



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

FoodUPV
INSTITUTO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

Caracterización, a través de técnicas de imagen, del uso
de *Caenorhabditis Elegans* como indicador del daño
oxidativo

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Cifuentes Adán, Iñaki

Tutor/a: Grau Meló, Raúl

Cotutor/a: Barat Baviera, José Manuel

Director/a Experimental: Verdú Amat, Samuel

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE ALIMENTOS

CARACTERIZACIÓN, A TRAVÉS DE TÉCNICAS DE IMAGEN, DEL USO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS* COMO INDICADOR DEL DAÑO OXIDATIVO

Autor:
D. Iñaki Cifuentes Adán

Tutor:
Prof. D. Raúl Grau Meló
Prof. D. José Manuel Barat Baviera

Director experimental:
D. Samuel Verdú Amat

Valencia, 9 de julio 2024
Curso académico 2024/25



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

CARACTERIZACIÓN, A TRAVÉS DE TÉCNICAS DE IMAGEN, DEL USO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS* COMO INDICADOR DEL DAÑO OXIDATIVO

D. Iñaki Cifuentes Adán, Prof. D. Raúl Grau Meló¹ & Prof. D. José Manuel Barat Baviera¹.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar, a través de técnicas de imagen como son la locomoción y la fluorescencia, el uso de *Caenorhabditis Elegans* como indicador del daño oxidativo generado por el agente oxidante peróxido de hidrógeno. Para ello, una vez sincronizados adultos de *C. elegans*, fueron expuestos a cinco concentraciones de H₂O₂ (0, 1, 2, 5 y 7 mM) durante un tiempo de 1, 2 y 5 horas. El efecto del H₂O₂ fue evaluado a través de la cuantificación de la locomoción (cantidad de movimiento total) y de la fluorescencia de los tejidos dañados, así como por el conteo de los individuos fallecidos (análisis de letalidad). Los resultados mostraron un efecto de la dosis de H₂O₂ y del tiempo de exposición sobre el comportamiento del *C. elegans*. Así, el incremento de ambos produjo un incremento en la letalidad del nematodo y una disminución en la cantidad de movimiento total de éstos la cual se pudo relacionar directamente con la mortalidad. El análisis de la fluorescencia también evidenció el efecto de dosis y tiempo de exposición a H₂O₂ sobre los nematodos, incrementando la cantidad de ésta con el incremento de la intensidad del tratamiento. Este incremento de la fluorescencia evidenció el efecto que agentes como el H₂O₂ tienen sobre los tejidos de *C. elegans*, la cual fue también relacionada directamente con la letalidad e inversamente con la cantidad de movimiento total. Así pues, mediante la aplicación de las técnicas de imagen de locomoción y fluorescencia se evidenció el uso de *Caenorhabditis Elegans* como indicador del daño oxidativo generado por el agente oxidante peróxido de hidrógeno.

Palabras claves:

Técnicas de imagen, locomoción, fluorescencia, *C. elegans*, daño oxidativo, H₂O₂, letalidad.

Resum

L'objectiu d'aquest treball va ser avaluar, a través de tècniques d'imatge com son la locomoció i la fluorescència, l'ús de *Caenorhabditis Elegans* com a indicador del dany oxidatiu generat per l'agent oxidant peròxid d'hidrogen. Per això, una vegada sincronitzats adults de *C. elegans*, van ser exposats a cinc concentracions de H₂O₂ (0, 1, 2, 5 i 7 mM) durant un temps de 1, 2 i 5 hores. L'efecte del H₂O₂ va ser avaluat a través de la quantificació de la locomoció (quantitat de moviment total) i de la fluorescència dels teixits danyats, així com pel comptatge dels individus morts (anàlisi de letalitat). Els resultats van mostrar un efecte de la dosi de H₂O₂ i del temps d'exposició sobre el comportament del *C. elegans*. Així, l'increment de tots dos va produir un increment en la letalitat del nematode i una disminució en la quantitat de moviment total d'aquestos la qual

¹ Instituto de ingeniería de alimentos para el desarrollo. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera, s/n. E46022. València, España.

es va poder relacionar directament amb la mortalitat. L'anàlisi de la fluorescència també es va evidenciar l'efecte de dosi i temps d'exposició a H_2O_2 sobre els nematodes, incrementant la quantitat d'aquesta amb l'increment de la intensitat del tractament. Este increment de la fluorescència va evidenciar l'efecte que agents com el H_2O_2 tenen sobre els teixits de *C. elegans*, la qual va ser també relacionada directament amb la letalitat i inversament amb la quantitat de moviment total. Així doncs, mitjançant l'aplicació de les tècniques d'imatge de locomoció i fluorescència es va evidenciar l'ús de *Caenorhabditis Elegans* com a indicador del dany oxidatiu generat per l'agent oxidant peròxid d'hidrogen.

Paraules claus:

Tècniques d'imatge, locomoció, fluorescència, *C. elegans*, dany oxidatiu, H_2O_2 , letalitat.

Abstract

The objective of this project was evaluating, through imaging techniques such as locomotion and fluorescence, the use of *Caenorhabditis Elegans* as an indicator of oxidative damage generated as a result of the oxidant agent hydrogen peroxide. In order to achieve it, once synchronized adult strains of *C. elegans*, these strains were exposed to five different concentrations of H_2O_2 (0, 1, 2, 5 y 7 mM) for a period of 1, 2 and 5 hours. The effect of H_2O_2 was evaluated through locomotion quantification (total movement amount) and the fluorescence of damaged tissues, in addition of the count of the dead individuals (lethality analysis). The results showed an effect in the lethality of the nematode and a decrease in the total amount of movement of these ones, which was linked to their mortality. The analysis of the fluorescence evidenced the effect of dose and exposure time to H_2O_2 over nematodes as well, increasing the amount of this with the rise of the intensity of the treatment. This increase of the fluorescence also showed the effect that agents as hydrogen peroxide have over the *C. elegans* tissues, which was directly linked to the lethality and inversely with the total movement amount. In conclusion, by application of imaging techniques of locomotion and fluorescence it was evidenced the use of *C. elegans* as indicator of oxidative damage generated by the oxidant agent hydrogen peroxide.

Key words:

Imaging techniques, locomotion, fluorescence, *C. elegans*, oxidative damage, hydrogen peroxide, lethality.

1 INTRODUCCIÓN

El oxígeno es un compuesto esencial en el metabolismo de todos los organismos aerobios puesto que participa en diversas reacciones de oxidación, incluyendo la respiración. Durante estos procesos el oxígeno molecular se reduce, dando origen a las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS), las que en su mayoría son radicales libres (González et al., 2000). Los daños oxidativos que se producen en los organismos biológicos al exponerlos ante un agente oxidante son consecuencia de un desequilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes necesarios para combatirlos, lo cual desencadena respuestas al estrés oxidativo en el organismo que causan daños en diversas estructuras biológicas. Este estrés aparece debido al exceso de radicales libres (moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno) en las células provocando un deterioro celular que favorece diferentes patologías al alterar el metabolismo de células, proteínas o ADN (Bokov et al., 2004, Brys et al., 2007, Harman, 1956).

Las especies reactivas de oxígeno que se forman por la reducción secuencial del oxígeno (O_2) derivan en la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que finalmente genera el radical hidroxilo ($*OH$) (Sakamoto & Imai et al., 2017). Para evitar los daños oxidativos que puede ocasionar el peróxido de hidrógeno, en las células hay varios mecanismos endógenos involucrados como son la acción de las catalasas (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPO) (Crichton et al., 2002, Halliwell, 2011, Imlay, 2011, Sies, 2017). Las ROS son moléculas extremadamente reactivas, con una vida corta que resultan muy difícil de medir directamente *in vivo* en muestras biológicas. Por ello, se busca desarrollar, mediante mediciones indirectas de los niveles de ROS, un método simple con el menor procesamiento que permita ser un buen indicador del daño oxidativo (Okoye et al., 2022). Las técnicas para evaluar el estrés oxidativo se centran en instrumentales y en modelos biológicos. Existen varias técnicas instrumentales que evalúan el estrés enfocadas en la capacidad antioxidante y en otros aspectos del daño oxidativo como pueden ser: i) la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleada en la medición de biomarcadores específicos de daño oxidativo en el ADN (Chiorcea, 2022), ii) la espectrofotometría en métodos como el ensayo de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) que miden productos de la peroxidación lipídica (Osyczka et al., 2023), iii) ensayos de fluorescencia que mediante sondas fluorescentes miden especies reactivas al oxígeno (ROS) y su actividad antioxidante (Zhang et al., 2022), iv) quimioluminiscencia, que evalúa la presencia de radicales libres y la capacidad antioxidante total (Rubio & Cerón, 2021), v) microscopía de fluorescencia que permite visualizar las ROS y daños oxidativos en tejidos y células (Habibalahi et al., 2020, Murphy et al., 2022). Cada técnica tiene sus ventajas y limitaciones para cada muestra en función de la naturaleza del análisis y recursos disponibles. A menudo, se emplean varias técnicas complementarias para obtener una

evaluación más completa sobre el estrés oxidativo causado en un sistema biológico.

Respecto a las técnicas para evaluar el estrés oxidativo en modelos biológicos también existen diferentes modelos, como son el uso de células, levaduras, *Drosophila*, pez cebra o el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Zhu et al., 2022). *C. elegans* ha sido escogido en numerosos estudios como organismo modelo por ser un organismo multicelular eucariota con el genoma codificado completamente, de tamaño pequeño con un ciclo de vida corto que permite realizar procedimientos experimentales con bajo coste. Este nematodo es un organismo relativamente simple con semejanzas con organismos superiores. Fue elegido por sus notables ventajas frente a otros organismos tales como su simplicidad anatómica y genética. Es un nematodo transparente (se puede observar en microscopía sin diseccionar), no existen límites éticos para su uso experimental, un fácil manejo en el laboratorio y es sencillo de almacenar en incubadoras en grandes cantidades (Gottschling & Döring, 2019, Hunt et al., 2020, Wang et al., 2022). Este nematodo, en realidad, puede explorar diferentes vías moleculares de estudio en el organismo al existir un alto grado de homología entre los genes humanos involucrados en diversos procesos celulares (Ayuda et al., 2020) como envejecimiento (Tissenbaum, 2015) o apoptosis celular (Lant & Brent, 2014) que hacen más susceptible al nematodo a patologías. Asimismo, este nematodo es uno de los organismos que se puede congelar y descongelar y sigue siendo viable en estudios posteriores logrando que se almacene durante un largo periodo. El nematodo se puede teñir con proteínas fluorescentes con el fin de visualizar proteínas o tejidos (Barettino et al., 2015). También, pueden ser sincronizados todas sus fases desde la fase L1 a la L4 (adultos), de manera que mediante un tratamiento con lejía se matan todas las fases que se encuentren quedándonos con los huevos, seguidamente se desecha la lejía y se lava con un tampón como puede ser el tampón M9 para diluirla (Ivanova & Moss, 2024, Patil & Van Zon, 2024). Otro rasgo destacable del nematodo es su gran población, puesto que la mayoría está formada por hembras hermafroditas que se autofecundan y dan lugar a las futuras poblaciones. Por consiguiente, facilitan bastante su expansión y mantenimiento de cepas de *C. elegans* (Migliori et al., 2023). El *C. elegans* es un modelo con un gran potencial para evaluar la respuesta ante agentes oxidantes como el agua oxigenada. El H_2O_2 inflige daño a las macromoléculas que son vitales para la salud y supervivencia celular (Schiffer et al., 2021). Es por ello que el *C. elegans* se utiliza como modelo vivo midiéndose las especies reactivas al oxígeno y así, detectar y mostrar la presencia de ROS en sus tejidos y células (Calabria et al., 2020; Zenin et al., 2022), o someterlo a H_2O_2 para ver los efectos sobre la pérdida de movilidad (Kumsta et al., 2010).



FIGURA 1. Fotografía del *C. elegans* al microscopio óptico (Leaver, 2020).

En la actualidad, las técnicas de análisis de imagen son fundamentales para el estudio de la biología y fisiología a nivel experimental. Estas técnicas permiten la recopilación y análisis de datos durante los experimentos generando un poderoso enfoque para mejorar su aprovechamiento y comprensión de los resultados. Esto es posible cuando se aplican técnicas e instrumentos que recogen grandes cantidades de datos para aplicar el análisis de datos, reducir tiempos y costes de análisis (Puchalt et al., 2020). El análisis de imágenes representa un conjunto de técnicas que potencian el estudio de los impactos físicos y químicos sobre organismos, células o tejidos. Las tecnologías de imágenes permiten captar y estudiar una cantidad considerable de muestras para dilucidar la toxicidad *in vivo* de ciertas partículas como puede ser el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en animales y ver los efectos que originan y los cambios morfológicos y funcionales que se ocasionan (Espino et al., 2020, Mathew et al., 2012). Además, estas técnicas de imagen pueden emplearse de manera complementaria a estudios experimentales para proporcionar una evaluación integral de la toxicidad de las partículas en ratas, permitiendo una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes (Kostyuk et al., 2020, Zhang et al., 2020, Zeidan & Noori Raddam, 2021).

En el caso de *C. elegans*, se han aplicado distintos tipos de técnicas de análisis de imagen, algunas de las más comunes son el seguimiento de movimiento de vídeo, donde se graban videos de grupos de *C. elegans* con movimientos aleatorios en placas de agar o en medios líquidos para luego, con un software especializado para el seguimiento eficiente de múltiples animales y análisis de movimiento evaluar la velocidad de movimiento de cada nematodo en un tiempo determinado, la distancia recorrida y la trayectoria que forman. A su vez, durante la locomoción del *C. elegans* este software genera imágenes desordenadas con variaciones de iluminación. El estudio experimental del *C. elegans* facilitaría la evaluación de diversos factores llegando hasta la investigación de procesos biológicos subyacentes (Brown et al., 2013, Geng et al., 2004, Tsechpenakis et al., 2008, Wang & Wang, 2013). Otra técnica de análisis de imagen aplicada es el uso del microscopio de fluorescencia que permite visualizar procesos biológicos en tiempo real en organismos vivos mediante la

detección de señales fluorescentes siendo útil a nivel celular y en la fisiología en modelos animales (Kelley et al., 2020, Lu et al., 2023, Tjahjono et al., 2020).

Algunos artículos como Feng et al., 2004, Cronin et al., 2005, y más recientemente Verdú et al., 2020, 2021a, 2021b y 2022, proporcionan una base sólida para comprender mejor las técnicas de análisis de imagen empleadas en estudios sobre el comportamiento de los animales para estudiar patrones de movimiento y mortalidad en el *C. elegans*, vislumbrar mecanismos subyacentes del estrés oxidativo y su impacto en organismos vivos, así como claros ejemplos de su aplicación en el ámbito científico.

2 OBJETIVOS

Evaluar a través de técnicas de imagen (locomoción y fluorescencia) el uso de *Caenorhabditis Elegans* como indicador del daño oxidativo generado por el agente oxidante peróxido de hidrógeno.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

En el estudio se empleó la cepa salvaje de Bristol *Caenoradibitis elegans* N2 como modelo biológico. El nematodo fue cultivado y crecido en placa con medio NGM (nematode growth medium) sembrado con *E. coli* OP50 a 20°C (Brenner, 1974). Para los ensayos se trabajó con el estado larvario L4 del nematodo, lo que implicó la sincronización de estos mediante hipoclorito sódico la cual se realizó siguiendo el método descrito por Verdú et al., 2022 y que posteriormente se describe. Finalmente, el estudio de locomoción, letalidad y fluorescencia se efectuó en medio líquido utilizándose como tampón el M9 (Xiao et al., 2023).

3.2 Procedimiento experimental

Inicialmente y con la finalidad de incrementar la población inicial de nematodos, se procedió a la transferencia de pequeñas porciones de agar con nematodos a otras placas de agar. Una vez obtenida una masa importante, se procedió a su sincronización, es decir, tener individuos nacidos a la vez y por tanto alcanzar todos el estadio L4. Se prepararon 20 mL de una solución blanqueante (NaOH 1,6 M; NaClO 2,5 % (15 % de pureza); agua destilada) de lejía. Esta solución desintegra el cuerpo del nematodo, pero no destruye los huevos debido a la capa impermeable formada en la cáscara del huevo formado tras la fertilización del embrión en su desarrollo de forma independiente (Verdú et al., 2022).

Para ello, primero varias placas de agar NGM y nematodos, en todas sus fases de su ciclo vital, se lavaron con 1,3 mL de tampón M9. Este contenido fue transferido a tubos Eppendorf de 1,5 mL. Para eliminar restos de suciedad presentes en el medio, los tubos se centrifugaron (1500 rpm, 1 min) y se eliminó el sobrenadante. El pellet, formado únicamente por nematodos, se lavó con 1,1 mL de la solución blanqueante de lejía preparada previamente. Los tubos se agitaron manualmente durante 7-10 minutos hasta que los cuerpos de los nematodos se desintegraron, quedando únicamente los huevos. Esto se consiguió mediante la visualización periódica con una lupa. Posteriormente se adicionaron 200 µL de tampón M9 para paralizar el efecto de la solución blanqueante. A continuación, los huevos se centrifugaron y se lavaron con 1,3 mL de tampón M9, para eliminar los posibles restos de la solución blanqueante. Se centrifugaron de nuevo y se lavaron con 500 µL de tampón M9. Finalmente, se transfirieron a placas Petri con agar NGM y *E.coli* OP50, incubándose a 20° C, durante 2-3 días hasta obtener una población sincronizada del nematodo en estado larvario L4.

3.3 Ensayos toxicológicos

Los efectos de la exposición de *C. elegans* a H₂O₂ se evaluaron utilizando técnicas de imagen. Se prepararon cinco concentraciones de H₂O₂ (0, 1, 2, 5 y 7 mM) en tampón M9 a las que se les incorporó, en función del estudio, una masa de *C. elegans* estimada de estudios previos, incubándose a tiempos de exposición 1, 2 y 5 horas.

3.3.1 Ensayo de locomoción

El ensayo se centró en evaluar el impacto del H₂O₂ en la capacidad de movimiento de *C. elegans* mediante técnicas de seguimiento con videos. Para ello, los nematodos sincronizados en fase adulta L4 de varias placas de agar NGM, se lavaron con 2 mL de tampón M9 y se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 mL. Estos se centrifugaron (1500 rpm, 1 min) y se lavaron de nuevo con 1 mL de tampón M9, con el fin de eliminar restos de suciedad presentes en el medio. Se creó una población conjunta formada por los nematodos obtenidos de varias placas. A continuación, se prepararon diferentes disoluciones en función de la concentración de H₂O₂ y el tiempo de exposición al nematodo, en un volumen total de 500 µL. Estas se formaron a partir de 50 µL de la población de nematodos en tampón M9, la cantidad de H₂O₂ correspondiente en cada concentración y un volumen de tampón M9 hasta alcanzar el volumen total. La población aproximada de nematodos en cada caso fue de 20 nematodos. Una vez preparadas todas las disoluciones, se traspasaron 0,2 mL de cada una, por duplicado, a placas de 24 pocillos Costar (Corning ® 3526 Costar ® 24-Well Flat Bottom). Estas se

incubaron a 20 °C durante los tiempos de exposición establecidos (1, 2 y 5 h). Una vez transcurrido el tiempo, se estudiaron los efectos del H₂O₂ en la locomoción del nematodo. El ensayo se realizó en 5 experimentos independientes y cada uno fue llevado a cabo por duplicado. Los controles negativos y positivos fueron incluidos.

El ensayo de locomoción se realizó con un dispositivo controlado por el ordenador para la adquisición de imágenes. Este constaba de una cámara (Logitech C920 HD Pro Webcam, LogitechEurope S.A., Suiza) colocada perpendicularmente a 3,5 cm de una fuente de luz generada por una pantalla TFT-LCD de 7" (NHD-7.0 OLED, Newhaven Display Intl, IL, EE.UU.). Ambos elementos se introdujeron dentro de una cámara aislada de luz (20*20*20 cm). Las placas de 24 pocillos con nematodos se colocaron entre la cámara y la fuente de luz. Los vídeos fueron capturados a 30 fps en formato RGB y con una resolución de 1080-720 píxeles. El análisis de imágenes se realizó con el paquete de procesamiento de imágenes de Fiji (Schindelin et al., 2012). Para el procesamiento de imágenes y adquisición de datos, se capturaron, por duplicado, vídeos de 30 segundos para cada concentración de H₂O₂ y tiempo de exposición (figura 2).



FIGURA 2. Imagen captada por el equipo sobre la que se realiza la grabación.

A continuación, los vídeos se cortaron en 900 imágenes (figura 3) y se crearon GIFs. A partir de estos, se obtuvieron datos de los cambios de movimiento de un píxel respecto al píxel anterior. Posteriormente, se llevó a cabo una normalización de los datos, con el fin de eliminar la dependencia del número de nematodos inicial, obteniendo rangos de cantidad de movimiento. Seguidamente, se crearon histogramas de frecuencia a partir de estos datos procesados del comportamiento de *C. elegans*. La matriz de datos de los histogramas se analizó estadísticamente mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA), para reducir la dimensionalidad de la matriz y concentrar la variabilidad de los datos

en un menor número de variables, llamadas Componentes Principales (PC). La información de los PCs queda recogida en los scores.

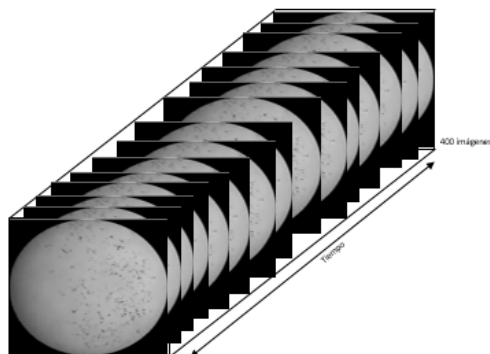


FIGURA 3. Esquema visual de la segmentación de los videos en imágenes a lo largo del tiempo.

3.3.2 Ensayo de letalidad

El ensayo de letalidad se realizó con la finalidad de evaluar el efecto del H_2O_2 sobre la mortalidad de *C. elegans*. Las exposiciones se llevaron a cabo en medio líquido (tampón M9) siguiendo el protocolo de Meneely et al., 2019.

Primero, se lavaron varias placas de agar NGM con nematodos sincronizados en fase adulta L4, con 2 mL de tampón M9. Estos se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 mL y se sometieron a una centrifugación (1500 rpm, 1 min). A continuación, los pellets restantes se lavaron de nuevo con 1 mL de tampón M9, con el fin de eliminar restos de suciedad presentes en el medio. Se creó una población conjunta de nematodos obtenidos de las diferentes placas. Seguidamente, los nematodos se expusieron a las diferentes concentraciones de H_2O_2 y tiempos de exposición. Después, se prepararon diferentes disoluciones en tubos Eppendorf de 1,5 mL, en un volumen total de 250 μ L. Estas se formaron a partir de 20 μ L de la población de nematodos en tampón M9, la cantidad de H_2O_2 correspondiente en cada concentración y un volumen de tampón M9 hasta alcanzar el volumen total. La población aproximada de nematodos en cada caso fue de 100 nematodos.

Los tubos se incubaron a 20 °C durante los tiempos de exposición establecidos (1, 2 y 5 h). Una vez transcurrido el tiempo, se contaron los nematodos vivos y muertos mediante una inspección visual con lupa. Para ello, con una pipeta se fueron poniendo gotas de las disoluciones en placas de Petri y se fueron realizando recuentos del nematodo. Este fue contado como muerto si al tocarle con una punta metálica no había movimiento. Los resultados se expresaron como porcentaje de nematodos muertos. El ensayo se realizó en 5 experimentos independientes y cada uno fue llevado a cabo por duplicado. Los controles (no tratados) negativos y positivos fueron incluidos en el ensayo.

3.3.3 Ensayo de fluorescencia

Los ensayos de fluorescencia se llevaron a cabo para identificar si existían tejidos dañados por el efecto del H_2O_2 y si había una posible relación entre la cantidad de fluorescencia (tejido dañado) y la intensidad del tratamiento con H_2O_2 . En este primer estudio, solo se pretendió evaluar la capacidad del ensayo con la finalidad de poderlo utilizar en sucesivos ensayos.

En este ensayo se analizaron al menos 100 nematodos adultos (L4) sincronizados. Su exposición al H_2O_2 se llevó a cabo de la misma manera que en el ensayo de letalidad. Transcurrido el tiempo de exposición al agente, los nematodos se transfirieron a 100 μ l de una solución de reactivo de H_2 DCFDA (dicloroacetato de diclorofluoresceína) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Este compuesto es un indicador de estrés oxidativo general que penetra en las células de especies reactivas de oxígenos y genera fluorescencia. A continuación, los nematodos se centrifugaron (1500 rpm, 1 min) y se lavaron con 1 mL de tampón M9, para eliminar los restos de tinte en el medio. Finalmente, se observó la intensidad de fluorescencia creada por la exposición al H_2O_2 en el nematodo mediante un microscopio. Las imágenes observadas fueron capturadas y procesadas con la finalidad de determinar el área de fluorescencia de los nematodos. Los resultados se expresaron como porcentaje de área de intensidad de fluorescencia generada en *C. elegans* respecto al área total de la imagen. Todos los grupos fueron evaluados por duplicado. Los controles negativos y positivos fueron incluidos.

3.4 Análisis estadístico

Para el análisis de la matriz de datos de los histogramas procedente del estudio de movilidad, empleando la captura de imágenes, se utilizó la herramienta estadística multivariante PCA (Análisis de Componentes Principales). Esta permite reducir la dimensionalidad de la matriz y concentrar la variabilidad de los datos en un menor número de variables, llamadas Componentes Principales (PC). Para ello se utilizó el paquete informático PLS Toolbox, 6.3 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, Washington, EE. UU.), una extensión de la caja de herramientas en el entorno computacional Matlab 7.6 (The Mathworks, Natick, Massachusetts, EE. UU.).

Los resultados de movilidad (scores) y letalidad se analizaron y compararon estadísticamente mediante el análisis de varianza con ANOVA multifactorial empleando el software Statgraphics Centurion XVIII (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia, EE.UU), con el fin de evaluar si existían diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de H_2O_2 y tiempos de exposición sobre el movimiento y la letalidad de *C.elegans*. El método utilizado

para discriminar entre las medias fue el de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher con un intervalo de confianza del 95 %. Los resultados finales fueron expresados como la media de las repeticiones \pm la desviación estándar.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayo de locomoción

El comportamiento locomotriz del *Caenorhabditis elegans* ha sido empleado en numeros estudios, en los que la modificación en este es evaluado y caracterizado en base a los agentes a los que es expuesto (Feng et al., 2004; Verdú et al., 2020; Verdú et al., 2021a). Así, en el estudio, una vez obtenidos los videos en los que se captura su movimiento y segmentados estos en imágenes y formados los GIFs, se procedió a comparar las imágenes entre dos frames contiguos, es decir una con respecto a la anterior, a fin de evaluar la cantidad de pixeles diferentes entre ambas, siendo estos interpretados como cantidad de movimiento total de los nematodos. La figura 4, a modo de ejemplo, muestra los cambios en pixeles entre imágenes a lo largo de los 30 s de captura del video para cada ensayo. En la parte izquierda (A) de la figura 4 se muestran la cantidad de pixeles de cambio para *C. elegans* expuestos a concentraciones de H_2O_2 de 0 mM a 0 h (control) y 1 mM durante 1 h de exposición. En el caso de la parte derecha (B) de la figura 4, se muestra para *C. elegans* expuestos a una concentración de 7 mM durante 1 h y 5 h de exposición. Los resultados reflejaron como la exposición del nematodo a peróxido de hidrogeno afecta a los cambios de movimiento siendo menor cuanto mayor fue la concentración de este (figura 4A). Pero a la vez, el tiempo de exposición también ejerció efecto, siendo menor la variación de pixeles y por tanto el movimiento de los nematodos al incrementarse este (figura 4B).

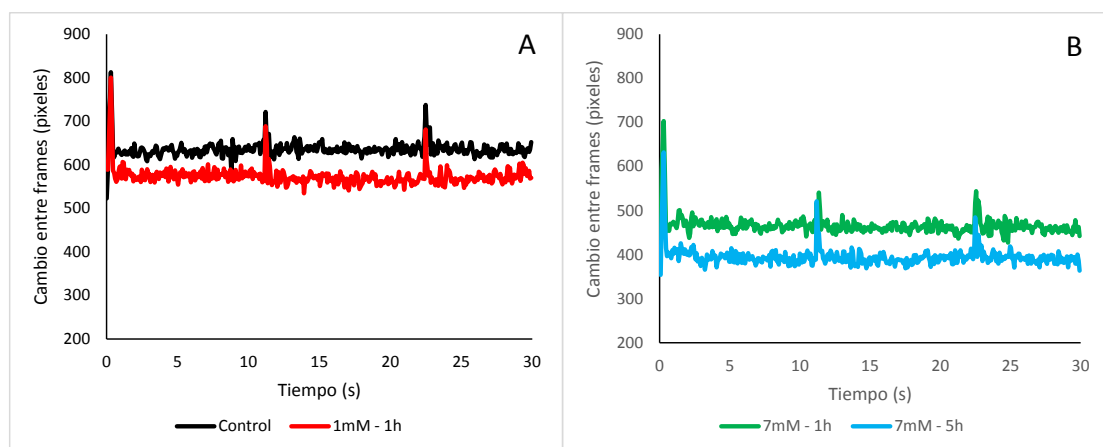


FIGURA 4. Cantidad de pixeles que presentan cambio entre dos frames contiguos a lo largo del estudio. A: *C. elegans* sin exposición a H_2O_2 (control) y a una concentración de 1 mM durante 1 hora. B: *C. elegans* expuesto a H_2O_2 a una concentración de 7 mM durante 1 o 5 horas.

Si bien los resultados mostrados reflejaron un efecto a la intensidad del tratamiento con H_2O_2 al igual que estudios con extractos de semillas de *Peganum harmala L.* en los que también se observó un descenso con el incremento del nivel de exposición (Miao et al., 2020), con la finalidad de poderlos cuantificar se procedió a su normalización dado que la cantidad de cambio también podría estar ligada a la cantidad inicial de *C. elegans*. Para ello, se calculó el histograma de frecuencia, obteniéndose rangos de la cantidad de movimiento que originan los nematodos. La figura 5, a modo de ejemplo, muestra el histograma de frecuencia de *C. elegans* tras haber sido expuestos a peróxido de hidrógeno a una concentración de 0 mM (sin exposición), y 1 mM durante 1 h (figura 5A) y a 7 mM durante 1 y 5 horas (figura 5B), al igual que se ha mostrado en la figura anterior (figura 4). Como se puede observar, el incremento en la concentración (figura 5A) generó una distribución más heterogénea del movimiento (menor pico y mayor base), el cual se aprecia mejor si observamos la respuesta para los nematodos expuestos durante una hora a 1 mM (figura 5A, línea roja) y 7 mM (figura 5B, línea verde). En el mismo sentido se apreció el efecto del tiempo (figura 5B) en la que el incremento del tiempo de exposición también generó mayor heterogeneidad del movimiento. Esta mayor heterogeneidad en el movimiento de los nematodos con el incremento de la intensidad del tratamiento podría ser debido a la dificultad que generaría en este la presencia de nematodos muertos, así como el efecto del propio tratamiento sobre cada uno de los individuos.

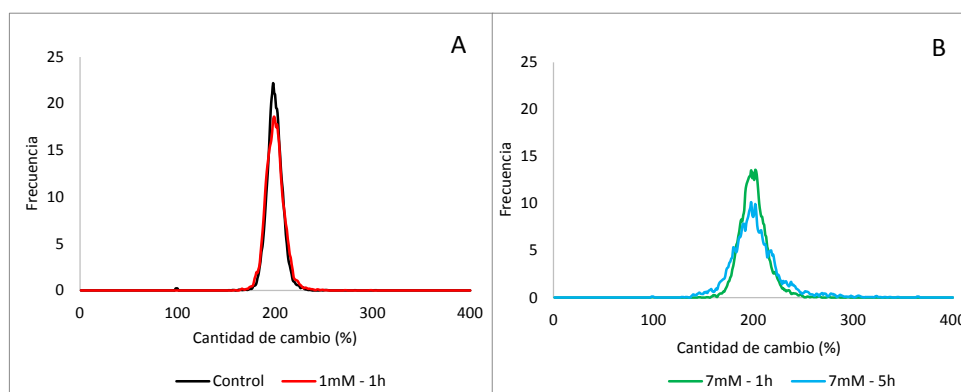


FIGURA 5. Histograma de frecuencia de la cantidad de movimiento del *C. elegans*. A: *C. elegans* sin exposición a H_2O_2 (control) y a una concentración de 1 mM durante 1 hora. B: *C. elegans* expuesto a H_2O_2 a una concentración de 7 mM durante 1 o 5 horas.

Una vez explorados los datos y evidenciado el efecto de la intensidad del tratamiento sobre la movilidad de *C. elegans*, se procedió a su cuantificación. Para ello se aplicó el análisis multivariante PCA, y los componentes principales obtenidos en este fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA

multifactorial teniendo en cuenta los factores concentración de H₂O₂ y tiempo de exposición. El resultado mostró como la PC1 con un 13.35% de la varianza fue suficiente para evidenciar el efecto de la intensidad del tratamiento en el movimiento. Asimismo, el análisis multifactor de la PC1 mostró el efecto de ambos factores ($P < 0,05$), así como de su interacción. En la figura 6, se muestran los scores de la PC1 para los tres tiempos de exposición (1, 2 y 5 h) de cada una de las 5 concentraciones de H₂O₂ utilizadas (0, 1, 2, 5 y 7 mM). Como se puede apreciar, existe interacción de ambos factores disminuyendo el valor del score con el incremento del tratamiento tanto en concentración como en tiempo de exposición. Este menor valor del score estaría expresando la menor movilidad del nematodo por efecto del tratamiento la cual, como se ha comentado anteriormente podría deberse a un impedimento físico como consecuencia de la presencia de nematodos muertos y/o a un menor número de nematodos en movimiento.

Con el fin de evaluar si este descenso en la movilidad está relacionado con una posible mortalidad de *C. elegans*, se procedió a realizar un estudio de letalidad.

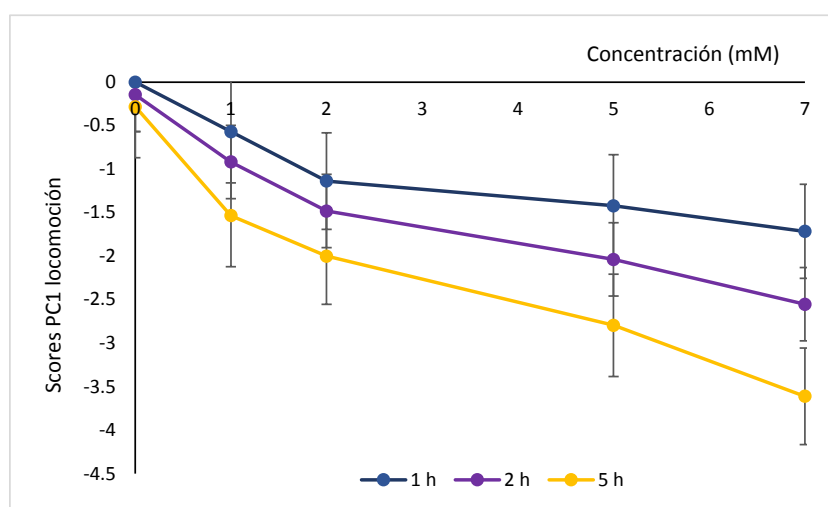


FIGURA 6. Scores de la PC1 del análisis de PCA realizado a partir de los datos de los histogramas de locomoción para *C. elegans* tratados a las diferentes concentraciones durante 1, 2 o 5 horas. Las barras negras verticales expresan diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

4.2 Ensayo de letalidad

El recuento de nematodos permitió conocer la mortalidad de los mismos conforme se expusieron a peróxido de hidrógeno a dosis crecientes, 0, 1, 2, 5 y 7 mM durante 1, 2 y 5 horas. El análisis estadístico multifactorial mostró un efecto de ambos factores (concentración y tiempo de exposición), así como el de su interacción. La figura 7 muestra el porcentaje de letalidad en función de ambos factores. Como se puede observar, el incremento de la intensidad del tratamiento

produjo un incremento en la mortalidad del nematodo la cual fue dependiente tanto de la concentración de H₂O₂ utilizada como del tiempo de exposición.

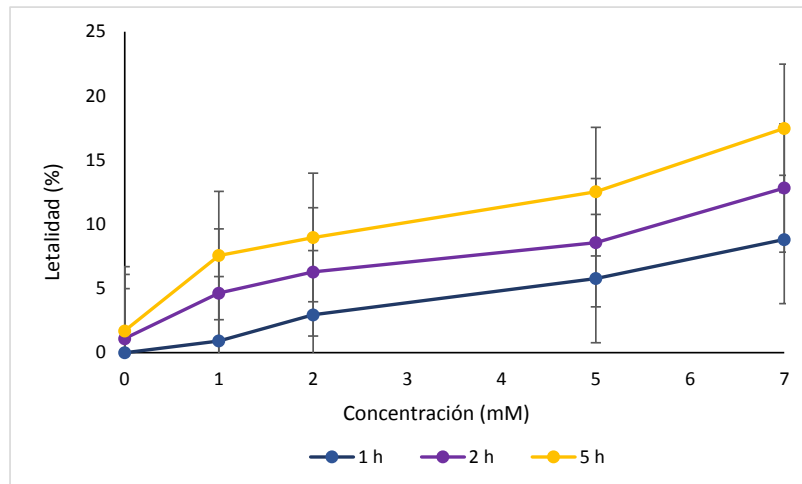


FIGURA 7. Resultados de letalidad del porcentaje de muertos de *C. elegans* frente a la concentración (0, 1, 2, 5 y 7 mM) de H₂O₂ a lo largo del tiempo (1, 2 y 5 h). Las barras negras verticales expresan diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

Una vez evaluado el efecto del tratamiento sobre la mortalidad del nematodo, se procedió a examinar la relación que podría tener esta con el descenso de movimiento observado en el apartado anterior. Como se puede apreciar en la figura 8, en la que se muestra dicha relación, esta fue lineal. Este resultado estaría indicando que el descenso en el movimiento observado estaría ligado fundamentalmente a la mortalidad de los individuos y no tanto al impedimento físico que estos generarían sobre el movimiento de los vivos.

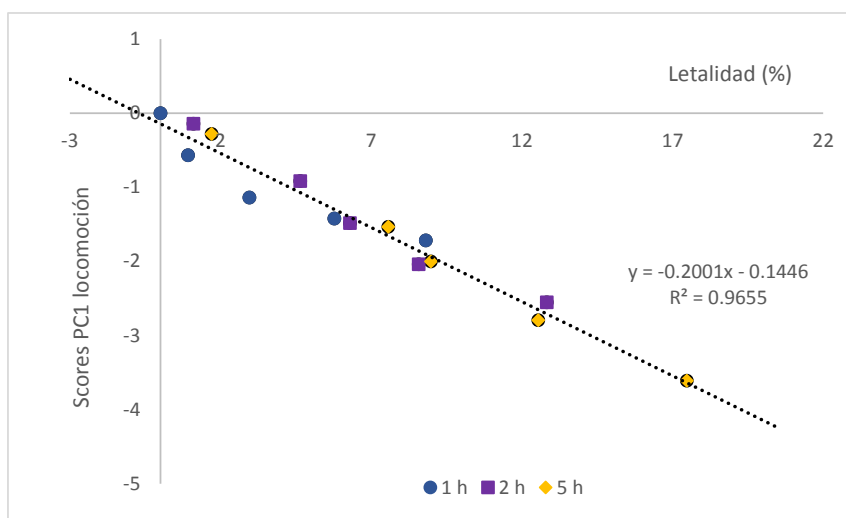


FIGURA 8. Relación entre los scores de movimiento colectivo y la letalidad del *C. elegans*.

En base a este resultado, la aplicación de la técnica de captura de videos, con la finalidad de evaluar la cantidad de movimiento, podría utilizarse para respaldar el efecto que agentes como el H_2O_2 tienen sobre la mortalidad de *C. elegans* la cual ya fue observada en estudios (Ji et al., 2022; Morton et al., 2024) en los que al incrementar los niveles de ROS disminuía la esperanza de vida del modelo biológico.

4.3 Ensayo de fluorescencia

Finalmente, una vez evaluado el efecto del H_2O_2 sobre *C. elegans* se procedió a evaluar la posible existencia de tejidos dañados como consecuencia de este. Para ello, se evaluó la fluorescencia que generaba su acción sobre los tejidos. Como se ha comentado en materiales y métodos, en este estudio sólo se pretendió evaluar la capacidad del ensayo con la finalidad de poder ser utilizado en sucesivos ensayos. Así dicha fluorescencia se evaluó sobre los nematodos control, tratados a una concentración 1 mM durante 1 hora, y a 7 mM durante 1 hora y 7 horas. La figura 9A, B, C y D, muestran respectivamente imágenes de fluorescencia de los nematodos tratados a dichas intensidades. Como se puede observar, con el incremento de la intensidad del tratamiento con H_2O_2 se produjo un incremento de la cantidad de fluorescencia presente en cada imagen, evidenciando el daño sobre los tejidos que genera la acción de H_2O_2 . Si bien la cantidad de nematodos iniciales se cuantificó por aproximación, tal y cómo se detalla en materiales y métodos, dada que la diferencia en éstos es mínima se procedió a cuantificar la fluorescencia de forma absoluta. Para ello, las imágenes obtenidas fueron procesadas hasta lograr la segmentación del área de nematodo fluorescente (figura 9A, B, C y D con subíndices), Así, el porcentaje de área de fluorescencia con respecto al área total de la imagen para la muestra control fue de un 0 %, 1,42 % para la muestra con una hora de exposición a 1 mM, 5,38 % para los tratados el mismo tiempo pero con 7 mM de H_2O_2 y finalmente, del 10,47 % para los tratados también a 7 mM pero durante 5 horas. Cuando se relacionó dichas áreas con los valores de letalidad (%) (figura 10A) y scores (figura 10B) para los mismos tratamientos se evidenció una gran linealidad con ambos. Este resultado evidenciaría que los daños sufridos en los tejidos del nematodo por efecto del H_2O_2 ejercen un efecto sobre su mortalidad la cual queda reflejada en la letalidad evaluada, pero también en la cantidad de movimiento captada por las cámaras.

Así pues, el empleo de la evaluación de la fluorescencia generada por los nemátodos, a priori, podría ser también una herramienta útil para respaldar el efecto que agentes como el H_2O_2 tienen sobre la mortalidad de *C. elegans* Hu et al., 2021 y Fu et al., 2022 en sus estudios evaluando la capacidad antioxidante de flavonoides y la toxicidad del metoxaleno, respectivamente, también observaron

como la producción inducida de ROS también aumentaba significativamente la fluorescencia *C. elegans*.

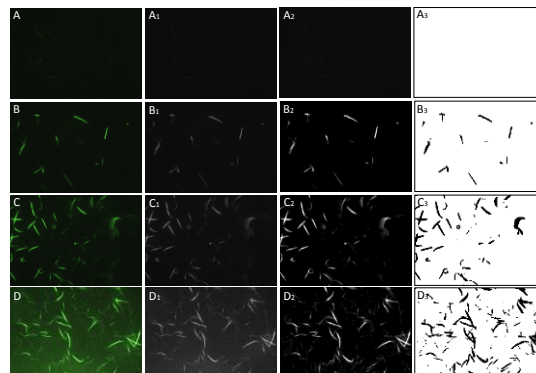


FIGURA 9. Imágenes de fluorescencia (ROS) tomadas a *Caenorhabditis elegans* adultos sincronizados. Se trataron con un tiempo de exposición y concentración de 1 h sin H₂O₂ (control) (A), 1 h con 1 mM H₂O₂ (B), 1 h con 7 mM H₂O₂ (C) y 5 h con 7 mM H₂O₂ (D). Los subíndices en las letras expresan los sucesivos tratamientos de imagen para obtener las áreas de fluorescencia representativas de los nematodos.

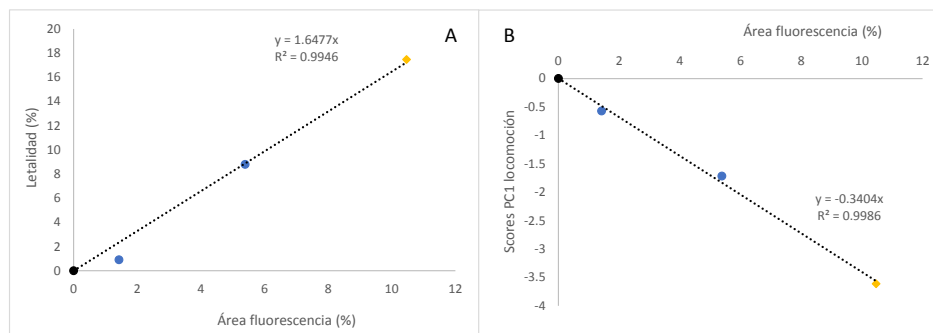


Figura 10. Relación entre el área de fluorescencia, la letalidad (A) y los scores de movimiento colectivo (B).

5 CONCLUSIONES

Los resultados de los ensayos mostraron un efecto de la dosis de H₂O₂ y del tiempo de exposición sobre el comportamiento del *C. elegans*. Así, el incremento de ambos produjo también un incremento en la letalidad del nematodo y una disminución en la cantidad de movimiento total de éstos la cual se pudo relacionar directamente con la mortalidad.

El análisis de la fluorescencia también evidenció el efecto de dosis y tiempo de exposición a H₂O₂ sobre los nematodos, incrementando la cantidad de ésta con el incremento de la intensidad del tratamiento. Este incremento de la fluorescencia evidenció el efecto que agentes como el H₂O₂ tienen sobre los tejidos de *C. elegans*, la cual fue también relacionada directamente con la letalidad e inversamente con la cantidad de movimiento total.

Así pues, mediante la aplicación de técnicas de imagen como son la evaluación de la locomoción y de la fluorescencia se ha evidenciado el uso de *Caenorhabditis Elegans* como indicador del daño oxidativo generado por el agente oxidante peróxido de hidrógeno.

6 BIBLIOGRÁFICAS

- Ayuda, b., González, S., González, A. M., & Santos, C. (2020). *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism to Evaluate the Antioxidant Effects of Phytochemicals. *Molecules*, 25(14), 1–23. <https://doi.org/10.3390/molecules25143194>
- Barettino, A., Sirera, R., Flames, N. (2015). Estudio en *Caenorhabditis elegans* del papel de los genes de la vía de apoptosis como mediadores de longevidad. *Universitat Politècnica de València. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural.*, 2–4. <https://doi.org/10.1002/jat.3357>
- Bokov, A., Chaudhuri, A., & Richardson, A. (2004). *The role of oxidative damage and stress in aging*. 125, 811–826. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.009>
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77:71–94. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1213120/pdf/71.pdf>
- Brown, A. E., Yemini, E. I., Grundy, I. J., Jucikas, T., & Schafer, W. R. (2013). A dictionary of behavioral motifs reveals clusters of genes affecting *Caenorhabditis elegans* locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2), 791–796. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211447110>
- Brys, K., Vanfleteren, J. R., & Braeckman, B. P. (2007). Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, 42 (9), 845–851. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.02.004>
- Calabria, D., Guardigli, M., Mirasoli, M., Punzo, A., Porru, E., Zangheri, M., Simoni, P., Pagnotta, E., Ugolini, L., Lazzeri, L., Caliceti, C., & Roda, A. (2020). Selective chemiluminescent TURN-ON quantitative bioassay and imaging of intracellular hydrogen peroxide in human living cells. “Chemiluminescent quantitative bioassay for intracellular hydrogen peroxide in living cells.” *Analytical Biochemistry*, 600 (January), 1137601-8. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113760>
- Chiorcea, A. M. (2022). 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine Biomarkers of Oxidative DNA Damage: A Review on HPLC–ECD Determination. *Molecules*, 27(5), 1–18.
- Crichton, R. R., Wilmet, S., Legssyer, R., & Ward, R. J. (2002). Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91 (1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00461-0](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00461-0)
- Cronin, C. J., Mendel, J. E., Mukhtar, S., Kim, Y. M., Stirbl, R. C., Bruck, J., & Sternberg, P. W. (2005). An automated system for measuring parameters of nematode sinusoidal movement. *BMC Genetics*, vol 6, 1-19. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-5>
- Espino, J. A., Zhang, Z., & Jones, L. M. (2020). Chemical Penetration Enhancers Increase Hydrogen Peroxide Uptake in *C. elegans* for in Vivo Fast Photochemical Oxidation of Proteins. *Journal of Proteome Research*, 19(9), 3708–3715. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00245>

- Feng, Z., Cronin, C. J., Jr, J. H. W., Sternberg, P. W., & Schafer, W. R. (2004). An imaging system for standardized quantitative analysis of *C. elegans* behavior. *BMC Bioinformática* 5, 115 (2004). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-115>
- Fu, K., Zhang, J., Wang, L., Zhao, X., & Luo, Y. (2022). Xanthotoxin induced photoactivated toxicity, oxidative stress and cellular apoptosis in *Caenorhabditis elegans* under ultraviolet A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 251(October 2021), 109217. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109217>
- Geng, W., Cosman, P., Member, S., Berry, C. C., Feng, Z., & Schafer, W. R. (2004). Automatic Tracking, Feature Extraction and Classification of *C. elegans* Phenotypes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 51 (10), 1811–1820. <https://doi: 10.1109/TBME.2004.831532>
- González, M.C., Betancourt, M. & Ortiz, R. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes, *Bioquímica*, 25 (1), 3-9. Sociedad Mexicana de Bioquímica A. C. Distrito Federal, México. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57611797001>
- Gottschling, D.C, & Döring, F. (2019). Is *C. elegans* a suitable model for nutritional science? *Genes & Nutrition* 3, 1–4. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2130875>
- Habibalahi, A., Moghari, M. D., Campbell, J. M., Anwer, A. G., Mahbub, S. B., Gosnell, M., Saad, S., Pollock, C., & Goldys, E. M. (2020). Non-invasive real-time imaging of reactive oxygen species (ROS) using auto-fluorescence multispectral imaging technique: A novel tool for redox biology. *Redox Biology*, 34(January), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101561>
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32 (3), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>
- Harman, D. (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 3, 298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Hu, Q., Liu, Z., Guo, Y., Lu, S., Du, H., & Cao, Y. (2021). Antioxidant capacity of flavonoids from *Folium Artemisiae Argyi* and the molecular mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 279 (June), 114398. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114398>
- Hunt, P. R., Camacho, J. A., & Sprando, R. L. (2020). *Caenorhabditis elegans* for predictive toxicology. *Current Opinion in Toxicology*, 23–24, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.02.004>
- Imlay, A. (2011). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, IL 61801. Annu Rev Biochem.*, 34(1), 47–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055>. Cellular
- Ivanova, M., & Moss, E. G. (2024). A temporal sequence of heterochronic gene activities promotes stage-specific developmental events in *C. elegans*. Department of Molecular Biology, Rowan-Virtua School of Translational Biomedical Engineering & Sciences, Rowan University, Stratford, 17-18. <https://doi.org/10.1101/2024.02.26.582127>
- Ji, P., Li, H., Jin, Y., Peng, Y., Zhao, L., & Wang, X. (2022). *C. Elegans* as an in vivo model system for the phenotypic drug discovery for treating paraquat poisoning. *PeerJ*, 10, 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.12866>
- Kelley, C. A., Henau, S. De, Bell, L., Dansen, T. B., Cram, E. J., & Hardin, J. (2020). Redox signaling modulates Rho activity and tissue contractility in the *Caenorhabditis elegans*

spermatheca. *Biología molecular de la célula*, 31 (14), 1486-1497. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-04-0236>

Kostyuk, A. I., Panova, A. S., & Kokova, A. D. (2020). In vivo imaging with genetically encoded redox biosensors. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8164. <https://doi.org/10.3390/ijms21218164>

Kumsta, C., Thamsen, M., & Jakob, U. (2011). Effects of Oxidative Stress on Behavior, Physiology, and the Redox Thiol Proteome of *Caenorhabditis elegans*. 14(6), 1-12. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3203>

Lant, B., & Brent, W. (2014). Analysis of apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(5), 447–453. <https://doi.org/10.1101/pdb.top070458>

Leaver, M. (2020). Biolistic Transformation in *C. elegans*. *CBG, Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics.*, 1–5. *Hyman Lab*. https://hymanlab.org/hyman_lab/wp-content/uploads/2012/09/Biolistic-transformation-of-c.elegans-bombardment-protocol.pdf

Lu, Y., Jiang, R., Cui, B., Wang, M., Fang, J., Li, F., Kong, F., & Zhou, Y. (2023). Quantification and visualization of hydrogen peroxide in an ischemic model and serum samples from stroke patients using a reaction-based fluorescence sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 397(July), 134662. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134662>

Mathew, M. D., Mathew, N. D., & Ebert, P. R. (2012). WormScan: A technique for high-throughput phenotypic analysis of *Caenorhabditis elegans*. *Plos one*, 7(3), 3–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033483>

Meneely, P. M., Dahlberg, C. L., & Rose, J. K. (2019). Working with Worms: *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 19(1), 1–35. <https://doi.org/10.1002/cpet.35>

Miao, X., Zhang, X., Yuan, Y., Zhang, Y., Gao, J., Kang, N., Liu, X., Wu, J., Liu, Y., & Tan, P. (2020). The toxicity assessment of extract of Peganum harmala L. seeds in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03051-x>

Migliori, M. L., Goya, M. E., Lamberti, M. L., Silva, F., Rota, R., Bénard, C., & Golombek, D. A. (2023). *Caenorhabditis elegans* as a Promising Model Organism in Chronobiology. *Journal of Biological Rhythms*, 38 (2), 131–147. <https://doi.org/10.1177/07487304221143483>

Morton, K. S., Wahl, A. K., & Meyer, J. N. (2024). The effect of common paralytic agents used for fluorescence imaging on redox tone and ATP levels in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 19 (4 April), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292415>

Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N. G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., Van Remmen, H., Schumacker, P. T., Thornalley P. J., Toyokuni, S., Winterbourn, C. C. & Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, 4(6), 651–662. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>

Okoye, C. N., Chinnappareddy, N., Stevens, D., & Kamunde, C. (2022). Factors affecting liver mitochondrial hydrogen peroxide emission. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 259 (December 2021), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2022.110713>

- Oszyczka, P., Chowaniec, K., & Skubała, K. (2023). Membrane lipid peroxidation in lichens determined by the TBARS assay as a suitable biomarker for the prediction of elevated level of potentially toxic trace elements in soil. *Ecological Indicators*, 146 (January). <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.109910>
- Patil, G., & Van Zon, J. S. (2024). Timers, variability, and body-wide coordination: *C. elegans* as a model system for whole-animal developmental timing. *Current Opinion in Genetics and Development*, 85, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2024.102172>
- Puchalt, J. C., Sánchez, A. J., Ivorra, E., Genovés, S., Martínez, R. & Martorell, P. (2020). Improving lifespan automation for *Caenorhabditis elegans* by using image processing and a post-processing adaptive data filter. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65619-4>
- Rubio, C. P., & Cerón, J. J. (2021). Spectrophotometric assays for evaluation of Reactive Oxygen Species (ROS) in serum: general concepts and applications in dogs and humans. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02924-8>
- Sakamoto, T., & Imai, H. (2017). Hydrogen peroxide produced by superoxide dismutase SOD-2 activates sperm in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 292(36), 14804–14813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788901>
- Schiffer, J. A., Stumbur, S. V., Seyedolmohadesin, M., Xu, Y., Serkin, W. T., Mgowan, N. G., Banjo, O., Torkashvand, M., Lin, A., Hosea, C. N., Assié, A., Samuel, B. S., O'donnell, M. P., Venkatachalam, V., & Apfeld, J. (2021). Modulation of sensory perception by hydrogen peroxide enables *Caenorhabditis elegans* to find a niche that provides both food and protection from hydrogen peroxide. *Plos Pathogens*, 17(12), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010112>
- Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C., & Eliceiri, K. W. (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 82 (7–8), 518–529. <https://doi.org/10.1002/mrd.22489>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11 (November 2016), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Tissenbaum, H. A. (2015). Using *C. elegans* for aging research. *Invertebrate Reproduction and Development*, 59, 59–63. <https://doi.org/10.1080/07924259.2014.940470>
- Tjahjono, E., Mcanena, A. P., & Kirienko, N. V. (2020). The evolutionarily conserved ESRE stress response network is activated by ROS and mitochondrial damage. *BMC Biology*, 18 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00812-5>
- Tsechpenakis G, Bianchi L, Metaxas D, Driscoll M. (2008). A novel computational approach for simultaneous tracking and feature extraction of *C. elegans* populations in fluid environments. *IEEE Trans Biomed Eng.* May; 55 (5): 1539-49. <https://doi: 10.1109/TBME.2008.918582>. PMID: 18440900
- Verdú, S., Ruiz, M. Perez, A.J., Barat, J.M., Talens, P., Grau, R. (2020). Toxicological implications of amplifying the antibacterial activity of gallic acid by immobilization on silica particles: A study on *C. elegans*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103492>

- Verdú, S., Perez, A.J., Carrascosa, C., Barat, J.M., Talens, P., Grau, R. (2021a). *Caenorhabditis elegans* to Model the Capacity of Ascorbic Acid to Reduce Acute Nitrite Toxicity under Different Feed Conditions: Multivariate Analytics on Behavioral Imaging. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (4), 42068. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042068>
- Verdú, S., Ruiz, M. Perez, A.J., Barat, J.M., Grau, R. (2021b). Evaluation of the influence of food intake on the incorporation and excretion kinetics of mesoporous silica particles in *C. elegans*. *Chemico-Biological Interactions*, 334, 109363. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109363>
- Verdú, S., Fuentes, C., Barat, J. M., & Grau, R. (2022). Characterization of chemical damage on tissue structures by multispectral imaging and machine learning procedures: Alkaline hypochlorite effect in *C. elegans*. *Computers in Biology and Medicine*, 145 (April). <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.105477>
- Wang, S. J., & Wang, Z. (2013). Track-A-Worm, An Open-Source System for Quantitative Assessment of *C. elegans* Locomotory and Bending Behavior. University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut, United States of America, Department of Neuroscience, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut, United States of America. *Plos One*, 8 (7), 15–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069653>
- Wang, Y., Guo, K., Wang, Q., & Zhong, G. (2022). *Caenorhabditis elegans* as an emerging model in food and nutrition research: importance of standardizing base diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2130875>
- Xiao, Y., Zhang, L., & Liu, Y. (2023). Protocol for assessing the healthspan of *Caenorhabditis elegans* after potential anti-aging drug treatment. *STAR Protocols*, 4(2), 102285. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102285>
- Zeidan, M. M., & Noori Raddam, Q. (2021). Physiological and histological protective role of *Astragalus spinosus* root alcoholic extract against oxidative stress induced by H₂O₂ in rabbits. *Journal of Physics: Conference Series*, 1879(2), 1–10. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1879/2/022039>
- Zenin, V., Ivanova, J., Pugovkina, N., Shatrova, A., Aksenov, N., Tyuryaeva, I., Kirpichnikova, K., Kuneev, I., Zhuravlev, A., Osyayeva, E., Lyublinskaya, E., Gazizova, I., Guriev, N., & Lyublinskaya, O. (2022). Resistance to H₂O₂-induced oxidative stress in human cells of different phenotypes. *Redox Biology*, 50, 1022451-10. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102245>
- Zhang, G., Li, Z., Chen, F., Zhang, D., Ji, W., Yang, Z., Wu, Q., Zhang, C., Li, L., & Huang, W. (2020). A novel fluorogenic probe for visualizing the hydrogen peroxide in Parkinson's disease models. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 13(3), 1–10. <https://doi.org/10.1142/S1793545820500133>
- Zhang, Y., Yang, M., Wang, Y., Huang, W., & Ji, M. (2022). Lighting up hydrogen peroxide in living cells by a novel quinoxalinamine based fluorescent probe. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 267, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120528>
- Zhu, A.; Zheng, F.; Zhang, W.; Li, L.; Li, Y.; Hu, H.; Wu, Y.; Bao, W.; Li, G.; Wang, Q. (2022). Oxidation and Antioxidation of Natural Products in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants*, 11, 705. <https://doi.org/10.3390/antiox11040705>

ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.		X		
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.		X		
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

El actual trabajo presenta una alineación con el ODS N.º 9 "Industria, innovación e infraestructuras" puesto que contribuye en posibles aplicaciones del *C. elegans* a productos y la interacción de un sistema al estrés oxidativo fomentando la innovación. Además, en un menor grado este trabajo puede ayudar con el ODS N.º 8 "Trabajo decente y crecimiento económico" permite trabajar adecuadamente en un entorno en el que promover el desarrollo económico inclusivo y sostenible, y apoyar al crecimiento del país al conseguir métodos más eficaces que permiten conocer el grado de oxidación, por ejemplo en un control de calidad de un alimento y así, garantizar a toda la sociedad de alimentos saludables donde se han realizado los pertinentes controles de calidad de forma eficiente y correcta como se puede observar en el ODS N.º 3 "Salud y Bienestar" que favorecen el bienestar en toda la población y les permite llevar una vida sana.