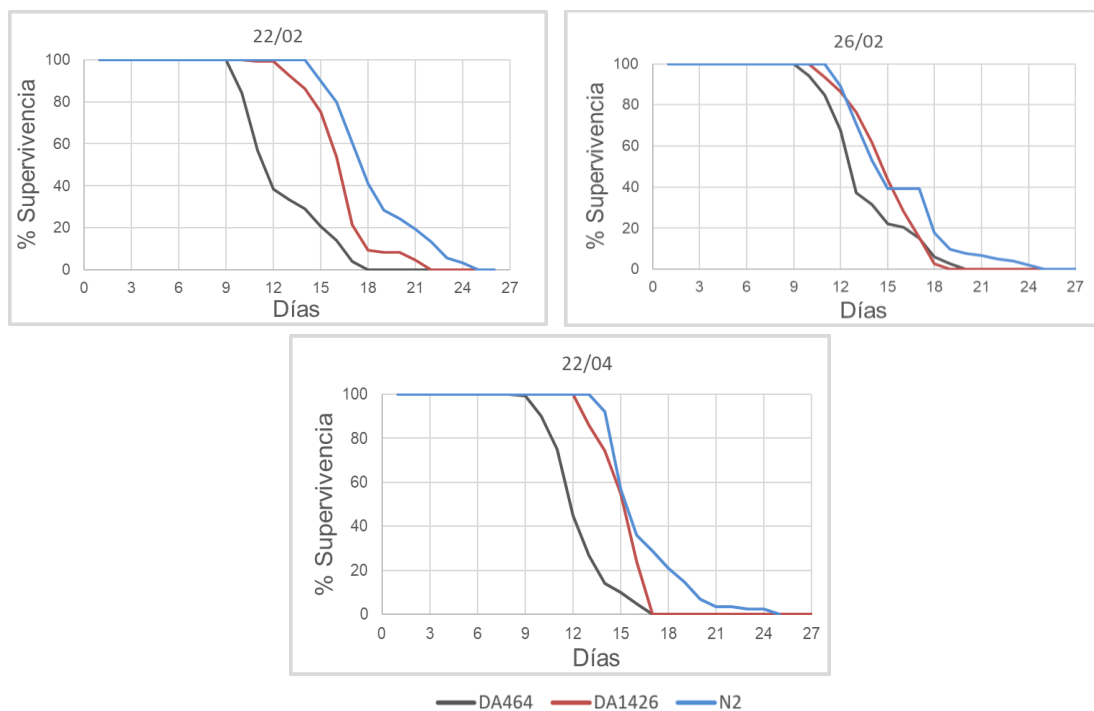
se invierte en los días 3,4 y 5. Aunque exista diferencias entre las fertilidades de ambas cepas durante los cinco días, este parámetro no es estadísticamente significativo. El comportamiento de la cepa DA1426 indica que existe una disminución de la puesta de huevos respecto a la cepa control durante los cinco días de estudio. Sin embargo, solo a día 1,2 y 3 esta diferencia es estadísticamente significativa.

Las cepas de estudio al igual que la cepa control, ponen una mayor cantidad de huevos durante los 3 primeros días de adultos. Los nematodos DA464 tienen una fertilidad muy similar que los nematodos control y la fertilidad de la cepa DA1426 es menor respecto al control.

### 3.3 Mortalidad

Se realizaron tres experimentos de mortalidad con un promedio 113 nematodos por cepa, teniendo un total de 335 nematodos N2, 358 DA464 y 331 DA1426.

El análisis de las curvas de mortalidad correspondiente a cada nematodo (Figura 13), indica que las cepas mutadas DA464 y DA1426 tienen una esperanza de vida de 24% y 9% respectivamente, menor que la cepa control N2, siendo estadísticamente significativa, como se puede observar en la Tabla 4 y 5. El mutante DA464 presenta el mayor porcentaje de la disminución de la esperanza de vida.



**Figura 13:** Curvas de mortalidad de tres experimentos distintos. Comparación de la esperanza de vida de las cepas N2, DA464 y DA1426

Fecha	N2		DA464		Análisis		
	nCont/ nTotal	EEV	nCont/ nTotal	EEV	DEV%	p-valor	DMEV %
22/02	119/120	18,686	120/120	12,808	31,46	<0,01	
26/02	102/120	16,441	118/120	13,814	15,98	<0,01	23,88
22/04	114/120	16,693	120/120	12,650	24,22	<0,01	

EEV: Estimación esperanza de vida en días. DEV: Descenso esperanza de vida en días.

DMEV: Descenso medio esperanza de vida.

**Tabla 4:** Estudio estadístico de las mortalidades. En esta se detalla: la fecha de cada experimento, cantidad nematodos estudiados (n), estimación de la esperanza de vida, disminución de la esperanza de vida de la cepa DA464 respecto al control N2, la significancia y el descenso medio de la esperanza de vida.

Fecha	N2		DA1426		Análisis		
	nCont/ nTotal	EEV	nCont/ nTotal	EEV	DEV%	p-valor	DMEV %
22/02	119/120	18,686	108/120	16,583	11,25	<0,01	
26/02	102/120	16,441	110/120	15,107	8,11	<0,01	8,99
22/04	114/120	16,693	113/120	15,423	7,60	<0,01	

EEV: Estimación esperanza de vida en días. DEV: Descenso esperanza de vida en días.

DMEV: Descenso medio esperanza de vida.

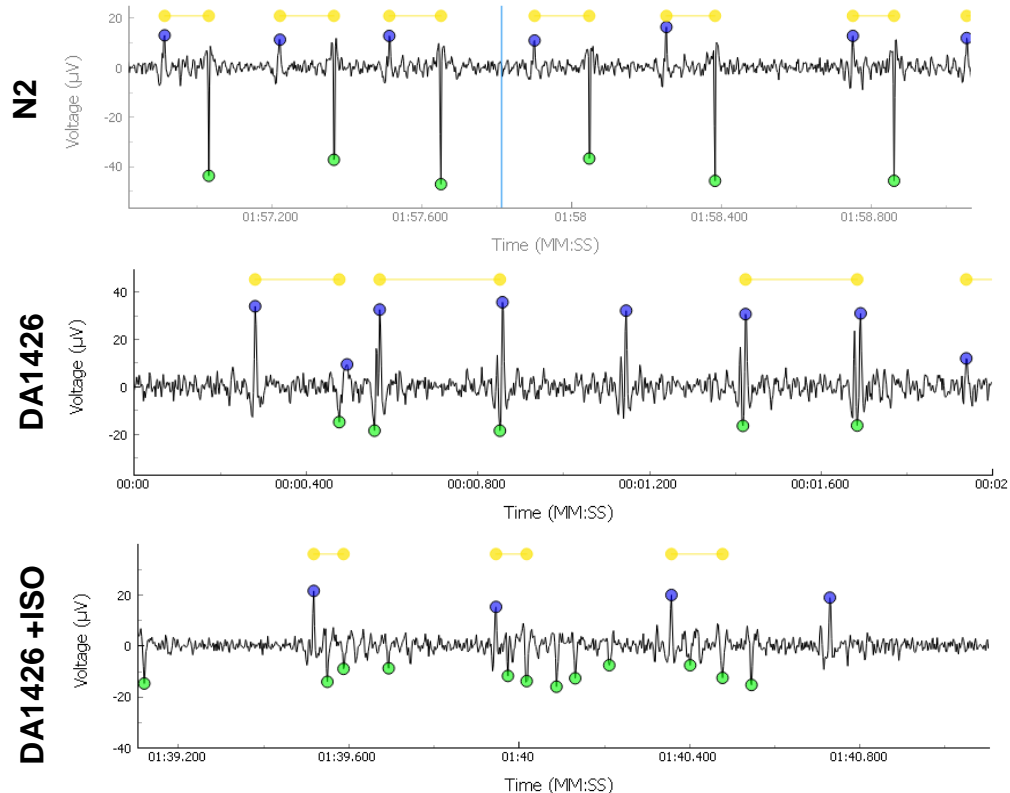
**Tabla 5:** Estudio estadístico de las mortalidades. En esta se detalla: el comienzo de cada experimento, cantidad de nematodos estudiados (n), estimación de la esperanza de vida, disminución de la esperanza de vida de las cepas DA1426 respecto al control N2, la significancia y el descenso medio de la esperanza de vida.

La cepa DA464 y DA1426 tiene una esperanza de vida menor respecto a la cepa control N2, aunque los nematodos DA464 son los que presentan la menor esperanza de vida. La cepa DA1426 tienen una esperanza de vida de un 9% menor que los N2.

### 3.4 Electrofaringeograma

Se realizaron dos experimentos de EFG donde se estudiaron las cepas DA464 y DA1426 con sus respectivos controles N2. Para este estudio, se utilizaron 20 nematodos DA464, 21 DA1426 y 21 N2 para cada uno de los experimentos. Además, se realizó un estudio para determinar el posible efecto del isoproterenol (ISO) sobre estas cepas, que es un fármaco inotrópico y cronotrópico positivo.

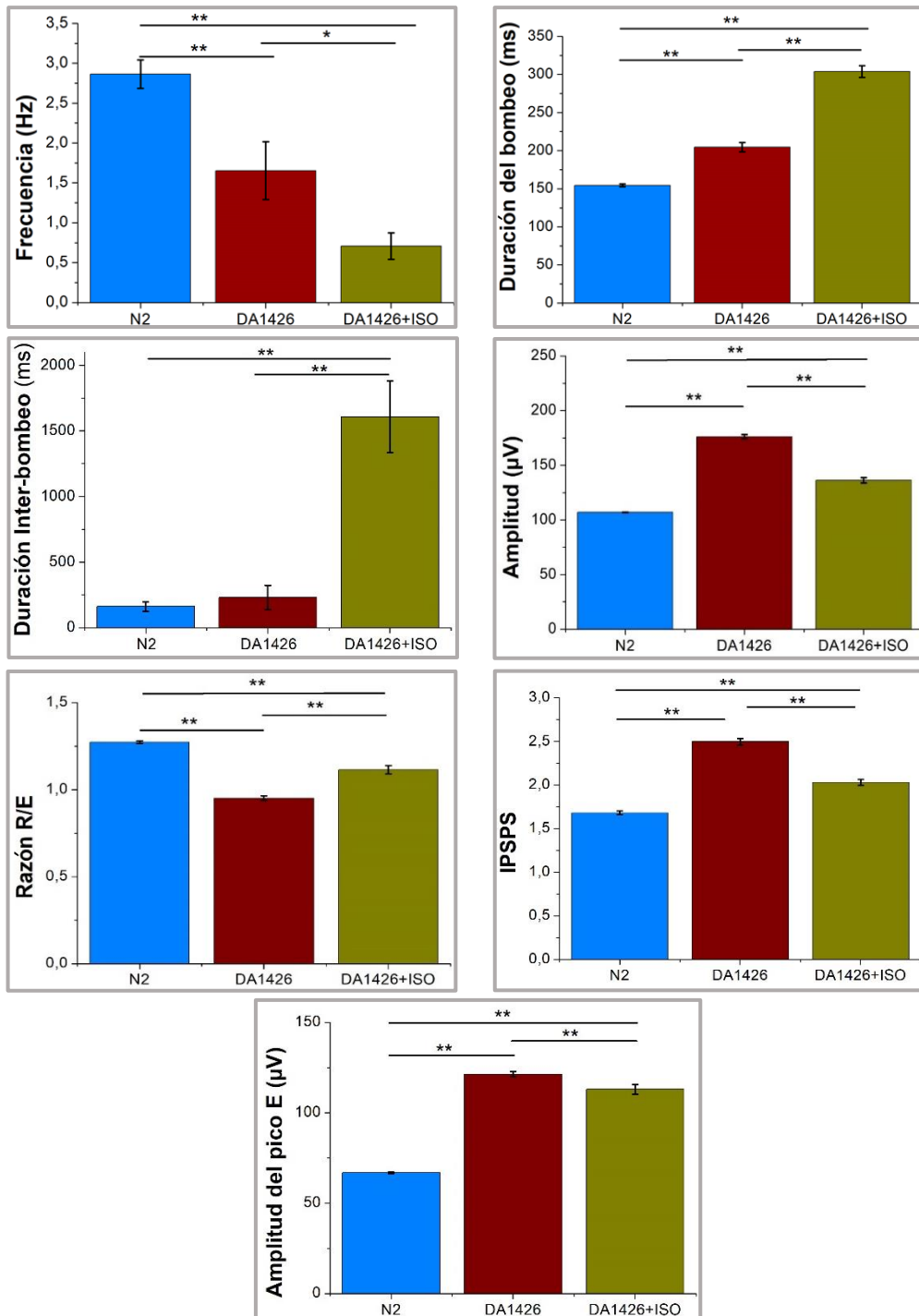
Los registros de los EFG realizados para los nematodos DA1426 y N2 se muestran en la Figura 14. En los mismos se pueden observar las marcadas diferencias de la cepa de estudio respecto al control. Dentro de estas destacan la disminución de los picos R (marcados en verdes) en la cepa DA1426 respecto al control y la disminución de la frecuencia. Para intentar recuperar el fenotipo de los nematodos DA1426, esta cepa se trata con isoproterenol 100 µM.



**Figura 14:** Registros de los EFG de 2s.

En la Figura 15 se analizan los EFG registrados con el programa NemAnalyse, del experimento con nematodos DA1426 y N2. Debido a que los picos R en los EFG se encuentran reducidos, el NemAnalyse no identifica todos los complejos ER. Por lo que se desarrolló un nuevo programa (Dr. J. Alvarez) que identifica todos los complejos ER, basándose en la asociación del pico E con el último pico R que hubiese antes de otro pico E. Con este programa se analizaron los siguientes parámetros: frecuencia, duración del bombeo, amplitud, duración inter-bombeo, razón R/E, picos adicionales asociados a los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPS) y amplitud del pico R. Además, se determinó el efecto que tiene el isoproterenol 100µM en los nematodos DA1426.

Como se muestra en la Figura 15 y en la Tabla 6, las medias de los parámetros: frecuencias, duración del bombeo, amplitud, razón R/E, IPSPS y amplitud pico R, analizados para la cepa DA1426, presentan diferencias respecto al control y son estadísticamente significativas. Sin embargo, a pesar de que existe un aumento de la duración inter-bombeo en estos nematodos respecto a los nematodos N2, esta diferencia no es significativa estadísticamente. Como se puede observar en la misma figura y tabla, la presencia del isoproterenol empeora algunos parámetros como: la frecuencia, la duración del bombeo y la duración inter-bombeo. No obstante, en el resto de parámetros intenta revertir el fenotipo.

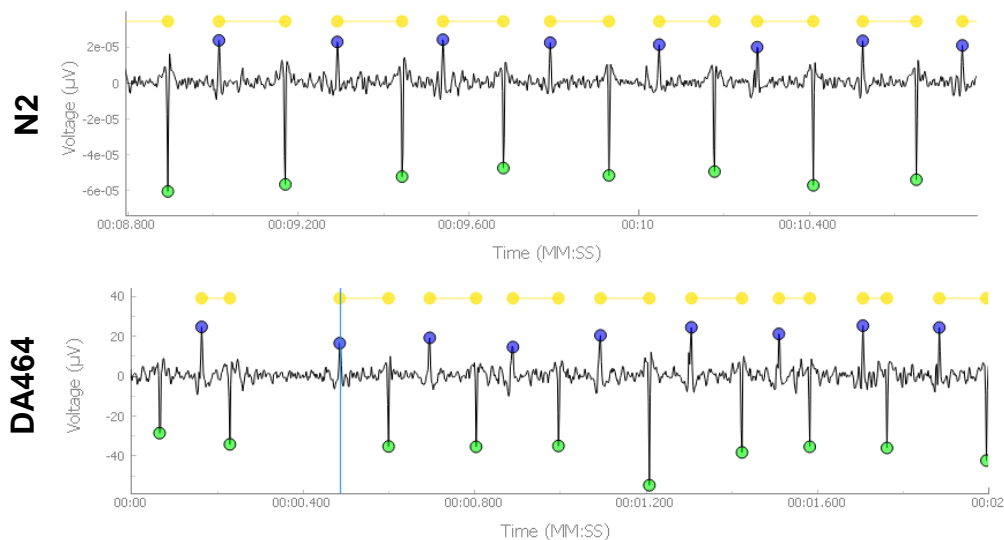


**Figura 15:** Diagrama de barras de las medias de la frecuencia, la duración, la amplitud, la duración inter-bombeo, razón R/E, IPSPs y amplitud del pico E de *C. elegans* N2, DA1426 y DA1426+ISO100μM. Asterisco: \* p<0,05, \*\* p<0,01.

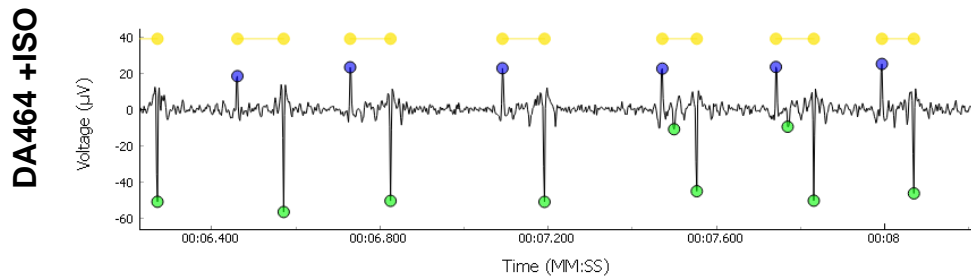
Parámetros	Cepas	Media	Error estándar	p-valor
Frecuencia (Hz)	N2	2,86	0,18	-
	<b>DA1426</b>	<b>1,65</b>	<b>0,36</b>	<b>&lt;0,01</b>
	<b>DA1426+ISO</b>	<b>0,7</b>	<b>0,17</b>	<b>&lt;0,01</b>
Duración del bombeo (ms)	N2	154,45	1,76	-
	<b>DA1426</b>	<b>204,44</b>	<b>6,05</b>	<b>&lt;0,01</b>
	<b>DA1426+ISO</b>	<b>303,66</b>	<b>7,77</b>	<b>&lt;0,01</b>
Duración Inter-Bombeo (ms)	N2	160,94	35,73	-
	DA1426	228,83	92,11	>0,05
	<b>DA1426+ISO</b>	<b>1607,68</b>	<b>271,67</b>	<b>&lt;0,01</b>
Amplitud ( $\mu\text{V}$ )	N2	106,98	0,36	-
	<b>DA1426</b>	<b>176,26</b>	<b>1,97</b>	<b>&lt;0,01</b>
	<b>DA1426+ISO</b>	<b>136,30</b>	<b>2,59</b>	<b>&lt;0,01</b>
Razón R/E	N2	1,27	0,01	-
	<b>DA1426</b>	<b>0,95</b>	<b>0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>
	<b>DA1426+ISO</b>	<b>1,11</b>	<b>0,02</b>	<b>&lt;0,01</b>
IPSPS	N2	1,68	0,02	-
	<b>DA1426</b>	<b>2,50</b>	<b>0,04</b>	<b>&lt;0,01</b>
	<b>DA1426+ISO</b>	<b>2,03</b>	<b>0,03</b>	<b>&lt;0,01</b>
Amplitud del pico E ( $\mu\text{V}$ )	N2	66,83	0,33	-
	<b>DA1426</b>	<b>121,36</b>	<b>1,47</b>	<b>&lt;0,01</b>
	<b>DA1426+ISO</b>	<b>112,94</b>	<b>2,55</b>	<b>&lt;0,01</b>

**Tabla 6:** Estudio estadístico de los parámetros de los EFGs, donde se señalan las medias, el error estándar y la significancia de las cepas N2 y DA1426.

La Figura 16 muestra los registros de los EFG realizados a la cepa DA464 y N2. En estos registros no se observan diferencias.

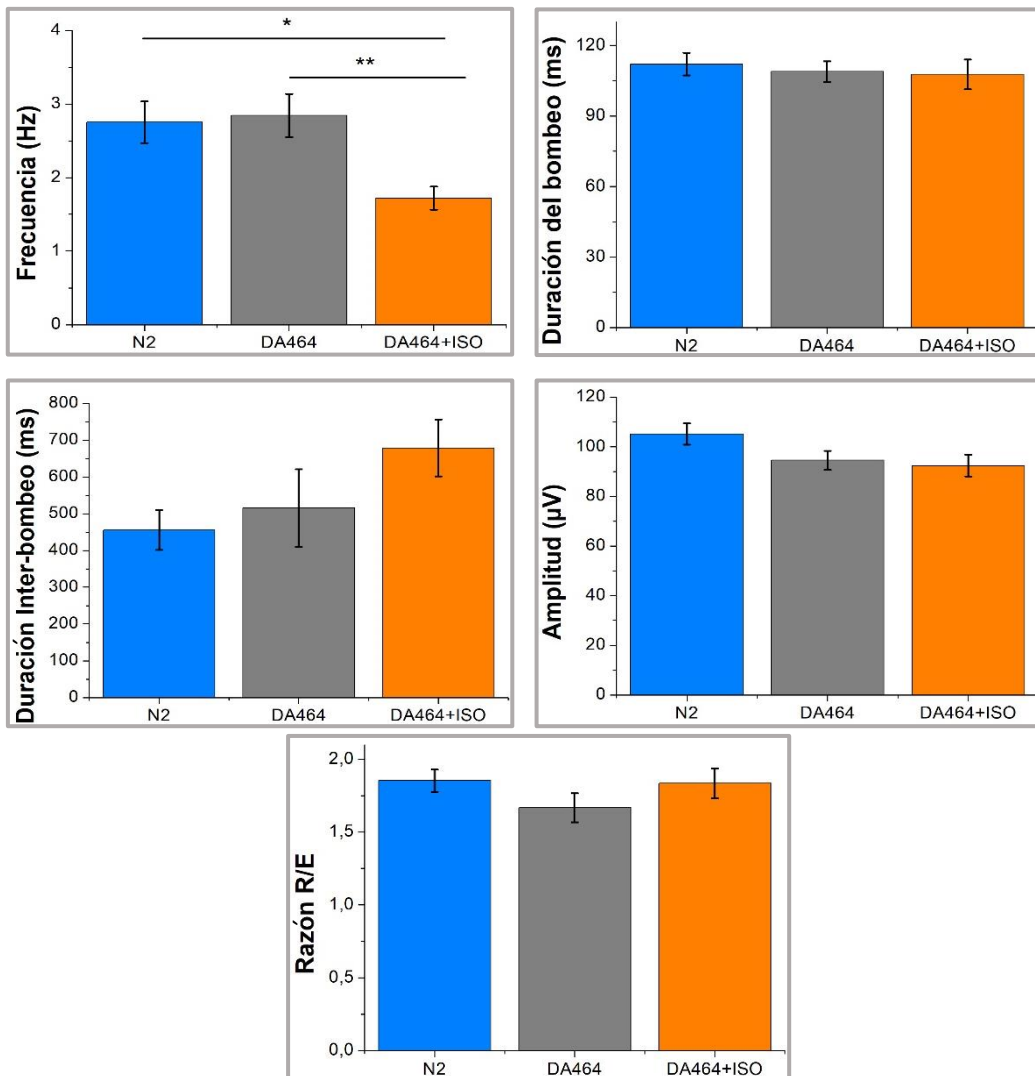






**Figura 16:** Registros de los EFG de 2s

En la Figura 17 se analizan los EFG registrados con el programa NemAnalyse, del experimento con nematodos DA464 y N2 y se analizó, la frecuencia, la duración del bombeo, la amplitud, la duración inter-bombeo y razón R/E. También, se estudió el efecto que puede tener el isoproterenol en esta cepa.



**Figura 17:** Diagrama de barras de las medias de la frecuencia, la duración, la amplitud, la duración inter-bombeo y razón R/E de *C. elegans* N2, DA464 y DA464+ISO 100µM. Asterisco: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

El análisis de la Figura 17 y de la Tabla 7 nos indica, que los parámetros analizados en los EFGs de las cepas DA464 y N2 no presentan diferencias estadísticamente

significativas. Sin embargo, el estudio del efecto del ISO 100  $\mu\text{M}$  en la cepa DA464 nos indica que el isoproterenol afecta la frecuencia de bombeo de esta cepa. La disminución de la frecuencia de bombeo es estadísticamente significativa, teniendo una media de 1,72 Hz y 2,75 Hz para la cepa DA464+ISO y N2 respectivamente.

Parámetros	Cepas	Media	Error estándar	p-valor
Frecuencia (Hz)	N2	2,75	0,28	-
	DA464	2,85	0,36	0,963
	<b>DA464+ISO</b>	<b>1,72</b>	<b>0,15</b>	<b>0,008</b>
Duración del bombeo (ms)	N2	112,08	4,85	-
	DA464	108,90	4,31	0,905
	DA464+ISO	107,62	6,32	0,820
Duración Inter-Bombeo (ms)	N2	455,56	53,90	-
	DA464	515,55	105,72	0,859
	DA464+ISO	678,73	77,25	0,132
Amplitud ( $\mu\text{V}$ )	N2	105,08	4,29	-
	DA464	94,48	3,78	0,176
	DA464+ISO	92,33	4,36	0,084
Razón R/E	N2	1,85	0,77	-
	DA464	1,67	0,01	0,335
	DA464+ISO	1,83	0,10	0,988

**Tabla 7:** Estudio estadístico de los parámetros de los EFGs, donde se señalan las medias, el error estándar y la significancia de las cepas N2 y DA464.

En el estudio realizado con el EFG en la cepa DA464 no se observan diferencias significativas en los parámetros analizados, sin embargo, en los nematodos DA1426 si se observan marcadas diferencias con relación al control. El tratamiento con isoproterenol afecta a las dos cepas mutantes y se observa que no existe una recuperación.

## 4. Discusión

En este trabajo fin de máster pretendemos caracterizar distintas cepas de *C. elegans* que sirvan como modelo para el estudio de enfermedades cardiovasculares. Los experimentos realizados han servido para establecer las características de estas cepas mutantes.

La cepa **DA464**, caracterizada por presentar una mutación en el gen *eat-5*, tiene un desarrollo (Anexo 1) y una fertilidad (Figura 12) muy similar a la cepa control N2. Sin embargo, presenta un fenotipo diferente, pues como se observa en la Anexo 1 y en el análisis de la superficie (Tabla 2), los nematodos DA464 son más pequeños que la cepa control. La mutación que presenta esta cepa se identifica por la inducción de un estado de restricción calórica que provocaría, que la esperanza de vida aumentase. Sin embargo, el comportamiento de estos nematodos es todo lo contrario, la esperanza de vida es un 24% menor que la esperanza de vida de la cepa control. Esta conducta puede que se deba a que la mutación que presenta esta cepa es demasiado débil como para afectar a la longevidad. Además, la misma puede producir efectos pleiotrópicos deletéreos que enmascaran el efecto positivo de la restricción calórica (54).

En el estudio electrofisiológico (Figura 17, 18) realizado en esta cepa, a pesar de que no hay diferencias significativas en cuanto a la frecuencia, la duración del bombeo el inter-bombeo, la amplitud y la relación razón R/E, se ve una tendencia a disminuir el factor razón R/E respecto a la cepa control. El aumento de la frecuencia y la disminución de razón R/E respecto al control, nos indican que hay un aumento de la excitabilidad, siendo esta una de las características de la FA. El tratamiento con isoproterenol 100  $\mu$ M afecta significativamente a la frecuencia, siendo menor que el control y que la cepa DA464. Además, el resto de parámetros analizados no se recuperan, aunque las diferencias mostradas no sean significativas. A pesar de que el isoproterenol puede causar cardiotoxicidad, no existe evidencia científica de los efectos que tiene este fármaco sobre las conexinas.

La cepa **DA1426** presenta una mutación en el gen *exp-2* y muestra un comportamiento diferente respecto al control. El desarrollo de los nematodos es más lento respecto al control como se puede observar en la Anexo 1. En el día 3, después de la eclosión de los huevos, la cepa control presenta nematodos en fase adulta y en fase L4. Sin embargo, los nematodos DA1426 se encuentran solamente en fase L4 a día 3 y a día 4 se observa que ya están en fase adulto. El desarrollo de esta cepa indica que se encuentran retrasados en horas respecto al control, pero este retraso no influye en los demás experimentos realizados. Otra diferencia significativa es el tamaño de los nematodos que son 3 veces más pequeños que los controles, esto se debe a la mutación que afecta al bombeo faríngeo. Al estar disminuido el bombeo, se alimentan mucho menos que los controles, por lo que son más pequeños. Sin embargo, esta restricción en la alimentación no alarga la esperanza de vida de estos nematodos. Como se observa en la Figura 13, la cepa DA1426 tiene una esperanza de vida significativamente menor que la cepa control, de un 9%. La fertilidad de los nematodos DA1426 se encuentra significativamente disminuida en los tres primeros días de la fase adulta respecto al control. El fenotipo de esta cepa se caracteriza por tener problemas en la expulsión y puesta de huevos (10).

La mutación que presenta la cepa DA1426, afecta la excitabilidad de la faringe, lo que da lugar a un aumento de la duración de los bombeos y una marcada reducción de los picos R (10). El estudio electrofisiológico realizado a esta cepa (Figura 13,15), evidencia

que existe un aumento significativo de la duración del bombeo respecto a la cepa control. La cepa DA1426 al tener una repolarización retardada, se demora más en recuperar el umbral para que se dispare otro potencial de acción. Al estar aumentada la duración de los bombeos, la frecuencia disminuye y esta diferencia es significativa respecto al control N2. La razón R/E se encuentra disminuida respecto al N2 y es estadísticamente significativa, este resultado indica que hay una reducción de los picos R y un aumento de la excitabilidad. La amplitud, que no es más que la suma de la despolarización y la repolarización, es significativamente mayor respecto al control. Además, la amplitud del pico E aumenta respecto al N2 y esta diferencia es estadísticamente significativa. El análisis de la razón R/E, la amplitud y la amplitud del pico E confirman la característica principal de esta cepa, donde la repolarización se encuentra disminuida drásticamente y la excitabilidad es mucho mayor. Una característica peculiar de la cepa DA1426, es el aumento de picos IPSPS, que se encuentran entre el pico de excitación y el pico de repolarización del complejo ER. Estos picos aumentan significativamente respecto a la cepa control, indicando que existe un incremento en la actividad de la motoneurona M3.

El tratamiento de la cepa DA1426 con isoproterenol 100  $\mu$ M, tiene un efecto negativo, en la frecuencia, duración del bombeo y en la duración inter-bombeo, siendo estadísticamente significativo. Este comportamiento podría indicar, que el isoproterenol está fosforilando otros canales que están provocando que exista una repolarización mucho más retardada de la que presenta la cepa DA1426. Sin embargo, en otros parámetros como la amplitud, la razón R/E, IPSPS y la amplitud del pico E, este fármaco produce una recuperación parcial del fenotipo, que es estadísticamente significativa.

## 5. Conclusiones

1. La cepa DA464 tiene un desarrollo muy similar respecto a la cepa control N2. Sin embargo, el desarrollo de la cepa DA1426 es más lento que la cepa control. Morfológicamente los nematodos DA464 son más grandes que los nematodos N2, sucediendo todo lo contrario para la cepa DA1426 que son significativamente más pequeños.
2. No existe diferencia en la fertilidad entre la cepa DA464 y la cepa control N2. La cepa DA1426 tiene una fertilidad menor que la cepa N2, la puesta de huevos es menor en los tres primeros días de edad adulta.
3. La esperanza de vida de los nematodos DA464 y DA1426 es un 24% y 9% respectivamente, menor que los nematodos N2.
4. El estudio electrofisiológico demuestra que no existen diferencias significativas en la frecuencia, duración del bombeo, duración inter-bombeo, amplitud y razón R/E entre los EFGs de la cepa DA464 y la cepa control N2. En los EFGs de la cepa DA1426 si se observan diferencias significativas en los parámetros: frecuencia, duración del bombeo, duración inter-bombeo, amplitud, razón R/E, IPSPS.
5. En la cepa DA1426, el isoproterenol tiene un efecto negativo en la duración del bombeo, la frecuencia y la duración inter-bombeo. No obstante, se ve una recuperación parcial del fenotipo en los parámetros: amplitud, razón R/E, IPSPS y amplitud del pico E. Este fármaco en la cepa DA464 solo tiene efecto en la frecuencia.

## Referencia Bibliográficas

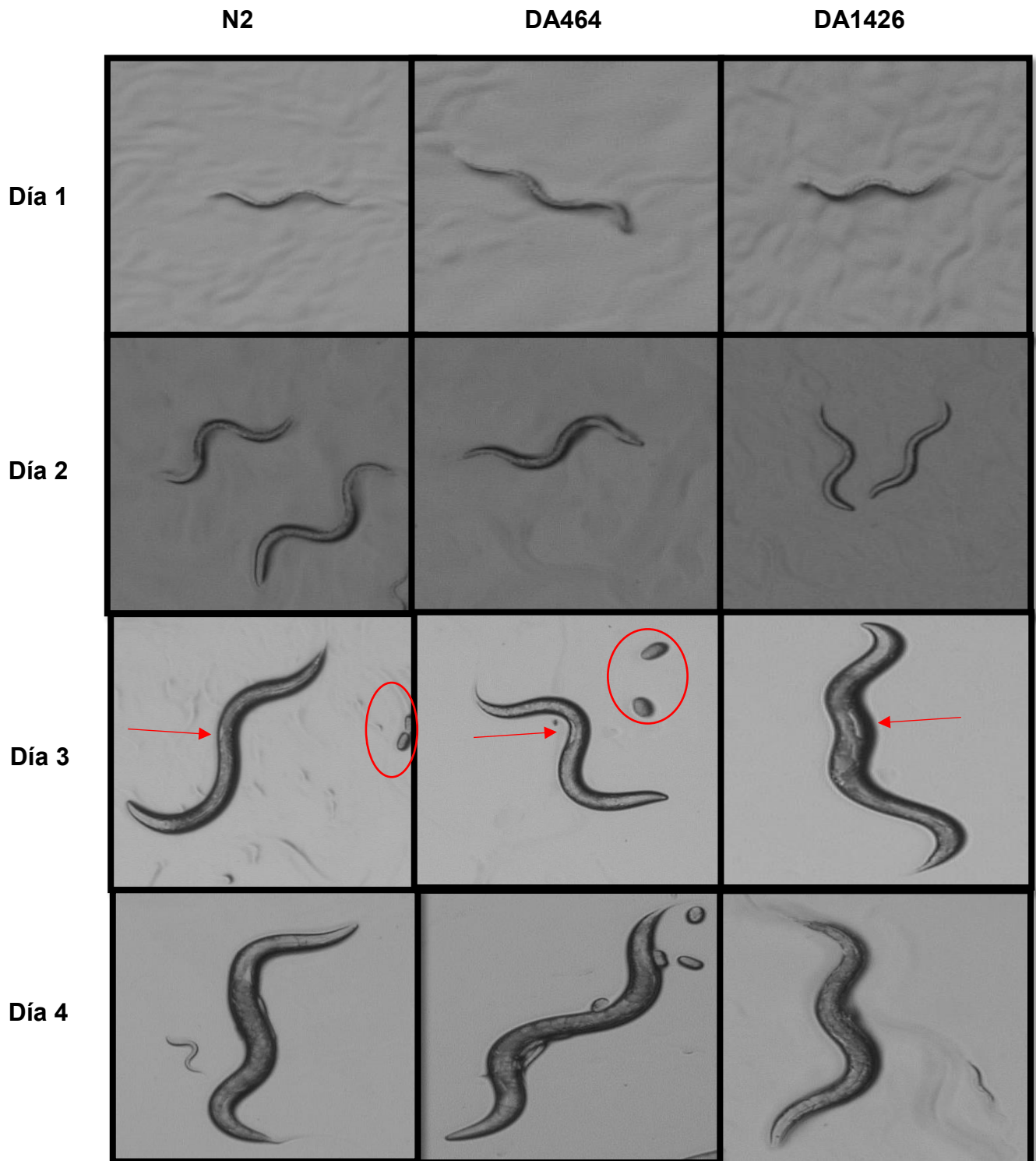
1. Francula-Zaninovic S, Nola IA. Management of measurable variable cardiovascular disease risk factors. *Current cardiology reviews*. 2018;14(3):153-63.
2. Organization WH. Las 10 principales causas de defunción: World Health Organization 2020 [updated 09/12/2020; cited 2021 25/04/2021]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
3. Sanidad Md. Indicadores de Salud 2020. Evolución de los indicadores del estado de salud en España y su magnitud en el contexto de la Unión Europea. Ministerio de Sanidad, 2020.
4. Kralj V, Brkić Biloš I. Morbidity and mortality from cardiovascular diseases. *Cardiologia Croatica*. 2013;8(10-11):373-8.
5. Noureldin M, Chen H, Bai D. Functional characterization of novel atrial fibrillation-linked GJA5 (Cx40) mutants. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4):977.
6. Sun Y, Yang YQ, Gong XQ, Wang XH, Li RG, Tan HW, et al. Novel germline GJA5/connexin40 mutations associated with lone atrial fibrillation impair gap junctional intercellular communication. *Human mutation*. 2013;34(4):603-9.
7. Kreuzberg MM, Liebermann M, Segschneider S, Dobrowolski R, Dobrzynski H, Kaba R, et al. Human connexin31. 9, unlike its orthologous protein connexin30. 2 in the mouse, is not detectable in the human cardiac conduction system. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;46(4):553-9.
8. Wallace E, Howard L, Liu M, O'Brien T, Ward D, Shen S, et al. Long QT syndrome: genetics and future perspective. *Pediatric cardiology*. 2019;40(7):1419-30.
9. González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, et al. K<sup>+</sup> channels: function-structural overview. *Comprehensive physiology*. 2012;2(3):2087-149.
10. Salkoff LB, Wei A, Baban B, Butler A, Fawcett GL, Ferreira G, et al. Potassium channels in *C. elegans*. 2005.
11. Heginbotham L, Abramson T, MacKinnon R. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels. *Science*. 1992;258(5085):1152-5.
12. Shtonda B, Avery L. CCA-1, EGL-19 and EXP-2 currents shape action potentials in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Journal of Experimental Biology*. 2005;208(11):2177-90.
13. Davis MW, Fleischhauer R, Dent JA, Joho RH, Avery L. A mutation in the *C. elegans* EXP-2 potassium channel that alters feeding behavior. *Science*. 1999;286(5449):2501-4.
14. Su K, Kyaw H, Fan P, Zeng Z, Shell BK, Carter KC, et al. Isolation, characterization, and mapping of two human potassium channels. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;241(3):675-81.
15. Tamargo Menéndez JL, editor *La patología de los canales iónicos (Canalopatías)*. Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias; 2003: Real Academia de Ciencias Veterinarias.
16. Fleischhauer R, Davis MW, Dzhura I, Neely A, Avery L, Joho RH. Ultrafast inactivation causes inward rectification in a voltage-gated K<sup>+</sup> channel from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*. 2000;20(2):511-20.
17. Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science*. 1995;269(5220):92-5.
18. Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function. *Molecular membrane biology*. 2002;19(2):121-36.
19. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. 2002.
20. Bai D. Atrial fibrillation-linked GJA5/connexin40 mutants impaired gap junctions via different mechanisms. *FEBS letters*. 2014;588(8):1238-43.
21. Pfenniger A, Chanson M, Kwak BR. Connexins in atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2013;1828(1):157-66.

22. Chaldoupi S-M, Loh P, Hauer RN, De Bakker JM, van Rijen HV. The role of connexin40 in atrial fibrillation. *Cardiovascular research*. 2009;84(1):15-23.
23. Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong X-Q, Shao Q, et al. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(25):2677-88.
24. Starich TA, Lee R, Panzarella C, Avery L, Shaw JE. eat-5 and unc-7 represent a multigene family in *Caenorhabditis elegans* involved in cell-cell coupling. *The Journal of cell biology*. 1996;134(2):537-48.
25. Gao AW, uit de Bos J, Sterken MG, Kammenga JE, Smith RL, Houtkooper RH. Forward and reverse genetics approaches to uncover metabolic aging pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2018;1864(9):2697-706.
26. Consortium\* CeS. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 1998;282(5396):2012-8.
27. Parada Ferro LK, Bustos AVG, Mora MRS. Caracterización fenotípica de la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* como un modelo en enfermedades neurodegenerativas. *Nova*. 2017;15(28):69-78.
28. Zhuang Z, Zhao Y, Wu Q, Li M, Liu H, Sun L, et al. Adverse effects from clenbuterol and ractopamine on nematode *Caenorhabditis elegans* and the underlying mechanism. *PLoS One*. 2014;9(1):e85482.
29. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2015;200(2):387-407.
30. Raizen DM, Zimmerman JE, Maycock MH, Ta UD, You Y-j, Sundaram MV, et al. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*. 2008;451(7178):569-72.
31. Ewald CY, Castillo-Quan JI, Blackwell TK. Untangling longevity, dauer, and healthspan in *Caenorhabditis elegans* insulin/IGF-1-signalling. *Gerontology*. 2018;64(1):96-104.
32. Sanz Horcas M. Control de la infección por *Salmonella* en *C. elegans* mediante antimicrobianos naturales 2018.
33. Gieseler K, Qadota H, Benian GM. Development, structure, and maintenance of *C. elegans* body wall muscle. *WormBook: the online review of C elegans biology* [Internet]. 2018.
34. Grant BD, Sato M. Intracellular trafficking. *WormBook*. 2006:1.
35. Baretino Grediaga A. Estudio en *C. elegans* del papel de los genes de la vía de apoptosis como mediadores de longevidad: Universitat Politècnica de València; 2015.
36. Ruszkiewicz JA, Pinkas A, Miah MR, Weitz RL, Lawes MJ, Akinyemi AJ, et al. *C. elegans* as a model in developmental neurotoxicology. *Toxicology and applied pharmacology*. 2018;354:126-35.
37. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1986;314(1165):1-340.
38. Bargmann CI. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science*. 1998;282(5396):2028-33.
39. Oikonomou G, Shaham S. The glia of *Caenorhabditis elegans*. *Glia*. 2011;59(9):1253-63.
40. Lockery SR, Goodman MB, Faumont S. First report of action potentials in a *C. elegans* neuron is premature. *Nature neuroscience*. 2009;12(4):365-6.
41. Goodman MB, Hall DH, Avery L, Lockery SR. Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. *Neuron*. 1998;20(4):763-72.
42. Albertson DG, Thompson J. The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences*. 1976;275(938):299-325.
43. Mango SE. The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis. *WormBook: The Online Review of C elegans Biology* [Internet]. 2007.
44. Pilon M, Mörck C. Development of *Caenorhabditis elegans* pharynx, with emphasis on its nervous system. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005;26(4):396-404.

45. Calahorra F, Keefe F, Dillon J, Holden-Dye L, O'connor V. Neuroigin tuning of pharyngeal pumping reveals extrapharyngeal modulation of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Biology*. 2019;222(3).
46. Fang-Yen C, Avery L, Samuel AD. Two size-selective mechanisms specifically trap bacteria-sized food particles in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(47):20093-6.
47. Avery L, Shtonda BB. Food transport in the *C. elegans* pharynx. *Journal of Experimental Biology*. 2003;206(14):2441-57.
48. Avery L. Motor neuron M3 controls pharyngeal muscle relaxation timing in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Biology*. 1993;175(1):283-97.
49. Avery L, Horvitz HR. A cell that dies during wild-type *C. elegans* development can function as a neuron in a *ced-3* mutant. *Cell*. 1987;51(6):1071-8.
50. Trojanowski NF, Raizen DM, Fang-Yen C. Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-10.
51. Dillon J, Andrianakis I, Bull K, Glautier S, O'Connor V, Holden-Dye L, et al. AutoEPG: software for the analysis of electrical activity in the microcircuit underpinning feeding behaviour of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2009;4(12):e8482.
52. Raizen DM, Avery L. Electrical activity and behavior in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Neuron*. 1994;12(3):483-95.
53. Hu C, Dillon J, Kearn J, Murray C, O'Connor V, Holden-Dye L, et al. NeuroChip: a microfluidic electrophysiological device for genetic and chemical biology screening of *Caenorhabditis elegans* adult and larvae. *Plos one*. 2013;8(5):e64297.
54. Lakowski B, Hekimi S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(22):13091-6.
55. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;77(1):71-94.
56. Mitchell DH, Stiles JW, Santelli J, Sanadi DR. Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *Journal of gerontology*. 1979;34(1):28-36.
57. Song B-m, Avery L, editors. *The pharynx of the nematode C. elegans: a model system for the study of motor control*. *Worm*; 2013: Taylor & Francis.



## Anexo



**Anexo 1:** Desarrollo de las cepas DA464, DA1426 y N2, tomadas mediante una cámara acoplada a la lupa binocular Leica, con una magnificación de 50X.