



Universidad de Valladolid

INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

FACULTAD DE MEDICINA

Grupo de Envejecimiento y Calcio

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Efecto del silenciamiento del canal de calcio voltaje dependiente tipo L en *C. elegans*

ANDREA MORÁN CERRO

Directora: Dra. Rosalba Inés Fonteriz García

Valladolid, Julio 2025

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN		ii
1. INTRODUCCIÓN		1
1.1. Calcio y envejecimiento		1
1.2. Canal de calcio dependiente de voltaje EGL-19		2
1.3. <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio		3
1.4. El pharynx de <i>C. elegans</i>		6
1.5. Hipótesis		7
1.6. Objetivos		8
2. MATERIAL Y MÉTODOS		8
2.1. Mantenimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i>		8
2.2. Preparación de placas de agar		8
2.3. Crecimiento y siembra de bacterias		9
2.4. Preparación de huevos y sincronización de gusanos		9
2.5. Ensayos de longevidad de <i>C. elegans</i>		10
2.6. Estudios de movilidad		10
2.7. Fertilidad		10
2.8. RT-qPCR		11
2.9. Electrofaringeograma (EFG)		12
2.10. Análisis estadístico		13
3. RESULTADOS		14
3.1. Ensayos de longevidad de <i>C. elegans</i>		14
3.2. Estudios de movilidad		15
3.3. Fertilidad		17
3.4. RT-qPCR		17
3.5. Electrofaringeograma (EFG)		18
4. DISCUSIÓN		21
5. CONCLUSIONES		23
6. BIBLIOGRAFÍA		24

ABREVIATURAS

- Amp: Ampicilina
- ARNi: ARN de interferencia
- ANOVA: Análisis de la Varianza
- BLPS: *body length per second*
- Ca²⁺: calcio
- CACNA1C: es el ortólogo en humanos del canal EGL-19
- Cav1.2: canal de calcio dependiente de voltaje tipo L
- Complejo RISC: Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN
- Duración IPI: tiempo entre bombeos.
- dsRNA: ARN de doble cadena
- EFG: electrofaringeograma
- *Egl-19*: gen que codifica para el canal de calcio voltaje dependiente tipo L en *C. elegans*
- FuDR: 5-Fluoro-2' deoxyuridine
- IGF: Insulin-like growth factor
- IPTG: isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido
- IP₃R: IP3 Receptor
- *itr-1*: gen codificante del canal IP₃R en nematodos
- LB: medio de crecimiento bacteriano
- L4440: cepa bacteriana control (contiene el plásmido vacío)
- *Mcu-1*: gen que codifica para el uniportador de calcio mitocondrial
- NGM: *Nematode Growth Medium*
- OP50: cepa bacteriana *Escherichia coli* OP50
- SERCA: SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase
- *Sca-1*: gen que codifica para el ortólogo de la SERCA en *C. elegans*
- siRNA: ARN interferentes
- *pmr-1*: gen codificante del ortólogo de la bomba de calcio en el retículo endoplasmático, SPCA.
- VGCC: canales de calcio dependientes de voltaje
- *Unc-68*: gen codificante del ortólogo del canal de rianodina en el nematodo

RESUMEN

El calcio es un segundo mensajero fundamental en múltiples procesos celulares, incluyendo la contracción muscular, la neurotransmisión y la regulación génica. El envejecimiento está asociado a una desregulación de la homeostasis del calcio, un proceso que se ha relacionado tanto con el deterioro funcional propio de la edad como con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, cuyo ortólogo en *Caenorhabditis elegans* es el canal EGL-19, desempeñan un papel central en la excitabilidad muscular y neuronal. En este trabajo se ha analizado el efecto del silenciamiento del gen *egl-19* mediante ARN de interferencia en *C. elegans*, evaluando parámetros clave como la longevidad, movilidad, fertilidad, y la actividad faríngea. Los resultados muestran que la reducción de la expresión de *egl-19* afecta significativamente a la movilidad del nematodo. Sin embargo, no se observó un impacto relevante en la longevidad, puesta de huevos y bombeo faríngeo. En conjunto, los resultados sugieren que los niveles residuales de expresión de *egl-19* mantienen las funciones esenciales del canal, salvo en el control de la actividad motora, donde su reducción impacta negativamente.

Palabras clave: envejecimiento, *Caenorhabditis elegans*, silenciamiento, *egl-19*.

ABSTRACT

Calcium is a key second messenger in multiple cellular processes, including muscle contraction, neurotransmission and gene regulation. Aging is associated with dysregulation of calcium homeostasis, a process that has been linked to both age-related functional decline and the development of neurodegenerative diseases. L-type voltage-dependent calcium channels, the EGL-19 channel of *Caenorhabditis elegans*, play a central role in muscle and neuronal excitability. In this work we analyzed the effect of RNA interference silencing of the *egl-19* gene in *C. elegans*, evaluating key parameters such as longevity, motility, fertility, and pharyngeal activity. The results show that reduced *egl-19* expression significantly affects the motility of the nematode. However, no relevant impact on longevity, egg laying, and pharyngeal pumping was observed. Taken together, the results suggest that residual levels of *egl-19* expression maintain the essential functions of the carcass, except in the control of motor activity, where its reduction negatively impacts.

Keywords: aging, *Caenorhabditis elegans*, silencing, *egl-19*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Calcio y envejecimiento

El envejecimiento implica diversos cambios biológicos que provocan un deterioro gradual de las capacidades cognitivas y físicas, lo que finalmente resulta en una pérdida de autonomía y un aumento del riesgo de mortalidad (Anton & Leeuwenburgh, 2013).

El calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero ubicuo que desempeña un papel esencial en diversos procesos fisiológicos fundamentales, como la contracción muscular, la secreción, excitabilidad neuronal y la proliferación o diferenciación celular. Numerosos estudios han demostrado que la desregulación de la señalización de Ca^{2+} constituye un evento clave en el desarrollo de procesos neurodegenerativos (Alvarez et al., 2020).

El papel del desequilibrio en la homeostasis del calcio en el envejecimiento y en patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, ha sido objeto de investigación durante las últimas cuatro décadas. En la década de 1980 se propuso por primera vez la denominada “Hipótesis del Calcio en la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento cerebral”. Esta hipótesis plantea que alteraciones sostenidas en los mecanismos que regulan la homeostasis intracelular del Ca^{2+} pueden perturbar la señalización neuronal, desencadenando disfunciones cerebrales. Estas disfunciones pueden manifestarse como deterioro cognitivo asociado al envejecimiento como, en casos más severos, derivar en enfermedades neurodegenerativas (“Calcium Hypothesis of Alzheimer’s Disease and Brain Aging: A Framework for Integrating New Evidence into a Comprehensive Theory of Pathogenesis,” 2017).

Con el tiempo, esta hipótesis se ha extendido para incluir no solo la enfermedad de Alzheimer, sino también otras enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento normal. Actualmente, se reconoce que múltiples rutas de señalización del Ca^{2+} están implicadas en la neurodegeneración. Entre ellas se incluyen la captación de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático (mediada por bombas como SERCA, cuyo ortólogo en *C. elegans* es *sca-1*) y en el aparato de Golgi (*pmr-1* ortólogo de SPCA), así como la liberación desde estos compartimentos a través de canales como IP_3R , *itr-1* en el caso del nematodo y RyR (*unc-68* es el ortólogo en *C. elegans*). También intervienen mecanismos de captación mitocondrial de Ca^{2+} mediante el uniportador mitocondrial (MCU, *mcu-1*) y la entrada de calcio desde el medio extracelular a través de diversos canales de membrana plasmática, como los receptores nicotínicos de acetilcolina, *trp-4* y *clhm-1* (**Figura 1**) (Popugaeva et al., 2018).

Los efectos funcionales de la modulación de estas vías sobre la neurodegeneración son complejos y, en muchos casos, contradictorios entre distintos modelos experimentales. Por ejemplo, la activación de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática suele inducir neurodegeneración, mientras que la inhibición de genes involucrados en el almacenamiento (*crt-1*, *cnx-1*), liberación (*itr-1*, *unc-68*) o captación mitocondrial (*mcu-1*) de calcio puede tener efectos protectores o perjudiciales, dependiendo del contexto (Alvarez et al., 2020).

En conjunto, estos datos evidencian que la señalización intracelular de Ca^{2+} desempeña un papel central en los mecanismos de neurodegeneración. Sin embargo, el sistema presenta una notable complejidad, en la que una fina línea separa los niveles fisiológicos de calcio de aquellos que pueden conducir a la patología.

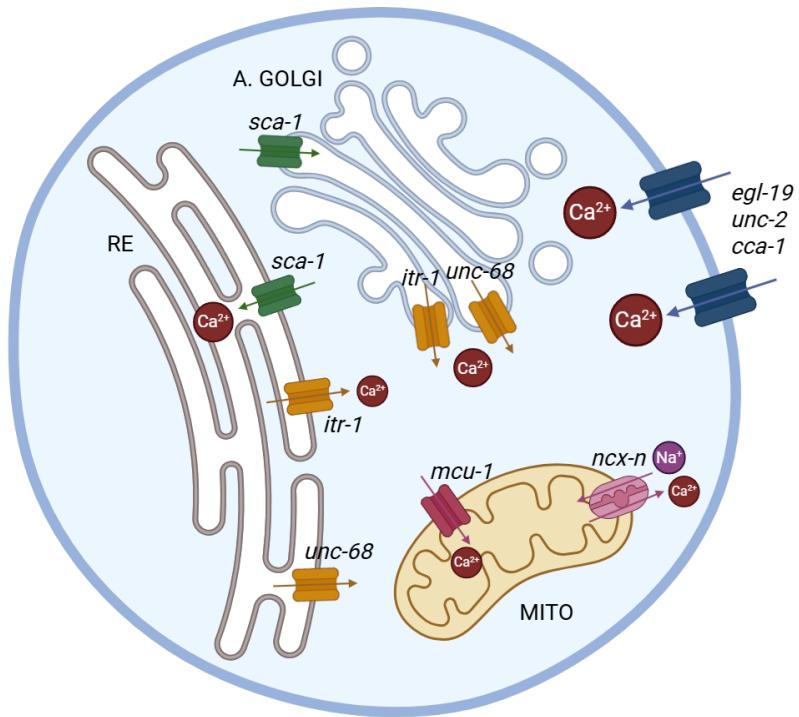


Figura 1. Representación esquemática de las rutas de señalización del calcio que han sido asociadas con la regulación del envejecimiento y los procesos neurodegenerativos en *C. elegans*. Imagen modifica (Alvarez et al., 2020).

1.2. Canal de calcio dependiente de voltaje EGL-19

Los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) son componentes esenciales de la fisiología celular en organismos animales. Son proteínas transmembrana encargadas de mediar la entrada de calcio extracelular en respuesta a despolarizaciones de la membrana plasmática, convirtiendo señales eléctricas en respuestas celulares, como la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores y la regulación de la expresión génica (Catterall, 2011; Frøkjær-Jensen et al., 2006; M. C. Wang et al., 2004; Zamponi et al., 2015)

Entre los VGCC, los canales de tipo L son particularmente relevantes en células excitables como las musculares y las neuronales. Estos canales están compuestos por una subunidad principal $\alpha 1$ formadora del poro, que incorpora un sensor de voltaje y sitios de unión farmacológicos, junto a subunidades auxiliares ($\alpha 2/\delta$, β y γ) que modulan su localización, regulación y propiedades biofísicas (Caylor et al., 2013; Lainé et al., 2011). Estos canales son críticos en procesos como la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores y la regulación génica.

Los canales de calcio tipo L se caracterizan por requerir una despolarización intensa para activarse, muestran una actividad prolongada y pueden ser bloqueados de manera significativa por concentraciones submicromolares de antagonistas orgánicos como las dihidropiridinas, las fenilalquilaminas y las benzotiacepinas (Hofmann et al., 2014).

Alteraciones genéticas en los canales de tipo L se han asociado con múltiples patologías humanas, incluidas la distrofia muscular de Duchenne, el síndrome de Timothy, el síndrome de Brugada, la encefalopatía epiléptica neonatal grave y trastornos del espectro autista (McDonald et al., 2023).

En el modelo nematodo *Caenorhabditis elegans*, el único gen que codifica para un canal de tipo L es *egl-19*, que genera tres isoformas (a, b y c). Este gen codifica la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio EGL-19 (**Figura 2**), homóloga del canal Cav1.2, CACNA1C, en humanos

(McDonald et al., 2023). EGL-19 constituye la vía principal de entrada de calcio en músculos faríngeos y corporales, esencial para la contracción y la locomoción, y regula procesos como la puesta de huevo, el apareamiento y la actividad del sistema entérico (Jospin et al., 2002; Widaad et al., 2022).

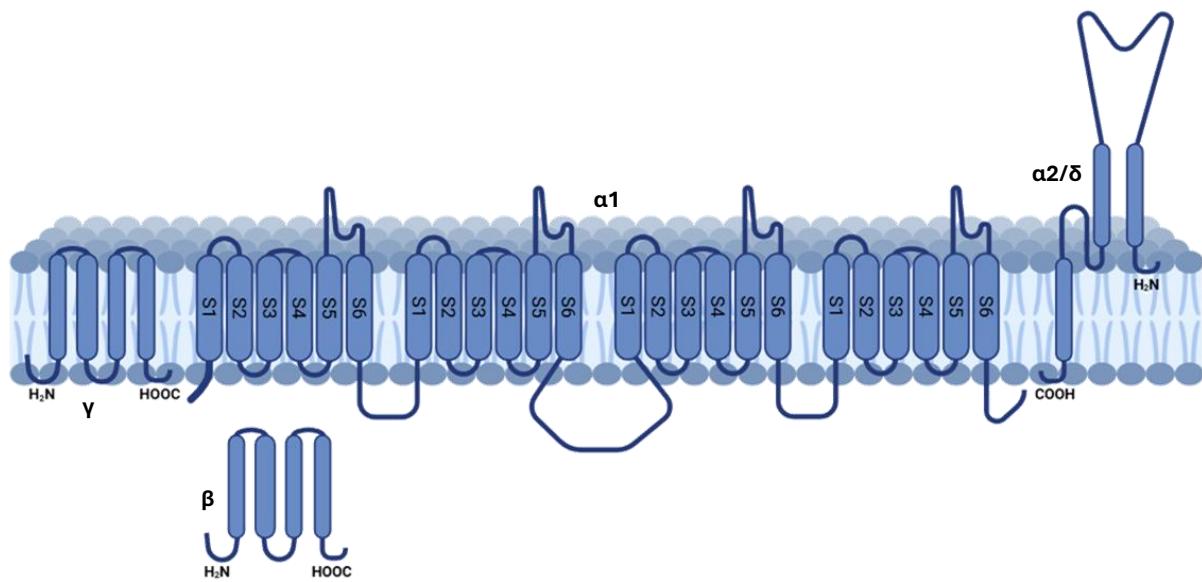


Figura 2. Estructura del canal de calcio dependiente de voltaje de tipo L EGL-19. Se trata de una proteína transmembrana formada por cuatro dominios, cada uno de ellos consta de seis hélices transmembrana. El segmento S4 presenta aminoácidos positivos que le confiere la capacidad de actuar como un sensor de voltaje. Cada dominio contiene un lazo que presenta residuos de glutamato que confieren especificidad para los iones de calcio. Además, presenta tres subunidades accesoriales: α , β , y γ . Imagen de elaboración propia.

EGL-19 se expresa ampliamente en *C. elegans*, incluyendo los músculos de la pared corporal, el músculo faríngeo, neuronas y el ganglio preanal (Jospin et al., 2002; Widaad et al., 2022). Esta amplia distribución permite que el canal participe en procesos neuromusculares y en la generación de potenciales de acción prolongados, particularmente en el *pharynx*, donde desempeña un papel funcional comparable al de los canales tipo L en los miocitos cardíacos y en los músculos lisos gastrointestinales de mamíferos (Raymond et al., 1997).

Dado que *egl-19* codifica una proteína homóloga a CACNA1C en humanos, y considerando su papel central en la excitabilidad muscular y neuronal, *C. elegans* se presenta como un modelo eficaz para estudiar cómo las alteraciones en la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje pueden afectar la fisiología muscular, especialmente en contextos relacionados con potenciales de acción prolongados.

1.3. *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio

Las mutaciones en el gen *egl-19* pueden alterar significativamente la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje, dando lugar a una amplia variedad de fenotipos. Con el objetivo de comprender mejor los efectos derivados de la modulación de la expresión de estos canales, se emplea *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental. Este nematodo presenta numerosas ventajas: es un organismo de pequeño tamaño, transparente, fácil de manipular, con un ciclo de vida corto, y posee una descendencia abundante. Además, su genoma ha sido completamente secuenciado, lo que facilita enormemente el análisis genético.

En comparación con otros modelos animales, *C. elegans* ofrece características distintivas que lo convierten en una herramienta poderosa para la biología molecular y celular. Su ciclo de

vida completa, desde huevo hasta adulto capaz de poner huevos, se desarrolla en tan solo tres días a 20°C, presentando una esperanza de vida de unos 20 días, lo que lo convierte en un buen modelo que facilita los estudios de envejecimiento (Byerly et al., 1976). La mayoría de los individuos son hermafroditas autofertilizantes, lo que permite que un solo animal sea suficiente para generar toda una población.

La embriogénesis de *C. elegans* dura aproximadamente 16 horas a 20°C. Tras la fertilización, se forma una cáscara de huevo casi impermeable que permite al embrión desarrollarse de manera independiente de la madre. No obstante, los embriones suelen permanecer en el interior del hermafrodita hasta alcanzar la etapa de unas 24 células, momento en el que son puestos. El embrión hermafrodita eclosiona y se convierte en una larva de primer estadio (L1). A partir de este momento, el animal comienza a alimentarse y pasa por cuatro etapas larvarias (L1-L4). La etapa L1 dura unas 16 horas, mientras que cada una de las siguientes etapas (L2-L4) tiene una duración aproximada de 12 horas. Al final de cada etapa se produce un período de inactividad similar al sueño, denominado letargo, durante el cual se forma una nueva cutícula. El letargo concluye con la muda de la cutícula anterior. Unas 12 horas después de la muda L4, los hermafroditas adultos inician la producción de descendencia durante 2-3 días, hasta agotar sus espermatozoides autoproducidos. Si esto ocurre, pueden seguir generando descendencia mediante el apareamiento con un macho (**Figura 3**) (WormBook, n.d.).

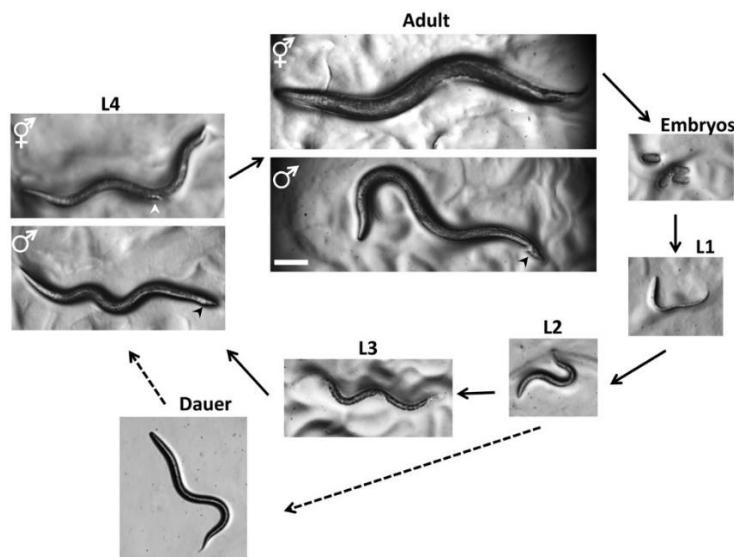


Figura 3. Ciclo de vida de *C. elegans*. Los nematodos aumentan de tamaño a lo largo de las cuatro etapas larvarias. En L4, los hermafroditas presentan una cola afilada y puede observarse el desarrollo de la vulva (marcada con una flecha blanca) (WormBook, n.d.)

El cuerpo transparente de *C. elegans* permite la visualización directa de células individuales y estructuras subcelulares en tiempo real, lo que lo convierte en un sistema ideal para el estudio de procesos biológicos como el desarrollo, la neurobiología y la contracción muscular (**Figura 4**). A lo largo de su desarrollo, el número de células permanece invariable, lo que facilita la trazabilidad de linajes celulares y la reproducción de experimentos (WormBook, n.d.).

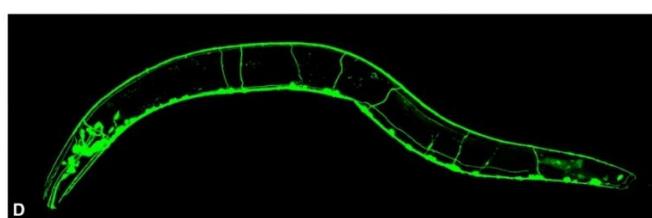


Figura 4. Imagen fluorescente que muestra el sistema nervioso marcado con un reportero GFP.

Atendiendo a la anatomía del nematodo, posee tanto músculos estriados como no estriados. Entre los músculos no estriados se encuentran 20 células musculares faríngeas, 2 músculos estomatointestinales, un músculo depresor anal, un músculo del esfínter anal, 8 músculos vulvares, 8 músculos uterinos y 10 células contráctiles de la vagina gonadal (**Figura 5**). En cuanto a las células musculares estriadas, estas se ubican en la pared corporal del gusano, siendo equivalentes funcionales de los músculos esqueléticos de los vertebrados. La estructura, composición y función del sarcómero, se encuentran altamente conservadas entre nematodos y vertebrados. Los músculos de la pared corporal son esenciales para el movimiento sinusoidal sobre superficies semisólidas y para el desplazamiento en forma de C que *C. elegans* realiza en medios líquidos (Gieseler, 2017; Riddle et al., 1997).

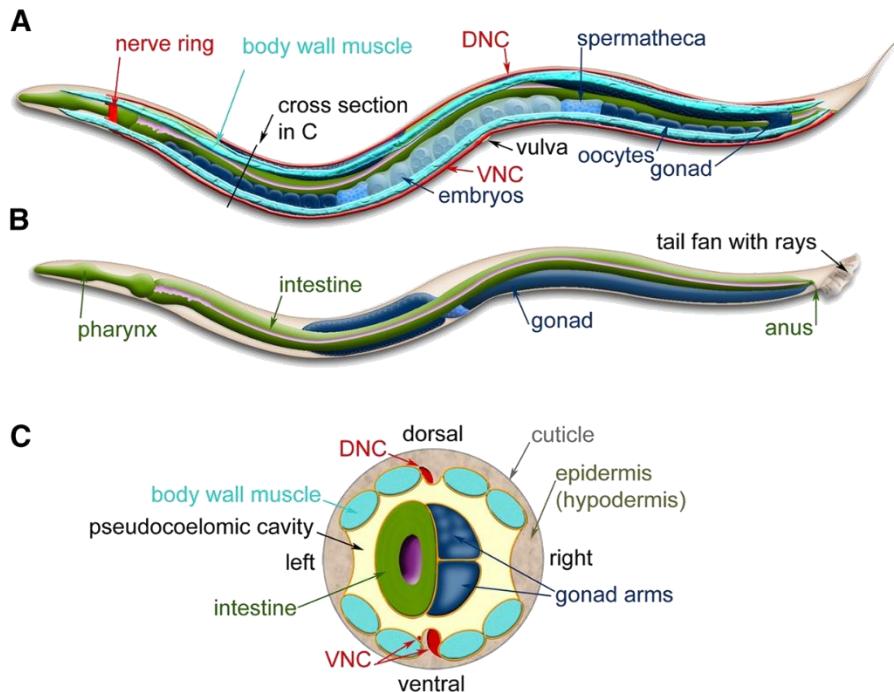


Figura 5. Anatomía de *C. elegans*. En el **A**) se muestra un hermafrodita y en **B**) un macho. **A)** El cordón nervioso dorsal (DNC) y el cordón nervioso central (VNC) se extienden a lo largo de todo el cuerpo desde el anillo nervioso. **B)** Se omiten el sistema nervioso y los músculos para visualizar con mayor claridad el *pharynx* y el *intestino*. **C)** Corte transversal de la región anterior del hermafrodita (WormBook, n.d.).

Además, se ha estimado que entre el 60% y el 80% de los genes del nematodo presentan ortólogos en humanos (Smith et al., 2013). Aproximadamente el 40% de los genes asociados a enfermedades humanas tienen un equivalente funcional claro en *C. elegans*, lo que justifica su uso en investigaciones biomédicas. Otra ventaja destacada es su facilidad de cultivo y bajo coste de mantenimiento en el laboratorio.

Una de las características más destacadas de *C. elegans* es la posibilidad de silenciar genes específicos de manera sencilla y eficiente mediante la técnica de ARN de interferencia (ARNi). Esta técnica puede aplicarse simplemente alimentando a los nematodos con bacterias modificadas para expresar el ARN de doble cadena (dsRNA) dirigido contra el gen de interés, lo que permite analizar de forma directa la función génica en organismos vivos sin necesidad de generar mutantes genéticos complejos. Tras la ingestión, el dsRNA es procesado por la enzima Dicer en pequeños ARN interferentes (siRNA) de 20-25 nucleótidos. Los siRNA se integran en el complejo RISC que guía la degradación del ARN mensajero complementario, bloqueando la traducción de la proteína diana (Kamath et al., 2000; Lezzerini et al., 2015).

Finalmente, cabe señalar que *C. elegans* es un organismo inocuo para los humanos, ya que no puede crecer a temperaturas corporales y, por lo tanto, no representa un riesgo biológico alguno. Estas cualidades hacen de este nematodo un modelo idóneo para estudiar

mutaciones específicas, como las que afectan al canal de calcio tipo L EGL-19, y su implicación en procesos como la contracción muscular y la aparición de fenotipos relacionados con enfermedades humanas.

1.4. El *pharynx* de *C. elegans*

El *pharynx* de *C. elegans* es un órgano neuromuscular lineal y bilobulado, rodeado por una membrana basal, cuya función principal es bombear bacterias desde el entorno hacia el intestino del nematodo, proceso esencial para su alimentación (Kerr et al., 2000). Este bombeo se realiza mediante contracciones musculares cíclicas, conocidas como bombeo faríngeo, que están impulsadas por potenciales de acción, que se asemejan cualitativamente a los potenciales de acción cardíacos de los vertebrados, lo que convierte al *pharynx* en un modelo relevante para el estudio de patologías cardíacas humanas (Franks et al., 2002).

Anatómicamente, el *pharynx* está compuesto por diferentes tipos celulares que forman un sincitio funcional, incluyendo células musculares mioepiteliales, células estructurales, células secretoras y neuronas (Raymond et al., 1997; Schüler et al., 2015; Vinogradova et al., 2006). La estructura del órgano se divide en varias secciones: cavidad bucal, procorpus, bulbo anterior (metacorpus), itsmo, bulbo posterior y la válvula faríngeo-intestinal (**Figura 6**). La contracción del músculo del bulbo anterior facilita la captación de bacterias, mientras que la contracción del músculo del bulbo terminal se encarga de triturarlas antes de dirigir los desechos al intestino (**Figura 7**) (Raymond et al., 1997). El bombeo faríngeo está regulado tanto por el sistema nervioso autónomo faríngeo como por la serotonina, que modula la actividad del órgano en presencia o ausencia del alimento.

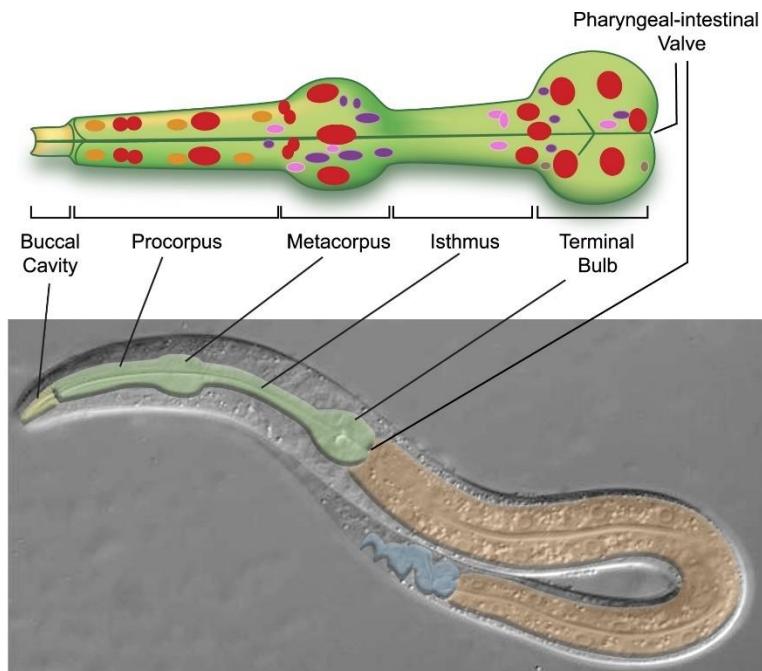


Figura 6. Núcleos del *pharynx* de *C. elegans*. El tracto digestivo está formado por un tubo epitelial que incluye la cavidad bucal (amarillo), la faringe o intestino anterior (verde), el intestino medio (naranja) y el intestino posterior (azul). En la parte superior de la imagen se muestran los núcleos presentes en el *pharynx*, correspondientes a células musculares (rojo), neuronas (morado), epitelio (naranja), células marginales (rosa) y glándulas (marrón). Imagen obtenida de (WormBook, n.d.).

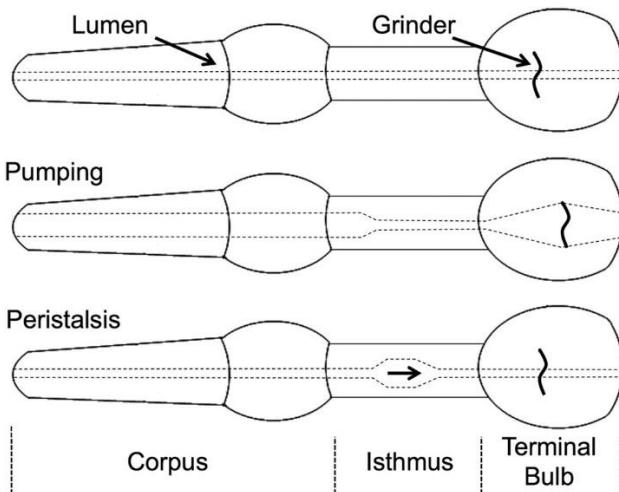


Figura 7. Partes del *pharynx*: el cuerpo, el istmo y el bulbo terminal. Durante el bombeo, el alimento ingresa al cuerpo y es transportado a lo largo del istmo por ondas peristálticas que se propagan hacia atrás. Posteriormente, durante el bombeo siguiente, el alimento es fragmentado por el triturador cuticular en el bulbo terminal (Trojanowski et al., 2016).

El sistema nervioso autónomo faríngeo regula la actividad motora del *pharynx* tanto en presencia como en ausencia de alimento. Dentro de este sistema, las neuronas motoras MC y M3 desempeñan un papel fundamental. Las neuronas MC inducen la contracción rápida del músculo faríngeo mediante la activación del receptor colinérgico eat-2/eat-18, mientras que la neurona M3 participa en la fase de repolarización generando hiperpolarizaciones inhibitorias a través del canal de cloruro AVR-15, sensible al glutamato (Shtonda & Avery, 2005).

Desde el punto de vista electrofisiológico, la actividad del *pharynx* puede registrarse mediante el electrofaringograma (EFG), que monitoriza los flujos de corriente asociados a los cambios en el potencial de membrana de las células musculares faríngeas (Raymond et al., 1997).

El potencial de acción del *pharynx* está controlado principalmente por tres corrientes dependientes de voltaje: una mediada por canales de calcio tipo T (CCA-1), otra por canales de calcio tipo L (EGL-19), y una tercera por canales de potasio que participa en la repolarización. El canal EGL-19 se activa a voltajes elevados y presenta una inactivación lenta, lo que le permite sostener la fase de meseta del potencial de acción y, por ende, mantener la contracción muscular durante ese periodo (Shtonda & Avery, 2005).

La similitud funcional entre el *pharynx* del *C. elegans* y el corazón de los vertebrados, junto con la presencia de homólogos de canales iónicos, bombas y transportadores característicos de la fisiología cardiaca humana, hacen del *C. elegans* excelente modelo para el estudio de mutaciones arritmogénicas, especialmente aquellas relacionadas con canales de calcio tipo L, como el canal EGL-19.

1.5. Hipótesis

En las últimas décadas, se ha propuesto que los desequilibrios en la homeostasis del calcio desempeñan un papel clave en el envejecimiento. Esto sugiere que alteraciones persistentes en los mecanismos que regulan los niveles intracelulares de Ca^{2+} pueden interferir en distintos procesos moleculares causando defectos en el organismo.

Por ello, se espera que el silenciamiento de *egl-19* a través del ARNi reduzca la expresión del canal, se produzcan efectos en distintos parámetros del nematodo como la esperanza de vida, movilidad, fertilidad, o el bombeo faríngeo. Además, el uso de distintas dosis de ARNi, 20% y 100%, producirán distintos efectos en el nematodo.

1.6. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es determinar el efecto que se produce en *C. elegans* al silenciar el gen *egl-19* con distintas dosis de ARNi: 20% y 100%, observando sus posibles efectos en comparación con los nematodos control. Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Estudiar posibles efectos del silenciamiento de *egl-19* sobre la esperanza de vida.
- Evaluar distintos parámetros de la movilidad de *C. elegans*.
- Estudiar la puesta de huevos del nematodo.
- Verificar el grado de silenciamiento del gen *egl-19* mediante ARNi a través de RT-qPCR.
- Evaluar alteraciones en el bombeo faríngeo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*

En este trabajo se utilizó como modelo de estudio el nematodo *Caenorhabditis elegans*, concretamente la cepa *wild type* N2. Los nematodos se mantuvieron en placas de NGM (*Nematode Growth Medium*) sembradas con la cepa bacteriana OP50 de *E.coli*, alimento para el *C. elegans*, y a 20°C.

Una vez alcanzado el estadio de adulto joven, los gusanos se transfirieron a placas de agar sembradas con diferentes bacterias, para poder llevar a cabo los diferentes experimentos:

- L4440: bacteria que contiene el plásmido vacío, no codifica para el gen *egl-19*, de modo que actúa como control.
- *Egl-19 20%*: contiene un 80% de la bacteria L4440 y un 20% de la bacteria que codifica el ARNi de *egl-19*.
- *Egl-19 100%*: bacteria que contiene el plásmido que codifica para el ARNi del gen *egl-19*.

2.2. Preparación de placas de agar

Para el mantenimiento del *Caenorhabditis elegans* se utilizaron placas de agar sembradas con diferentes bacterias en función del experimento. Para llevar a cabo la preparación de las placas:

1. A una botella de 500ml que contenía 250ml de agua desionizada, se añadieron 0'75g de NaCl, 4'25g de Agar y 0'625g de peptona.
2. Despues de añadir todos los reactivos, se agito la botella para posteriormente introducirla en el autoclave durante unos 45 min.
3. Una vez autoclavada, la botella se mantuvo en un baño a 60°C con el objetivo de que se atemperase y no solidificase el agar.
4. A continuación, una vez atemperada, dentro de la cabina de flujo laminar, se añadieron 250µl de colesterol, 250µl de CaCl₂, 250µl de MgSO₄ y 6'25ml del buffer KPO₄ a cada botella.

Las placas usadas para los experimentos contenían 250 μ l de IPTG ($[IPTG]_{final}$ 1mM), 250 μ l de carbenicilina ($[carbenicilina]_{final}$ 50 μ M), y 125 μ l de FuDR ($[FuDR]_{final}$ 15 μ M), además de todo lo comentado anteriormente.

El FUdR (5-Fluoro-2' deoxyuridine) consiste en un compuesto encargado de inhibir la síntesis de ADN (Rooney et al., 2014). El IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido) por su parte se utiliza para inducir la expresión de vectores plasmídicos en bacterias transformadas (Marbach & Bettenbrock, 2012) y finalmente la carbenicilina es un antibiótico.

Es muy importante, antes de añadir el agar preparado a las placas, resuspender correctamente con la ayuda de una pipeta de 50ml.

5. Finalmente, en función del experimento y las placas necesarias, se pipetearon 10ml de Agar a las placas de 55mm Ø y 4 ml de Agar a las placas de 35mm Ø.

2.3. Crecimiento y siembra de bacterias

Otro de los componentes esenciales para poder realizar los experimentos son las bacterias, que actúan como alimento para el *C. elegans*. La metodología llevada a cabo para su crecimiento fue la siguiente:

1. En un tubo de crecimiento bacteriano se añadió medio LB + Amp y la bacteria obtenida del stock, según las cantidades necesarias en función del ensayo.
2. El tubo se dejó *overnight* en el agitador a 37°C.

Una vez crecida la bacteria, el siguiente paso fue medir y ajustar la densidad óptica, es decir se midió la turbidez que se corresponde con la cantidad de bacteria presente.

1. Con ayuda de la pipeta se resuspendió correctamente el tubo para posteriormente añadir 250 μ l de bacteria en uno de los pocillos de la placa de 96. En este caso, se realizaron duplicados, es decir 2 pocillos por cada bacteria.
2. Se procedió a medir la densidad óptica a una longitud de onda de 595nm.

Concretamente, en los diferentes ensayos llevados a cabo, la densidad óptica se ajustó a 0'5 o 0'7, en función del número de gusanos presentes en cada placa y el tiempo que fuesen a estar en ella. La densidad óptica se ajustó con medio LB + Amp. En el caso de las placas de 55mm de diámetro, se sembraron entre 400-500 μ l de bacteria, y en el caso de las placas de 35mm Ø, 200 μ l de bacteria.

2.4. Preparación de huevos y sincronización de gusanos

Para realizar los experimentos los gusanos deben de estar sincronizados, es decir tener la misma edad, para ello procedemos a la obtención de huevos. De esta forma todos estarán en el mismo estadio y condiciones. Para lo cual:

1. Se recolectaron los gusanos adultos de las placas de agar añadiendo entre 1-2ml de la solución salina M9 (cloruro sódico, fosfato monopotásico, fosfato disódico y sulfato de magnesio) que se pipeteó posteriormente a los eppendorfs.
2. Se centrifugaron 1 min a 2000 rpm (0'3g). Lo que permitió separar las bacterias y concentrar los gusanos.
3. Con ayuda de una pipeta se retiró el sobrenadante y se procedió a realizar una rotura química añadiendo a cada eppendorf 150 μ l una mezcla de lejía + NaOH (proporción 2:1) y 250 μ l de buffer M9 para rebajar la lejía.
4. Seguidamente, se realizó una rotura mecánica con el vortex: 20 seg cada 2 min durante unos 10 min.

5. A continuación, fue necesario retirar la lejía, por lo que se volvió a centrifugar, en este caso 1 min a 8000 rpm (ya no hay presencia de gusanos, solo huevos que son más resistentes).
6. Se retiró el sobrenadante dejando 100 μ l y se añadió 1ml de la solución salina M9, y se agitó.
7. Se volvió a centrifugar 1 min a 8000rpm.
8. Finalmente, se retiró el sobrenadante y con lo poco que hubiese quedado se resuspendió correctamente el pellet de huevos, para a continuación pipetear unos 15 μ l en placas nuevas de agar con la bacteria OP50; observando al microscopio el número de huevos por si fuese necesario añadir más.
9. Una vez la gota de huevos estuvo seca, las placas se colocaron en el incubador a una temperatura de 20°C.

2.5. Ensayos de longevidad de *C. elegans*

Para estos ensayos fue necesario la obtención de los huevos. Cuando los nematodos alcanzaron el estadio de adulto joven sincronizados (día 1), se transfirieron unos 10-15 gusanos por placa, a placas de agar sembradas con sus respectivas bacterias en función de las condiciones comentadas anteriormente.

Los gusanos presentes en las placas fueron contados todos los días con el objetivo de ver los muertos, aquellos que no respondían al contacto del pick (alambre de platino) y retirarlos. Además, se contaron también los gusanos censurados, es decir aquellos nematodos que sufrían protusión de vulva, los que habían desaparecido y los que se encontraban por debajo del agar.

Todas las placas, independientemente de la condición se mantuvieron a 20°C dentro del incubador.

2.6. Estudios de movilidad

Se llevaron a cabo estudios de movilidad a días 1, 3 y 5 de gusano adulto joven, aprovechando las mismas placas del ensayo de longevidad. Por cada una de las condiciones, se grabaron videos con una duración de 30 seg, tras previamente haber sometido a los gusanos a un estímulo mecánico.

Se cuantificaron los parámetros de: longitud recorrida, velocidad máxima y media, área y BLPS (*body lenght per second*), utilizando el complemento de wrMTrck de ImageJ.

2.7. Fertilidad

Para realizar los ensayos de fertilidad se prepararon placas de agar sembradas con un 20% o 100% de la bacteria que contiene el ARNi contra *egl-19* y las placas control con la bacteria con el plásmido vacío. Posteriormente, se colocó un gusano adulto joven (día 1) en cada una de las placas y se fue contabilización la puesta de huevos, es decir el número de huevos puestos, y tras 24 horas, ese mismo gusano se transfirió a una nueva placa. Repitiendo el mismo proceso durante 5 días.

2.8. RT-qPCR

Para determinar el grado de silenciamiento del gen que obtuvimos con las dos dosis distintas de ARNi, una al 20% y otra al 100%, se realizó un ensayo de RT-qPCR con gusanos adultos día 4:

1. Se recogieron los gusanos en eppendorfs con la pipeta de vidrio añadiendo 1-2 ml de buffer M9 a las placas.
2. Se centrifugaron durante 1 min a 2000rpm. Posteriormente se retiró el sobrenadante, y se añadió 1ml de buffer M9.
3. Se volvió a centrifugar de nuevo 1 min a 2000rpm. Repitiendo este proceso las veces que fuesen necesarias hasta conseguir limpiar y retirar por completo toda la bacteria.
4. En la última centrifugación, se retiró el sobrenadante hasta el ras del pellet.
5. A continuación, los eppendorfs fueron introducidos durante 30 seg en nitrógeno líquido, y posteriormente otros 30 seg en hielo. Repitiendo este proceso 2 veces.
6. Finalmente, los tubos fueron guardados a -80°C.

El siguiente paso fue llevar a cabo la extracción del ARN a través del método de pestle:

1. A cada uno de los eppendorfs se les añadió 1ml de fenol/guanidina (Quiazol) que se transfirió a un nuevo tubo.
2. Se centrifugaron a 12000 g durante 1min a 4°C. Posteriormente, en cada eppendorf se introdujo un homogeneizador con el objetivo de disgregar los gusanos.
3. Se añadieron 200µl de cloroformo por tubo.
4. Se volvieron a centrifugar a 12000 g durante 15min a 4°C.
5. A continuación, se pipeteo la fase superior acuosa correspondiente al ARN a un nuevo eppendorf. Añadiendo a continuación un volumen 1:1 de isopropanol.
6. Se incubaron 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 12000g durante 10 min a 4°C.
7. Finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se añadió 1ml de etanol al 70%, centrifugando de nuevo a 7500 g durante 5 min a 4°C. Se repitió este paso 2 veces.
8. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ARN. Una vez seco, se añadió 40µl de H₂O libre de RNAasas a cada tubo.
9. Finalmente, se incubaron a 55°C durante 10 min. Después, se llevó a cabo la cuantificación del ARN en el Nanodrop.

Una vez extraído el ARN, el siguiente paso fue llevar a cabo la **síntesis del cDNA** según las indicaciones del kit, pipeteando todos los reactivos en cada uno de los eppendorfs, hasta obtener un volumen final de 20µl:

Condición	µl ([1 µg])	5x Script reaction mix	iScript reverse transcriptase	H ₂ O nucleasa free
En función de la concentración en el tubo		4 µl	1 µl	Agua suficiente para un volumen final de 20 µl

Una vez preparados, se introdujeron en el termociclador:

Priming	25°C	5 min
Trans reverse	46°C	20 min
Inactivación RT	95°C	1 min
Opcional	4°C	mantenimiento

Finalmente se congelaron a -20°C hasta su uso en la RT-qPCR:

MasterMix	Primer	H ₂ O dd
10 µl (pocillo)	0,5 µl (pocillo)	8 µl (pocillo)

Los cebadores utilizados fueron:

Primer forward (5' a 3')	TCGACCGCTTCGTCTTGATC
Primer reverse (5' a 3')	GGCAATGTGGAGCAAAGGA

2.9. Electrofaringeograma (EFG)

Esta técnica permite registrar la actividad eléctrica durante el bombeo del *pharynx*. En un registro del EFG, cada bombeo faríngeo genera una onda estereotipada, compuesta por cinco transitorios eléctricos distintos, cada uno con una anotación específica. Estos eventos ocurren en el siguiente orden (**Figura 8**) (Dillon et al., 2009):

- e: un pequeño pico positivo que refleja la actividad de la neurona motora colinérgica MC.
- E: un pico ascendente correspondiente a la despolarización muscular.
- P: una fase de meseta durante la cual el músculo permanece despolarizado y contraído, caracterizada por varios picos negativos mediados por la liberación de glutamato desde la neurona motora M3.
- R: un pico descendente de gran amplitud que marca la relajación y repolarización del cuerpo del músculo.
- r: un pico descendente de menor amplitud que representa la repolarización del músculo en el bulbo terminal.

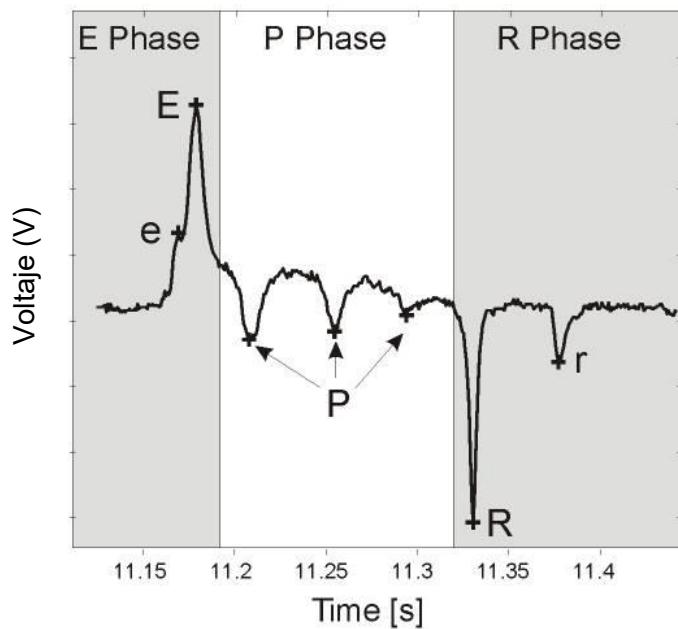


Figura 8. Registro típico de un EFG. La forma de onda está compuesta por cinco transitorios eléctricos: "e", pequeño pico positivo, causado por la activación de la neurona MC; "E", gran pico positivo, asociado a la contracción muscular rápida; "P", pequeños picos negativos generados por la activación de la neurona M3; "R", gran pico negativo, correspondiente a la relajación rápida del músculo del cuerpo, y "r", pequeño pico negativo, que refleja la relajación del bulbo terminal. Imagen obtenida de (Dillon et al., 2009).

Para registrar la actividad eléctrica del *pharynx* se utilizó el sistema de ScreenChip NemaMetrix (**Figura 9**) que detecta los potenciales eléctricos generados por las contracciones y relajaciones rítmicas del *pharynx* mientras el gusano bombea. El software NemAnalysis permite analizar la frecuencia, amplitud y duración de los bombeos, así como identificar los picos característicos del EFG que corresponden a distintas fases del ciclo de contracción y relajación muscular y neuronal.

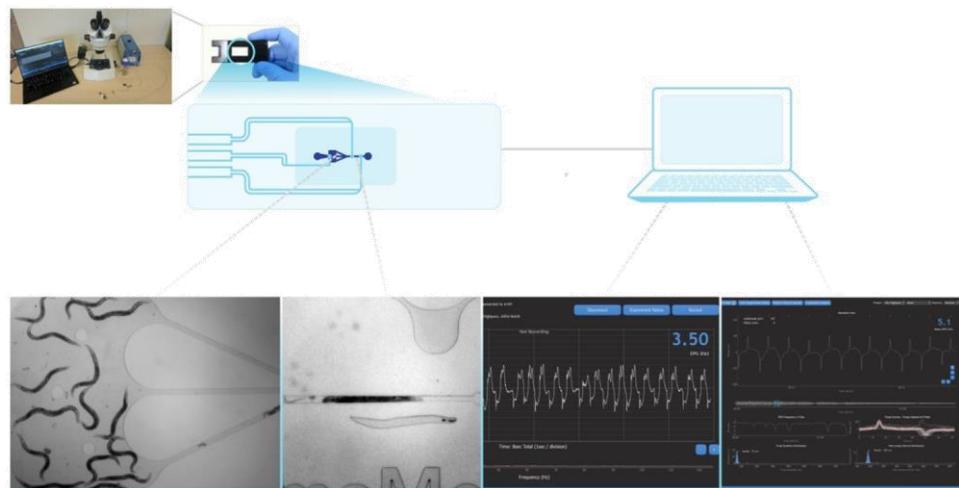


Figura 9. Esquema del sistema de trabajo. En la parte inferior se muestran los gusanos dentro de la cámara y los registros del electrofaringeograma.

Procedimiento:

1. En un eppendorf que contenía 500 μ l de medio M9 se picaron 100 gusanos adultos a día 5 por cada condición. Se dejó que sedimentaran los nematodos.
2. Se retiró el medio del M9 del eppendorf y se lavaron los gusanos con 700 μ l de una solución de Tween20 al 0,1%.
3. El eppendorf se mezcló suavemente invirtiéndolo unas 10 veces. Posteriormente, se le dio un pulso para que sedimentasen. Tras ello, se retiró el sobrenadante.
4. Se añadieron 1000 μ l de buffer M9, y este lavado se repitió 2 veces.
5. En el lavado 4 se resuspendieron los gusanos en 1 ml de una solución de serotonina al 2,3 mM,
6. Se dejaron posar después de haberlos agitado suavemente, se retiró el medio y se dejaron en una solución de serotonina para proceder a la realización del experimento y se esperaron 15 min antes de dar comienzo.

Con el objetivo de registrar la actividad eléctrica se utilizó el sistema de ScreenChip NemaMetrix con un chip SC60. Todos los experimentos fueron realizados entre los 15 min y hasta un máximo de 90 min posteriores a la exposición a la serotonina, registrando la actividad eléctrica durante un periodo de 3 min por cada gusano.

Para el análisis se descartaron los experimentos en los que la frecuencia no alcanzó 0,1 Hz y en aquellos donde la señal/ruido fuese muy elevada.

2.10. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando diferentes softwares como GraphPad Prism, SPSS u Origin. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). Para comparar diferencias entre dos grupos se utilizó la prueba *t* de Student para muestras independientes. En los casos con más de dos grupos o múltiples condiciones, se aplicó un

análisis de varianza de una vía, ANOVA de una vía, siempre y cuando cumplieren la normalidad. En caso de que no fuese así, se realizó el test estadístico de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney.

3. RESULTADOS

3.1. Ensayos de longevidad de *C. elegans*

El objetivo principal del ensayo de longevidad fue determinar si el silenciamiento del gen *egl-19* produjo un efecto significativo en la esperanza de vida de los nematodos.

La **Figura 10** refleja la diversidad de los resultados obtenidos. En el ensayo de supervivencia #1 observamos que los gusanos en presencia de un 100% ARNi son los que tienen una mayor esperanza de vida y en el caso del 20% tienen una situación intermedia. Estos datos son más acentuados para la mortalidad #2. Sin embargo, en el caso de la mortalidad #3, los resultados obtenidos son opuestos, ambas dosis disminuyen la vida media. Finalmente, en el caso de la mortalidad #4 no se observa ningún efecto.

En la **Tabla 1**, se ven los datos numéricos de nematodos totales y censurados. Como se puede apreciar, existe un gran número de gusanos censurados. Se ve que en la supervivencia #2 hay un altísimo número de gusanos censurados que pueden modificar los resultados de la gráfica de supervivencia.

En ninguno de los casos hay diferencias significativas en los resultados.

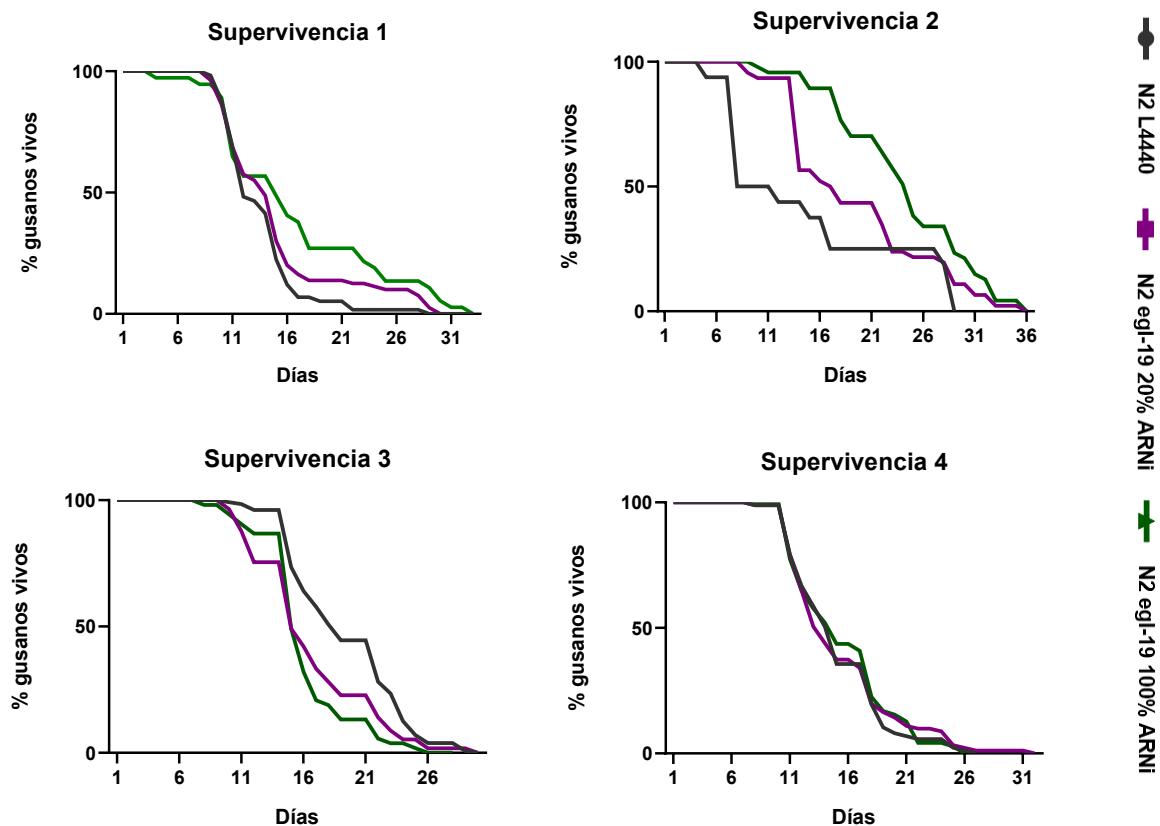


Figura 10. Esperanza de vida de *C. elegans*. Se representa el porcentaje de gusanos vivos frente al tiempo (días) de las tres condiciones experimentales. En color gris se muestra el control (N2 L4440), en verde la condición experimental de ARNi = 100%, y en morado la condición experimental ARNi = 20%. N=4 experimentos.

Tabla 1. Número de nematodos presentes y censurados por cada una de las condiciones experimentales, N2 L4440, *egl-19* 20% y *egl-19* 100%, en cada uno de los experimentos.

	N total			N censurados		
	N2 L4440	N2 egl-19 20%	N2 egl-19 100%	N2 L4440	N2 egl-19 20%	N2 egl-19 100%
Supervivencia 1	98	100	60	40 (40,8%)	20 (20%)	23 (38,3%)
Supervivencia 2	107	138	92	91 (85%)	92 (66,7%)	45 (48,9%)
Supervivencia 3	158	83	75	30 (19%)	26 (31,3%)	22 (29,3%)
Supervivencia 4	92	100	100	5 (5,4%)	9 (9,0%)	29 (29%)

3.2. Estudios de movilidad

Se estudiaron distintos parámetros relacionados con la movilidad de *C. elegans*: distancia recorrida, velocidad máxima y media, área y BLPS (body lenght per second), en los días 3 y 5 de su desarrollo con el objetivo de determinar el efecto del silenciamiento de *egl-19*.

La **Figura 11.A**, muestra que con la condición experimental ARNi 100% los gusanos recorren una distancia significativamente menor a día 3 en comparación con el control. Concretamente disminuye un 17,87%.

En el caso de la velocidad máxima, nuevamente solo a día 3 los gusanos tratados con ARNi al 100% también presentan una disminución de la velocidad máxima del 16,67% (**Figura 11.B**).

El área del gusano es también significativamente menor, en este caso tanto a día 3 como a día 5 para los nematodos de la condición ARNi del 100%, siendo aún mayor la diferencia en el día 5 con respecto al día 3, 17,42% y 10,20% respectivamente (**Figura 11.C**).

Para la velocidad media a día 3 en ambas condiciones hay una disminución estadísticamente significativa entre el control y las dos condiciones experimentales, ARNi del 20% un 16,22% menos y un 22,97% para la condición ARNi del 100% (**Figura 11.D**).

Por último, en el parámetro BLPS, ambas condiciones mostraron una disminución significativa, del 13,68% y 17,89%, con respecto al grupo control en el día 3 (**Figura 11.E**).

Para el resto de los casos no comentados no se observaron diferencias significativas entre las condiciones experimentales y el control.

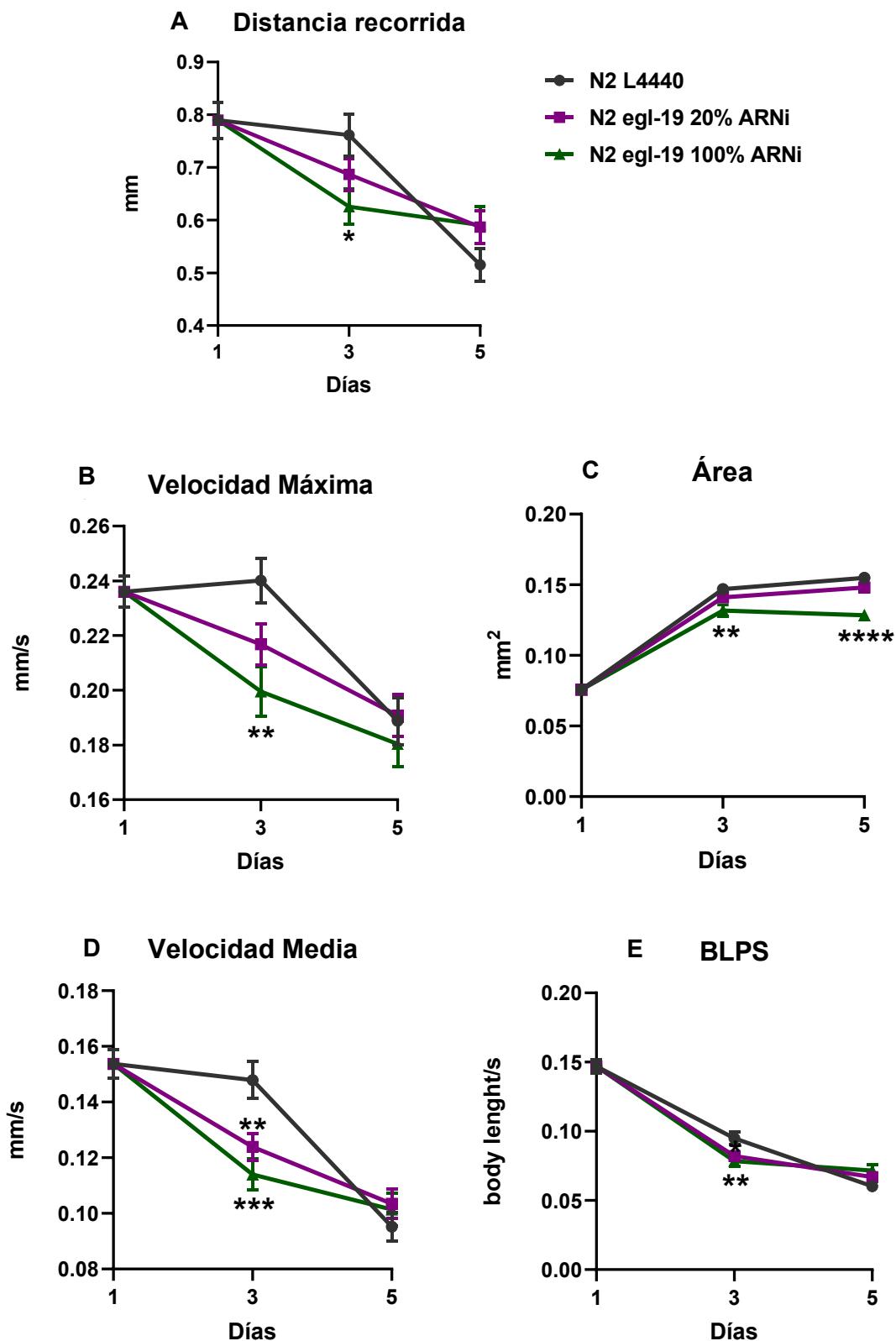


Figura 11. Parámetros de movilidad medidos en un periodo de tiempo de 30 segundos a día 1, 3 y 5 de adulto joven. **A)** Distancia recorrida por el nematodo (mm). **B)** Velocidad máxima (mm/s). **C)** Área del nematodo (mm²). **D)** Velocidad media (mm/s). **E) BLPS** (body length per second) (body length/s). (N=4 experimentos en total con 79 gusanos en el control, 88 gusanos en la condición egl-19 20% y 79 gusanos en egl-19 100%). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). *p-valor < 0,05, **p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,005, ****p-valor < 0,001 referido a cada condición experimental con respecto al control. Test estadístico aplicado fue una ANOVA de una vía y Kruskal-Wallis.

3.3. Fertilidad

Para evaluar el impacto que el silenciamiento del gen *egl-19* ejerce sobre la fertilidad, en ambas condiciones experimentales, se cuantificó la puesta de huevos de un adulto joven diariamente (**Figura 12.A**), además de la puesta de huevos total (**Figura 12.B**), a largo de los primeros 5 días de vida adulta.

En el caso de la puesta de huevos total no se observaron diferencias significativas entre cada una de las condiciones (*egl-19* 20% y *egl-19* 100%) y el control (N2 L4440) (**Figura 12.B**). Para todas las condiciones el pico máximo de puesta de huevos se sitúa en el día 2, y a partir de ahí comienza a disminuir. Por otro lado, la puesta de huevos diaria no muestra diferencias significativas a lo largo de los días (**Figura 12.A**).

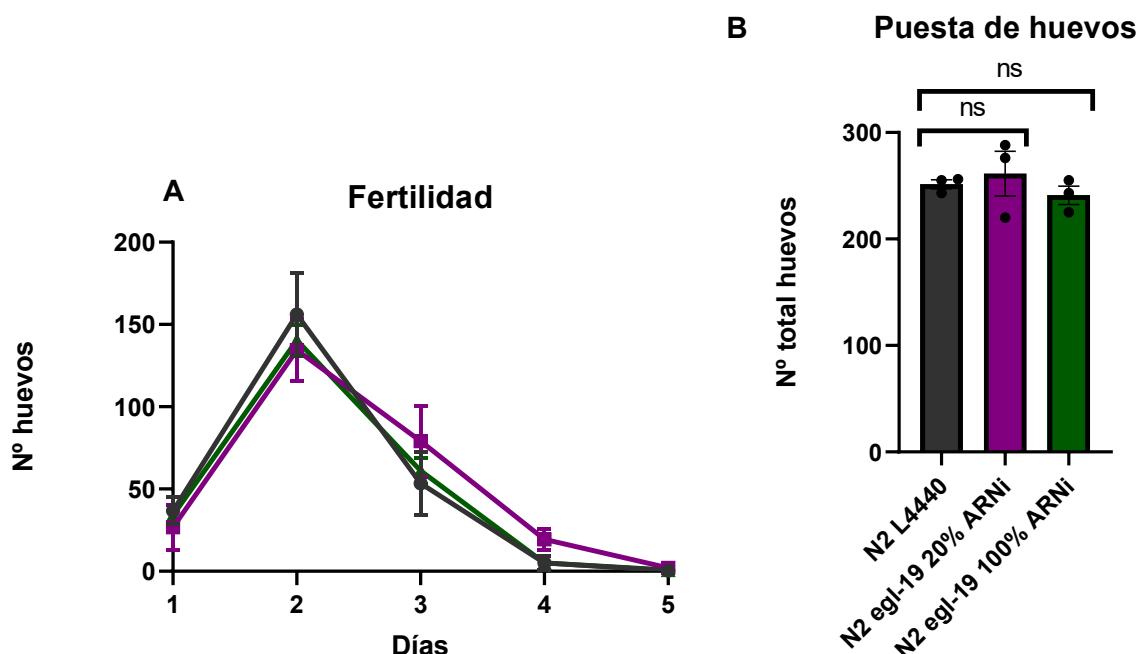


Figura 12. Fertilidad de *C. elegans* bajo distintas condiciones experimentales (N2 L4440, *egl-19* 20% y *egl-19* 100%). **A)** Número de huevos puestos cada día por el nematodo a lo largo del tiempo (días). **B)** Puesta total de huevos por gusano en los 5 días. (N=3 experimentos total de 15 gusanos por condición). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). *p-valor < 0,05. Se realizó un análisis ANOVA de una vía.

3.4. RT-qPCR

Con el objetivo de verificar la eficacia del silenciamiento génico inducido mediante ARNi, se realizó un análisis de expresión génica por RT-qPCR. Se cuantificaron los niveles de ARN mensajero del gen diana en gusanos tratados con ARNi dirigido frente a *egl-19*, y se compararon con los niveles de expresión en gusanos control usando 4 muestras distintas de gusanos a día 5 y que estuvieron sometidos a una concentración de plásmido del 100%.

La cuantificación relativa de la expresión génica se llevó a cabo mediante el método $\Delta\Delta Ct$, normalizando con respecto al gen de referencia endógeno o *housekeeping*, *cdc-42*. Esta aproximación permitió evaluar el grado de silenciamiento alcanzado tras el tratamiento, determinando si la exposición al ARNi fue suficiente para reducir significativamente la transcripción del gen objetivo.

El análisis de los datos nos indica que hay un silenciamiento significativo del gen de un 60% (**Figura 13**).

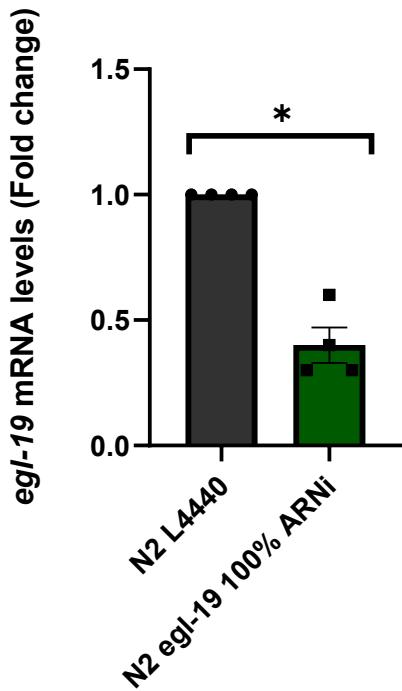


Figura 13. Expresión relativa del gen *egl-19* tras el tratamiento con ARNi, cuantificada por RT-qPCR. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). **p*-valor < 0,05. Test estadístico aplicado fue Mann-Whitney (N=3 experimentos).

3.5. Electrofaringeograma (EFG)

Se realizaron experimentos en los nematodos del grupo control y los nematodos de la condición experimental *egl-19* 100%, midiendo los parámetros que se muestran en la **Figura 14** (frecuencia, duración del bombeo, tiempo entre bombeos y ratio R/E).

En condiciones basales, los gusanos control, N2 L4440, presentaron una frecuencia de bombeo faríngeo media de 2,5 Hz, con una duración media del bombeo de 110 ms. En el caso de los nematodos *egl-19* 100%, se observó una pequeña disminución en ambos parámetros con respecto al control, pero sin ser significativa (**Figura 14.A-B**).

En el caso del tiempo entre bombeos los valores son más altos para la condición experimental con respecto al control, pero de nuevo estas diferencias no son significativas (**Figura 14.C**). Finalmente, la ratio R/E tampoco muestra diferencias significativas entre la condición experimental *egl-19* 100% y el control (**Figura 14.D**).

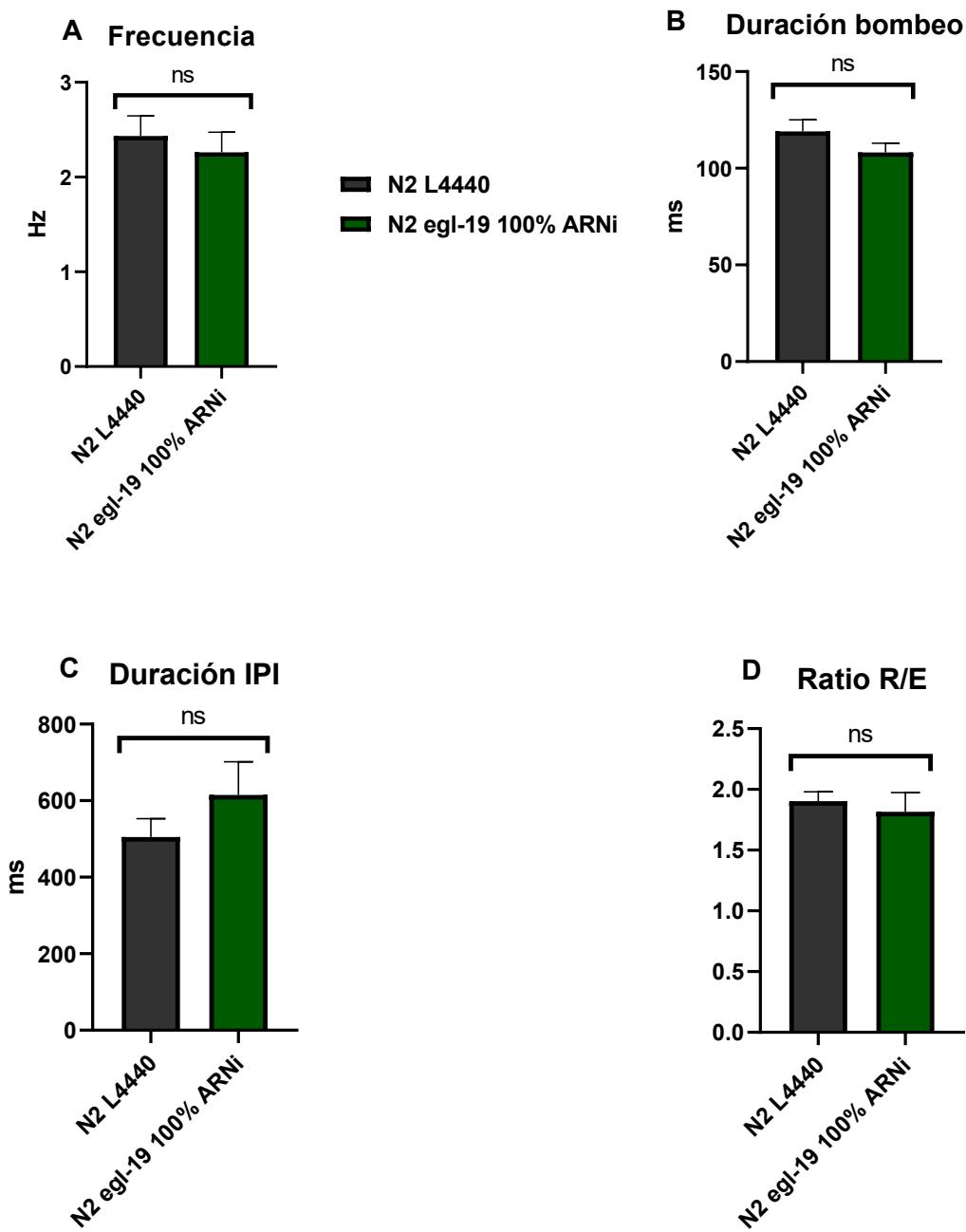


Figura 14. Parámetros del EFG en *C. elegans* medidas en períodos de 3 min. **A)** Frecuencia de bombeo faríngeo (Hz). **B)** Duración del bombeo (ms). **C)** Duración inter-bombeo (ms). **D)** Ratio R/E. (N=3 experimentos en total con 29 gusanos en el control, y 32 gusanos en *egl-19* 100%). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). El test estadístico aplicado fue Mann-Whitney.

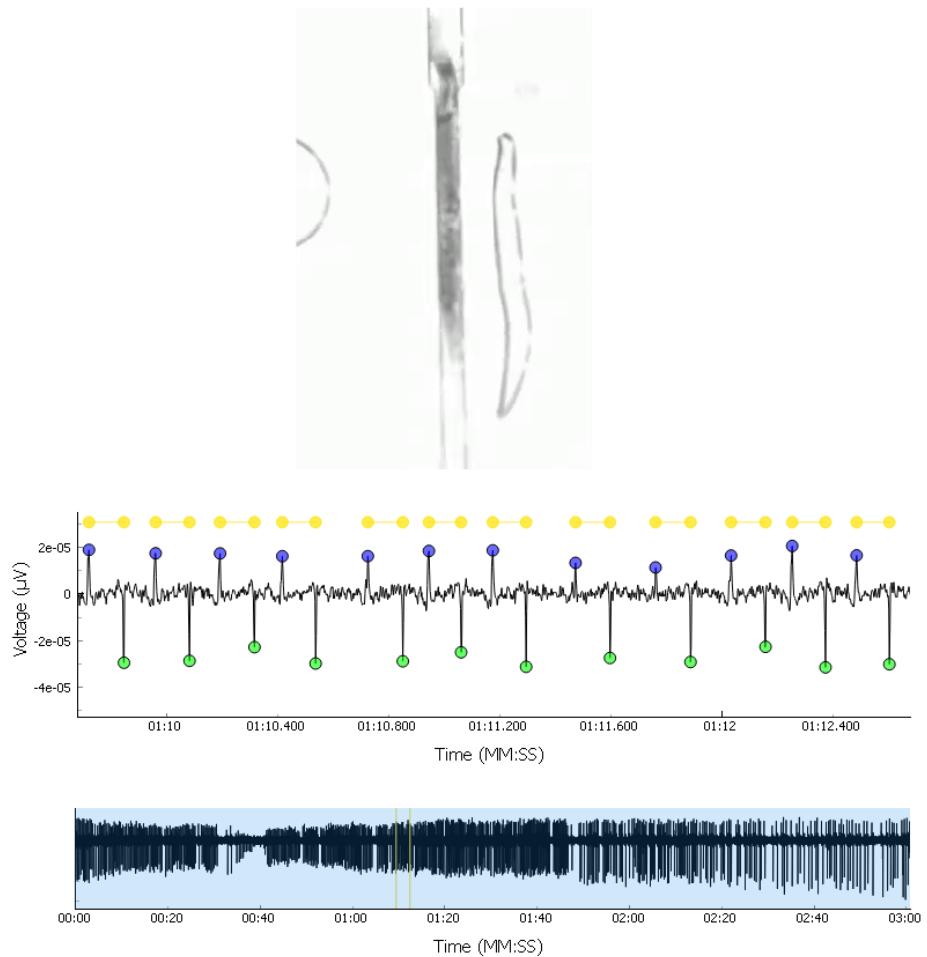


Figura 15. Registro representativo de un EFG en *C. elegans* del control, N2 L4440. El trazo muestra la actividad eléctrica del pharynx. Se identifican los picos principales correspondientes a la fase de despolarización (pico azul) y repolarización (pico verde).

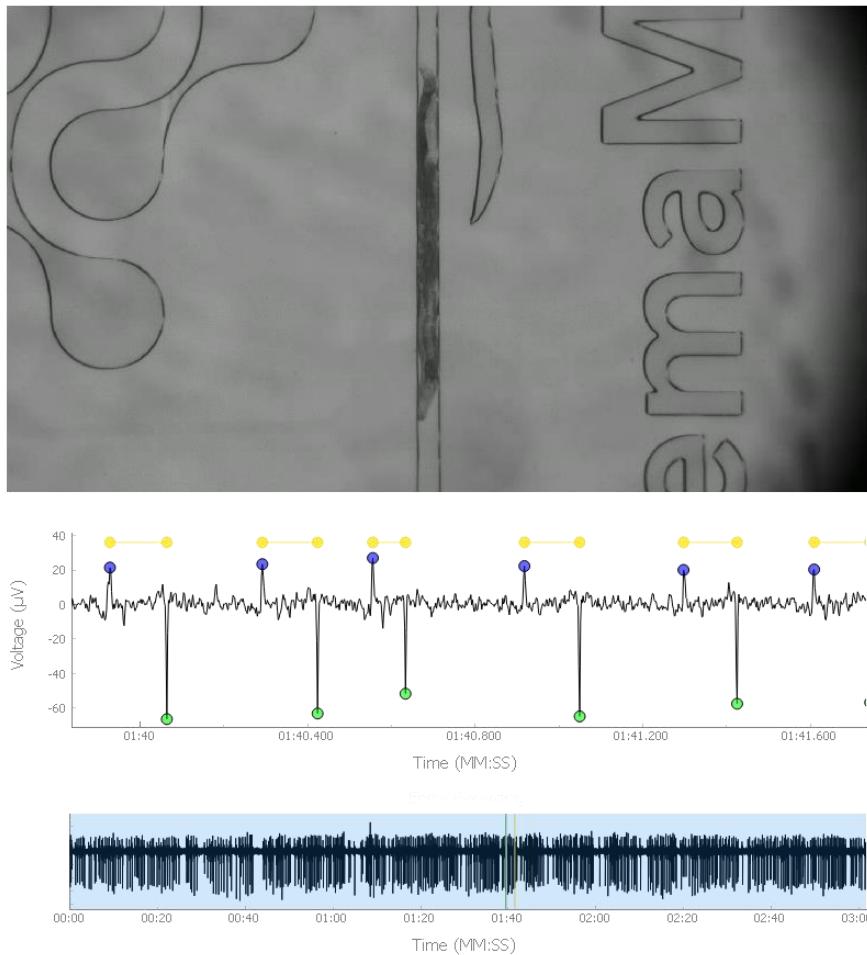


Figura 16. Registro representativo de un EFG en *C. elegans* de la condición experimental, N2 egl-19 100%. El trazo muestra la actividad eléctrica del pharynx. Se identifican los picos principales correspondientes a la fase de despolarización (pico azul) y repolarización (pico verde).

4. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos querido ver si el silenciamiento del gen *egl-19* que codifica para un canal de calcio voltaje dependiente tipo L, presenta efectos visibles en el fenotipo del gusano con dos condiciones distintas de ARN de interferencia. Nuestra hipótesis de partida, basada en datos previos del laboratorio realizados a 25°C, era que íbamos a observar diferencias significativas en los gusanos en los que se había silenciado dicho gen, y además también esperábamos que las distintas dosis produjesen efectos diferentes.

Para determinar el posible efecto se realizaron **experimentos de longevidad** de los gusanos en dos condiciones experimentales en comparación con el control. Sin embargo, no se observaron diferencias, hay resultados muy variables debido a los gusanos censurados. Los resultados sugieren que parece que el silenciamiento del canal no mejora la supervivencia del gusano. Diversos estudios han demostrado que la esperanza de vida en *C. elegans* está regulada principalmente por rutas genéticas específicas como la vía de insulina/IGF, la señalización EGF, la inhibición de la respiración mitocondrial y la homeostasis del estrés oxidativo, entre otras (Lee et al., 2010; Uno & Nishida, 2016; Yu & Driscoll, 2010; Zhou et al., 2011). Las mutaciones en genes clave de estas rutas, como *daf-2*, *age-1*, o intervenciones farmacológicas dirigidas a la homeostasis del calcio o el metabolismo energético, han mostrado efectos robustos sobre la longevidad.

Además, se ha observado que la interacción con otros genes como *jph-1* (colocaliza con UNC-68/RyR y EGL-19) es determinante para que los efectos de la disfunción de *egl-19* se manifiesten de forma más severa (Piggott et al., 2021). Esto sugiere que una reducción parcial de *egl-19*, como la inducida por ARNi, puede no ser suficiente para generar un impacto fisiológico favorable en términos de longevidad, y que los niveles residuales de actividad del canal podrían ser suficientes para mantener la viabilidad sin inducir un efecto protector.

Paralelamente se realizaron **experimentos de movilidad**. Cuando se realizan los experimentos de movilidad, observamos que a día 3 hay una disminución significativa en todos los parámetros en los gusanos en los que la dosis del ARNi es mayor. Esta observación es coherente con múltiples estudios que destacan la importancia crítica de *egl-19* en la excitación y contracción muscular de la pared corporal. En concreto, la bibliografía indica que la reducción parcial de la función de *egl-19* (como ocurre con ARNi o alelos hipomórficos) produce fenotipos de debilidad muscular y alteraciones locomotoras, pero no afecta la supervivencia hasta la edad adulta ni extiende la longevidad (Piggott et al., 2021).

Raymond et al. (Raymond et al., 1997) y *Jospin et al.* (Jospin et al., 2002) reportaron que mutaciones de pérdida parcial de función en *egl-19* conducen a una contracción muscular débil y a un fenotipo flácido, mientras que los mutantes nulos son embrionarioariamente letales, lo que refleja la esencialidad de este canal de calcio tipo L para la función muscular. Además, *Du et al.* (Du et al., 2025) muestran que *egl-19* es indispensable para la generación de potenciales de acción en las células musculares de la pared corporal, y que los alelos viables con pérdida parcial de función como *n582* y *ad1006* presentan locomoción reducida, parálisis flácida y cinéticas de corriente de Ca^{2+} alteradas. Esto se relaciona directamente con nuestras observaciones, ya que la reducción funcional de *egl-19* mediante ARNi probablemente afecta la excitabilidad de las células musculares estriadas, resultando en una disminución de la movilidad. De forma coherente, *Shindou et al.* (Shindou et al., 2019) también observaron una disminución significativa en la velocidad de locomoción tras el silenciamiento de *egl-19* en neuronas sensoriales, lo que apoya la hipótesis de que *egl-19* también contribuye, de manera directa o indirecta, al control motor global a través de la actividad muscular y neuronal.

En el caso de la **fertilidad**, nuevamente no se observaron diferencias significativas en la puesta de huevos total ni en la dinámica temporal de la puesta entre los nematodos tratados con ARNi contra *egl-19* y los controles. Estos resultados podrían explicarse por varios factores. En primer lugar, aunque *egl-9* codifica el canal de calcio tipo L principalmente en músculo y su implicación en la contracción muscular está bien documentada (Raymond et al., 1997), también se ha demostrado que existen mecanismos redundantes. Estudios genéticos y farmacológicos demuestran que EGL-19 actúa de forma redundante con otros canales de calcio dependientes de voltaje como UNC-2 (tipo N/P/Q) y CCA-1 (tipo T) en la regulación de la puesta de huevos (Kwok et al., 2006). Esta compensación molecular explicaría la ausencia de fenotipo en la puesta de huevos bajo inhibición parcial de *egl-19*.

Por otro lado, la resistencia diferencial al ARNi entre tejidos podría limitar la eficacia de la intervención. Mientras que en el músculo responde al ARNi por alimentación, las neuronas HSN y VC (críticas para la regulación de la puesta de huevos) muestran menor sensibilidad (Jospin et al., 2002). Dado que EGL-19 participa en la contracción muscular directa como en la modulación neuroendocrina, a través de las células uv1 y la liberación de tiramina (Yan et al., 2025), la inhibición incompleta en tejidos neuronales podría enmascarar efectos observables en la fertilidad.

Además, como se ha señalado previamente, los fenotipos más marcados relacionados con la pérdida de función de *egl-19* se han observado en mutantes de perdida de función o en condiciones de inhibición farmacológica aguda con nemadipina (Yan et al., 2025), lo que sugiere que una inhibición parcial mediante ARNi podría no ser suficiente para provocar un fenotipo observable. Por último, es posible que el ARNi no haya logrado una supresión completa de la expresión de *egl-19* en los tejidos clave, como los músculos vulvares o las neuronas HSN/VC, lo cual podría explicar la ausencia de diferencias respecto al control.

En el caso de la fertilidad no se observó nada, en comparación con la movilidad donde si se observaron efectos. Al tratarse de dos parámetros decisivos, quisimos ver el silenciamiento real que teníamos con el ARNi y se observó que con la dosis máxima posible se obtiene un 60% de silenciamiento, aunque si afecta a la movilidad, no afecta ni a la fertilidad ni a la esperanza de vida.

Finalmente, en los **experimentos de medida de la actividad eléctrica del *pharynx* mediante el electrofaringeograma** realizados, no se observaron diferencias significativas entre la condición experimental *egl-19* 100% y el control. Sin embargo, si hay una deficiencia del canal EGL-19 que mantiene la meseta del potencial de acción, esperaríamos una disminución en la duración de los distintos bombeos, y no se encontró este resultado significativo, pero sí que se vio una tendencia.

Aunque *egl-19* codifica la subunidad $\alpha 1$ de un canal de calcio tipo L que participa en la fase de meseta del potencial de acción faríngeo, su reducción parcial no parece suficiente para alterar de manera significativa los parámetros electrofisiológicos registrados. Estudios previos han demostrado que mutaciones hipomórficas de *egl-19*, como *n582*, no modifican de forma relevante los transitorios de calcio ni la morfología general del potencial de acción en el *pharynx*, aunque sí pueden disminuir ligeramente la tasa de bombeo (Kerr et al., 2000; Steciuk et al., 2014).

Por lo tanto, la presencia del 40% residual del canal EGL-19 sería suficiente para mantener la funcionalidad del *pharynx* y explicaría la ausencia de cambios detectables en el EFG tras la inhibición parcial de *egl-19*.

Finalmente, la especificidad tisular y los umbrales de activación de los diferentes canales iónicos en el *pharynx* hacen que solo las mutaciones severas o combinaciones de mutaciones provoquen alteraciones evidentes en la actividad eléctrica. Las mutaciones de perdida de función completa en *egl-19* son letales, mientras que las mutaciones parciales o la reducción de ARNi, como en este estudio, no afectan de manera apreciable la función faríngea (Franks et al., 2002; Raymond et al., 1997).

5. CONCLUSIONES

- Ninguna de las dos dosis de plásmido añadido produce una modificación de la esperanza de vida del gusano ni la vida media.
- El silenciamiento del gen *egl-19* sí produce una disminución significativa en los parámetros de movilidad, evidenciando el papel del canal de calcio tipo L EGL-19 en la musculatura estriada de la pared corporal del nematodo.
- La deficiencia de *egl-19* no causa cambios en la fertilidad, ni en el bombeo faríngeo del *C. elegans*, lo que puede deberse a que el canal no es relevante en la musculatura lisa, o bien a la existencia de mecanismos de compensación.
- La funcionalidad del canal es más relevante en la musculatura estriada.
- A pesar de producirse un silenciamiento en torno al 60%, puede que no sea bastante, y el 40% residual de canal sea suficiente como para llevar a cabo la función sin producirse ningún efecto significativo.
- Este estudio preliminar muestra que la administración de ARNi frente a *egl-19* no es el método adecuado para conseguir un silenciamiento con efectos significativos, habría que buscar otros métodos alternativos para disminuir la expresión de la proteína.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, J., Alvarez-Illera, P., García-Casas, P., Fonteriz, R. I., & Montero, M. (2020). The Role of Ca²⁺ Signaling in Aging and Neurodegeneration: Insights from *Caenorhabditis elegans* Models. *Cells*, 9(1), 204. <https://doi.org/10.3390/CELLS9010204>
- Anton, S., & Leeuwenburgh, C. (2013). Fasting or caloric restriction for Healthy Aging. *Experimental Gerontology*, 48(10), 1003. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2013.04.011>
- Byerly, L., Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology*, 51(1), 23–33. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90119-6)
- Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. (2017). *Alzheimer's and Dementia*, 13(2), 178-182.e17. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2016.12.006>
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), a003947. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A003947>
- Caylor, R. C., Jin, Y., & Ackley, B. D. (2013). The *Caenorhabditis elegans* voltage-gated calcium channel subunits UNC-2 and UNC-36 and the calcium-dependent kinase UNC-43/CaMKII regulate neuromuscular junction morphology. *Neural Development*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-10>,
- Dillon, J., Andrianakis, I., Bull, K., Glautier, S., O'Connor, V., Holden-Dye, L., & James, C. (2009). AutoEPG: Software for the Analysis of Electrical Activity in the Microcircuit Underpinning Feeding Behaviour of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 4(12), e8482. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008482>
- Du, X., Crodelle, J., Barranca, V. J., Li, S., Shi, Y., Gao, S., & Zhou, D. (2025). Biophysical modeling and experimental analysis of the dynamics of *C. elegans* body-wall muscle cells. *PLoS Computational Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1012318>,
- Franks, C. J., Pemberton, D., Vinogradova, I., Cook, A., Walker, R. J., & Holden-Dye, L. (2002). Ionic basis of the resting membrane potential and action potential in the pharyngeal muscle of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurophysiology*, 87(2), 954–961. <https://doi.org/10.1152/JN.00233.2001>,
- Frøkjær-Jensen, C., Kindt, K. S., Kerr, R. A., Suzuki, H., Melnik-Martinez, K., Gerstbreih, B., Driscoll, M., & Schafer, W. R. (2006). Effects of voltage-gated calcium channel subunit genes on calcium influx in cultured *C. elegans* mechanosensory neurons. *Journal of Neurobiology*, 66(10), 1125–1139. <https://doi.org/10.1002/NEU.20261>,
- Gieseler, K. (2017). Development, structure, and maintenance of *C. elegans* body wall muscle. *WormBook*, 2017, 1–59. <https://doi.org/10.1895/WORMBOOK.1.81.2>,
- Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S., & Wegener, J. W. (2014). L-type CaV1.2 calcium channels: From in vitro findings to in vivo function. *Physiological Reviews*, 94(1), 303–326. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00016.2013/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0011426780003.JPG>
- Jospin, M., Jacquemond, V., Mariol, M. C., Ségalat, L., & Allard, B. (2002). The L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel EGL-19 controls body wall muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology*, 159(2), 337–347. <https://doi.org/10.1083/JCB.200203055>

- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G., & Ahringer, J. (2000). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology*, 2(1), research0002.1. <https://doi.org/10.1186/GB-2000-2-1-RESEARCH0002>
- Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsien, R. Y., & Schafer, W. R. (2000). Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron*, 26(3), 583–594. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81196-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81196-4)
- Kwok, T. C. Y., Ricker, N., Fraser, R., Chan, A. W., Burns, A., Stanley, E. F., McCourt, P., Cutler, S. R., & Roy, P. J. (2006). A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist. *Nature*, 441(1), 91–95. <https://doi.org/10.1038/NATURE04657>,
- Lainé, V., Frøkjær-Jensen, C., Couchoux, H., & Jospin, M. (2011). The alpha1 subunit EGL-19, the alpha2/delta subunit UNC-36, and the beta subunit CCB-1 underlie voltage-dependent calcium currents in *Caenorhabditis elegans* striated muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36180–36187. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.256149>
- Lee, S. J., Hwang, A. B., & Kenyon, C. (2010). Inhibition of respiration extends *C. elegans*' lifespan via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Current Biology: CB*, 20(23), 2131. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2010.10.057>
- Lezzerini, M., Van De Ven, K., Veerman, M., Brul, S., & Budovskaya, Y. V. (2015). Specific RNA Interference in *Caenorhabditis elegans* by Ingested dsRNA Expressed in *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE*, 10(4), e0124508. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0124508>
- Marbach, A., & Bettenbrock, K. (2012). Lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*, 157(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.biote.2011.10.009>
- McDonald, K., Larkin, K., Dickinson, D. J., Golden, A., Bai, X., & Doonan, R. (2023). Using CRISPR knock-in of fluorescent tags to examine isoform-specific expression of EGL-19 in *C. elegans*. *MicroPublication Biology*, 2023. <https://doi.org/10.17912/MICROPUB.BIOLOGY.000858>
- Oh, S. II, Park, J. K., & Park, S. K. (2015). Lifespan extension and increased resistance to environmental stressors by N-Acetyl-L-Cysteine in *Caenorhabditis elegans*. *Clinics*, 70(5), 380. [https://doi.org/10.6061/CLINICS/2015\(05\)13](https://doi.org/10.6061/CLINICS/2015(05)13)
- Piggott, C. A., Wu, Z., Nurrish, S., Xu, S., Kaplan, J. M., Chisholm, A. D., & Jin, Y. (2021). *Caenorhabditis elegans* junctophilin has tissue-specific functions and regulates neurotransmission with extended-synaptotagmin. *Genetics*, 218(4). <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAB063>
- Popugaeva, E., Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2018). Dysregulation of Intracellular Calcium Signaling in Alzheimer's Disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(12), 1176–1188. <https://doi.org/10.1089/ARS.2018.7506>,
- Raymond, Y. N. L., Lobel, L., Hengartner, M., Horvitz, H. R., & Avery, L. (1997). Mutations in the alpha1 subunit of an L-type voltage-activated Ca²⁺ channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal*, 16(20), 6066–6076. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.20.6066>
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., & Priess, J. R. (1997). *The Organization, Structure, and Function of Muscle*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20168/>
- Rooney, J. P., Luz, A. L., González-Hunt, C. P., Bodhicharla, R., Ryde, I. T., Anbalagan, C., & Meyer, J. N. (2014). Effects of 5'-Fluoro-2-deoxyuridine on Mitochondrial Biology in

- Caenorhabditis elegans. *Experimental Gerontology*, 0, 69. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2014.03.021>
- Schüler, C., Fischer, E., Shaltiel, L., Steuer Costa, W., & Gottschalk, A. (2015). Arrhythmogenic effects of mutated L-type Ca 2+-channels on an optogenetically paced muscular pump in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/SREP14427>
- Shindou, T., Ochi-Shindou, M., Murayama, T., Saita, E. ichiro, Momohara, Y., Wickens, J. R., & Maruyama, I. N. (2019). Active propagation of dendritic electrical signals in *C. elegans*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-40158-9>,
- Shtonda, B., & Avery, L. (2005). CCA-1, EGL-19 and EXP-2 currents shape action potentials in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *The Journal of Experimental Biology*, 208(Pt 11), 2177–2190. <https://doi.org/10.1242/JEB.01615>
- Smith, M. A., Zhang, Y., Polli, J. R., Wu, H., Zhang, B., Xiao, P., Farwell, M. A., & Pan, X. (2013). Impacts of chronic low-level nicotine exposure on *Caenorhabditis elegans* reproduction: Identification of novel gene targets. *Reproductive Toxicology*, 40, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.05.007>
- Steciuk, M., Cheong, M., Waite, C., You, Y. J., & Avery, L. (2014). Regulation of synaptic transmission at the *Caenorhabditis elegans* M4 neuromuscular junction by an antagonistic relationship between two calcium channels. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(12), 2535–2543. <https://doi.org/10.1534/G3.114.014308>,
- Trojanowski, N. F., Raizen, D. M., & Fang-Yen, C. (2016). Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system. *Scientific Reports*, 6(1), 1–10. [https://doi.org/10.1038/SREP22940;TECHMETA=120,63,96;SUBJMETA=2632,378,3920,631;KWRD=MOTOR+CONTROL,NEURAL+CIRCUITS](https://doi.org/10.1038/SREP22940)
- Uno, M., & Nishida, E. (2016). Lifespan-regulating genes in *c. Elegans*. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, 2(1), 1–8. [https://doi.org/10.1038/NPJAMD.2016.10;SUBJMETA=208,631,92;KWRD=CHEMICAL+BIOLOGY,GENETICS](https://doi.org/10.1038/NPJAMD.2016.10)
- Vinogradova, I., Cook, A., & Holden-Dye, L. (2006). The ionic dependence of voltage-activated inward currents in the pharyngeal muscle of *Caenorhabditis elegans*. *Invertebrate Neuroscience : IN*, 6(2), 57–68. <https://doi.org/10.1007/S10158-006-0018-Y>
- Wang, M. C., Dolphin, A., & Kitmitto, A. (2004). L-type voltage-gated calcium channels: understanding function through structure. *FEBS Letters*, 564(3), 245–250. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00253-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00253-4)
- Wang, M., Zhang, Z., Sun, N., Yang, B., Mo, J., Wang, D., Su, M., Hu, J., Wang, M., & Wang, L. (2023). Gold Nanoparticles Reduce Food Sensation in *Caenorhabditis elegans* via the Voltage-Gated Channel EGL-19. *International Journal of Nanomedicine*, 18, 1659–1676. <https://doi.org/10.2147/IJN.S394666>
- Widaad, A., Zulkipli, I. N., & Petalcorin, M. I. R. (2022). Anthelmintic Effect of *Leucaena leucocephala* Extract and Its Active Compound, Mimosine, on Vital Behavioral Activities in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, 27(6). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27061875>,
- WormBook*. (n.d.). Retrieved June 25, 2025, from <http://www.wormbook.org/>
- Yan, L., Claman, A., Bode, A., & Collins, K. M. (2025). The *C. elegans* uv1 Neuroendocrine Cells Provide Mechanosensory Feedback of Vulval Opening. *The Journal of*

Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 45(6).
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0678-24.2024>

Yu, S., & Driscoll, M. (2010). EGF Signaling Comes of Age: Promotion of Healthy Aging in *C. elegans*. *Experimental Gerontology*, 46(2–3), 129. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2010.10.010>

Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacological Reviews*, 67(4), 821–870. <https://doi.org/10.1124/PR.114.009654>

Zhou, K. I., Pincus, Z., & Slack, F. J. (2011). Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)*, 3(8), 733. <https://doi.org/10.18632/AGING.100367>