

Experimentos de anoxia/inanición en *C. elegans* y precondicionamiento anestésico. Una actividad práctica de laboratorio para la formación integrada en las competencias del diseño de experimentos, análisis e interpretación de datos en la experimentación científica.

Isaias Sanmartín Santos^a, Ana Lloret Alcañiz^b, Ignacio Ventura González^c, Jesús Prieto Ruiz^a

a. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

b. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia.

c. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

Abstract

Competence in the design of experiments and the interpretation of their results is closely linked to the ability to understand and analyze information in the scientific-technical literature. In the present work, we present a project of integral activity that links the research, reading and interpretation of scientific articles together with the design and interpretation of experimental results, through a system of "step by step guide" very appropriate for an introduction to these competences To the students of the first courses of the university education.

Keywords: Competencies, training, design of experiments, writing of scientific articles, information management, biotechnology

Resumen

La competencia en el diseño de experimentos y la interpretación de sus resultados está íntimamente unida a la capacidad para entender y analizar la información en la bibliografía científico-técnica. En el presente trabajo, presentamos un proyecto de actividad integral que enlaza la búsqueda, lectura e interpretación de artículos científicos conjuntamente con el diseño e interpretación de resultados experimentales, mediante un sistema de "guía paso a paso" muy apropiado para una introducción a estas competencias a los alumnos de los primeros cursos de la educación universitaria.

Palabras clave: *competencias, formación, diseño de experimentos, redacción de artículos científicos, gestión de la información, biotecnología*

Introducción

La competencia en la lectura e interpretación de artículos técnicos o científicos es un contenido clave de los programas universitarios de aprendizaje en biotecnología, biomedicina y ciencias relacionadas. La competencia en el diseño e interpretación de experimentos es un contenido esencial que debiera ser parte necesaria de cualquier programa de formación en biotecnología. A pesar de ello, a menudo estas competencias son obviadas o dispersas a lo largo de las múltiples asignaturas y cursos que constituyen un grado. A menudo, en los programas de estudio no existe una asignatura que se encargue específicamente de desarrollar estas competencias, precisamente a causa de su transversalidad. No se considera que formen parte del cuerpo de contenidos de ninguna asignatura específica, y se relega la adquisición de estas competencias a los pequeños aportes que van sumando a lo largo del Grado las actividades y prácticas de las distintas asignaturas relacionadas con el diseño e interpretación de experimentos y la lectura de artículos científicos.

No obstante, consideramos que este goteo diluido de las pequeñas partes que constituyen la competencia no es la mejor forma de proporcionar una formación en estos aspectos. Se requiere una actividad integral que los contemple conjuntamente, ya que el diseño del experimento y la interpretación de sus resultados están íntimamente unidos. La capacidad para entender, analizar e interpretar los resultados en un artículo de la bibliografía científica no es más que la capacidad para entender el diseño e interpretación de los experimentos realizados por otros autores.

Un aspecto adicional es en qué momento debe introducirse a los estudiantes en la adquisición de estas competencias. Es nuestra opinión deben situarse cuanto antes en el plan de estudios, ya que proporcionan aspectos formativos muy interesantes para el estudiante. Por ejemplo es fundamental para entender cómo se ha generado el conocimiento que se encuentra en los libros de texto. Por otra parte y no menos importante, estimula la madurez intelectual que debiera adquirirse en el paso desde la educación secundaria a la universidad.

En el presente trabajo presentamos un proyecto de actividad que enlaza la búsqueda, lectura e interpretación de artículos científicos conjuntamente con el diseño e interpretación de resultados experimentales, mediante un sistema de "guía paso a paso". Este procedimiento es fundamental para una introducción en dichas competencias y habilidades científicas iniciales. Por su sencillez en el planteamiento resulta atractivo para estudiantes de los primeros cursos en grados de ciencias experimentales tales como el Grado en Biotecnología. Asimismo, otra característica de este diseño que enlaza actividades de aula con prácticas de laboratorio es que puede ser aplicado a múltiples asignaturas. El presente proyecto ha sido realizado en

la asignatura "biología celular" del primer curso del Grado en Biotecnología de la Universidad Católica de Valencia.

Objetivos

- Adquisición de la competencia en el diseño de experimentos en biotecnología, así como la capacidad de reunir e interpretar datos relevantes de índole científica para valorar un producto biotecnológico.
- Desarrollar habilidades en la gestión de la información en biotecnología y ciencias biomédicas (habilidad para buscar y analizar información procedente de bases de datos de artículos científicos).
- Introducir competencias de investigación, tales como describir y medir variables relevantes de procesos o experimentos y ser capaz de analizar e interpretar datos científicos en el ámbito de la biotecnología.

Desarrollo de la innovación

La actividad consiste en la realización de un experimento de laboratorio con el nematodo *C. elegans* para encontrar moléculas que protejan del daño tisular que se produce durante una intervención quirúrgica. Los resultados se reportarán en un informe final que constituye un mini artículo científico con un único experimento, pero estructurado en los habituales apartados (introducción, material y métodos, resultados, discusión y bibliografía). Para facilitar la realización de la actividad en estudiantes principiantes (ya que se realiza con estudiantes de primer curso) es clave el acompañamiento de una “guía paso a paso” para un abordaje simplificado y sistemático que facilita mucho la realización de la actividad.

El proyecto se realiza en tres fases:

- Primera fase. Elección de la sustancia farmacológica a ensayar, extracción del principio activo y diseño experimental.
- Segunda fase. Realización del experimento.
- Tercera fase. Análisis de los resultados del experimento e interpretación.

1.1 Elección de la sustancia farmacológica a ensayar

El profesor presenta a los alumnos el fenómeno del precondicionamiento anestésico (Murry, 1986), por el cual ciertos gases inhalatorios utilizados en la anestesia protegen los tejidos de los daños por la hipoxia/reperfusión que sufren las células durante una intervención quirúrgica. Se plantea a los estudiantes el siguiente contexto motivador: deben tratar de encontrar una molécula con actividad de protección celular similar a la que se describe en el fenómeno del precondicionamiento anestésico, con el objeto de desarrollar un posible fármaco que mejore el postoperatorio de pacientes intervenidos quirúrgicamente (Gilsanz,

1996). Los grupos de estudiantes son instados a seleccionar su propia molécula farmacológica para realizar los ensayos. Este factor de libertad en la elección, así como el comentario por el profesor de que las moléculas que elijan probablemente no han sido ensayadas nunca antes con este propósito, constituyen un importante factor favorecedor de la motivación y por tanto del aprendizaje. Los estudiantes se enfrentan a su primer experimento, y aunque se permite que cada grupo escoja qué sustancia desea testar, el profesor introduce unas breves directrices para una selección más adecuada. Algunos ejemplos de estas directrices serían:

- Es necesario una pequeña investigación sobre el mecanismo de acción del fármaco para asegurarse de que su selección tiene sentido. Por ejemplo, un inhibidor de la ECA como el captopril (utilizado en los tratamientos para la hipertensión) no es adecuado, ya que *C. elegans* carece de esta enzima y presumiblemente no va a tener ningún efecto fisiológico sobre este organismo.
- Se deben elegir con preferencia fármacos que tengan mecanismos de acción o efectos relacionados con la biología celular. Por ejemplo, el paracetamol resulta adecuado desde el punto de vista de su acción tóxica deplecionando los depósitos de glutatión intracelulares, lo que causa daños en las membranas por el efecto tóxico de los radicales libres.
- Los neurofármacos o fármacos para el sistema nervioso autónomo que afectan receptores nerviosos se consideran buenos candidatos si se comprueba en la bibliografía que el receptor está representado en la fisiología del nematodo. Por ejemplo, se encuentra que la dopamina, serotonina y otras aminas biógenas tienen efectos en la fisiología de *C. elegans*, aunque su papel no está claro (Lawal, 2013).
- Asimismo se consideran adecuadas vitaminas, suplementos alimenticios tales como aminoácidos, hierro, etc.

1.2 Extracción del principio activo

Se proporcionan los instrumentos y materiales necesarios para una sencilla extracción del principio activo desde la forma farmacéutica en la que se presenta en el medicamento seleccionado por el grupo de estudiantes. Por ejemplo, si se trata de comprimidos, estos pueden ser pulverizados en un mortero, mezclando el polvo con agua, disolviendo el principio activo mediante agitación en vórtex, centrifugando a continuación y filtrando el sobrenadante en papel o con un filtro 0,22 micras. Para cuantificar la concentración en principio activo del líquido resultante, se hace a partir de la dosis del comprimido o medicamento utilizado, con la asunción simplificada de que se ha disuelto completamente durante la extracción. No se considera importante un cálculo preciso de la concentración del principio activo ni de la dosis

que se aplicará a los animales, con la salvedad de que debe ser una dosis suficientemente pequeña para evitar problemas de toxicidad. El profesor sencillamente intervendrá para aconsejar a los estudiantes sobre qué dosis usar, asegurándose de que utilizan soluciones suficientemente diluidas y evitando así que los animales puedan morir por una dosis excesiva del compuesto a ensayar. Se trata de una práctica de simulación de un experimento, no de un experimento real, y no se consideran importantes aspectos como una optimización del rango de dosis aplicada ya que despistan a los alumnos primerizos del objetivo de aprendizaje real y consumen tiempo.

1.3 Diseño del experimento

Esta fase se realiza bajo la guía y supervisión del profesor. El grupo de alumnos dialoga y decide cómo va a realizarse la experiencia, guiados por el profesor. El diseño experimental es muy sencillo: los animales de cada cepa del nematodo que reciban la sustancia a evaluar se dividen en dos grupos, el grupo que recibirá el fármaco y el grupo control. Asimismo, se preparan grupos de control adicionales que permanecerán en la bancada del laboratorio a temperatura ambiente, sin ser sometidos a anoxia/inanición. Se explica también cómo se evaluarán los animales tras las condiciones de hipoxia inanición, es decir, se explica en qué consiste el modelo experimental y cómo se utilizará para evaluar el fármaco que testamos como posible protector celular.

1.4 Desarrollo de la experiencia de laboratorio

C. elegans es un nematodo microscópico usado como animal modelo de laboratorio en biología celular y en biomedicina. En la siguiente experiencia, los animales se someterán a condiciones de anoxia e inanición durante 24 horas. Estas condiciones simulan los procesos de isquemia seguida de reperfusión que se dan durante las intervenciones quirúrgicas y que son fuente de posibles complicaciones y repercusiones postoperatorias en los pacientes. El modelo experimental completo, así como los detalles de la construcción de la cámara de hipoxia, pueden encontrarse en (Queliconi, 2014). En esta experiencia de laboratorio, usaremos este modelo para evaluar la posible actividad protectora celular de una sustancia farmacológica elegida por los estudiantes. Asimismo, pueden utilizarse los gases anestésicos inhalatorios como isoflurano, halotano, etc. responsables del fenómeno de preacondicionamiento anestésico descrito en la bibliografía (Murry, 1986).

Los nematodos se separan de su fuente de alimento (bacterias) y se colocan en condiciones de anoxia durante 24 horas (isquemia simulada); posteriormente se trasladan a una atmósfera normal con presencia de oxígeno y de las bacterias que les sirven de alimento, simulando reperfusión. Como consecuencia, se producen muertes de los animales, así como daño neuronal. En el siguiente experimento, se

evalúa la viabilidad del nematodo, las alteraciones en la morfología de los axones neuronales y pérdida de la sensibilidad táctil (indicando daños neuronales), que representan al normal funcionamiento de las células neuronales estudiadas. El "preacondicionamiento anestésico" es una respuesta celular adaptativa que se observa tras la administración de anestésicos volátiles (isofluorano, halotano) durante una intervención quirúrgica (Gilsanz, 1986). La exposición a estos agentes desarrolla una respuesta adaptativa en las células que las protege frente a daños por la hipoxia/isquemia durante la intervención, especialmente en neuronas cerebrales y cardiomiocitos, que se ha investigado en modelos experimentales en *C. elegans* (Jia, 2008).

Utilizaremos un modelo experimental para evaluar la capacidad de la sustancia farmacológica problema para inducir el fenómeno de preacondicionamiento celular y proteger del daño neuronal. Se emplean tres cepas del nematodo en el experimento:

- N2 Bristol Wild type strain.
- TU2589 uIs25 [mec-18::GFP + dpy-20(+)]
- CB1338 mec-3 (e1338)IV

Estas cepas pueden obtenerse fácilmente desde el Caenorhabditis Genetics Center (CGC) del NIH en la University of Missouri, Columbia.

La cepa N2 procede del *C. elegans* salvaje aislado original. La cepa TU contiene una proteína de fusión con GFP, que proporciona fluorescencia a las neuronas mec implicadas en la respuesta al toque. La cepa CB es un mutante de las neuronas mec que no responde al toque, que usaremos para calibrar la fuerza con la que tocar a los animales en los ensayos de respuesta al toque.

1.5 Experimento de anoxia/inanición

Las cepas de *C. elegans* se encuentran en medio líquido conteniendo las bacterias *E. coli* OP50 que les sirven de alimento, mediante métodos de cultivo estándar. Se coloca la cantidad adecuada del líquido de cultivo que contiene los nematodos en tubos de microcentrífuga a los que se ha practicado un agujero en la tapa superior, mediante una aguja. Se disponen los tubos en hielo, hasta que los gusanos hayan caído a la parte inferior (~ 1-2 min), ya que el frío los inmoviliza y les impide nadar. Se elimina el sobrenadante, añadiendo seguidamente medio de cultivo fresco sin bacterias. Se repite la operación por 3 veces, usando en el último paso medio de cultivo previamente desgasificado por 30 minutos mediante burbujeo de gas N₂. Esto limpiará a los nematodos de los restos de bacterias del líquido del frasco de cría, y eliminará el oxígeno del medio circundante.

A continuación, se colocan los tubos de microcentrífuga con los gusanos en el medio desoxigenado dentro de una cámara de hipoxia, que consiste en un recipiente herméticamente cerrado pero conectado por un tubo a una botella de gas N₂ comprimido y con un tubo adicional para la salida de gas. La cámara se sumerge en un baño termostático a 26°C, bajo un flujo de gas N₂ constante (100 ml/min) durante 20-24 horas. Tras este período, se sacan los tubos de la cámara de hipoxia y se colocan los gusanos en placas de agar NPM provistas de las bacterias que les sirven de alimento, durante 24 horas, antes de proceder a la observación. Los detalles de la construcción de la cámara de hipoxia y el montaje del dispositivo pueden encontrarse en (Queliconi., 2014)

1.6 Identificación de gusanos vivos vs. muertos

Con el asa de platino se toca suavemente la parte superior de la cabeza del gusano. Los gusanos vivos se moverán hacia atrás después de ser tocados. Si los gusanos no manifiestan respuesta, se marcan como “muerte”.

Deben retirarse ambos tipos de gusanos, vivos y muertos, de la placa en la que se realiza el conteo para evitar conteos duplicados. Los gusanos vivos se mueven a una placa separada para realizar ensayos de respuesta al contacto. La cantidad de gusanos que viven en relación con el total se representa como el “% de supervivientes”.

1.7 Ensayos de respuesta al contacto

Para el recuento de las respuestas al toque, se identifican los gusanos que se mueven y se tocan ligeramente por el lado anterior del gusano (cerca de la parte media de la faringe) con el asa. Si el gusano se mueve hacia atrás, se marcar como “respondedor”. Si no, se anota como “no respondedor”. Se repite este paso para cada 10-15 gusanos con intervalos de 10 segundos. Para obtener datos precisos, es necesario testar al menos 10 gusanos en cada grupo. Hay que asegurarse de no tocar la cabeza o la cola del gusano, ya que esto estimula un comportamiento distinto. La cepa CB1338 mec-3 puede utilizarse para calibrar la fuerza con la que deben ser tocados los gusanos. Un estímulo demasiado duro provocará una respuesta de comportamiento en los mutantes mec, en cambio si el estímulo es demasiado suave no provocará un efecto en los controles de tipo salvaje N2.

1.8 Modificaciones neuronales

Para visualizar las modificaciones neuronales, se utiliza la cepa de *C. elegans* TU2589 uIs25 que expresa GFP en las neuronas mec respondedoras al contacto. Estas neuronas tienen largos axones, que discurren a lo largo de la pared del cuerpo y que son fácilmente visibles al microscopio para su revisión y constatación de posibles anomalías en su morfología. Bajo el microscopio de fluorescencia con el objetivo de inmersión en aceite 100X, con la iluminación adecuada, las neuronas

dañadas mostrarán un patrón citosólico de membrana en collar de perlas en los axones, compuesto de múltiples puntos, y/o anormalidades locales que aparecen como interrupciones o rupturas del axón. Para obtener datos significativos, los puntos y las anormalidades o rupturas deben contarse en ambas neuronas laterales en cada nematodo, y debe realizarse el recuento en un total de al menos 10 gusanos. Sin embargo, debido a la limitada duración de una sesión de prácticas, no se considera necesario el contaje en 10 ejemplares, ya que consume un tiempo excesivo y en cualquier caso ulteriormente se proporciona a los alumnos un set de datos con resultados experimentales ficticios. Por lo que durante la sesión los alumnos se limitan a observar y contar tan solo algunos de los gusanos de la muestra.

1.9 Análisis de los resultados del experimento e interpretación.

Los resultados se reportan en un miniartículo científico sobre este experimento único. Para ello, se considera importante la realización sistemática de los siguientes pasos, que pretenden enseñar cómo escribir artículos científicos. Para verificar que los alumnos siguen los pasos en el orden indicado, la actividad debe entregarse mediante una tarea de tipo “Wiki” en la plataforma LMS Moodle de la asignatura. Esta modalidad de tarea permite al profesor seguir la evolución en la redacción de la actividad por los alumnos, ya que queda un registro histórico de los cambios en la página que permite seguir la evolución en su construcción. De esta manera puede controlarse que el informe final se ha redactado siguiendo secuencialmente los pasos anteriores.

La actividad usualmente no se realiza con los datos obtenidos por los alumnos durante la sesión de prácticas pues, debido a su inexperiencia en el laboratorio y a la duración limitada de una sesión de prácticas, no es posible obtener en estas un número suficiente de datos (limitándose los alumnos a contar los gusanos vivos y muertos, realizar algunas experiencias de toque y respuesta, y observar algunas de las neuronas dañadas al microscopio). En su lugar se elaboran varios sets de datos completos, pero que conducen a resultados experimentales diferentes. Estos sets son asignados al azar, uno a cada alumno, desde la plataforma Moodle. La mayoría de los alumnos elige utilizar estos datos para la realización del informe final, pero en ocasiones los alumnos más competentes pueden obtener sets de datos propios útiles de los experimentos de respuesta al toque y contaje vivos/muertos y deciden usarlos para su informe. Los datos de contaje de lesiones neuronales son siempre tomados desde el set de datos del profesor, ya que este es un experimento lento que consumiría días, por lo que sólo se realiza alguna observación a nivel testimonial de las lesiones neuronales durante la sesión de prácticas.

1.10 Guía “paso a paso”

Inicio Cada alumno descarga un set de datos individual desde la plataforma Moodle de la asignatura

Paso 1 El alumno redacta un breve apartado sobre “material y métodos” a partir de la información proporcionada en el cuadernillo de prácticas.

Paso 2 A continuación, debe establecer cuál es el propósito del experimento en "objetivos".

Paso 3 El siguiente paso es usar las palabras clave proporcionadas (*keywords*) para buscar artículos en la bibliografía en los que se realicen experimentos análogos (que sirvan para inspirarse acerca de qué tipo de gráfico o tabla elegir para representar e interpretar el set de datos).

Paso 4 Una vez seleccionada la forma en que se representarán los datos, debe utilizarse el programa Excel u otro similar para construir las correspondientes gráficas o tablas.

Paso 5 Se debe redactar un pie de figura en cada gráfico o tabla, que se situarán en el apartado "resultados".

Paso 6 El alumno debe describir, sin interpretar su significado, los resultados que se muestran en sus gráficos y tablas. Este texto se sitúa en el apartado "resultados".

Paso 7 El alumno debe interpretar qué significan de sus resultados, e incluirlo este texto en el apartado "discusión".

Paso 8 El alumno debe redactar una pequeña "introducción", usando para ello el cuadernillo de prácticas proporcionado y los artículos que haya seleccionado en el paso 3.

Paso 9 El alumno elabora una pequeña lista bibliográfica (los dos o tres artículos citados en la introducción u otros apartados) para incluirla en el apartado "bibliografía". Introduce las citas en el cuerpo del texto del informe en su lugar correspondiente.

La realización en la secuencia temporal programada que indica esta guía “paso a paso” es importante, pues pretende enseñar un modelo de proceder estructurado para la redacción de un artículo o informe científico. Los trabajos se realizan en la plataforma Moodle de la asignatura mediante una Tarea Moodle de tipo “wiki” que permite realizar un seguimiento de la evolución temporal de un texto.

1.11 Seminarios

La actividad se acompaña además de los siguientes seminarios independientes, que proporcionan la competencia necesaria en aspectos específicos:

Seminario 1 Uso de programas de hoja de cálculo (Excel)

Seminario 2 Búsqueda de información científica en bases de datos (pubmed)

Seminario 3 Interpretación de resultados experimentales

El hecho de que el contenido de estos seminarios tenga utilidad y aplicabilidad inmediata en la elaboración de la actividad es otro valor adicional, pues son seguidos con mayor interés y aprovechamiento por los estudiantes. Por ello, deben intercalarse durante el período en que los alumnos están ocupados realizando la actividad, cubriendo la necesidad de formación en estos aspectos que surge de la propia actividad.

1.12 Evaluación de la actividad

Para la evaluación, se utilizará la siguiente rúbrica:

1. El informe contiene una correcta introducción, objetivos, resultados y discusión
2. La representación gráfica de los datos es correcta (gráficos adecuados, completos y con un pie de figura)
3. La descripción e interpretación de los datos en "resultados" y "discusión" es correcta
4. Se ha realizado una bibliografía con los artículos elegidos y estos son citados correctamente

Resultados

La actividad se ha realizado durante dos cursos académicos consecutivos, con carácter voluntario, aunque se trata de una actividad evaluable. Aunque se oferta como "voluntaria" a los estudiantes (la realización del informe final o mini artículo científico), se recompensa con un pequeño porcentaje de nota adicional que se suma a su evaluación final.

Durante el primer año la participación fue del 71%, mientras que el segundo año ha sido de sólo el 17%. Se observa asimismo que muchos alumnos comienzan el trabajo, pero no lo terminan. Las diferencias entre los dos años son atribuibles a la mejor situación en el primer año del rango de fechas de entrega de la actividad con respecto a los exámenes del fin de cuatrimestre, que fue bastante más desfavorable en el segundo año. No considerando este segundo año, por el efecto que haya tenido la cercanía de la entrega con las fechas de los exámenes finales, se puede considerar que la actividad tiene una elevada participación pese al carácter voluntario y la dificultad intrínseca de la competencia a desarrollar (especialmente si se tiene en cuenta que se trata de alumnos recién llegados a la universidad desde la educación

secundaria). Atribuimos el éxito en la participación al buen funcionamiento de la guía estructurada "paso a paso", que facilita mucho la realización de la actividad.

Conclusiones

La competencia en el diseño de experimentos va íntimamente ligada a la interpretación de los resultados y a la competencia en la lectura e interpretación de artículos científicos. Estas importantes competencias a menudo se dispersan en las múltiples actividades y prácticas de laboratorio de las asignaturas del Grado, que tratan sólo aspectos parciales, y su implementación en el programa de estudios queda diluida precisamente a causa de esta importancia y de la transversalidad a muchas asignaturas diferentes, por lo que no existe una asignatura específica encargada de enseñarlas. A los alumnos no se les presenta una visión integrada centrada en una única actividad, lo que en nuestra opinión desfavorece de manera importante la adquisición de estas competencias. En el presente trabajo, presentamos una actividad integral para su desarrollo. La estructuración en una "guía paso a paso" permite un aprendizaje fácil, y su integración con experimentos reales realizados en las prácticas de laboratorio genera aprendizajes muy interesantes a la vez que motivadores en el alumnado.

Referencias

GILSANZ F, CELEMIN R, BLANC G, ORTS MM. (1996) "Sevoflurane" en *Rev Esp Anesthesiol Reanim*. 1996 Aug-Sep;43(7):243-8.

JIA B, CROWDER CM. (2008) "Volatile Anesthetic Preconditioning Present in the Invertebrate *Caenorhabditis elegans*". en *Anesthesiology*. 2008 Mar;108(3):426-33.

LAWAL HO, KRANTZ DE. (2013) "SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine" en *Molecular Aspects of Medicine*. Volume 34, Issues 2–3, April–June 2013, Pages 360–372

MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA. (1986) "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium" en *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124-36.

QUELICONI BB, KOWALTOWSKI AJ, NEHRKE K. (2014) "An anoxia-starvation model for ischemia/reperfusion in *C. elegans*" en *J Vis Exp*. 2014 Mar 11;(85).

THE C. *ELEGANS* RESEARCH COMMUNITY, *WormBook* <<http://www.wormbook.org>>[Consulta: 3 de junio de 2016]

