

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Efectos del envejecimiento en la fertilización y el desarrollo embrionario temprano utilizando como modelo el pez cebra

Colaboradores:



TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: PALOMA FERNÁNDEZ PÉREZ

TUTORA: MARÍA INMACULADA MOLINA BOTELLA

COTUTOR EXTERNO: FERNANDO GARCÍA XIMÉNEZ

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, 23 de mayo de 2016



Efectos del envejecimiento en la fertilización y el desarrollo embrionario temprano utilizando como modelo el pez cebra

RESUMEN

La evolución de las sociedades desarrolladas está implicando un retraso en la edad de la maternidad. Frente a este hecho, se constata como fundamental el desarrollo de técnicas reproductivas que palien los efectos del envejecimiento sobre la reproducción y así mismo proporcionen un conocimiento más profundo de tales efectos. Una forma de abordar tal tipo de estudios está siendo llevada a cabo mediante el uso de organismos modelo mamíferos, peces e incluso invertebrados. En este contexto, la utilización del pez cebra supone ciertas ventajas: una vida relativamente corta (3 años), la disponibilidad de técnicas de recuperación de ovocitos y espermatozoides, así como de fecundación *in vitro* y, además, un desarrollo embrionario muy rápido, de forma que a los 5 días las larvas ya son autónomas. En el presente trabajo se evaluó el pez cebra como modelo para estudiar el posible efecto de la edad en las capacidades reproductivas de hembras y machos de diferentes edades (especímenes jóvenes y maduros). Con este fin, se analizaron cuatro parámetros: tasa de supervivencia, tasa de anormalidad, tasa de eclosión y tasa de fertilidad, en cuatro grupos mezclando hembras y machos de diferentes edades (Joven x Joven, Maduro x Madura, Joven x Madura y Maduro x Joven).

Los datos recogidos revelaron que cuando las hembras maduras estaban implicadas, se obtenían las mejores tasas de desarrollo (tasas de supervivencia y eclosión de las larvas) y de reproducción (tasa de fertilidad), lo cual significa que, al contrario que en los humanos, la calidad de los ovocitos aumenta conforme lo hace la edad de las hembras. Por otro lado, en cuanto a los resultados derivados de las tasas de anormalidad, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos por lo que no se pudo extraer ninguna conclusión de los efectos que tiene la edad al respecto.

En consecuencia, a pesar de que el pez cebra es un modelo adecuado para estudiar la senescencia como un fenómeno general, parece no ser el modelo correcto para evaluar el efecto del envejecimiento en la reproducción, al menos si se quiere sacar conclusiones que puedan extrapolarse a los seres humanos.

Palabras clave: envejecimiento, reproducción, organismo modelo, pez cebra

ABSTRACT

The evolution of developed societies is entailing a delay in childbearing age. Faced with this fact, it is observed as fundamental the development of reproductive techniques that alleviate the effects of aging on reproduction and, likewise, provide a deeper knowledge of such effects. One way to address this type of study is being carried out by using mammals, fish, and even invertebrates model organisms. In this context, the use of zebrafish involves certain advantages: a relatively short life (3 years), the availability of techniques to recover oocytes and sperm and to perform *in vitro* fertilization, and also very fast embryonic development, so that at 5 days the larvae are already autonomous. In this paper, the zebrafish was evaluated as a model to study the possible effect of age on the reproductive capacity of males and females. To this end, four parameters were analyzed: survival rate, abnormality rate, hatchability and fertility rate, in four groups by mixing males and females of different ages (Young x Young, Mature x Mature, Young x Mature and Mature x Young).

The data collected show that when the mature females were involved, the best growth rates (rates of survival and larvae hatch) and reproduction (fertility rate) were obtained, which means that, unlike humans, oocyte quality increases with the increasing age of the females. On the other hand, as to the results derived from abnormality rates, no significant differences between groups were found so it could not be drawn any conclusions from the effects of age on the matter.

Consequently, despite the zebrafish is suitable model to study senescence as a general phenomenon, it doesn't seem to be a correct model to assess the effect of aging on reproduction, at least if we want to draw conclusions that can be extrapolated to the human beings.

Keywords: aging, reproduction, model organism, zebrafish

Titulación: Grado en Biotecnología

Alumna: Dña. Paloma Fernández Pérez

Tutora: Prof. Dña. María Inmaculada Molina Botella

Cotutor colaborador: D. Fernando García Ximénez

Valencia, 23 de mayo de 2016

AGRADECIMIENTOS

Dicen que lo bueno, si breve, dos veces bueno así que, simplemente agradecer a todos los que han estado apoyándome durante los años de carrera y a los que sé que seguirán ahí cuando todo haya acabado, con una mención especial a mis queridas chachis y por supuesto a mi familia, sin vosotros esto no habría sido posible.

Let's get the party started!

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Retraso en la edad de maternidad en el ser humano.....	1
1.2. Problemas derivados del retraso en el momento reproductivo.....	1
1.3. El uso de modelos animales para el estudio de procesos biológicos....	2
humanos.	
1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	3
1.3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.3.3. <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
1.3.4. <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.3.5. <i>Mus musculus</i>	6
1.4. El pez cebra (<i>Danio rerio</i>) como organismo modelo para el estudio de los efectos del envejecimiento en la reproducción.....	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. Diseño experimental.....	10
3.2. Mantenimiento del pez cebra.....	10
3.3. Obtención de gametos inactivos.....	10
3.3.1. Recolección de huevos.....	11
3.3.2. Recolección de semen.....	11
3.4. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	11
3.5. Procedimiento de recogida de datos para las distintas tasas a evaluar.....	12
3.6. Análisis estadístico.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	15
4.1. Tasa de fecundación.....	15
4.2. Tasa de eclosión.....	16
4.3. Tasa de supervivencia.....	18
4.4. Tasa de anormalidad.....	19
5. CONCLUSIONES	23
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
7. ANEXOS	28
7.1. Análisis estadístico (versión extendida).....	29
7.2. Índice de fuentes de las figuras.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Escherichia Coli</i>	4
Figura 2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
Figura 3. <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
Figura 4. <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Figura 5. <i>Mus musculus</i>	7
Figura 6. Imágenes del ciclo de vida del pez cebra.....	8
Figura 7. Esponjas para la inmovilización de los peces durante la recolección. A la izquierda, esponja curvada para las hembras. A la derecha, esponja con una hendidura en el medio para los machos.....	11
Figura 8. No fecundados vs Fecundados (MBT).....	13
Figura 9. Anormalidades morfológicas del pez cebra evaluadas. a) control b) curvatura espinal c) curvatura de la cola (curly) d) edema en el saco pericárdico.....	13
Figura 10. Curva de crecimiento parabólico.....	22
Figura 11. Edad Media Nacional a la Maternidad por orden del nacimiento según nacionalidad (española/extranjera) de la madre.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de fecundación de los grupos de la misma edad.....	15
Tabla 2. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de fecundación de los grupos de distintas edades.....	15
Tabla 3. Tasas de fecundación para cada grupo de edad.....	16
Tabla 4. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de eclosión (72 hpf) de los grupos de la misma edad.....	16
Tabla 5. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de eclosión (72 hpf) de los grupos de distintas edades.....	17
Tabla 6. Tasas de eclosión a las 72 hpf para cada grupo de edad.....	17
Tabla 7. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de supervivencia (5 dpf) de los grupos de la misma edad.....	18
Tabla 8. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de supervivencia (5 dpf) de los grupos de distintas edades.....	18

Tabla 9. Tasas de supervivencia a los 5 dpf para cada grupo de edad.....	19
Tabla 10. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de anormalidad (5 dpf) de los grupos de la misma edad.....	19
Tabla 11. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de anormalidad (5 dpf) de los grupos de distintas edades.....	20
Tabla 12. Tasas de anormalidad a los 5 dpf para cada grupo de edad.....	21
Tabla 13. Datos de las tasas de fecundación para análisis estadístico. 1 → fecundados; 0 → no fecundados.....	29
Tabla 14. Datos de las tasas de supervivencia para análisis estadístico. 1 → vivos; 0 → no vivos.....	29
Tabla 15. Datos de las tasas de anormalidad para análisis estadístico. 1 → anormales; 0 → no anormales.....	30
Tabla 16. Datos de las tasas de eclosión para análisis estadístico. 1 → eclosionados; 0 → no eclosionados.....	30

ABREVIATURAS

IA	Inseminación artificial
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
ICSI	Inyección intracitoplásmica de espermatozoides
RAE	Real Academia Española
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Mb	megabases
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
J x J	macho joven cruzado con hembra joven
M x M	macho maduro cruzado con hembra madura
J x M	macho joven cruzado con hembra madura
M x J	macho maduro cruzado con hembra joven
mpf	meses post-fecundación
TF	Tasa de fecundación
MBT	mid blastula transition
TE	Tasa de eclosión
hpf	horas post-fecundación
TS	Tasa de supervivencia
TA	Tasa de anormalidad
dpf	días post-fecundación
h	horas
agua de sistema	agua de clorada y descalcificada
μL	microlitros
L	litro
mm	milímetros
v/v	volumen por volumen
BSA	albúmina de suero bovino
g	gramos
NaCl	cloruro sódico
cc	centímetros cúbicos
F1	solución para mantener la osmolaridad de los gametos
mOsm	miliosmol
°C	grados centígrados
min	minutos

Ov. Fec.	Ovocitos fecundados
Ov. Rec.	Ovocitos recogidos
-	No se recogieron datos del grupo ese día
Fec. In.	Fecundados iniciales
Embr. Ecl.	Embriones eclosionados a las 72 hpf
*	Se evaluó la eclosión a las 96 hpf por lo que fueron descartados del estudio
Vivas 5dpf	Larvas vivas a los 5 dpf
Anormales	Larvas anormales a los 5 dpf

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Retraso en la edad de maternidad en el ser humano

Desde principios de los años 60 existe una tendencia general a retrasar la edad a la que las parejas comienzan a tener hijos. Inicialmente esto fue debido a la introducción de métodos anticonceptivos de confianza como la píldora, entre otros, que permitían a las parejas tener un mayor control de su propia reproducción al disminuir el riesgo de concepción no deseada. (Bailey, 2006; Goldin and Katz, 2002; Leridon, 2006).

Este control, junto con la evolución hacia una sociedad más moderna, proporcionó los medios necesarios para la emancipación de la mujer, aumentando sus oportunidades educacionales y laborales. De esta forma, las mujeres comenzaron a ser capaces de elegir si querían ocupar exclusivamente el papel de madres o por el contrario combinarlo con la realización de trabajos remunerados fuera de casa. Esta elección alteró en gran medida el patrón temporal del comportamiento reproductivo, provocando un retraso masivo en la edad a la que las mujeres decidían ser madres. (Mills *et al.*, 2011).

En la actualidad, la vida laboral de la mujer ya no es algo tan determinante a la hora de decidir tener hijos, puesto que el rol de ama de casa ya no es inherente a la mujer, sino que las tareas domésticas se reparten en pareja permitiendo el desarrollo profesional de cada una de las partes. Sin embargo, esto no ha propiciado un adelanto en la edad de maternidad porque dicha edad no sólo determina el establecimiento de una carrera consolidada, sino que, además, sirve como un marcador de desarrollo personal y madurez (Helms-Erikson, 2001). De este modo, las parejas eligen voluntariamente no tener hijos o posponerlo hasta que llegue un periodo de tiempo en el que criar a un niño sea más compatible con el camino profesional elegido y con otros objetivos de la vida tales como la estabilidad de pareja, la seguridad financiera o la preparación para el rol parental. Así, los hombres y mujeres que retrasan la maternidad, suelen tener un nivel formativo superior, mayores ingresos y prestigio ocupacional, y en definitiva una probabilidad mayor de tener planeado el nacimiento de un hijo en comparación con otras parejas que sean más jóvenes (Wilkie, 1981).

Este hecho ha quedado claramente reflejado en los datos de la Media Española de edad de maternidad en el primer nacimiento que, en los años 80, se encontraba alrededor de los 25 años de edad y en cambio actualmente se encuentra en los 31 años (Ver anexo), con una tendencia que previsiblemente continuará en aumento. (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, 2014).

1.2. Problemas derivados del retraso en el momento reproductivo

Esta postergación de los primeros nacimientos es cada vez más común en los países occidentales, especialmente en grupos con elevada formación académica, y entabla un riesgo involuntario de no poder tener hijos debido a las implicaciones de la edad sobre la capacidad tanto masculina como femenina de concebir descendencia (Lampic *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2011).

Cíclicamente las mujeres generan un óvulo listo para ser fecundado, pero esto sólo ocurre durante un tiempo limitado, pues la provisión inicial de folículos primordiales que se convertirán en ovocitos se consume con cada ciclo hasta que se agota completamente. De hecho, el número de ovocitos comienza a disminuir en la mujer en el útero, desde incluso antes

del nacimiento y continúa bajando hasta llegar a la menopausia (Daly and Bewley, 2013). Debido a este fenómeno, la capacidad reproductiva de la mujer va descendiendo gradualmente, pero lo hará de forma significativa a la edad aproximada de 32 años y a una velocidad mayor tras los 37 (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2014). Ello supone un aumento exponencial del riesgo de infertilidad, de la probabilidad de concepción de descendencia con anomalías genéticas y las posibles complicaciones durante el embarazo, como por ejemplo el aborto espontáneo, el embarazo ectópico, la preeclampsia¹ o la necesidad de cesárea (Daly and Bewley, 2013; Ford, 2013).

Por otra parte, en los hombres la espermatogénesis continúa funcionando correctamente en edades avanzadas, lo cual les permite poder reproducirse durante la vejez y permanecer fértiles al menos hasta los 80 años de edad (Eskenazi *et al.*, 2003; Gems, 2014). No obstante, el hecho de que puedan seguir produciendo espermatozoides no significa que la edad no tenga consecuencias para ellos, ya que, por un lado, se pueden dar alteraciones del material genético de los espermatozoides causadas por factores ambientales acumulativos y, por otro, afectar de forma negativa tanto al volumen del semen como a la morfología y la motilidad del espermatozoide. (Eskenazi *et al.*, 2003; Kidd *et al.*, 2001; López y Palacios, 2011).

Estos obstáculos de la edad a los que deben enfrentarse las parejas cada vez más a menudo generan un importante problema de salud, de hecho, en los países desarrollados, se estima que entre el 9 y el 14% de las parejas tienen dificultades para concebir (Walschaerts *et al.*, 2012). Una posible señal de disminución de la salud reproductiva es la alta demanda para el tratamiento clínico de la infertilidad, cuyos métodos se han popularizado en las sociedades occidentales. En el caso de España, estas nuevas técnicas de reproducción han obtenido una muy amplia difusión, siendo uno de los países europeos en los que mayor número de tratamientos se realizan. Según datos del “Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI). Año 2012”, más de 25.000 mujeres fueron tratadas mediante dichas técnicas ese año. Y dado que, como ya se ha planteado anteriormente, una de las razones de este descenso de la fecundidad está relacionada con el aumento de la edad de los progenitores (Walschaerts *et al.*, 2012), la comprensión de cómo la edad afecta a la fertilidad se presenta de gran relevancia en la sociedad moderna.

1.3. El uso de organismos modelo para el estudio de procesos biológicos humanos.

Según la RAE, un modelo es una “*representación simple de una realidad compleja que se elabora para facilitar su comprensión y el estudio de su comportamiento*”. Así, un organismo modelo de experimentación podría definirse como un organismo no humano que permita esclarecer con el mínimo de dificultades los entresijos de la vida (procesos fisiológicos, genéticos, bioquímicos, etc.). Aplicado al campo de la biomedicina, se entendería como un organismo no humano que reproduce una enfermedad humana (o un proceso de una enfermedad) permitiendo la investigación y el desarrollo de diferentes técnicas terapéuticas (Hernández, 2006).

En investigación, los modelos resultan muy útiles y su elaboración implica varios aspectos opuestos ya que deben presentar la realidad lo más fielmente posible, pero a la vez ser

¹ Preeclampsia: Estado patológico de la mujer en el embarazo que se caracteriza por hipertensión arterial, edemas, presencia de proteínas en la orina y aumento excesivo de peso; puede preceder a una eclampsia (Enfermedad que afecta a la mujer en el embarazo o el puerperio, que se caracteriza por convulsiones seguidas de un estado de coma).

más sencillos y manejables que las situaciones reales. Según la Fundación Estadounidense para la Investigación Biomédica, la investigación científica con organismos modelo ha permitido la obtención de una enorme cantidad de información desempeñado un papel vital en prácticamente todos los avances médicos para la salud humana acontecidos durante el pasado siglo XX y dicha relevancia se mantiene actualmente en la investigación biomédica. De hecho, la mayor parte de los protocolos actuales para la prevención, curación y control de enfermedades, están basados en el conocimiento alcanzado a través de investigaciones realizadas en animales de laboratorio (CONFEDERACIÓN DE SOCIEDADES CIENTÍFICAS DE ESPAÑA, 2015).

Por otro lado, la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE) también suscribe que el uso de animales en la investigación es vital para el avance de la medicina, siempre y cuando se cumplan unas estrictas normas de conducta para garantizar un tratamiento y un cuidado ético de los organismos empleados. Los investigadores biomédicos están a favor de esta máxima y por ello aplican de forma rigurosa el “principio de las 3R” donde las R hacen referencia a Reemplazar, Reducir y Refinar. Es decir, los investigadores han de buscar maneras de reemplazar el uso de animales cuando sea posible, reducir el número de ejemplares utilizados a los estrictamente necesarios para obtener resultados significativos y válidos y, por último, refinar, perfeccionar, los métodos empleados para la mejora de su bienestar.

Existe una gran variedad de organismos modelo y cada uno de ellos se utiliza para analizar diversas líneas de investigación en las que sus características particulares los hacen idóneos para estudiar cada proceso en concreto. Aunque los organismos modelo son físicamente diferentes entre sí, años de investigación han puesto de manifiesto un sorprendente parecido en la mayoría de sus procesos biológicos fundamentales y que, además, resultan comunes a los seres humanos (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007). Esta estrategia de usar un organismo menos complejo para estudiar un determinado proceso y poder extrapolar los conocimientos obtenidos al ser humano, es posible debido a la conservación, en el transcurso de la evolución, de determinadas rutas metabólicas y de desarrollo básicas.

A continuación, se describen brevemente algunos de los organismos más conocidos y utilizados actualmente en las investigaciones biomédicas, ordenados de menor a mayor complejidad genética, exceptuando el pez cebra, del que se hablará en el apartado inmediatamente posterior.

1.3.1. *Escherichia coli*

Se trata de una bacteria gram negativa y anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota intestinal de mamíferos y aves. Normalmente, no suele causar ningún tipo de problema, es más, es necesaria para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Sin embargo, algunas cepas por intercambio de material genético, adquieren la capacidad de causar infecciones y provocar diarreas sangrantes. Muchas otras bacterias comparten los mismos hábitats que *E. coli*, pudiendo también ser las causantes de infecciones en las personas (Newman *et al.*, 1996; Schwarz-linek *et al.*, 2016).

Su genoma fue secuenciado por completo en 1997. Dicho genoma mide unas 4'6 Mb que albergan aproximadamente 4.300 genes, y a pesar de que se desconoce la función de algo más del 30% de estos genes, probablemente se trate del organismo vivo más conocido en la actualidad y uno de los usados más frecuentemente para el entendimiento de los procesos biológicos (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, 2015).

El estudio de esta bacteria ha permitido analizar los fundamentos de la biología moderna, como son los procesos de replicación del ADN, de transcripción del ARN, los mecanismos de regulación genética o los procesos de recombinación genética de las bacterias (CSIC, 2015). Además, su capacidad para almacenar el ADN exógeno la han convertido en una fábrica de clonar genes y producir proteínas de cualquier tipo, convirtiéndola en una herramienta más del laboratorio, sobretodo en el campo de la biología molecular.



Figura 1. *Escherichia Coli*.

1.3.2. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es un hongo unicelular, del grupo de los ascomicetos que se encuentra en la naturaleza en la savia y exudados dulces de algunas plantas o sobre sustratos ricos en azúcares (CSIC, 2015). Presenta dos fases biológicas estables: haploide y diploide y se reproduce por gemación (Barnett *et al.*, 1983).

Su genoma fue el primero de los eucariotas en ser secuenciado y consta de unas 12 Mb que codifican alrededor de 6000 genes. Se calcula que aproximadamente un tercio de los mismos cuentan con un homólogo en humanos y se sabe que una gran cantidad corresponden a genes relacionados con enfermedades metabólicas, hereditarias neurodegenerativas o con el cáncer, entre otras, lo que ha permitido el estudio de estas enfermedades gracias a su fácil manipulación genética y barato cultivo (Dujon, 1996). Además, la similitud entre los sistemas celulares fundamentales (división celular, cromosomas, respuesta al estrés y metabolismo primario, entre otros) de la levadura y de los organismos superiores ha consolidado a la levadura como un excelente modelo eucariota, tanto a nivel celular como a nivel molecular (Botstein *et al.*, 1997). A la vez, ha demostrado tener un enorme potencial como herramienta tecnológica para la biología molecular al permitir establecer con relativa facilidad la relación entre la estructura genética y la función de la proteína.

Por otro lado, la investigación biotecnológica también ha mantenido el uso tradicional que se ha hecho de esta levadura, mejorando e innovando los procesos de producción de bebidas alcohólicas y de panificación gracias a su capacidad de producir dióxido de carbono y etanol a partir de los azúcares que encuentra en el medio (proceso de fermentación) (González y Valenzuela, 2000).

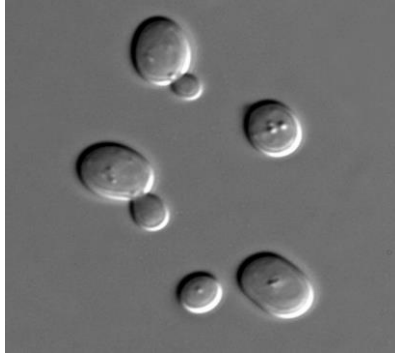


Figura 2. *Saccharomyces cerevisiae*.

1.3.3. *Caenorhabditis elegans*

Este organismo modelo es un nematodo que vive en el suelo y se alimenta de bacterias. Su genoma, secuenciado por completo en 1998 contiene 100 Mb y alberga unos 20000 genes, de los cuales aproximadamente el 40% tienen un homólogo humano (Leung *et al.*, 2008).

Su organización anatómica es muy sencilla y su modelo de desarrollo es bien conocido. Contiene 959 células somáticas, de las cuales 302 son neuronas, lo que convierte a este gusano en un organismo perfecto para modelizar aspectos de numerosas enfermedades neurodegenerativas, la mayoría de ellas asociadas a la edad, como por ejemplo el Alzheimer, el Parkinson o la enfermedad de Huntington (CSIC, 2015; Link, 2006).

Se trata de un organismo eucariota que posee una gran cantidad de características ventajosas que han permitido la ampliación de los horizontes de la biología molecular, empezando con estudios de desarrollo y del sistema nervioso y extendiéndose posteriormente a otros campos de relevancia biomédica como son la investigación de las causas del envejecimiento, la respuesta neuro-inmune o la muerte programada de las células (CSIC, 2015). Algunas de estas características que hacen propicio su estudio como modelo en los campos mencionados son: su pequeño tamaño, su elevada capacidad de reproducción, su facilidad de cultivo y bajo coste de mantenimiento, el hecho de ser el único animal pluricelular que puede conservarse congelado en nitrógeno líquido, su transparencia (sobre todo para ensayos con reporteros fluorescentes (GFP) in vivo) y su capacidad de reducir la actividad genética mediante el uso de ARNi, entre otras (Corsi *et al.*, 2015).

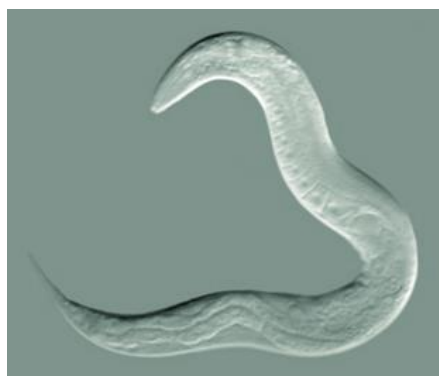


Figura 3. *Caenorhabditis elegans*.

1.3.4. *Drosophila melanogaster*

También conocida como mosca de la fruta o mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster* es un insecto que pertenece al orden de los dípteros y está considerado como uno de los organismos modelo de mayor renombre en la investigación, con una amplísima comunidad de investigadores que lleva trabajando con este vertebrado desde hace más de un siglo. Su genoma se secuenció por completo en el año 2000 donde, para sorpresa de los investigadores, se descubrió que tiene 164Mb en las que se distribuyen unos 14000 genes, una cifra muy inferior a la que esperaban pero que demuestra que con unos pocos genes se puede pasar de un organismo unicelular a “un animal que puede volar sin chocar con las paredes, tiene tejidos, nervios, músculos, recuerdos y otros comportamientos complejos” tal como declaró en su día Gerald Rubin, director del Proyecto de Genoma de *Drosophila* de Berkeley (Estados Unidos). (Adams *et al.* 2000; CORBELLA, 2000; CSIC, 2015;).

D. melanogaster fue introducida en el laboratorio a principios del siglo XX y las principales ventajas que hicieron que comenzara a utilizarse como modelo de estudio fueron su pequeño tamaño, su bajo coste de mantenimiento y su rápido tiempo de generación. Al principio comenzó a usarse para el estudio de teorías evolutivas, pero pronto suscitó interés en otros campos de la biología, destacando su aportación a los fundamentos de la genética como disciplina y como herramienta biológica (Arias, 2008). De hecho, el concepto de que en los cromosomas son transportados los rasgos hereditarios fue desarrollado por primera vez en este organismo, así como muchos otros descubrimientos hitos en la genética, como la definición de las estructuras de los genes o la identificación en la embriogénesis de los genes implicados en todos los aspectos del desarrollo (Pandey and Nichols, 2011).

Sorprendentemente, muchos de los genes identificados en estas investigaciones resultaron estar conservados en otros organismos. Aproximadamente el 75% de los genes de enfermedades humanas que se conocen tienen una contrapartida identificable en el código genético de la mosca de la fruta, y el 50% de las secuencias proteínicas de la mosca tiene análogos en los mamíferos (CSIC, 2015; YOUR GENOME, 2015)

Hoy en día, en los albores del siglo XXI, este organismo continúa a la vanguardia de la biología, donde los genes, las técnicas genéticas y otros descubrimientos son a menudo dilucidados primero en la mosca y luego son trasladados a los sistemas de mamíferos (Arias, 2008).



Figura 4. *Drosophila melanogaster*.

1.3.5. *Mus musculus*

El ratón común, más formalmente conocido como *Mus musculus*, es el primer mamífero vertebrado cuyo genoma fue secuenciado por completo. La hazaña tuvo lugar en 2002, y reveló

la existencia de unas 3000 Mb que albergan aproximadamente 25000 genes, un número muy similar al de los seres humanos (CSIC, 2015).

Los ratones y los humanos comparten la mayoría de sus funciones fisiológicas y patológicas, de hecho, han sido documentadas numerosas similitudes en sistemas como el cardiovascular, el endocrino, el nervioso, el músculo-esquelético e incluso en el sistema inmunológico (Rosenthal and Brown, 2007). En efecto, en este pequeño animal se reproducen gran variedad de enfermedades humanas, además de posibles terapias para el futuro y ensayos de toxicidad.

Inicialmente los estudios con este animal se realizaban generando mutantes naturales mediante cruces endogámicos, pero a partir de la década de los 80, los avances de las técnicas de manipulación genética permitieron la construcción de los primeros ratones genomodificados (knock outs) y de los ratones transgénicos (que incorporan genes no propios de su especie)(CSIC,2015), promoviendo el desarrollo de numerosos modelos de patologías humanas para un estudio más exacto de dichas enfermedades, como por ejemplo la diabetes, el cáncer o enfermedades inmunodeficientes como el SIDA.

La cercanía con el ser humano, tanto a nivel fisiológico como genético (más del 95% de sus genes tiene un homólogo humano), unido al fácil manejo en el laboratorio, el rápido tiempo de generación, su corta vida media y la abundante descendencia que engendra, han convertido a este animal en el organismo modelo por excelencia.



Figura 5. *Mus musculus*.

1.4. El pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo para el estudio de los efectos del envejecimiento en la reproducción

Los peces cebra son animales vertebrados y representan un modelo más cercano al hombre que los modelos invertebrados como podría ser *D. melanogaster*, ya que comparten más características con los humanos a nivel genético, de procesos de desarrollo, anatomía, fisiología o comportamiento. Sin embargo, no son mamíferos y no están tan relacionados a los humanos como lo está el ratón.

A pesar de ello, el pez cebra posee unas características que han hecho que haya sido altamente utilizado como modelo para investigar, entre otras cosas, los mecanismos subyacentes de la senescencia gradual en los seres humanos (De Groef *et al.*, 2015; Donnini *et al.*, 2013; Kishi, 2014). Asimismo, también podría ser adecuado para estudiar el efecto de la edad sobre la reproducción ya que además de dar lugar a abundantes puestas de huevos (unos 200-300 por semana, alcanza la madurez sexual alrededor de los 3 a 4 meses de edad (Westerfield, 2007) y su promedio de vida se encuentra entre los 31 y 45 meses, lo que hace que puedan ser estudiados en un período de tiempo relativamente corto (Herrera and Jagadeeswaran, 2004).

En cuanto a su reproducción, el pez cebra se reproduce mediante fecundación externa, que permite la recopilación sencilla de espermatozoides y óvulos para una fecundación *in vitro* controlada. Además, los huevos son claros y transparentes, lo que posibilita seguir fácilmente su desarrollo bajo el microscopio, tal y como se observa en la Figura 6, de forma que se pueden separar los huevos fecundados de los que no lo están antes de las 24 horas posteriores a la fecundación (Kimmel *et al.*, 1995).

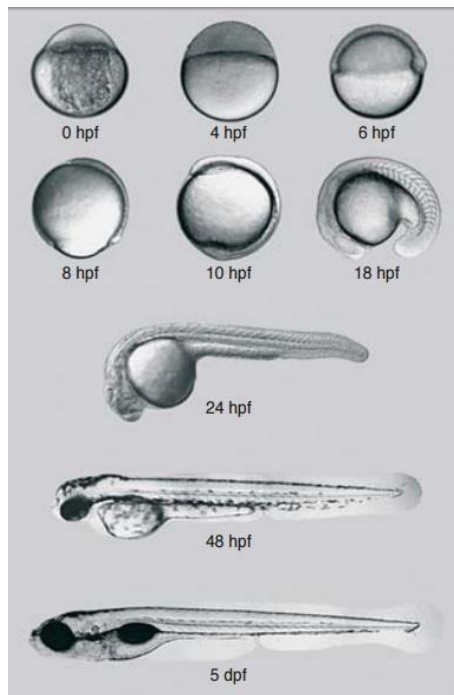


Figura 6. Imágenes del ciclo de vida del pez cebra.

Precisamente, el fácil análisis de la viabilidad de la descendencia ha sido uno de los factores determinantes para elegir este animal como posible modelo apropiado para el estudio que se va a llevar a cabo de los cruzamientos entre especímenes de diferentes edades, en comparación a lo que supondría realizar este trabajo en otros modelos animales en los que el análisis sería más costoso y consumiría mucho más tiempo, o en los seres humanos, donde a parte del tiempo y las implicaciones éticas que conlleva, la principal dificultad sería encontrar participantes para el estudio, dada la tendencia natural que tienen los seres humanos a emparejarse con individuos de edad similar. Estas, y otras dificultades, son las que provocan que la mayoría de la literatura publicada en relación a esta problemática esté basada en datos obtenidos a partir de estudios retrospectivos que incluyen factores difíciles de controlar como, por ejemplo, el hecho de que la recopilación de estos datos esté sujeta a la memoria de los participantes respecto a su estilo de vida o historia reproductiva.

2. OBJETIVOS

Tal como se ha comentado en la introducción, la edad juega un papel de gran importancia a la hora de tener un éxito reproductivo, por ello, en el presente trabajo se tratará de evaluar la influencia de la misma en las capacidades reproductivas utilizando el pez cebra como modelo de estudio. Así, como objetivos principales se encuentran los siguientes:

- Por un lado, obtener una mejor comprensión de los efectos que supone la edad de los progenitores sobre la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. Para lo cual se procederá al análisis de las tasas de fecundación, eclosión, supervivencia y anormalidad de las crías resultantes de cruzamientos entre peces cebra de diferentes edades.
- Por otro, comprobar si es posible extrapolar los resultados obtenidos con el pez cebra a los seres humanos, es decir, determinar si el pez cebra sería un modelo correcto para conseguir la información que se busca, dado que, a priori, las características propias de este animal parecen indicar que lo es. La hipótesis de partida para esta comprobación sería que el rendimiento reproductivo y la calidad de la descendencia sería mayor en los cruzamientos de peces jóvenes en comparación con lo logrado por los peces más maduros.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

Para evaluar los efectos del envejecimiento en la fertilización y el desarrollo embrionario se procedió a la fecundación *in vitro* de 4 grupos de peces de distintas edades: Macho Joven x Hembra Joven (J x J), Macho Maduro x Hembra Madura (M x M), Macho Joven x Hembra Madura (J x M) y Macho Maduro x Hembra Joven (M x J). La edad de los especímenes jóvenes era de 7 meses post-fecundación, mientras que la de los maduros estaba entre 29 y 31 mpf (aproximadamente 2 años y medio). En cada una de estas combinaciones se analizó la tasa de fecundación (TF) a las 3-4 horas post-fecundación, en la etapa MBT (mid blastula transition), la tasa de eclosión (TE) a las 72 hpf y las tasas de supervivencia (TS) y la de anormalidad (TA), ambas a los 5 días post-fecundación.

3.2. Mantenimiento del pez cebra

La colonia de peces cebra fue criada en el laboratorio siguiendo el protocolo descrito en Westerfield (2007). Brevemente, los sujetos de estudio se mantuvieron en tanques de 20 L a 28'5°C, en una proporción de 3:2 (hembras:machos). Se alimentaron dos veces al día con comida granular suplementada con yema de huevo de gallina y carne de camarón ambas recién descongeladas (Francisco-Simão *et al.*, 2010) y el ciclo de luz se reguló en 14h de luz / 10 h de oscuridad (Brand *et al.*, 2002; Matthews *et al.*, 2002).

Todos los acuarios fueron equipados con un sistema de recirculación de agua con filtros de carbón activo². Además, el agua del grifo se dechloró y descalcificó antes de su uso (convirtiéndose en agua de sistema de aquí en adelante). Por último, y de nuevo según las recomendaciones de Westerfield (2007), una cuarta parte del total de agua del acuario se eliminó semanalmente y se reemplazó por agua limpia para evitar concentraciones altas de amonio³. Es preciso señalar que todas las condiciones ambientales fueron idénticas en todos los acuarios.

Los procedimientos experimentales y de cuidado de los animales en el presente trabajo cumplen plenamente con las normas para el uso de animales establecidas por el Comité Ético de la Universidad Politécnica de Valencia, las directivas de la Comunidad Europea (86/609/EEC y 2003/65/EC) y la legislación española (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005).

3.3. Obtención de gametos inactivos

Los peces se reproducen por fecundación externa, cuando aparece el primer estímulo luminoso tras el ciclo de oscuridad, lo que se conoce como "hora del amanecer", se desencadena la liberación de los gametos al exterior. Primero los peces descienden al fondo de la pecera y posteriormente el macho comienza a perseguir a la hembra en círculos iniciando el ritual de cortejo. Esta persecución recibe el nombre de "bola" y segundos después se produce la expulsión de ovocitos por parte de la hembra y de semen por parte del macho, que se activan al

² Se trata de un material poroso que sirve para purificar el agua.

³ Las concentraciones altas de amonio causan daño en las membranas de las branquias e inhiben el sistema inmunológico desencadenando enfermedades que pueden causar la muerte de los peces. Aparece a través de la orina y las heces, también como consecuencia de la respiración de los peces.

entrar en contacto con el agua de sistema produciéndose la fecundación de los ovocitos al encontrarse con los espermatozoides.

Dado que se pretendía realizar una fecundación *in vitro*, era necesario evitar la liberación de los gametos, puesto que la activación y la fecundación de los mismos se realizaría posteriormente en el laboratorio. Es por ello que la extracción de los gametos se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Westerfield (2007), según el cual se recogieron los peces evaluando aquellos que mostraron conducta sexual, teniendo la precaución de capturarlos con el salobre mientras estaban en “bola”. Previamente a la extracción, se sedaron los peces introduciéndolos en una solución de aceite de clavo (100 μ L de aceite en 1L de agua de sistema) durante unos minutos, luego se procedió a la extracción.

3.3.1. Recolección de huevos

Las hembras se colocaron en una hoja de papel secante y se inmovilizaron con ayuda de la esponja que aparece en la Figura 7. A continuación, se ejerció una presión suave pero firme en el vientre para provocar la salida de los ovocitos al exterior y éstos se recogieron con la ayuda de una cuchara de plástico, teniendo especial cuidado de mantener los ovocitos fuera del alcance de las húmedas escamas de la hembra, ya que el contacto podría provocar la activación de los mismos antes de lo deseado.

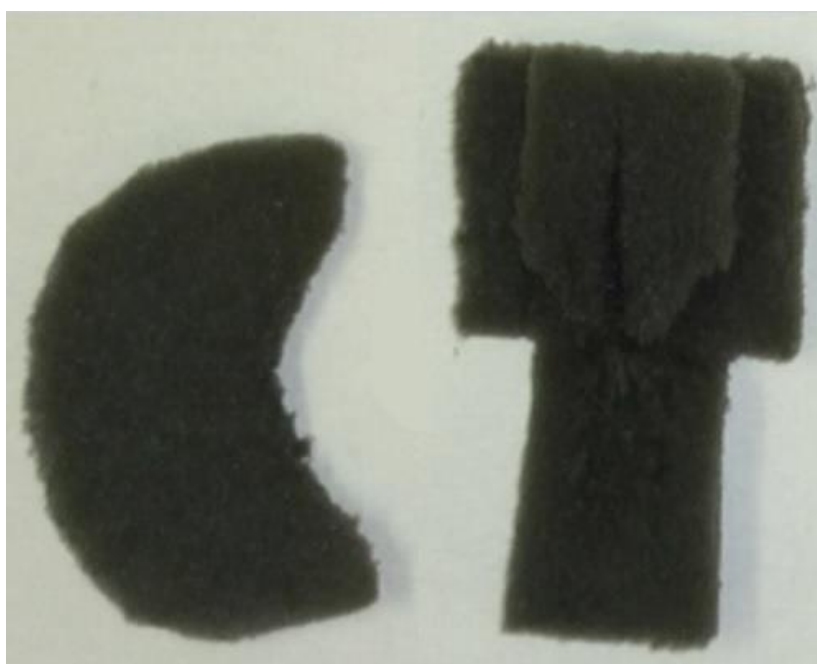


Figura 7. Esponjas para la inmovilización de los peces durante la recolección. A la izquierda, esponja curvada para las hembras. A la derecha, esponja con una hendidura en el medio para los machos.

Solamente los huevos de buena calidad (color amarillo y translúcidos) fueron seleccionados. Se depositaron en una placa Petri de 35 mm con medio F1⁴ y se mantuvieron a 8°C hasta su uso para la fecundación (1h 30 min como tiempo máximo).

⁴Medio F1: solución salina tamponada que simula la osmolaridad del interior de la hembra, está suplementada con 1,5% (v / v) de BSA (albúmina de suero bovino) y 0,1 g de NaCl / 100 cc de medio Hanks; ph: 7,4; osmolaridad: 310 a 320 mOsm.

3.3.2. Recolección de semen.

Para los machos, el procedimiento de recogida de la pecera y sedación fue idéntico, pero a la hora de extraer el semen lo que se hizo fue colocarlos boca arriba en la hendidura de la esponja que aparece en la Figura 7. Primero, el poro genital se secó suavemente para evitar la activación de los espermatozoides y posteriormente, con una mano se presionaron, de forma suave pero firme, los laterales de los peces con unas pinzas para inducir la salida del semen mientras que con la otra mano se sostenía un microcapilar (1 x 90 mm, Narishige Scientific Instrument Lab) pegado al poro genital para recoger el semen expulsado. El esperma de 2-3 machos de la misma edad (unos 0.5-2 μL /macho) se diluyó en 100 μl de F1 en una placa de Petri de 35 mm para mantenerlo inactivo y a continuación la dilución se almacenó como los ovocitos, a 8°C hasta su uso.

Tras la extracción de gametos, los peces se devolvieron a los tanques, no sin antes introducirlos en agua libre de aceite de clavo para que pudieran recuperar la completa movilidad después de haber sido anestesiados.

3.4. Fecundación *in vitro*

En el pez cebra, los ovocitos pierden rápidamente su capacidad de ser fecundados y, además, el tiempo entre la activación completa y la fecundación *in vivo* son extremadamente cortos (segundos) por lo que se recomienda que no pasen más de 90 min tras la extracción de los gametos para llevar a cabo la fecundación *in vitro* (Nusslein-Volhard y Dahm 2002).

Lo primero que se hizo fue sacar los huevos y el semen inactivos de la nevera. A continuación, se depositaron unas gotas de agua de sistema en las placas que contenían el esperma para ir activando los espermatozoides mientras que, con ayuda de una punta de vidrio y un chupete, se absorbió el F1 de las placas que contenían los huevos, con la precaución de colocar la punta de vidrio de forma perpendicular a la placa para prevenir la absorción accidental de los mismos.

Posteriormente, y formando 4 grupos en función de la edad de los peces de los cuales se habían extraído los gametos (Macho Joven x Hembra Joven (J x J), Macho Maduro x Hembra Madura (M x M), Macho Joven x Hembra Madura (J x M) y Macho Maduro x Hembra Joven (M x J)), se fue añadiendo la dilución de espermatozoides a la placa con los huevos libres de F1.

Finalmente, para activar los gametos por completo, se añadió a la mezcla huevos-esperma de los diferentes grupos de edad 1 mL⁵ de agua de sistema a temperatura ambiente. Pasados 2-3 min, el tiempo requerido para que se produzca la fecundación en el pez cebra, las placas se llenaron completamente con agua de sistema y se introdujeron en la incubadora a una temperatura de 28,5°C.

3.5. Procedimiento de recogida de datos para las distintas tasas a evaluar

Las placas se dejaron incubar durante 3-4 horas, tras las cuales se evaluó la tasa de fecundación que había habido, considerando que habían fecundado aquellos cigotos que,

⁵ Inicialmente se añade sólo 1 mL para aumentar la probabilidad de encuentro entre los gametos.

pasado este tiempo, se encontraban en estado de MBT ⁶ (Figura 8). Los embriones fecundados se trasladaron a placas Petri de 100 mm de diámetro colocando un máximo de 25 embriones por placa. Después, las placas se volvieron a colocar en la incubadora a 28,5°C.

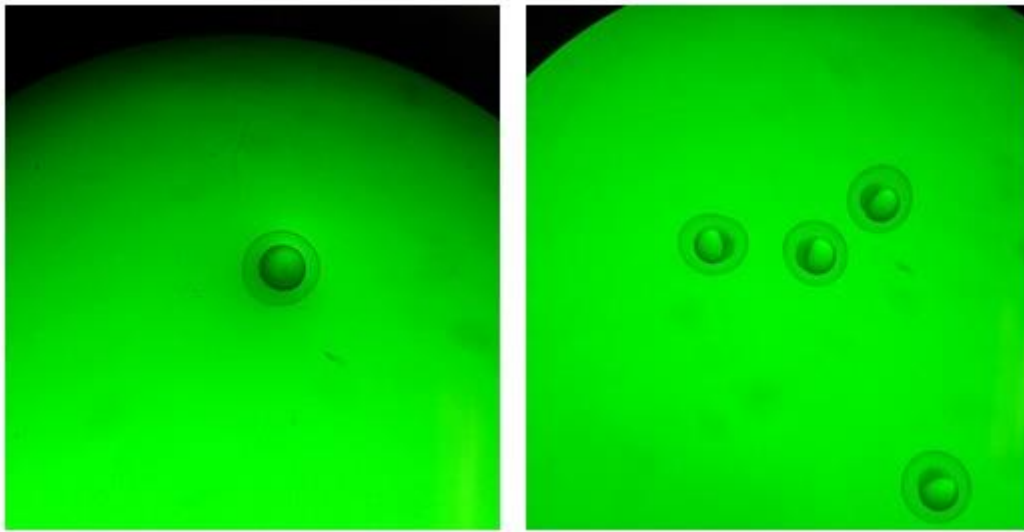


Figura 8. No fecundados vs Fecundados (MBT).

Los embriones no se sacaron de la incubadora de nuevo hasta pasadas 72 hpf, momento en el que se evaluó el número de embriones que había eclosionado, ya que lo normal es que en este punto la gran mayoría hubieran eclosionado si hubieran seguido un desarrollo normal.

La última valoración se llevó a cabo a los 5 dpf, cuando se procedió a evaluar cuántas larvas seguían vivas y de ellas, cuántas poseían alguna anomalía, considerándose anormales aquellas con columna vertebral irregular, curly o pericarditis (Figura 9).

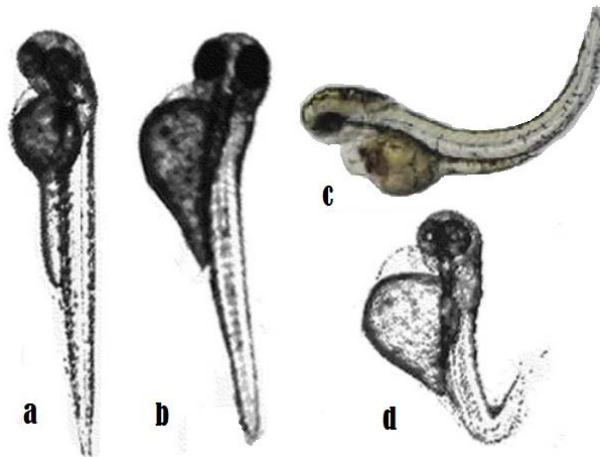


Figura 9. Anormalidades morfológicas del pez cebra evaluadas. a) control b) curvatura espinal c) curvatura de la cola (curly) d) edema en el saco pericárdico.

⁶A partir de este momento la división celular se convierte en asíncrona, el embrión comienza la transcripción de su propio ADN y comienza la expresión diferencial de los genes paternos.

3.6. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado (Statgraphics Plus 5.1). Se utilizó la corrección de Yates para continuidad cuando estaba implicado un solo grado de libertad y se consideró que los valores eran estadísticamente diferentes si $P < 0,05$. La versión extendida del análisis se encuentra en los Anexos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Tasa de fecundación

La tasa de fecundación se calculó dividiendo el total de ovocitos fecundados entre aquellos que fueron recogidos inicialmente, para cada uno de los grupos de estudio.

Tabla 1. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de fecundación de los grupos de la misma edad.

Fecha	Ov. Fec.	Ov. Rec.	Ov. Fec.	Ov. Rec.
GRUPO	Joven x Joven		Maduro x Madura	
13/01/15	-	-	0	35
14/01/15	0	46	73	156
15/01/15	121	252	0	147
16/01/15	-	-	0	197
19/01/15	19	181	276	385
20/01/15	-	-	53	81
30/01/15	0	90	-	-
16/02/15	96	239	-	-
17/02/15	18	160	-	-
26/02/15	255	369	-	-
TOTAL	509	1337	402	1001

Tabla 2. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de fecundación de los grupos de distintas edades.

Fecha	Ov. Fec.	Ov. Rec.	Ov. Fec.	Ov. Rec.
GRUPO	Joven x Madura		Maduro x Joven	
15/01/15	91	203	-	-
20/01/15	35	181	-	-
23/01/15	-	-	108	445
27/01/15	3	147	114	495
30/01/15	4	95	62	122
02/02/15	23	74	59	90
16/02/15	170	352	-	-
17/02/15	-	-	20	151

19/02/15	-	-	3	7
09/03/15	-	-	11	202
10/03/15	35	71	-	-
TOTAL	361	1123	377	1512

Tabla 3. Tasas de fecundación para cada grupo de edad.

GRUPO	J X J	M X M	J X M	M X J
<i>FECUNDADOS</i> <i>RECOGIDOS</i>	$\frac{509}{1337}$	$\frac{402}{1001}$	$\frac{361}{1123}$	$\frac{377}{1512}$
TASA DE FECUNDACIÓN	38'07 % ^{b7}	40'16 % ^a	32'14 % ^c	24'93 % ^d

Con los datos obtenidos lo primero que cabe destacar es que las tasas de fecundación fueron bastante bajas en comparación con los resultados obtenidos en otros estudios realizados por el grupo ACUMA (Martínez-Sales *et al.*, 2015), pudiendo ser el agua utilizada (filtro de resinas de intercambio) el motivo de este descenso. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos habiéndose obtenido el mejor resultado en el grupo M x M (40,16%) seguido por el grupo J x J (38,07%). El peor resultado se obtuvo en el grupo M x J (25%) (Véase la tabla 3).

A la vista de estos resultados y puesto que las mejores tasas de fecundación se obtuvieron en los grupos de la misma edad, cabría proponer la existencia de una interacción negativa en los grupos en los que macho y hembra eran de distintas edades.

4.2. Tasa de eclosión a las 72 hpf

La tasa de eclosión obtenida a las 72 hpf se calculó dividiendo el total de larvas que habían eclosionado entre el total de ovocitos que fueron fecundados inicialmente, para cada uno de los grupos de estudio.

Tabla 4. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de eclosión (72 hpf) de los grupos de la misma edad.

Fecha	Embr. Ecl.	Fec. In.	Embr. Ecl.	Fec. In.
GRUPO	Joven x Joven		Maduro x Madura	
13/01/15	-	-	0	0
14/01/15	0	0	61	73
15/01/15	*	*	0	0

⁷ Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los distintos grupos de estudio.

16/01/15	-	-	0	0
19/01/15	*	*	237	276
20/01/15	-	-	40	53
30/01/15	0	0	-	-
16/02/15	53	96	-	-
17/02/15	12	18	-	-
26/02/15	134	255	-	-
TOTAL	199	369	338	402

Tabla 5. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de eclosión (72 hpf) de los grupos de distintas edades.

Fecha	Embr. Ecl.	Fec. In.	Embr. Ecl.	Fec. In.
GRUPO	Joven x Madura		Maduro x Joven	
15/01/15	*	*	-	-
20/01/15	32	35	-	-
23/01/15	-	-	103	108
27/01/15	3	3	75	114
30/01/15	0	4	36	62
02/02/15	23	23	55	59
16/02/15	129	170	-	-
17/02/15	-	-	11	20
19/02/15	-	-	3	3
09/03/15	-	-	7	11
10/03/15	35	35	-	-
TOTAL	222	270	290	377

Tabla 6. Tasas de eclosión a las 72 hpf para cada grupo de edad.

GRUPO	J X J	M X M	J X M	M X J
<i>ECLOSIONADOS FECUNDADOS IN.</i>	$\frac{199}{369}$	$\frac{338}{402}$	$\frac{222}{270}$	$\frac{290}{377}$
TASA DE ECLOSIÓN	53'92 % ^b	84'08 % ^a	82'22 % ^a	76'92 % ^{ab}

Estadísticamente se observaron diferencias significativas en todos los grupos, excepto entre los grupos M x M y J x M, que obtuvieron las tasas más altas (84,08% -82,22%, respectivamente). El peor resultado se obtuvo en el grupo J x J (54%) (Véase la tabla 6). De acuerdo con estos resultados, la tasa de eclosión a las 72 hpf parece verse favorecida en aquellos grupos en los que participaron peces maduros, siendo aún mejores si los peces maduros eran las hembras.

4.3. Tasa de supervivencia a los 5 dpf

La tasa de larvas que habían sobrevivido 5 días después de haber sido fecundadas se calculó dividiendo el total de larvas vivas (considerándose como tal aquellas que se movían, incluso aunque el movimiento fuese leve), entre el total de ovocitos que fueron fecundados inicialmente, para cada uno de los grupos de estudio.

Tabla 7. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de supervivencia (5 dpf) de los grupos de la misma edad.

Fecha	Vivos 5dpf	Fec. In.	Vivos 5dpf	Fec. In.
GRUPO	Joven x Joven		Maduro x Madura	
13/01/15	-	-	0	0
14/01/15	0	0	63	73
15/01/15	112	121	0	0
16/01/15	-	-	0	0
19/01/15	17	19	237	276
20/01/15	-	-	42	53
30/01/15	0	0	-	-
16/02/15	53	96	-	-
17/02/15	12	18	-	-
26/02/15	134	255	-	-
TOTAL	328	509	342	402

Tabla 8. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de supervivencia (5 dpf) de los grupos de distintas edades.

Fecha	Vivos 5dpf	Fec. In.	Vivos 5dpf	Fec. In.
GRUPO	Joven x Madura		Maduro x Joven	
15/01/15	83	91	-	-

20/01/15	33	35	-	-
23/01/15	-	-	105	108
27/01/15	3	3	75	114
30/01/15	0	4	38	62
02/02/15	23	23	55	59
16/02/15	130	170	-	-
17/02/15	-	-	11	20
19/02/15	-	-	3	3
09/03/15	-	-	7	11
10/03/15	35	35	-	-
TOTAL	307	361	294	377

Tabla 9. Tasas de supervivencia (5 dpf) para cada grupo de edad.

GRUPO	J X J	M X M	J X M	M X J
<i>VIVAS</i>	328	342	307	294
<i>FECUNDADOS IN.</i>	509	402	361	377
TASA DE SUPERVIVENCIA	64'44 % ^c	85'07 % ^a	85'04 % ^a	77'98 % ^b

De nuevo se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos, excepto entre los grupos M x M y J x M, donde se volvieron a obtener las tasas más elevadas (85,07% - 85,04%, respectivamente). La peor tasa de supervivencia se obtuvo en el grupo J x J (64,44%). Una vez más los resultados conseguidos, esta vez a través de los valores de las tasas de supervivencia, parecen sugerir que las hembras de mayor edad confieren algún tipo de ventaja a sus descendientes haciendo que éstos se desarrollen mejor y, por lo tanto, posean las tasas de supervivencia más elevadas (Véase la tabla 9).

4.4. Tasa de anomalía a los 5dpf

La tasa de anomalía de las larvas se calculó dividiendo el total de larvas anormales (considerándose anormales aquellas con columna vertebral irregular, curly o pericarditis), entre el total de ovocitos que fueron fecundados inicialmente, para cada uno de los grupos de estudio.

Tabla 10. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de anomalía (5dpf) de los grupos de la misma edad.

Fecha	Anormales	Fec. In.	Anormales	Fec. In.
GRUPO	Joven x Joven		Maduro x Madura	

13/01/15	-	-	0	0
14/01/15	0	0	8	73
15/01/15	45	121	0	0
16/01/15	-	-	0	0
19/01/15	9	19	110	276
20/01/15	-	-	19	53
30/01/15	0	0	-	-
16/02/15	16	96	-	-
17/02/15	6	18	-	-
26/02/15	90	255	-	-
TOTAL	166	509	137	402

Tabla 11. Datos recogidos para el cálculo de la tasa de anormalidad (5dpf) de los grupos de distintas edades.

Fecha	Anormales	Fec. In.	Anormales	Fec. In.
GRUPO	Joven x Madura		Maduro x Joven	
15/01/15	52	91	-	-
20/01/15	6	35	-	-
23/01/15	-	-	64	108
27/01/15	1	3	47	114
30/01/15	0	4	20	62
02/02/15	3	23	7	59
16/02/15	29	170	-	-
17/02/15	-	-	7	20
19/02/15	-	-	0	3
09/03/15	-	-	6	11
10/03/15	14	35	-	-
TOTAL	105	361	151	377

Tabla 12. Tasas de anormalidad a los 5dpf para cada grupo de edad.

GRUPO	J X J	M X M	J X M	M X J
<i>ANORMALES FECUNDADOS IN.</i>	$\frac{166}{509}$	$\frac{137}{402}$	$\frac{105}{361}$	$\frac{151}{377}$
TASA DE ANORMALIDAD	32'61 % ^b	34'08 % ^{ab}	29'08 % ^b	40'05 % ^a

Cabe destacar que las tasas de anormalidad han sido relativamente altas en comparación con los resultados obtenidos en otros estudios anteriores realizados por el grupo ACUMA (Martínez-Sales et al., 2015), de nuevo se considera que puede haber sido debido al agua. El peor resultado se obtuvo en el grupo M x J (40,05%) y el mejor en el grupo J x M (29,08%). De acuerdo con las tasas obtenidas (Véase la tabla 12), no es posible establecer una relación entre estos resultados y la edad de los progenitores (maduro vs. joven).

Las consecuencias del proceso de envejecimiento del pez cebra son similares a las de los mamíferos, ambas especies comparten fenotipos⁸ tales como la curvatura de la columna, la degeneración muscular, la oxidación de biomoléculas por la presencia de radicales libres de oxígeno y la falta de enzimas antioxidativas, y también el incremento de la β -galactosidasa en la senescencia celular (Keller and Murtha, 2004; Kishi, 2014; Kurz *et al.*, 2000). Sin embargo, los efectos directos de la edad en la reproducción aún no se comprenden por completo en ambos grupos de especies (Gardiner, 2014; Kishi, 2014).

Algunos autores han estudiado los efectos del envejecimiento en la capacidad reproductiva de los machos de pez cebra (Kanuga et al, 2011; Gardiner, 2014), aunque obteniendo resultados contradictorios. Por otro lado, acerca de la figura de la hembra hay poca información disponible, y del mismo modo ocurre con la interacción entre machos y hembras de diferentes edades. Por ello, en el presente trabajo se decidió estudiar esta interacción, tratando así de esclarecer el efecto que tiene la longevidad de los peces sobre la reproducción y más concretamente sobre el desarrollo embrionario.

Empezando por los resultados obtenidos en la tasa de fecundidad, se observó que los especímenes de la misma edad (joven-joven y maduro-madura) lograron una mejor eficacia reproductiva. A la vista de estos resultados, cabría proponer la existencia de una interacción negativa en los grupos en los que macho y hembra son de distintas edades, provocando así unas tasas de fecundación peores. Sin embargo, no se encontró ninguna posible explicación en la literatura revisada para justificar esta potencial interacción negativa de los gametos en base a la edad de los progenitores, a pesar de la existencia de varios trabajos cuyo objeto de estudio fue comportamiento sexual y la interacción de gametos en teleósteos⁹ (Hart, 1990; Pyron, 2003; Bernois et al, 2011).

⁸ La acumulación de lipofuscina es también un rasgo característico del envejecimiento que en el caso del pez cebra no ha sido observado. Una posible explicación de esta ausencia ha sido descrita por Kishi et al. 2003: la lipofuscina es un pigmento que se acumula en células postmitóticas y no en células que proliferan, ya que éstas últimas consiguen diluirlo con éxito durante la división celular. “Dado que el pez cebra continúa creciendo durante toda su vida, es posible que sus células somáticas se dividan continuamente, independientemente de su maduración y envejecimiento, lo que impide la acumulación de lipofuscina intracelular”.

⁹ Teleósteo: “Dicho de un pez: Que tiene el esqueleto completamente osificado. Usado también como sustantivo masculino, en plural como taxón.” (RAE, 2001).

En cuanto a las tasas de supervivencia y de eclosión, éstas revelaron mejores resultados en los especímenes maduros que en los jóvenes, siendo aún mejores aquellos en los que había participado una hembra madura. Este resultado podría estar justificado por el crecimiento parabólico que experimentan los peces (Figura 11), de forma que como el requerimiento energético necesario en etapas juveniles para el desarrollo propio es mayor que en las etapas posteriores, las hembras maduras pueden disponer más recursos energéticos para la configuración de los ovocitos, lo cual les puede proporcionar algún tipo de ventaja respecto a los concebidos por las hembras de menor edad.

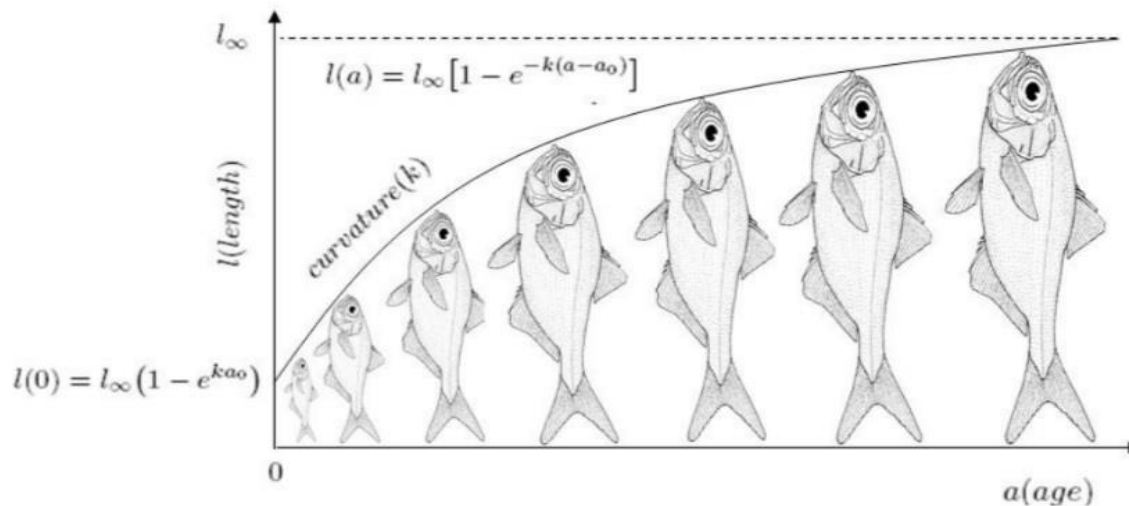


Figura 10. Curva de crecimiento parabólico.

Tratando de encontrar una razón para explicar esta ventaja, se encontró un estudio llevado a cabo en otra especie de peces (*Sebastes melanops*) que evidenciaba algunos efectos de los rasgos maternos sobre el rendimiento de las larvas. Uno de estos rasgos era la edad de las hembras, que al parecer favorecía el crecimiento y la supervivencia de las larvas al proporcionarles, durante el estadio de huevo, con mayores glóbulos de aceite (compuestos principalmente por triglicéridos ricos en energía) (Berkeley et al. 2004). Los huevos de peces no son móviles y, por lo tanto, los embriones que están desarrollándose no pueden aprovechar de forma activa el entorno que les rodea, por consiguiente, parece lógico pensar que cuanto mayor es el glóbulo de aceite, mejor será el pronóstico de la larva resultante (Heming and Buddington, 1988).

Por último, tal y como se ha referido anteriormente respecto a la tasa de anormalidad, no se ha logrado relacionar los datos obtenidos con la edad de los progenitores (maduro vs. joven).

5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados globales obtenidos, es posible concluir que las hembras maduras alcanzaron los mejores resultados a través del desarrollo (tasas de supervivencia y de larvas de la eclosión) y la reproducción (tasa de fecundación), lo que significa que no disminuye la calidad de los ovocitos sino que aumenta con la madurez en las hembras de pez cebra, pudiendo ser debido al crecimiento parabólico de reptiles y peces que difiere del crecimiento sigmoide que experimentan los mamíferos (Balinsky, 1960).

Estos resultados contrastan con los de los seres humanos, donde la edad avanzada en las mujeres es un factor limitante de la viabilidad de la descendencia (Aitken, 2014). En los seres humanos, el declive reproductivo es diferente en machos y hembras. En cuanto a la hembra, la fertilidad desciende precipitadamente entre las edades de 31 y 42 años (Fertilización Humana y Embriología, 2010) y finaliza con la pérdida de la menstruación, mientras que en la masculina no hay pérdida abrupta de la fertilidad, aunque la calidad de sus gametos se deteriora (Das et al., 2013). Ciertamente, el proceso de maduración y envejecimiento está más limitado en las hembras humanas que en los peces, o incluso que en otros mamíferos, donde las hembras maduras son capaces de reproducirse en edades avanzadas (Jones et al., 2014).

Por lo tanto, y en resumen, a pesar de que el pez cebra puede ser utilizado ampliamente en la búsqueda de los orígenes evolutivos y de desarrollo del fenómeno del envejecimiento común en los vertebrados (Kishi, 2014), teniendo en cuenta los resultados dispares obtenidos en el trabajo actual y por otros autores, el pez cebra no parece ser un modelo adecuado para estudiar el efecto del envejecimiento sobre la reproducción para poder extraer conclusiones aplicables a los seres humanos, especialmente en las hembras.

Más estudios son necesarios en esta temática en relación al pez cebra. Al respecto, una posible línea de investigación que debería seguir a la ya comenzada sería un estudio más exhaustivo de la viabilidad de las crías, puesto que en el presente trabajo debido al tiempo se valoraron sólo parámetros tras 5 días post fecundación, pero sería muy interesante por ejemplo haber podido estudiar las capacidades reproductivas de esta generación, así como de una segunda generación de peces.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A., EVANS, C. A., GOCAYNE, J. D., AMANATIDES, P. G., ... and GEORGE, R. A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.
- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2014. Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589. *Fertil Steril*, 101(3), 633-634.
- ARIAS, A. M. (2008). *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century. *Drosophila: Methods and Protocols*, 1-25.
- BAILEY, M.J. (2006) More power to the pill: the impact of contraceptive freedom on women's life cycle labor supply. *Quarterly Journals of Economics*; 121:289–320.
- BARNETT, J. A., PAYNE, R. W. and YARROW, D. (1983). *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen. *Yeasts: Characteristics and Identification*, 467.
- BOTSTEIN, D., CHERVITZ, S. A. and CHERRY, J. M. (1997). Yeast as a model organism. *Science (New York, NY)*, 277(5330), 1259.
- BRAND, M.; GRANATO, M. and NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (2002). Keeping and raising zebrafish. *Zebrafish*, 261, 7-37.
- CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC). Delegación de Cataluña. Seres modélicos entre la naturaleza y el laboratorio. Visto el 5 y 6 de marzo de 2016. <http://seresmodelicos.csic.es/sobre-els-models.html>
- CORBELLA J. (2000), Los científicos descifran el genoma de la mosca drosófila, especie estrella de la biología. Sección Ciencia Periódico *LA VANGUARDIA*, viernes 24 de marzo, pág 30.
- CORSI, A. K., WIGHTMAN, B., and CHALFIE, M. (2015). A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387-407.
- DALY, I. and BEWLEY, S. (2013). Reproductive ageing and conflicting clocks: King Midas' touch. *Reproductive biomedicine online*, 27(6), 722-732.
- de España, Confederación de Sociedades Científicas, Alberch, J.; Fernández, N.; Guillen, J.; Lerma, J.; Llamas, M. A.; ... y Zapatero, J. (2015). DOCUMENTO COSCE SOBRE EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA. *Cuadernos de Bioética*, 26(2ª), 327.
- DE GROEF, L.; DEKEYSTER, E. and MOONS, L. (2015). The zebrafish as a gerontology model in nervous system aging, disease, and repair. *Ageing research reviews*, 24, 358-368.
- DONNINI, S.; GIACHETTI, A. and ZICHE, M. (2013). Assessing vascular senescence in zebrafish. *Cell Senescence: Methods and Protocols*, 517-531.
- DUJON, B. (1996). The yeast genome project: what did we learn?. *Trends in Genetics*, 12(7),

263-270.

- ESKENAZI, B.; WYROBEK, A. J.; SLOTER, E.; KIDD, S. A.; MOORE, L.; YOUNG, S. and MOORE, D. (2003). The association of age and semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 18(2), 447-454.
- FOGELGREN, B., LIN, S. Y., ZUO, X., JAFFE, K. M., PARK, K. M., REICHERT, R. J., ... and LIPSCHUTZ, J. H. (2011). The exocyst protein Sec10 interacts with Polycystin-2 and knockdown causes PKD-phenotypes. *PLoS Genetics*, 7(4), e1001361.
- FORD, J. H. (2013). Reduced Quality and Accelerated Follicle Loss with Female Reproductive Aging: Does Decline in Theca Dehydroepiandrosterone (DHEA) Underlie the Problem? (Doctoral dissertation, BioMed Central).
- FRANCISCO-SIMÃO, M.; CARDONA-COSTA, J.; PÉREZ CAMPS, M. and GARCÍA-XIMÉNEZ, F. (2010). Ultraviolet Radiation Dose to be Applied in Recipient Zebrafish Embryos for Germ-line Chimaerism is Strain Dependent. *Reproduction in domestic animals*, 45(6), 1098-1103.
- GARDINER, T. C. (2014). Effects of Male Age on Reproductive Success and Offspring Fitness in Zebrafish (*Danio rerio*) (Doctoral dissertation, University of Otago).
- GEMS, D. (2014). Evolution of sexually dimorphic longevity in humans. *Aging (Albany NY)*, 6(2), 84.
- GOLDIN, C. and KATZ, L.F. (2002) The power of the pill: oral contraceptives and women's career and marriage decisions. *Journal of Political Economy*; 110:730–770.
- GONZÁLEZ, A. and VALENZUELA, L. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* en *Microbios en línea*. Disponible en Internet: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/> Visto el 6 de marzo 2016.
- HELMS-ERIKSON, H. (2001). Marital quality ten years after the transition to parenthood: Implications of the timing of parenthood and the division of housework. *Journal of Marriage and Family*, 63(4), 1099-1110.
- HEMING, T. A. and BUDDINGTON, R. K. (1988). Yolk absorption in embryonic and larval fishes. *Fish physiology*, 11(Part A), 407-446.
- HERNÁNDEZ, S. (2006). El modelo animal en investigaciones biomédicas. *Biomedicina*, 2(3), 252-256.
- HERRERA, M. and JAGADEESWARAN, P. (2004). Annual fish as a genetic model for aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 59(2), B101-B107.

- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, 2014. Edad Media Nacional a la Maternidad por orden del nacimiento según nacionalidad (española/extranjera) de la madre. Visto el 20 de febrero de 2016.
<http://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=1579>
- KIDD, S. A.; ESKENAZI, B. and WYROBEK, A. J. (2001). Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertility and sterility*, 75(2), 237-248.
- KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B. and SCHILLING, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310.
- KISHI S. (2014). Using zebrafish models to explore genetic and epigenetic impacts on evolutionary developmental origins of aging. *Translational Research* 163(2): 123-135.
- KURZ, D. J., DECARY, S., HONG, Y. and ERUSALIMSKY, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*, 113(20), 3613-3622.
- LAMPIC, C.; SVANBERG, A. S.; KARLSTRÖM, P. and TYDÉN, T. (2006). Fertility awareness, intentions concerning childbearing, and attitudes towards parenthood among female and male academics. *Human Reproduction*, 21(2), 558-564.
- LERIDON, H. (2006) Demographic effects of the introduction of steroid contraception in developed countries. *Human Reproduction Update*; 12:603–616.
- LEUNG, M. C., WILLIAMS, P. L., BENEDETTO, A., AU, C., HELMCKE, K. J., ASCHNER, M. and MEYER, J. N. (2008). *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological sciences*, 106(1), 5-28.
- LINK, C. D. (2006). *Caenorhabditis elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*, 41(10), 1007-1013.
- LÓPEZ MORATALLA, N. y PALACIOS ORTEGA, S. (2011). Retraso de la edad de la procreación, incremento de la infertilidad y aumento del recurso a la reproducción asistida. Consecuencias en la salud de los hijos. *Cuadernos de Bioética*, 22(75), 259-272.
- MARTÍNEZ-SALES, M.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. y ESPINÓS, F. J. (2015). Zebrafish as a possible bioindicator of organic pollutants with effects on reproduction in drinking waters. *Journal of Environmental Sciences*, 33, 254-260.
- MATTHEWS, M.; TREVARROW, B. and MATTHEWS, J. (2002). A virtual tour of the guide for zebrafish users. *Resource*, 31, 34-40.
- MILLS, M.; RINDFUSS, R. R.; MCDONALD, P. and TE VELDE, E. (2011). Why do people postpone parenthood? Reasons and social policy incentives. *Human Reproduction Update*, 17(6), 848-860.

- NEWMAN, E. B., LIN, R. T. and D'ARI, R. (1996). *Escherichia coli* and Salmonella: cellular and molecular biology.
- NUSSLEIN-VOLHARD, C. and DAHM, R. (2002). *Zebrafish*. Oxford University Press.
- PANDEY, U. B. and NICHOLS, C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*, 63(2), 411-436.
- Real Academia Española (2001). Modelo, Teleósteo. En *Diccionario de la lengua española* (avance de la 23a ed.). Recuperado de <http://dle.rae.es/?id=PTk5Wk1> y <http://dle.rae.es/?id=ZNE2TBL>. Visto en 12 de marzo y 7 de mayo de 2016, respectivamente.
- ROJAS-MUÑOZ, A.; MIANA, A. B. y BELMONTE, J. C. I. (2007). El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y ciencia*, (366), 62-69.
- ROSENTHAL, N. and BROWN, S. (2007). The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature cell biology*, 9(9), 993-999.
- SCHWARZ-LINEK, J., ARLT, J., JEPSON, A., DAWSON, A., VISSERS, T., MIROLI, D., ... and POON, W. C. (2016). *Escherichia coli* as a model active colloid: A practical introduction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 137, 2-16.
- SI, J., ZHANG, H., WANG, Z., WU, Z., LU, J., DI, C., ... and WANG, X. (2013). Effects of 12 C 6+ ion radiation and ferulic acid on the zebrafish (*Danio rerio*) embryonic oxidative stress response and gene expression. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 745, 26-33.
- SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FERTILIDAD, 2012. Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI). Consultado el 18 de mayo de 2016. Disponible en https://www.registrosef.com/public/docs/sef2012_IAFIV.pdf
- WALSCHAERTS, M.; BUJAN, L.; ISUS, F.; PARINAUD, J., MIEUSSET, R. and THONNEAU, P. (2012). Cumulative parenthood rates in 1735 couples: impact of male factor infertility. *Human reproduction*, 27(4): 1184-1190.
- WESTERFIELD, M. (2007). *The Zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. Edn 5. University of Oregon Press: Eugene, US.
- WILKIE, J. R. (1981). The trend toward delayed parenthood. *Journal of Marriage and Family*, 583-591.
- YOUR GENOME: Discover more about DNA, genes and genomes, and the implications for our health and society. "Why use the fly in research?" Visto el 13 de marzo de 2016. <http://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-fly-in-research>

7. ANEXOS

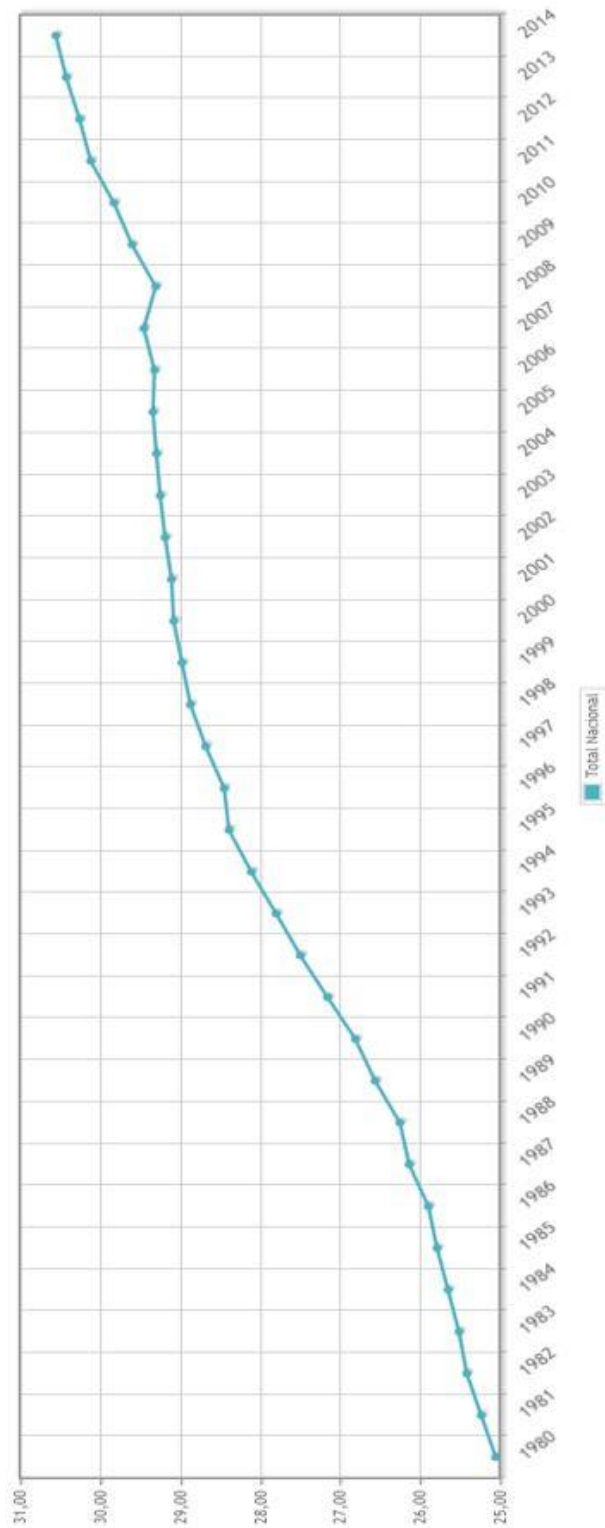


Figura 11. Edad Media Nacional a la Maternidad por orden del nacimiento según nacionalidad (española/extranjera) de la madre.

7.1. Análisis estadístico (versión extendida)

Los resultados se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado (Statgraphics Plus 5.1). Se utilizó la corrección de Yates para continuidad cuando estaba implicado un solo grado de libertad y se consideró que los valores eran estadísticamente diferentes si $P < 0,05$.

Tabla 13. Datos de las tasas de fecundación para análisis estadístico. 1 → fecundados; 0 → no fecundados

	TF	1	0
J x J (A)	$\frac{509}{1137} * 100 = 38.07\%$	509	628
J x V (B)	$\frac{361}{1123} * 100 = 32.14\%$	361	762
V x J (C)	$\frac{377}{1512} * 100 = 24.93\%$	377	1135
V x V (D)	$\frac{402}{1001} * 100 = 40.16\%$	402	599

Primero se comparan todos los grupos y luego se van comparando de dos en dos si el resultado es que son estadísticamente diferentes entre sí.

A – B – C – D → $P < 0.05$ (Diferentes significativamente), a partir de ahora se hablará de Dif. o No dif. dependiendo de si son o no estadísticamente distintos.

A – B → Dif. (0.0003) B – C → Dif. (0.0015) C – D → Dif. (0.0001)

A – C → Dif. (0.0026) B – D → Dif. (0.0028)

A – D → Dif. (0.0350)

A^b **B^c** **C^d** **D^a**
 38.07% 32.14% 24.93% 40.16%

Tabla 14. Datos de las tasas de supervivencia para análisis estadístico. 1 → vivos; 0 → no vivos

	TS	1	0
J x J (A)	$\frac{328}{509} * 100 = 64.44\%$	328	181
J x V (B)	$\frac{307}{361} * 100 = 85.04\%$	307	54
V x J (C)	$\frac{294}{377} * 100 = 77.98\%$	294	83
V x V (D)	$\frac{342}{402} * 100 = 85.07\%$	342	60

A – B – C – D → $P < 0.05$ (Diferentes significativamente)

A – B → Dif. (0.0002) B – C → Dif. (0.0033) C – D → Dif. (0.0032)

A – C → Dif. (0.0028) B – D → No Dif. (0.4130)

A – D → Dif. (0.0001)

A^c B^a C^b D^a
 64.44% 85.04% 77.98% 85.07%

Tabla 15. Datos de las tasas de anormalidad para análisis estadístico. 1 → anormales; 0 → no anormales

	TA	1	0
J x J (A)	$\frac{166}{509} * 100 = 32.61\%$	166	343
J x V (B)	$\frac{105}{361} * 100 = 29.08\%$	105	256
V x J (C)	$\frac{151}{377} * 100 = 40.05\%$	151	226
V x V (D)	$\frac{137}{402} * 100 = 34.08\%$	137	256

A – B – C – D → P < 0.05 (Diferentes significativamente)

A – B → No dif. (0.3010) B – C → Dif. (0.023) C – D → No Dif. (0.1573)

A – C → Dif. (0.0260) B – D → No Dif. (0.1055)

A – D → No Dif. (0.5230)

A^b B^b C^a D^{ab}
 32.61% 29.08% 40.05% 34.08%

Tabla 16. Datos de las tasas de eclosión para análisis estadístico. 1 → eclosionados; 0 → no eclosionados

	TE	1	0
J x J (A)	$\frac{199}{369} * 100 = 53.92\%$	199	170
J x V (B)	$\frac{222}{270} * 100 = 82.22\%$	222	48
V x J (C)	$\frac{290}{377} * 100 = 76.92\%$	290	87
V x V (D)	$\frac{338}{402} * 100 = 84.08\%$	338	64

A – B – C – D → P < 0.05 (Diferentes significativamente)

A – B → Dif. (0.0056) B – C → No dif. (0.1241) C – D → Dif. (0.0149)

A – C → Dif. (0.0048) B – D → No dif. (0.5976)

A – D → Dif. (0.0013)

A ^b	B ^a	C ^{ab}	D ^a
53.92%	82.22%	76.92%	84.05%

7.2. Índice de fuentes de las figuras

Figura 1. Pixabay. <https://pixabay.com/es/koli-bacterias-escherichia-coli-123081/>

Figura 2. Wikipedia. https://es.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae

Figura 3. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Caenorhabditis_elegans

Figura 4. Shutterstock: <http://www.yourgenome.org/stories/fruit-flies-in-the-laboratory>

Figura 5. <http://larasplagas.es/raton-comun.php>

Figura 6. Imagen de Rojas-Muñoz *et al.*, 2007.

Figura 7. Imagen de modificación propia obtenida de Gardiner, 2014.

Figura 8. Elaboración propia.

Figura 9. Imagen de modificación propia obtenida de Fogelgren *et al.* 2011 y Si *et al.*, 2013.

Figura 10. Emaze. <https://www.emaze.com/@ACFRLOZI/FOTO-DE-PORTADA>

Figura 11. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. <http://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=1579>