

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



ESTUDIO EN C. ELEGANS DEL PAPEL DE LOS GENES DE LA VÍA DE APOPTOSIS COMO MEDIADORES DE LONGEVIDAD

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: ANA BARETTINO GREDIAGA

TUTOR/A: DR. RAFAEL SIRERA PÉREZ
COTUTOR/A: DRA. NURIA FLAMES BONILLA

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, MAYO 2014

Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada”

Estudio en *Caenorhabditis elegans* del papel de los genes de la vía de apoptosis como mediadores de longevidad

Autor: Ana Baretino Grediaga

Tutor: Dr. Rafael Sirera Pérez

Cotutor: Dra. Nuria Flames Bonilla

Valencia, Mayo 2015

RESUMEN:

A pesar de la importancia de la muerte celular programada (apoptosis) como proceso clave en regulación y mantenimiento de la homeostásis, y su papel central en numerosas patologías asociadas con la edad como cáncer, no existen resultados previos que asocien directamente niveles altos o bajos de los genes que regulan apoptosis con una mayor longevidad.

Este TFG propone el uso del modelo animal *Caenorhabditis elegans* para estudiar el papel de los genes de la vía de apoptosis en longevidad *in vivo*. Para ello se obtuvieron distintos mutantes de la vía de la apoptosis (incluyendo un mutante de ganancia de función del homólogo de Bcl-xL, *ced-9*) y se realizaron curvas de longevidad para estudiar si estas mutaciones alargaban significativamente la vida del nematodo, además se realizaron estudios de envejecimiento saludable para testar su posible implicación en este proceso. En base a los resultados obtenidos en este estudio se puede sugerir que niveles reducidos de apoptosis intrínseca pueden asociarse a una mayor longevidad y, aún más importante, pueden promover un envejecimiento más saludable.

Palabras clave: Apoptosis, longevidad, envejecimiento, *C. elegans*.

Licencia: Creative Commons, "Reconocimiento no Comercial -Sin Obra Derivada".

Study in *Caenorhabditis elegans* of the role of apoptosis pathway genes as mediators in longevity

Author: Ana Barettino Grediaga

Supervisor: Dr. Rafael Sirera Pérez

Co-supervisor: Dr. Nuria Flames Bonilla

Valencia, May 2015

ABSTRACT:

Despite the importance of programmed cell death (apoptosis) as a key process in the regulation and maintenance of homeostasis, and its central role in numerous age-associated pathologies such as cancer, there are no existing results that directly associate high or low levels of apoptosis regulating genes with an increased longevity. This dissertation proposes the use of the animal model *Caenorhabditis elegans* for the study of the role of the genes of the apoptosis pathway in longevity in vivo. With this aim different mutants of the apoptosis pathway were raised (including a gain-of-function mutant of the Bcl-xL homologue, *ced-9*) and longevity curves were obtained in order to study if these mutations significantly extend the nematode's lifespan. In addition, studies of healthy aging were carried out to test the genes' possible implication in the process. Based on the results of the study it can be suggested that reduced levels of intrinsic apoptosis are associated with a longer lifespan, and importantly, can promote a healthier aging.

Keywords: Apoptosis, longevity, aging, *C. elegans*.

License Type: Creative commons, "Attribution-Noncommercial-No Derivative Works".

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi cotutora Nuria Flames Bonilla, de la Unidad de Neurobiología del Desarrollo del Instituto de Biomedicina de Valencia, por su excelente dirección, apoyo, paciencia y conocimiento de los que he podido disfrutar durante el desarrollo de este proyecto, así como por ser el claro ejemplo de que en ciencia hay que ser atrevido y adentrarse en campos de investigación fuera de tu zona de confort.

Me gustaría agradecerle especialmente haberme dado la oportunidad de unirme a su equipo durante todo este año, donde me he encontrado con compañeros que me han hecho sentir como en casa, cada uno de ellos aportando su granito de arena tanto en lo científico como en lo personal todos y cada uno de los días.

Por otra parte, no me considero apta para expresar con palabras la gratitud que siento hacia Carla Lloret Fernández, que me ha proporcionado inestimable orientación en la investigación. No solo eso, sino que ha sido mi bote salvavidas cuando se me hacía difícil compaginar el proyecto con otras obligaciones debido a las características del mismo, y cuya ayuda y apoyo moral han sido clave en estos meses.

No quisiera olvidarme de agradecer a toda mi familia que me han animado y respaldado durante el desarrollo del trabajo, en especial a mi madre y a mi hermana por su comprensión y confianza.

Me gustaría agradecerle a Maite Castaño el apoyo desde la distancia y a pesar de ello estar siempre a mi lado.

Agradecer también a todos mis amigos el enseñarme tanto y ayudarme en los momentos malos.

También quisiera agradecer a Ramón y Mariche el apoyo y el ser mis padrinos en el ámbito investigador, y a mi tutor Rafa Sirera por aceptar ser mi tutor y proporcionarme consejos.

Por último, quisiera agradecerle a mi padre el haberme dado el mejor ejemplo.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AKT: *Protein kinase B*, proteína quinasa B

Apaf: *Apoptosis protease-activating factor*, factor activador de la proteasa de apoptosis

Bcl: *B-cell lymphoma*, linfoma de células B

Bcl-Xl: *B-cell lymphoma-extra large*, linfoma de las células B extra grande

C+: Control positivo

C-: Control negativo

ced: *CEll Death abnormality*, anormalidad en la muerte celular

C. elegans: *Caenorhabditis elegans*

cep: *C. Elegans P-53-like protein*, proteína de tipo P-53 en *C. elegans*

clk: *CLock (biological timing) abnormality*, anormalidad en relojes biológicos

daf: *abnormal DAuer Formation*, anormal en la formación de dauer

dNTPs: deoxinucleósido trifosfato

E. coli: *Escherichia coli*

egl: *EGg Laying defective*, defecto en la puesta de huevos

F(1-4): Generación filial (1-4)

FOXO: *Forkhead box TF*, factor de transcripción de cabeza de tenedor

GF: *Gain of function*, ganancia de función.

GFP: *Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente.

hus: *human HUS1 related*, relacionada a la HUS1 humana

IGF: *Insulin Growth Factor*, factor de crecimiento insulínico

IIS: insulina/IGF-I

ILPs: *Insulin like peptides*, péptidos de tipo insulina.

Kb: Kilobases

KO: *Knock Out*

L(1-4): Estadío larvario (1-4)

LF: *Loss of Function*, pérdida de función

M: Marcador de pesos moleculares

Mb: Megabases

MUT: Mutante

n: Tamaño de la muestra

N2: Cepa salvaje de referencia N2

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*, centro nacional para información biotecnológica

NIH: *National Institutes of Health*, Instituto nacional de salud

n.s.: No significativo

P0: Generación parental 0

pb: Pares de bases

PDE: *Posterior Deirid Neurons*, neuronas posteriores de la deirid

PI3: *Phosphoinositol 3-kinase*, fosfoinositol 3-quinasa

r.p.m.: revoluciones por minuto

SGK: *Serine/threonine-protein kinases*, serina/treonina protein quinasa

WT: *Wild Type*, tipo salvaje/silvestre

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. <i>C. elegans</i> como organismo modelo.....	2
1.3. Muerte celular programada en <i>C. elegans</i>	5
1.3.1. Control genético: genes que afectan a la apoptosis.....	5
1.3.2. Genes ‘asesinos’, genes de supervivencia y genes ‘guardianes’.....	7
1.3.3. Conservación de la apoptosis entre nematodos y mamíferos	8
1.4. Envejecimiento en <i>C. elegans</i>	9
1.4.1. Control genético de la esperanza de vida, genes <i>daf</i>	10
1.4.2. Genes <i>clk</i>	11
1.5. Relación entre apoptosis y envejecimiento.....	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i>	13
3.2. Cultivo de las cepas de <i>C. elegans</i>	13
3.3. Extracción de ADN genómico.....	14
3.4. Cebadores.....	14
3.5. Creación de las cepas salvaje y mutante de fondo genético común.....	15
3.5.1. Cruce y selección de candidatos.....	15
3.5.2. Genotipado por PCR.....	17
3.5.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	18
3.5.4. Genotipado por secuenciación.....	19
3.6. Ensayo de longevidad	19
3.6.1. Obtención de la población de estudio	19
3.6.2. Análisis de supervivencia.....	20
3.6.3. Eventos de muerte censurados.....	20
3.6.4. Curvas de longevidad.....	20
3.7. Ensayo de envejecimiento saludable (healthspan)	21
3.7.1. Estrés térmico.....	21
3.7.2. Estrés oxidativo.....	21
3.7.3. Locomoción en medio sólido.....	21
3.7.4. Locomoción en medio líquido.....	21
3.8. Técnicas de microscopía.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Obtención de las cepas salvaje y mutante de fondo genético común.....	23
4.2. Curvas de longevidad.....	25
4.2.1. <i>ced-9(n1950)</i> alelo ganancia de función de Bcl-2.....	25
4.2.2. <i>ced-4(n1162)</i> alelo pérdida de función de Apaf-1.....	26
4.2.3. <i>ced-3(n717)</i> alelo de pérdida de función de Caspasa 9.....	27
4.2.4. <i>hus-1(op241)</i> alelo de pérdida de función del “check point” de ciclo celular <i>hus-1</i>	28
4.3. Envejecimiento saludable.....	29
5. DISCUSIÓN	30
6. CONCLUSIONES	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades en las que están involucradas alteraciones en la apoptosis.....	1
Tabla 2. Genes con función en apoptosis en <i>C. elegans</i>	5
Tabla 3. Cepas de <i>C. elegans</i> empleadas en el proyecto.	13
Tabla 4. Componentes del medio de recuperación de nematodos (M9).	14
Tabla 5. Componentes de la solución de lisis para los nematodos.	14
Tabla 6. Cebadores utilizados en el proyecto. D: cebador directo; R: cebador reverso.....	15
Tabla 7. Mezcla Reacción PCR Estándar.....	18
Tabla 8. Mezcla Reacción PCR Estándar con betaína.	18
Tabla 9. Programa PCR Estándar.....	18
Tabla 10. Componentes de la solución de Egg Prep.....	19
Tabla 11. Resumen p-valor de la curva de longevidad WT vs. <i>ced-9(n1950)</i> réplica 1 y réplica 2.....	26
Tabla 12. Datos de supervivencia media y supervivencia máxima de cepa silvestre vs. <i>ced-9(n1950)</i> en las réplicas 1 y 2.....	26
Tabla 13. Datos de supervivencia media y supervivencia máxima de cepa tipo silvestre vs. <i>ced-4(n1164)</i>	27
Tabla 14. Datos de supervivencia media y supervivencia máxima de la cepa tipo silvestre vs. <i>ced-3(n717)</i>	28
Tabla 15. Datos de supervivencia media y supervivencia máxima de cepa tipo silvestre vs. <i>hus-1(op241)</i>	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) Fotografía de <i>C. elegans</i> al microscopio óptico (Leaver M., Hyman lab)	3
Figura 1. (B) Esquema de la anatomía de <i>C. elegans</i> y distribución de los tejidos (Schroeder K.D.).....	3
Figura 2. Esquema del ciclo de desarrollo de <i>C. elegans</i> (WORM ATLAS).....	4
Figura 3. Regulación del proceso de apoptosis en <i>C. elegans</i> (WORMBOOK).....	7
Figura 4. Conservación de la ruta de la apoptosis en <i>C. elegans</i> y mamíferos (Colin et al, 2009).....	8
Figura 5. Historia de la vida de <i>C. elegans</i> . (Gems & Doonan, 2008).....	9
Figura 6. Modelo de la trasducción de señales de eje insulina/IGF-1 (Antebi, 2007).....	10
Figura 7. Diagrama de cruces realizados ejemplificado con el gen <i>ced-3(IV)</i> y <i>cat-1(III)</i>	16
Figura 8. Gel de electroforesis para el genotipado del gen <i>ced-4</i>	23
Figura 9. Gel de electroforesis para el genotipado del gen <i>cep-1</i>	23
Figura 10. Resultado de la secuenciación para el gen <i>ced-4(n1162)</i> en cepa salvaje.....	24
Figura 11. Cromatograma de la secuencia de <i>ced-4(n1162)</i> en cepa salvaje.....	24
Figura 12. Resultado de la secuenciación para el gen <i>ced-4(n1162)</i> en cepa mutante.....	24
Figura 13. Cromatograma de la secuencia de <i>ced-4(n1162)</i> en cepa mutante.....	25
Figura 14. Cromatograma de la secuencia de <i>ced-4(n1162)</i> en la cepa heterocigoto.....	25
Figura 15. Curva de longevidad WT vs. <i>ced-9(n1950)</i> réplica 2.....	26
Figura 16. Curva de longevidad WT vs <i>ced-4(n1162)</i>	27
Figura 17. Curva de longevidad WT vs <i>ced-3(n717)</i>	27
Figura 18. Curva de longevidad WT vs <i>hus-1(op241)</i>	28
Figura 19. Resultado de las pruebas de envejecimiento saludable. (A-D).....	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El ser humano ha pasado mucho tiempo buscando el significado de la vida, pero en las últimas décadas los biólogos han estado aún más absortos en encontrar el significado de la muerte.

La apoptosis (muerte celular programada) es un importante proceso celular conservado en la evolución para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis. La mayoría de las células apoptóticas comparten una serie de características morfológicas y fisiológicas que las distinguen de las muertes por necrosis. Éstas fueron descritas por Kerr *et al.* en 1972, pero su importancia fue desestimada durante muchos años. Estudios genéticos han indicado que estos cambios característicos resultan de la activación de un 'programa de suicidio' endógeno presente de forma latente en todas las células (Chinnaiyan & Dixit, 1996). En la apoptosis, la célula ejecuta un programa genético de muerte donde las señales o estímulos que inician el proceso conducen a la activación de una vía común. Hoy en día, la apoptosis tiene un papel central por su implicación en numerosos procesos biológicos, desde la embriogénesis y la homeostasis normal de un tejido, hasta el desarrollo de muchas enfermedades humanas (indicadas en la Tabla 1). Por este motivo se ha convertido en uno de los campos más activos de la investigación biomédica ya que, no solo está involucrada en la patología, sino que la apoptosis también ofrece herramientas para el posible desarrollo de terapias.

Tabla 1. Enfermedades en las que están involucradas alteraciones en la apoptosis.

Patologías con alteraciones en la apoptosis	
Cáncer	
	Pecho
	Pulmón
	Riñón
	Ovario y útero
	CNS
	Tracto gastro-intestinal
	Cabeza y cuello
	Melanoma
	Linfoma
	Leucemia
Desórdenes neurológicos	
	Alzheimer
	Parkinson
	Huntington
	Esclerosis lateral amiotrófica
	Accidente cerebrovascular
Desordenes cardiovasculares	
	Isquemia
	Insuficiencia cardiaca
Enfermedades infecciosas	
	Bacterianas
	Virales
Enfermedades autoinmunes	
	Lupus eritematoso sistémico
	Síndrome autoinmune linfoproliferativo
	Artritis reumatoide
	Tiroiditis

No obstante, uno de los campos que más ha llamado la atención a los investigadores es el posible papel de la apoptosis en el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con éste, ya que desentrañar los elementos que regulan este complejo proceso biológico es algo que se lleva persiguiendo desde el inicio de los tiempos, algo como la 'receta' de la longevidad.

El envejecimiento es un fenómeno fisiológico esencial e inevitable, caracterizado por una acumulación progresiva de daños moleculares deletéreos en las células y tejidos durante el deterioro posterior a la etapa de madurez, que reduce la habilidad de sobrevivir e incrementa el riesgo de muerte (Finch, 1990). El proceso de envejecimiento tiene muchas facetas. El principal fenotipo durante el envejecimiento resulta de la acumulación estocástica de daño molecular que desencadena en heterogeneidad molecular e insuficiencia funcional (Rattan, 2006). La senescencia celular es el estado en que las células han perdido irreversiblemente su capacidad de proliferación y exhiben deficiencias en cuanto al mantenimiento de la homeostasis, y ésta aumenta en los tejidos conforme van envejeciendo (Muller, 2009).

Se han postulado muchas teorías sobre el envejecimiento, agrupándose en las estocásticas y las de genética del desarrollo (Troen, 2003). La degeneración asociada con la edad puede ser una consecuencia del programa genético o puede ser un proceso entrópico. En última estancia, desórdenes en los procesos básicos celulares ponen en peligro la homeostasis y exponen a las células a la muerte por apoptosis y/o necrosis.

Como se ha mencionado, la apoptosis es también un proceso necesario en el mantenimiento de la homeostasis de tejidos y hay evidencias que sugieren que, al menos parcialmente, la desregulación de la apoptosis está asociada al proceso de envejecimiento y la tumorigénesis en mamíferos (Warner, 1997). No obstante, aún está bajo debate si el envejecimiento suprime o fomenta la apoptosis *in vivo* (Warner, 2006).

Por todo ello, es de crucial interés dilucidar esta posible conexión entre envejecimiento y apoptosis, no sólo por la posible participación de la apoptosis en la longevidad, sino también por el posible papel central de la apoptosis en el desarrollo de enfermedades asociadas con la edad y envejecimiento saludable. Esto último es algo a tener muy en cuenta hoy en día debido al envejecimiento actual de las poblaciones. Los avances en tecnología, salud y nutrición han conseguido aumentar la esperanza de vida en los países desarrollados, dando lugar a su vez a una tasa de natalidad y de mortalidad menor, que en definitiva suponen un aumento en el número de individuos ancianos. De hecho, según la Organización Mundial de la Salud, se prevé que la población global de gente mayor de 85 años aumente en un 351% en los próximos 40 años (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Puesto que el envejecimiento viene acompañado de un incremento en la incidencia de muchas enfermedades, incluyendo cáncer, artritis, obesidad y diabetes, la mayoría de los costes asociados a los últimos años de vida llevaría a una situación insostenible económicamente (Meara *et al.* 2004). Con esto en mente, investigar en incrementar la salud de este rango de la población podría ser una posible solución para el próximo escenario futuro al que tendremos que enfrentarnos (Christensen *et al.*, 2009).

1.2 *C. elegans* como organismo modelo

C. elegans fue racionalmente establecido como organismo modelo en los años sesenta por el biólogo sudafricano Sidney Brenner, este nematodo fue elegido entre una baraja de organismos ya que presentaba ventajas notables frente a modelos animales más complejos (Brenner, 1974). *C. elegans* es un nematodo transparente no parásito que suele habitar en suelos húmedos y templados, pudiendo ser empleado en el laboratorio de manera segura. Es de muy pequeño tamaño, mide entorno a 1mm de longitud, lo que facilita su manipulación y cultivo, pudiendo ser almacenados en grandes cantidades en incubadores en un espacio muy reducido (10.000 gusanos por placa Petri). Además, su alimentación es a base de cepas bacterianas como *Escherichia coli*, haciendo que su cultivo sea sencillo y económico. Por otra

parte, *C. elegans* es de los pocos organismos que pueden ser congelados y descongelados y permanecer viables, permitiendo un almacenaje a largo plazo de los mismos.

Anatómicamente, *C. elegans* es un nematodo segmentado, vermiforme y de simetría bilateral. Cuenta con una cutícula (cubierta exterior dura), cuatro cordones epiteliales y un pseudoceloma (cavidad corporal) lleno de líquido. La anatomía básica de *C. elegans* contiene múltiples tejidos e incluye una boca, faringe, intestino, las gónadas, y la cutícula de colágeno (apreciables en la Figura 1) aunque, como todos los nematodos, no tienen ni sistema circulatorio ni respiratorio. Las cuatro bandas de músculos que se disponen a lo largo del cuerpo están conectadas a un sistema neural que permite a los músculos mover el cuerpo del animal.

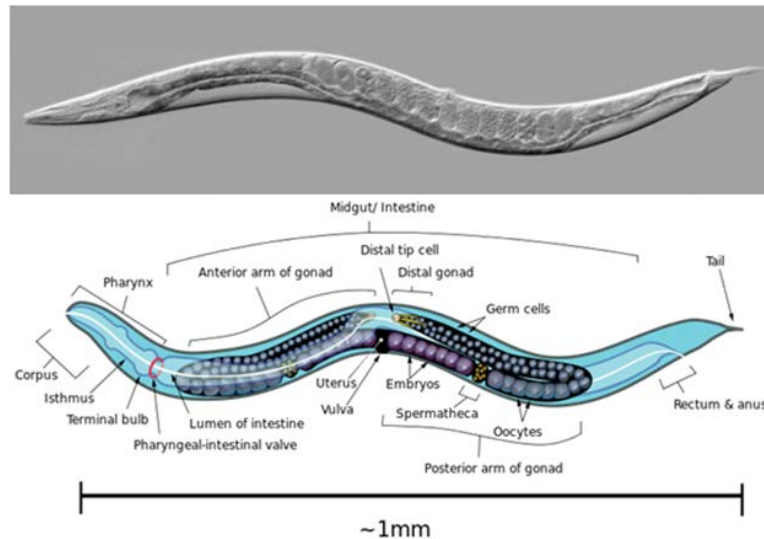


Figura 1. (A) Fotografía de *C. elegans* al microscopio óptico (Leaver M., Hyman lab)
(B) Esquema de la anatomía de *C. elegans* y distribución de los tejidos (Schroeder K.D.)

En cuanto a su genética, *C. elegans* es un organismo relativamente simple. Consta de cinco parejas de cromosomas autosómicos y una pareja de cromosomas sexuales, siendo su tamaño de 100 millones de pares de bases de nucleótidos; veinte veces mayor que el genoma de *E. coli* y sobre 1/30 parte del genoma humano.

C. elegans fue el primer organismo multicelular eucariota cuyo genoma se secuenció completamente en 1998, revelando 97 Mb (Mega bases) de secuencia codificante correspondiente a los 19.000 genes predichos (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Debido a su simplicidad anatómica y genética, se ha convertido en un sistema modelo animal muy estudiado, ya que además posee elevada similitud con el genoma humano (40% de homología), haciéndolo atractivo para el estudio de patologías humanas.

Otra ventaja a destacar es su transparencia, que permite la observación bajo el microscopio óptico del desarrollo y linaje celular in vivo, así como los distintos tejidos. Destacar que gracias a ello, el linaje celular de *C. elegans* está perfectamente establecido, lo que puede aportar una información interesante y emplearse de herramienta como se hizo en este trabajo. Otra aplicación que hace uso de esa característica es la utilización de cepas reporteras que marcan distintos tejidos mediante la expresión de proteínas fluorescentes (como la proteína verde fluorescente, GFP), que en nuestro caso se empleó para poder visualizar la morfología neuronal in vivo.

Además, otro rasgo destacable es que únicamente existen machos y hermafroditas, no hembras. La gran mayoría de la población es hermafrodita, las cuales se autofecundan y dan origen a poblaciones isogénicas formadas por generaciones filiales idénticas a ellas, lo que también es conocido como generaciones clonales. Esto es una gran ventaja, ya que facilita mucho la expansión y mantenimiento de las cepas de *C. elegans*: la colocación de un sólo animal fundador en una placa genera una población entera. Sin embargo, también se podrá

introducir el factor variabilidad mediante su fecundación vía machos. Los machos aparecen de modo espontáneo con una frecuencia inferior al 0,3% y son los responsables de aumentar la diversidad genética. En el laboratorio podemos inducir la presencia de machos y utilizarlos para generar cruces entre cepas.

Por último, se han descrito métodos para generar animales transgénicos y *knock out* (KO). Por todas las características comentadas, en definitiva, *C. elegans* se ha establecido rápidamente como el ‘*E. coli* de los metazoos’.

No sólo es *C. elegans* un organismo modelo muy útil en general, sino que tiene una serie de características que lo hacen especialmente interesante para el estudio de la vía de la **apoptosis**, que está muy conservada en la evolución y fue originariamente descrita en *C. elegans*. Aunque tiene distintos tipos de células, tiene una anatomía invariante. Por ejemplo, el hermafrodita adulto tiene exactamente 959 células somáticas y 131 células que son generadas en desarrollo pero cuyo destino final es la apoptosis. Además, como se ha comentado anteriormente, el cuerpo transparente de *C. elegans* permite observar el linaje de cada célula individualmente y seguirla mientras se divide, diferencia o muere.

De igual manera, hay características añadidas que hacen al nematodo muy útil para el estudio del **envejecimiento**, ya que los factores genéticos y ambientales que afectan a *C. elegans* son similares a aquellos que afectan a humanos, principalmente estrés oxidativo (muy fácil de inducir en el gusano), restricción calórica y sarcopenia (pérdida degenerativa de masa muscular y fuerza al envejecer). Es decir, el proceso de envejecimiento en el nematodo es equiparable al de humanos presentando grandes paralelismos.

El animal también cuenta con un tiempo de generación rápido y una vida media relativamente corta, permitiendo que estudios genéticos de longevidad puedan ser realizados en un periodo de tiempo razonable y con un valor estadístico mayor debido al empleo de grandes poblaciones. Su ciclo de vida es muy corto, de tan sólo 3 días (Figura 2). La esperanza media de vida es de 2 a 3 semanas bajo condiciones adecuadas, lo que es de vital importancia para justificar el empleo de este organismo modelo en el proyecto (mucho más corto si se compara a la esperanza de vida de un ratón que es de dos años o más). Además, un nematodo puede llegar a poner entre 200 y 300 huevos produciendo una descendencia muy numerosa. En comparación con otros organismos modelo, como el ratón, el ciclo de vida corto y la numerosa descendencia de *C. elegans* reduce el ciclo experimental y facilita el estudio biológico, además de que no se tienen efectos negativos en la longevidad causados por consanguinidad.

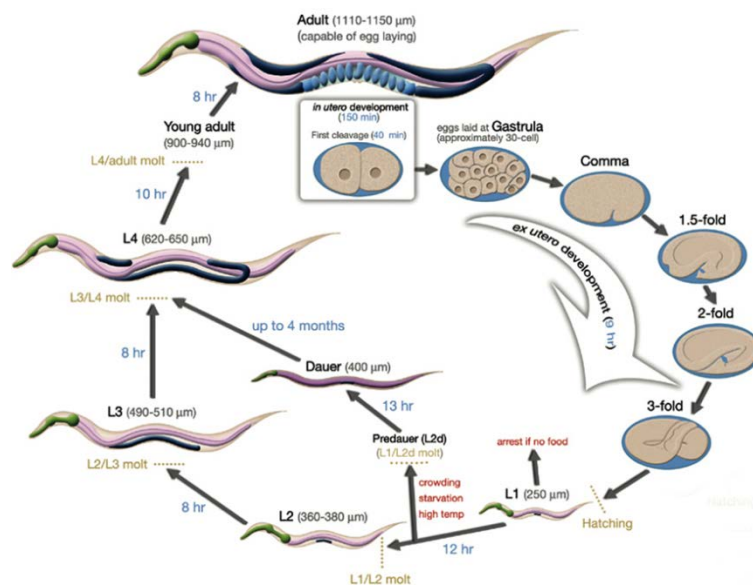


Figura 2. Esquema del ciclo de desarrollo de *C. elegans* (WORM ATLAS). L1: Estadio larvario1; L2: Estadio larvario2; L3: Estadio larvario3; L4: Estadio larvario 4.

1.3 Muerte celular programada en *C. elegans*

El proceso de muerte celular programada en *C. elegans* comparte una serie de rasgos morfológicos y fisiológicos característicos de la apoptosis que lo distinguen de muerte por necrosis (Wyllie *et al.*, 1980): conforme la célula del gusano muere, su volumen se reduce y su núcleo se condensa (Robertson & Thomson, 1982). Los orgánulos citoplasmáticos permanecen intactos durante las fases tempranas de la muerte. La célula ‘condenada’ es reconocida rápidamente y engullida por una célula vecina (no hay fagocitos profesionales en *C. elegans*) y finalmente degradada por fusión con lisosomas. La muerte celular programada es un proceso muy rápido en *C. elegans*: en menos de una hora pueden apreciarse de los primeros cambios morfológicos hasta la desaparición completa de la célula bajo el microscopio óptico.

Como en mamíferos, el desarrollo de *C. elegans* va acompañado de una extensa muerte celular programada: de las 1090 células generadas durante su desarrollo, 131 mueren (Sulston & Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983), es decir, en torno a un 12%. Como casi todo en el desarrollo de *C. elegans*, estas muertes son altamente reproducibles de un animal a otro: las mismas células mueren en su punto característico del desarrollo. Por tanto, la muerte de células individuales puede ser estudiada en el organismo.

No obstante, existen otros factores ambientales o estímulos que pueden acabar lanzando a la célula al proceso de apoptosis, con especial importancia el daño al ADN o la infección por patógenos.

1.3.1 Control genético: genes que afectan a la apoptosis

Durante los últimos 25 años, estudios genéticos han llevado a la identificación de un gran número de genes involucrados en la muerte celular programada, dividiendo el proceso de apoptosis en cuatro pasos separados temporalmente: decisión de ‘suicidio celular’, ejecución de la sentencia de muerte, atrapamiento de las células condenadas por las células vecinas y degradación final de la célula.

Estos genes identificados, la función de su proteína y su proteína homóloga en mamíferos (la homología se define por el mejor resultado de BLAST recíproco) (Lettre & Hengartner, 2006) se encuentran recogidas en la Tabla 2.

Tabla 2. Genes con función en apoptosis en *C. elegans*. ABC. ATP-binding cassette; AIF. apoptosis-inducing factor; APAF1. apoptotic protease activating factor-1; Bcl-2. B-cell lymphoma-2; BH3. Bcl-2-homology domain-3; bHLH. basic helix-loop-helix; BTB. ‘Broad complex, Tramtrack, Bric-a-brac’ domain; bZIP. basic-region leucine zipper; *C. elegans*. *Caenorhabditis elegans*; ces. cell-death selection abnormal; ced. cell death abnormal; CPS-6. CED-3 protease suppressor-6; crn. cell-death-related nuclease; egl-1. egg-laying defective-1; ELMO. engulfment and cell-motility protein; EndoG. endonuclease G; EOR. egl-1 suppressor/DiO uptake defective/raf enhancer; FEN1. Flap endonuclease; GULP. engulfment adapter protein; HLH2/3. helix-loop-helix protein-2/3; ICD-1. inhibitor of cell death-1; MEGF10. multiple epidermal-growth-factor-like motifs-10; MIG-2. abnormal cell migration-2; βNAC. β-subunit of the nascent-polypeptide-associated complex; NEX-1. annexin-family member-1; NUC-1. abnormal nuclease-1; PH domain. pleckstrin-homology domain; PLZF. promyelocytic leukaemia zinc-finger protein; PSR-1. phosphatidylserine receptor-1; SH2/3. Src-homology-2/3 domain; TRA-1. transformer-1; UNC-73. uncoordinated-73; WAH-1. worm AIF homologue-1; XK. Kell blood-group precursor.

Gen <i>C. elegans</i>	Función de la proteína	Proteína homóloga en mamífero
Decisión		
<i>ces-1</i>	Factor de transcripción dedos de zinc de tipo C2H2 (Familia Snail)	Slug
<i>ces-2</i>	Factor de transcripción bZIP	Proteína de unión a sitio D
<i>hlh-2</i>	Factor de transcripción bHLH	Factor de transcripción E2-α (Daughterless-like)
<i>hlh-3</i>	Factor de transcripción bHLH	Achaete-scute homólogo-1 (Achaete-scute-like)
<i>tra-1</i>	Proteína dedos de zinc	GLI3
<i>eor-1</i>	Factor de transcripción BTB/dedos de zinc	PLZF
<i>eor-2</i>	Nueva	KIAA1205

Ejecución		
<i>ced-3</i>	Caspasa	Caspasa-3/Caspasa-9
<i>ced-4</i>	Proteína adaptadora	APAF1
<i>ced-9</i>	Proteína anti-apoptótica del tipo BCL-2	BCL2
<i>egl-1</i>	Proteína pro-apoptótica de dominio único BH3	Proteína de dominio BH3
<i>ced-13</i>	Proteína pro-apoptótica de dominio único BH3	Proteína de dominio BH3
Atrapamiento		
<i>ced-1</i>	Proteína Transmembrana	MEGF10
<i>ced-2</i>	Proteína adaptadora con dominios SH2 y SH3	CrkII
<i>ced-5</i>	Proteína de andamiaje	DOCK180
<i>ced-6</i>	Proteína adaptadora	GULP
<i>ced-7</i>	Transportador ABC	ABCA1
<i>ced-10</i>	Pequeña GTPasa, de tipo Rac	Rac
<i>ced-12</i>	Proteína de dominio PH	ELMO
<i>mig-2</i>	Pequeña GTPasa, de tipo Rho	RhoG
<i>unc-73</i>	Factor de intercambio de nucleótido guanina	TRIO
<i>nex-1</i>	Proteína de unión a fosfolípido dependiente de Calcio	AnnexinA13
<i>psr-1</i>	Receptor fosfatidilserina	PSR
Degradación de ADN		
<i>nuc-1</i>	Deoxiribonucleasa	DNasell
<i>cps-6</i>	Endonucleasa mitocondrial	EndoG
<i>wah-1</i>	Oxidoreductasa	AIF
<i>crn-1</i>	5'→3' exonucleasa	FEN1
Otras		
<i>ced-8</i>	Transportador de membrana	XK
<i>icd-1</i>	Proteína mitocondrial	βNAC

Además de los genes involucrados en el mecanismo de apoptosis en sí, distintos tipos de estímulos pueden llevar a la célula a la apoptosis e involucran un abanico de genes más amplio en el proceso, como se ilustra en el esquema general de regulación de la apoptosis en la Figura 3. Una vez se definió que la apoptosis fisiológica de las células germinales es un mecanismo corriente en el animal, sobre todo durante la fase de desarrollo como se ha indicado, se impulsaron estudios para probar la posibilidad de que el daño del ADN podría inducir la apoptosis de células germinales (Gartner *et al.*, 2000). El correcto mantenimiento y duplicación de la información genética es vital en la célula que cuenta con puntos de control de ADN conservados que conducen a la reparación del ADN, arresto del ciclo celular o a la apoptosis. Pese a que la apoptosis fisiológica e inducida por daño a ADN no pueden diferenciarse a simple vista, múltiples genes se requieren específicamente para la inducción de la apoptosis causada por daño al ADN y no para la apoptosis de células somáticas o apoptosis fisiológica de las células germinales (Gartner *et al.*, 2000), sugiriendo que están reguladas por una ruta diferente pese a que ambos comparten la misma maquinaria central de ejecución de la apoptosis como se muestra en la Figura 3, cuyos componentes principales serán descritos en detalle más adelante.

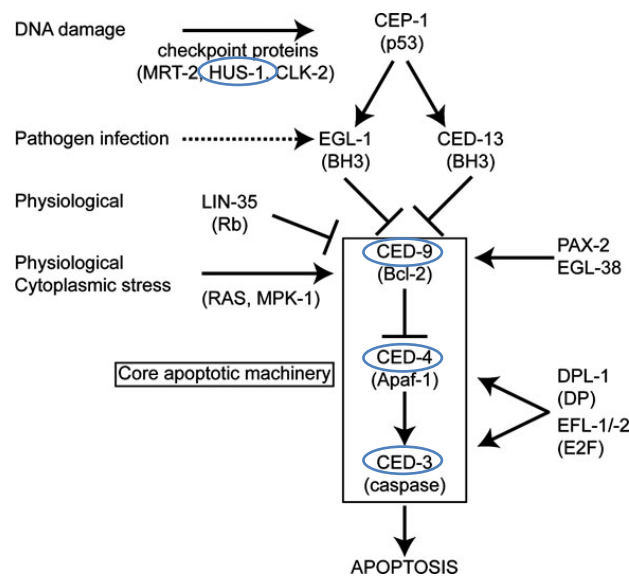


Figura 3. Regulación del proceso de apoptosis en *C. elegans*. Entre paréntesis se indica el gen homólogo en humanos. Rodeados en azul se muestran los genes de especial importancia en el proyecto actual. (WORMBOOK, 2015) Bcl-2: B-cell lymphoma-2; BH3: Bcl-2-homology domain-3; ced: Cell Death abnormality; cep-1: C. Elegans P-53-like protein; dpl: vertebrate transcription factor DP-Like; efl: E2F-like (mammalian transcription factor); egl: Egg Laying defective; hus-1: human HUS1 related; lin: abnormal cell LINEage; MPK: MAP Kinase; MRT: MoRTal germline; pax: PAX (Paired box) transcription factor, Rb: retinoblastoma.

1.3.2 Genes ‘asesinos’, genes de supervivencia y genes ‘guardianes’

Hasta ahora, en el presente trabajo se ha hecho referencia a diversidad de genes, de los cuales *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* y *hus-1* son de especial relevancia para la comprensión del trabajo. Así pues, su función y posición en la ruta de apoptosis se explicará más en detalle en este apartado, así como las características de sus mutantes.

Screens genéticos de mutantes con patrones de muerte celular anormales identificaron cuatro genes que regulan todas las muertes de células somáticas en *C. elegans*, llamados ‘los cuatro esenciales’: *cell death abnormal ced-3*, *ced-4*, *ced-9* y *egg-laying defective (egl)-1*.

Mutaciones de pérdida de función (*loss of function ‘lf’*) en *ced-3* y *ced-4* resultan en la supervivencia de casi todas las células ‘condenadas’ (~131), lo que indica que estos dos genes tienen funciones pro-apoptóticas y son esenciales para la muerte celular programada en *C. elegans*. Pese a que estos mutantes tienen un 12% más de células que sus correspondientes cepas salvajes no muestran ninguna anomalía morfológica o de comportamiento: son viables, fértiles e indistinguibles de la cepa salvaje en cuanto a locomoción, alimentación y muchos otros comportamientos. No obstante un análisis más profundo desvela defectos sutiles: los mutantes de *ced-3* y *ced-4* crecen más lentamente y tienen una fertilidad ligeramente reducida, y son de alguna manera defectuosos en tareas complejas como la quimiotaxis (Ellis *et al.*, 1991b). Las células ‘no muertas’ en los mutantes de *ced-3* y *ced-4* no se dividen nunca, pero se diferencian adoptando el destino de su célula hermana (Avery & Horvitz, 1987). Mientras que las neuronas muestran mayor variabilidad en posición y conectividad que sus hermanas normales (Ellis & Horvitz, 1986; White *et al.*, 1991), son claramente sanas y de apariencia normal, sugiriendo que la ausencia de la función de *ced-3* y *ced-4* bloquea el programa de muerte celular en estadios tempranos, anteriores a que ningún evento ‘irreversible’ haya tenido lugar.

En contraste, *ced-9* tiene un papel anti-apoptótico ya que el mutante de ganancia de función (*gain of function ‘gf’*) de *ced-9* bloquea la apoptosis, mientras que los mutantes de pérdida de función de *ced-9* (*lf*) mueren durante el desarrollo temprano debido a muerte celular excesiva que afecta a células esenciales. Por tanto, el gen *ced-9* es un regulador negativo de la apoptosis en *C. elegans* (Hengartner *et al.*, 1992) cuya sobreexpresión resulta en un fenotipo similar al observado en animales que carecían de *ced-3* o *ced-4* (Hengartner & Horvitz, 1994b).

Por tanto, mientras que la muerte celular programada *per se* no es esencial en *C. elegans*, puesto que los mutantes de *ced-3* y *ced-4* son viables y fértiles, el control adecuado de la apoptosis es claramente crucial incluso en este organismo tan simple.

Otro de los genes que es conveniente destacar para el trabajo es *hus-1*, que codifica para una proteína de punto de control de daño a ADN. En *C. elegans*, la actividad de *hus-1* se requiere para el arresto del ciclo celular y apoptosis inducido por daño al ADN, mantenimiento de los telómeros y por tanto, estabilidad del genoma y desarrollo. Específicamente, *hus-1* es requerida para el incremento en la expresión de *egl-1* dependiente de CEP-1(p53 o ‘el guardián del genoma’) (Hofmann *et al.*, 2002), cuyo papel en la ruta está indicado en la Figura 3.

1.3.3 Conservación de la apoptosis entre nematodos y mamíferos

Los análisis moleculares de *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* y *egl-1* en los años noventa proporcionaron pistas muy importantes para entender cómo funciona la maquinaria apoptótica, no sólo en *C. elegans*, sino en otras especies. La ruta de muerte celular programada caracterizada en nematodos permanece conservada en la evolución y también funciona en mamíferos; de hecho, los cuatro genes codifican reguladores apoptóticos conservados.

ced-3 codifica para una proteasa de la familia de las caspasas (un grupo de enzimas cisteína proteasas esenciales por su papel en la apoptosis). CED-4 es una proteína adaptadora similar al factor-1 de activación de proteasas apoptóticas (*apoptotic protease-activating factor-1* (APAF1)). Como sus homólogos en mamíferos, CED-3 y CED-4 oligomerizan y forman un complejo de tipo apoptosoma, unión que es requerida para la activación de la apoptosis.

Por otra parte, la proteína CED-9 muestra significativa similaridad con el producto del proto-oncogen Bcl-2 en mamíferos que, como *ced-9*, es un regulador negativo de la apoptosis (revisado por Korsmeyer *et al.*, 1993; Reed, 1994). Además, Bcl-2 puede impedir la apoptosis cuando es sobreexpersada en los gusanos, y puede sustituir parcialmente a *ced-9*, sugiriendo que esas dos proteínas tienen un mecanismo de acción molecular similar (Vaux *et al.*, 1992; Hengartner and Horvitz, 1994a).

La participación de miembros de las familias génicas de *ced-9*/Bcl-2 y *ced-3*/caspasa en la mediación de la muerte celular programada, tanto en *C. elegans* como en humanos, y la observación de que esos genes estructuralmente similares son funcionalmente intercambiables sugiere encarecidamente que los nematodos y mamíferos comparten un camino molecular común para el proceso de apoptosis. De hecho, no sólo CED-9 y CED-3, sino todo el resto de la ruta de apoptosis que ha sido caracterizada en *C. elegans* está conservada en la evolución como se ilustra en la Figura 4.

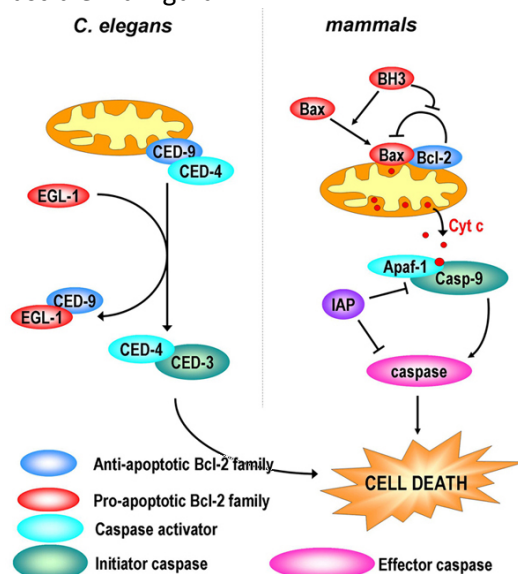


Figura 4. Conservación de la ruta de la apoptosis en *C. elegans* y mamíferos. (Colin *et al.*, 2009).

Apaf-1: apoptotic protease activating factor-1; *Bax*: Bcl-2-associated X protein; *Bcl-2*: B-cell lymphoma-2; *BH3*: Bcl-2-homology domain-3; *ced*: CELL Death abnormality; *cyt-c*: cytochrome complex; *egl*: EGg Laying defective; *IAP*: Inhibitors of apoptosis proteins.

Así pues, en definitiva, los estudios en el nematodo *C. elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y en ratón, indican que la maquinaria molecular de la apoptosis está conservada en la evolución y es intrínseca a todas las células de metazoos. Por tanto, investigar la apoptosis en *C. elegans* puede proporcionar pistas para comprender mejor la apoptosis en humanos.

1.4 Envejecimiento en *C. elegans*

Los nematodos *C. elegans* tienen una vida media de en torno a 18-20 días cuando crecen a 20°C. Son organismos poiquilotermos, lo que significa que este valor varía drásticamente con la temperatura: la esperanza de vida aumenta a 22 días a 15°C y se reduce a menos de una docena de días a 25°C (Lakowski & Hekimi, 1996). El desarrollo embrionario y larval dura de tres a cuatro días. Tras alcanzar la etapa adulta y la madurez sexual, son capaces de generar progenie durante unos cinco días. La semana restante de la vida del animal, comprende el periodo post-reproductivo o de senescencia como se muestra en la Figura 5.

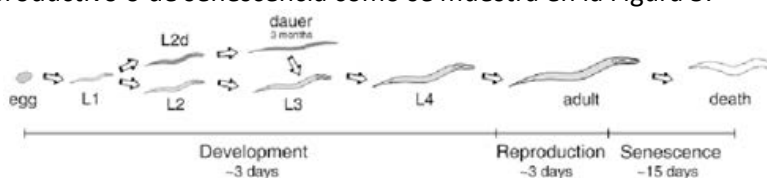


Figura 5. Historia de la vida de *C. elegans*. L1 corresponde a estadio larvario 1, habiendo hasta 4 estadios larvarios. La 'd' hace referencia al estado alternativo de arresto dauer, en el que el gusano entra cuando las condiciones de desarrollo no son favorables (ausencia de alimento, temperatura alta, exceso de población) y puede permanecer en él hasta 3 meses. Además, es capaz de reanudar el ciclo de vida normal cuando las condiciones vuelven a ser favorables sin ningún efecto. De este modo aumenta cuatro veces su esperanza de vida media. (Gems & Doonan, 2008).

Este nematodo, presenta una serie de cambios relacionados con la edad equiparables a los observados en otros organismos, incluidos los humanos. Conforme aumenta la edad, los gusanos son menos activos, muestran movimientos descoordinados, y finalmente dejan de moverse, resultado de la degeneración muscular, mientras que el sistema neuronal permanece relativamente intacto. Otros cambios observados son la aparición de arrugas en la cutícula, la acumulación de lipofuscina, pigmentos oscuros, presencia de estructuras de tipo vacuola y niveles altos de proteínas oxidadas y carboniladas, así como una reducción en la fertilidad, problemas en la alimentación y delecciones en el ADN mitocondrial.

Los principales estudios sobre envejecimiento en *C. elegans* se han dirigido hacia la genética del proceso, analizando el efecto de mutaciones puntuales en búsqueda de aquellas que alargaban la vida del nematodo y han sido muy útiles para identificar rutas de señalización y genes conservados en la evolución que incrementan la esperanza de vida. No obstante, en los últimos años se ha redirigido la investigación hacia saber si aumentar la vida media también supone aumentar el 'periodo saludable' (*healthspan*, periodo en el que animal posee una capacidad funcional mayor que el 50% de la capacidad máxima funcional del tipo salvaje) o simplemente se está prolongando el 'periodo de fragilidad' (*gerspan*, periodo en que el animal posee una capacidad funcional inferior al 50% de la capacidad funcional máxima del tipo salvaje) con el consecuente incremento de enfermedades asociadas con la edad. Así pues, surge la necesidad de desdoblarse los estudios de envejecimiento en estudios de longevidad o *lifespan* y estudios de envejecimiento saludable o *healthspan* (Bansal *et al*, 2014), que serán integrados en el desarrollo de este proyecto.

1.4.1 Control genético de la esperanza de vida, genes *daf*

El descubrimiento de que mutaciones en un sólo gen, *age-1* o *daf-2*, podían extender la esperanza de vida llegando a duplicarla reveló que la longevidad está ciertamente bajo control genético (Friedman & Johnson, 1988) (Kenyon *et al.*, 1993). También se vio que la longevidad es dependiente de *daf-16*, definiendo la existencia de un camino de epistasis para este proceso. Además, la identificación molecular de estos tres genes como componentes de la ruta de señalización de la insulina/IGF-I (IIS) ((Morris *et al.*, 1996), (Kimura *et al.*, 1997), (Ogg *et al.*, 1997), (Lin *et al.*, 1997)) finalmente llevó a la comprensión de que una modesta regulación a la baja de la IIS promueve resistencia al estrés y longevidad en los diferentes taxones (Clancy *et al.*, 2001) (Tatar *et al.*, 2001) (Bluher *et al.*, 2003) (Holzenberger *et al.*, 2003). Estudios de genética molecular sugieren que, en respuesta a los péptidos de tipo insulina (*insulin-like peptides*, ILPs), la activación del receptor tirosina kinasa DAF-2/insulina/IGF-1 desencadena una cascada de quinasas PI3/AKT/SGK que fosforila al factor de transcripción DAF-16/FOXO, como se muestra en la Figura 6 (Paradis & Ruvkun, 1998) (Ogg & Ruvkun, 1998) (Paradis *et al.*, 1999). En consecuencia, se retiene a DAF-16/FOXO en el citoplasma y los animales tienen una vida media normal.

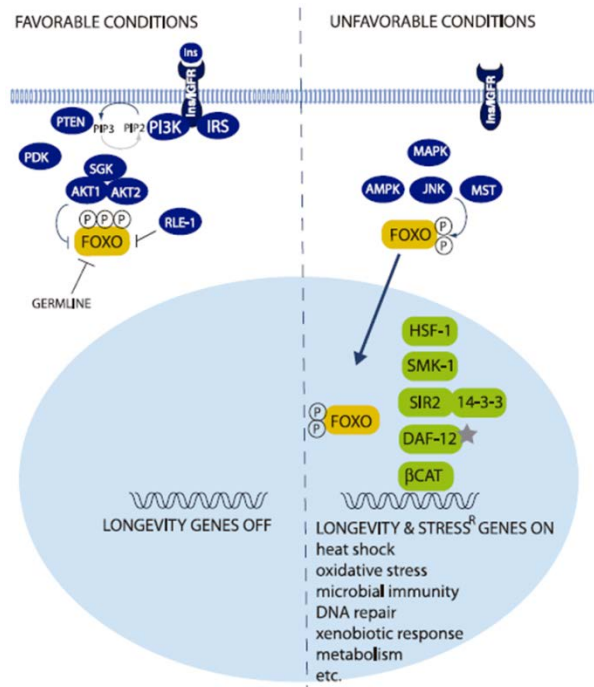


Figura 6. Modelo de la trasducción de señales de eje insulina/IGF-1, mostrando las quinasas asociadas (azul) y los factores nucleares (verde). (Antebi, 2007). AKT: proteína quinasa B; AMPK: proteína quinasa activada por AMP; Bcat: β-catenina; DAF: abnormal DAuer Formation; FOXO: Forkhead box protein; HSF: factor de transcripción de choque térmico; Ins: Insulina; Ins/IGFR: Insuline Growth Factor Receptor; IRS: Insulin receptor substrate; JNK: Quinasas c-Jun N-terminal; MAPK: Mitogen-activated protein kinases; MST: mammalian sterile 20-like kinase; P: Phosphate groups; PDK: Pyruvate dehydrogenase kinase; PIP: phosphatidylinositol di/tri phosphate; PI3K: fosfoinositol 3-quinasa; PTEN: Phosphatase and tensin homolog; RLE: ubiquitin ligase; SGK: Serine/threonine-protein kinases; SIR: yeast SIR related; MK: SMEK (Dictyostelium Suppressor of MEK null) homolog.

En respuesta al incremento de la actividad DAF-18/PTEN, estrés (térmico, oxidativo, inanición) o reducida IIS, DAF-16/FOXO entra en el núcleo (Lee *et al.*, 2001) (Lin *et al.*, 2001) (Henderson & Johnson, 2001) y activa los genes de supervivencia, incluyendo los que controlan el estrés oxidativo, de choque térmico, inmunidad innata, metabolismo, autofagia y respuesta a xenobioticos, entre otros.

Así pues, IIS se entiende mejor como una ruta de señalización seleccionada a lo largo de la evolución para regular la supervivencia del organismo, no el envejecimiento per se. De hecho, durante el desarrollo larval, DAF-16/FOXO especifica el paso a la diapausa *dauer*, un estado

larval altamente resistente al estrés y de larga vida, especializado en la supervivencia durante condiciones adversas. Sin embargo, tras recuperar unas condiciones de crecimiento normales, los nematodos son capaces de recuperar el ciclo de vida normal y desencadenar la longevidad en adultos (Dillin, 2002). Evidentemente, el papel funcional del IIS es proporcionar resistencia somática para sobrellevar los tiempos difíciles y, por el contrario, especificar crecimiento y reproducción en los buenos tiempos, con consecuencias secundarias en la vida media del adulto. Consecuentemente, muchos mutantes de la longevidad tienen aptitudes Darwinianas (*fitness*) reducidas bajo condiciones que favorecen un rendimiento reproductivo rápido a corto tiempo (Jenkins *et al.*, 2004).

1.4.2 Genes *clk*

Desde que se elucidó la ruta central explicada en el apartado 1.4.1, se han ido detectado muchos más de los llamados 'genes de longevidad', algunos relativos o que convergen en la ruta de IIS, como los genes *sir* y los genes *old*, y otros que no, como son los genes *clk* (*clock abnormal biological timing*). Éstos son de especial interés puesto que, a diferencia del resto, afectan a la esperanza de vida no sólo en el periodo postreproductivo.

Los genes *clk* regulan los relojes fisiológicos, del desarrollo y del comportamiento durante su ciclo vital. Se han identificado cuatro mutantes *clk* que muestran un moderado incremento en la longevidad: *clk-1*, *clk-2*, *clk-3*, y *gro-1* (Hekimi *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1995; Lakowski & Hekimi, 1996). Mutaciones en estos genes ralentizan la mayoría de los procesos dependientes de tiempo y también los comportamientos rítmicos en *C. elegans*, incluyendo la sincronización de las divisiones celulares durante el desarrollo embrionario, la alimentación, defecación y locomoción.

Pese a que muchas de las mutaciones que desencadenan longevidad se han acabado relacionando con la función de *daf-16* o convergen en su ruta, la existencia de estos mutantes cuya longevidad es independiente a *daf-16* sugiere que esas clases de genes afectan al proceso de envejecimiento por mecanismos distintos. De hecho, los dobles mutantes para los genes *clk* y los genes de la ruta de formación de *dauer* tienen efectos aditivos en la esperanza de vida (Lakowski & Hekimi, 1996). Esto hace pensar que realmente no nos encontramos frente a un único programa de envejecimiento, sino múltiples.

1.5 Relación entre apoptosis y envejecimiento

A pesar de la importancia de los procesos de apoptosis y envejecimiento, y de que la amplia investigación efectuada en ambos campos parece sugerir que los dos procesos podrían estar relacionados de alguna manera, no existen evidencias que asocien directamente niveles altos o bajos de los genes que regulan apoptosis con una mayor longevidad.

El grupo del Dr. José Viña, de la Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, en colaboración con el Grupo Español para el Estudio de Centenarios, ha analizado un grupo de centenarios de la Comunidad Valenciana y su estudio revela patrones específicos de expresión en centenarios. En esta investigación, se realizaron estudios de transcriptómica con microarrays en los que se comparan tres poblaciones: centenarios, septuagenarios y jóvenes. Se observó que genes sobreexpresados en centenarios no lo estaban en septuagenarios y sí en personas jóvenes. De entre los genes regulados de manera diferencial en centenarios, destacan aquellos asociados con el control de la apoptosis y senescencia celular, poseyendo niveles elevados de la proteína antiapoptótica Bcl-xL (Borrás *et al.*, resultados en preparación para publicar).

El análisis por PCR de transcripción reversa (RT-PCR) de células mononucleares periféricas de la sangre desveló que, de hecho, los centenarios regulaban positivamente Bcl-xL comparado con septuagenarios y gente joven.

Sus resultados, en definitiva, sugieren que los centenarios reprimen la apoptosis intrínseca, proporcionando una pista de cómo las personas más longevas en la sociedad consiguen vidas tan largas, y a la vez tan saludables.

2. OBJETIVOS

El principal interés de este trabajo es comprobar la hipótesis de que los genes de apoptosis podrían estar directamente involucrados en longevidad y envejecimiento saludable, con especial interés en Bcl-xL. Hasta ahora, se ha encontrado una correlación mediante estudios de transcriptómica entre niveles de expresión de Bcl-xl y longevidad, pero no existe evidencia funcional *in vivo* de causalidad entre nivel de Bcl-xl y esperanza de vida. Por ello, se propone al organismo *Caenorhabditis elegans* como herramienta para este estudio.

Para ello, se han propuesto una serie de objetivos:

1. Creación de cepas de mutantes de la vía de la apoptosis y su respectiva cepa salvaje con un fondo genético común mediante la realización de cruces.
2. Constatación del efecto de las mutaciones en la vida del nematodo mediante la realización de curvas de longevidad.
3. Análisis de envejecimiento saludable mediante cuatro pruebas de *healthspan*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas de *Caenorhabditis elegans*

Las cepas de *C. elegans* empleadas están detalladas en la siguiente Tabla 3:

Tabla 3. Cepas de *C. elegans* empleadas en el proyecto. La procedencia de las mismas viene indicada con el superíndice, siendo a: cedidas por el laboratorio de Oliver Hobert en la Universidad de Columbia; b: adquiridas del *Caenorhabditis Genetics Center (CGC)*; c: generadas en el laboratorio.

Nombre	Genotipo	Cromosoma	Tipo de Mutación	Descripción
N2 ^a			Ninguna	Cepa silvestre de referencia
OH8246 ^a	<i>otIs221(cat-1::gfp)</i>	III	Ninguna	Cepa reportero GFP en PDE
OH8249 ^a	<i>otIs224(cat-1::gfp)</i>	Desconocido No III	Ninguna	Cepa reportero GFP en PDE
DL308 ^b	<i>ced-3(n717)</i>	IV	Sustitución C>T	Cepa mutante de la apoptosis
MT2547 ^b	<i>ced-4(n1162)</i>	III	Sustitución C>T codón de parada prematuro	Cepa mutante de la apoptosis
WS2277 ^b	<i>hus-1(op241)</i>	I	Sustitución G>A	Cepa mutante de la apoptosis
MT8735 ^b	<i>egl-1(n1084n3082)</i>	V	Desconocida	Cepa mutante de la apoptosis
TJ1 ^b	<i>cep-1(gk138)</i>	I	Delección 1660pb Mutación KO	Cepa mutante de la apoptosis
MD792 ^b	<i>ced-13(sv32)</i>	X	Delección 1304pb	Cepa mutante de la apoptosis
NFB469 ^c	<i>ced-9(n1950)</i>	III		Cepa mutante de la apoptosis de fondo genético común a NFB470
NFB470 ^c				Cepa silvestre de fondo genético común a NFB469
NFB654 ^c	<i>cep-1(gk138)</i>	I	Delección 1660pb Mutación KO	Cepa mutante de la apoptosis de fondo genético común a NFB655
NFB655 ^c				Cepa silvestre de fondo genético común a NFB654
NFB677 ^c				Cepa silvestre de fondo genético común a NFB678
NFB678 ^c	<i>ced-4(n1162)</i>	III	Sustitución C>T codón de parada prematuro	Cepa mutante de la apoptosis de fondo genético común a NFB677
NFB679 ^c				Cepa silvestre de fondo genético común a NFB680
NFB680 ^c	<i>ced-3(n717)</i>	IV	Sustitución C>T	Cepa mutante de la apoptosis de fondo genético común a NFB679
NFB681 ^c				Cepa silvestre de fondo genético común a NFB682
NFB682 ^c	<i>hus-1(op241)</i>	I	Sustitución G>A	Cepa mutante de la apoptosis de fondo genético común a NFB681

3.2 Cultivo de las cepas de *C. elegans*

El mantenimiento de los cultivos se hizo de acuerdo a lo establecido por el método de Sydney Brenner (Brenner, 1974), el cual está basado en el uso de placas Petri que contienen NGM (*Nematode Growth Medium*) agar sobre el cual se adiciona la cepa OP50-1 de *Escherichia Coli*. El medio NG agar contiene NaCl (3g L⁻¹), agar (17 g L⁻¹), peptona (2,5 g L⁻¹), CaCl (1M, 1 ml L⁻¹), MgSO₄ (1M, 1 ml L⁻¹), tampón KPO₄ (1M, pH=6.0, 25 ml L⁻¹), colesterol (5 mg ml⁻¹ en etanol al

95% 1 ml L⁻¹), agua mili-Q y nistatina (Sigma) que actúa como antifúngico y antibiótico. Los nematodos pueden ser crecidos a 15, 20 ó 25 °C, sin embargo en este experimento se crecieron siempre a 20°C para asegurar que la temperatura de incubación no afecta a la velocidad de crecimiento, y por tanto a su longevidad, de manera distinta entre cepas y experimentos.

3.3 Extracción de ADN genómico

En los ensayos de genotipado el ADN genómico de gusano se extrajo mediante un lisado de los nematodos, siguiendo la modificación descrita por Williams (Williams *et al.*, 1992). En primer lugar, se lavaron las placas con medio M9 para recuperar los nematodos y de cada placa se pasaron a tubos de PCR independientes. Con ayuda de hielo se dejó sedimentar los gusanos en el fondo del tubo, para posteriormente, retirar el sobrenadante. El pellet de gusanos se resuspendió en 100 µl una solución de lisis y proteinasa K (20 mg/ml, Thermo Scientific). Después, se incubaron a -80°C durante 20 minutos para conseguir la rotura de las células de los gusanos por la formación de cristales de hielo. Finalmente, se incubaron durante 4 horas a 65°C para que la proteinasa K degradase los tejidos y posteriormente 30 minutos a 95°C para inactivar el enzima. La composición del medio M9 y de la solución de lisis se encuentra detallada en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Componentes del medio de recuperación de nematodos (M9).

Componente	Concentración
Na₂HPO₄·12H₂O	80 mM
KH₂PO₄	22 mM
NaCl	8,5 mM
NH₄Cl	0,2 M

Tabla 5. Componentes de la solución de lisis para los nematodos.

Componente	Concentración
KCl	50mM
Tris-HCl	10mM, pH 8.3
MgCl₂	2,5mM
Triton X-100	0,45% (v/v)
Tween 20	0,45% (v/v), Sigma

3.4 Cebadores

En este trabajo se han empleado cebadores para el genotipado que permite discernir entre cepa mutante y cepa salvaje con un fondo genético común. En el diseño de los cebadores se han tenido en cuenta lo siguiente:

- Longitud entre 18 y 30 nucleótidos, siendo el tamaño ideal de 21-25 nucleótidos.
- Porcentaje de C/G aproximadamente un 40-60% del total de bases incorporadas
- Temperatura de fusión (T_m) entre 50-65 °C
- La auto-complementariedad debe ser evitada para minimizar la formación de estructuras secundarias y dímeros de cebadores.
- Posicionamiento de G y C en el extremo 3' del cebador para propiciar la unión al ADN molde.

Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa Ape(A plasmid editor) versión 2.0.45, indicándose el resultado obtenido en la Tabla 6.

Para el diseño de cebadores en el caso de que la mutación fuera una sustitución se empleó la secuencia contigua a la mutación, de tal forma que se amplificara una banda en torno a 400—800pb. Para las deleciones se emplearon tanto las secuencias flanqueantes como un cebador interno en la secuencia de la deleción que, por tanto, amplificará solo en las cepas salvajes. En

el caso de la mutación de *egl-1*, cuya naturaleza es desconocida, se emplearon las secuencias adyacentes a la región del gen.

Tabla 6. Cebadores utilizados en el proyecto. D: cebador directo; R: cebador reverso.

Cebador	Secuencia 5' →3'	Tm (°C)	Aplicación
oCL18 ^D	TCTGAAATCCACAAGCGACC	58	Para secuenciar <i>ced-3</i> (n717)
oCL19 ^R	CGCAAGTTCAGGTTGCAATT		
oCL20 ^D	CGACTTTGAACCACGTGACGC	69.5	Para secuenciar <i>ced-4</i> (n1162)
oCL21 ^R	ACGGGCTCGTCTTCAAACAC		
oCL22 ^D	AAGGCTAGGCGGAGGAAGAG	70	Para secuenciar <i>ced-13</i> (sv32)
oCL23 ^R	CGAGAAGGCTCACAAGAAGGAC		
oCL24 ^D	TTAACAACGGGACAACGGGAC	59.8	Para secuenciar <i>cep-1</i> (gk138)
oCL25 ^R	CGGAGGAACGCATCCATGAAG		
oCL26 ^D	AGATACTGCGGCAATCGACG	66	Para secuenciar <i>hus-1</i> (op241)
oCL27 ^R	GACGTGTAAGAAACGGGACATC		
oCL28 ^D	GGGAGTTGGAGACGGAGAGATCG	-	Para secuenciar <i>egl-1</i> (n1084n3082)
oCL29 ^R	GCACACCATTTCACACCCAAA		
oCL30 ^D	CGACGAACAATGCTGGCATACG	-	Para amplificar la delección en <i>ced-13</i> (+ en cepa silvestre solo)
oCL31 ^R	GTTTCTGTCCGCTTCTTCC		
oCL32 ^D	ACAAGTACGGTAGTCTCGACACG		Para amplificar la delección en <i>cep-1</i> (+ en cepa silvestre solo)
oCL33 ^R	AAAGACCGCAAGGCACATCG	-	

3.5 Creación de las cepas salvaje y mutante de fondo genético común

3.5.1 Cruce y selección de candidatos

Se partió de cepas de mutantes de la vía de la apoptosis proporcionadas por el CGC (recogidas en la Tabla 3) y se cruzaron con la cepa salvaje N2 con la finalidad de recuperar de nuevo una cepa mutante y una cepa salvaje con un fondo genético común y así evitar la posible influencia en la longevidad de otros elementos del genoma. Además, con el fin de facilitar la selección de posibles candidatos de mutantes y cepa silvestre se introdujo mediante cruces el reportero del gen *cat-1* fusionado a GFP que se expresa en las dos neuronas posteriores *deirid* (PDE) de la zona posterior de la gónada del nematodo. Estas neuronas son bilaterales y tienen un linaje muy bien establecido, en cuyo último punto de división una célula entra en procesos apoptótico y muere y la célula hermana da lugar a la neurona PDE. Puesto que se emplearon cepas con alteraciones en el proceso de apoptosis, o muerte celular programada, uno de los fenotipos de estos mutantes es que en el linaje del PDE, en el último paso de división no se produce la muerte de la célula hermana a PDE y esto da lugar a la presencia de neuronas PDE ectópicas en los gusanos mutantes. Por tanto, el uso de cepas *cat-1::gfp* supone una herramienta de utilidad a la hora de discriminar entre cepa mutante (animales con neuronas PDE ectópicas) y cepa salvaje (número normal de neuronas PDE). Para introducir este reportero de la neurona PDE, se realizó un cruce de la cepa mutante en cuestión con la cepa OH8246, portadora del reportero *cat-1::gfp*, en el cromosoma III. Esto se hizo para todas las cepas excepto MT2547(*ced-4* (n1162)) puesto que este gen también se encuentra en el cromosoma III y al intentar poner en homocigosis a ambos se repelerían. Por ello se empleó la cepa OH8249 con el reportero *cat-1::gfp* en un cromosoma distinto al III. Los cruces realizados vienen indicados a continuación en la Figura 7. A la hora de realizar un cruce con *C. elegans* se utiliza una proporción de machos y de hermafroditas en estadio L4 3:1; generalmente 12 machos y 4 hembras, para propiciar el cruce por encima de la autofecundación cuando era lo deseado.

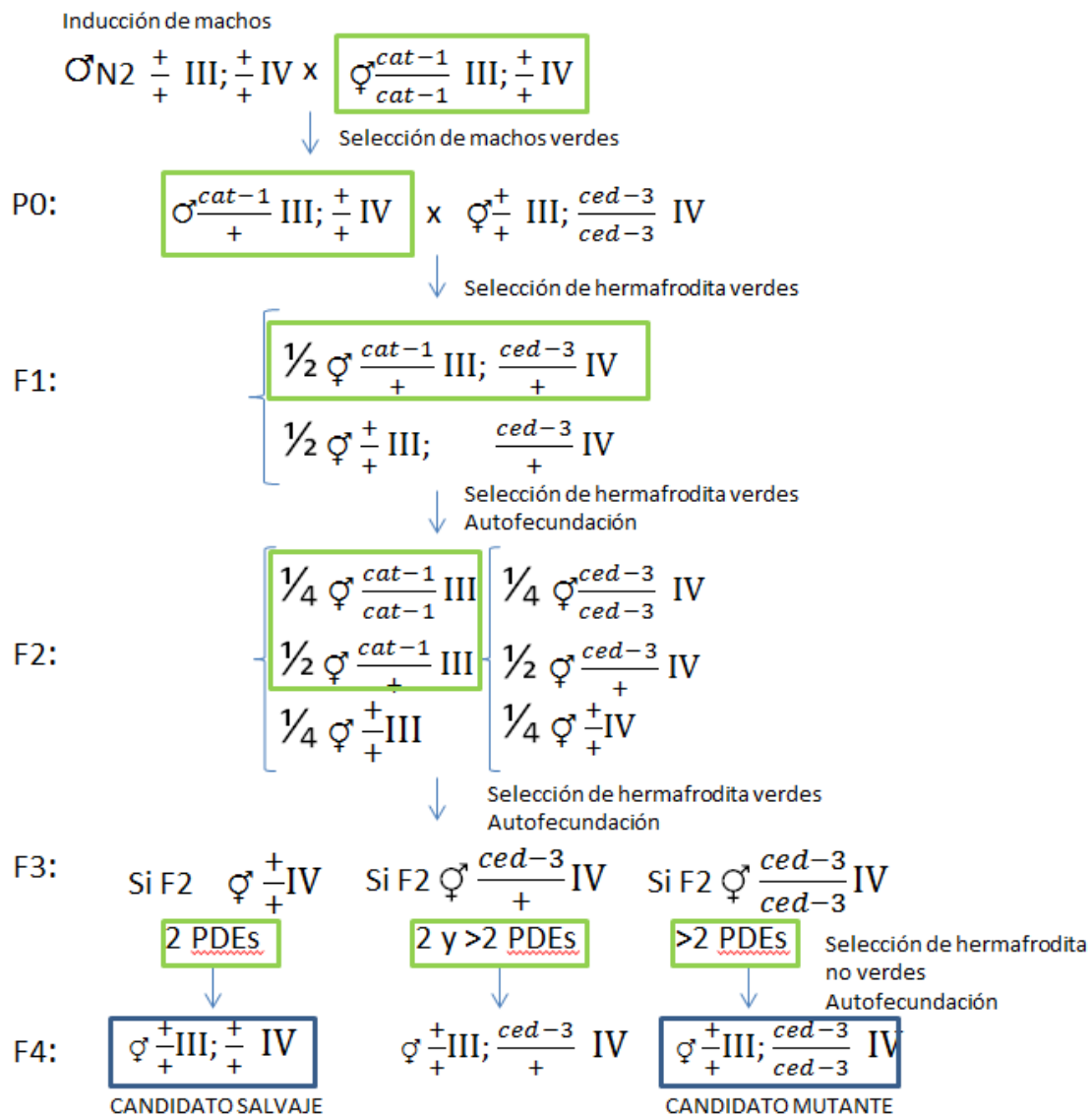


Figura 7. Diagrama de cruces realizados ejemplificado con el gen *ced-3(IV)* y *cat-1(III)*.

Como se ve en la Figura 7, en primer lugar se indujeron machos de la cepa salvaje N2. Esto se realizó mediante el método descrito por Lints & Hall (2009), que consiste en una sucesión de incubaciones de larvas L4, estadio anterior al periodo reproductivo, a distintas temperaturas: 30' a 27°C, 6h a 30°C y 2 días a 20°C. Con estos choques térmicos se consigue generar un estrés que inducirá el aumento de la frecuencia de machos para crear variabilidad como mecanismo de supervivencia en la descendencia.

A continuación estos machos generados se cruzaron con la cepa que contiene el reportero *cat-1::gfp* que marca las neuronas PDE por la finalidad comentada anteriormente, obteniendo así machos con las neuronas marcadas en GFP que servirían como parentales P0 y se cruzaron con hermafroditas mutantes para los genes de la vía de la apoptosis. Con este cruce se generó una descendencia F1 (generación filial 1) uniforme de heterocigotos para la mutación de interés, la mitad de ellos sin reportero y la otra mitad con reportero, siendo estos últimos seleccionados a la lupa de fluorescencia. Se transfirieron diez gusanos individualmente a placas nuevas y se analizó su descendencia proveniente de la autofecundación. En la segunda generación filial F2 se tuvieron tanto homocigotos para la mutación y para su ausencia como heterocigotos en ambos cromosomas; es decir, para el reportero y para la mutación de la vía de la apoptosis. De

ellos, se seleccionó 20-30 gusanos que contenían el reportero verde y se observó el fenotipo de la descendencia F3 para tratar de dilucidar el genotipo de los parentales F2.

- Si la F2 era homocigota salvaje, careciendo de la mutación, se contabilizaron sólo dos neuronas PDE en todos los gusanos de la placa F3. Por tanto estos gusanos se tomaron como candidatos para ser la cepa salvaje.
- Si la F2 era heterocigoto, se obtuvo una mezcla de gusanos con sólo dos o más neuronas PDE en la F3.
- Si la F2 era homocigota para la mutación de la vía de la apoptosis, se observaron gusanos que siempre tenían más de dos neuronas PDE. Por tanto, se tomaron como candidatos para ser cepa mutante. Además, un punto muy importante es que estos gusanos tendrían el mismo fondo genético que los salvajes, puesto que proceden de una misma F2.

Una vez identificados los posibles homocigotos mutantes y salvajes de interés, se seleccionaron diez gusanos de cada placa candidata (mutante y salvaje): cinco con reportero y cinco sin, y se procedió a observar la F4 con la intención de constatar lo ya observado en la F3 relativo al número de neuronas PDE. En el caso de que en las cinco placas con reportero se observara que todos gusanos poseían neuronas PDE extra, se confirmaría la naturaleza mutante de éstos, y se utilizarían las placas sin reportero para genotipar. El hecho de seleccionar gusanos sin reportero es debido a que no se desea ningún elemento adicional en el genoma que pueda interferir en el estudio de longevidad a realizar. Del mismo modo, en el caso de que todas las placas del candidato salvaje presentasen el número normal de neuronas PDE, se utilizarían las placas sin reportero para genotipar y confirmar la naturaleza del gen.

3.5.2 Genotipado por PCR

Una vez obtenidos los candidatos de mutante y cepa salvaje para cada caso, se procedió a su genotipado por PCR. El concepto de 'genotipado' hace referencia a un ensayo que revela los alelos específicos heredados por un individuo, que resulta particularmente útil en situaciones en las que más de una combinación genotípica pueden producir la misma presentación clínica (GENEREVIEWS NCBI, 2015).

Para amplificar las regiones génicas de interés se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se ajustaron parámetros como el programa de PCR (la temperatura y tiempo de cada ciclo, número de ciclos), la temperatura media de fusión de los cebadores y la mezcla de la reacción (enzima, tampón, concentración de deoxinucleótidos (dNTPs) y de ADN molde, volumen final).

El ADN utilizado en la PCR de genotipado procede de muestras lisadas de gusanos. Para poner a punto la reacción se realizó una PCR de gradiente previa para averiguar la temperatura media de fusión de los cebadores óptima para cada caso. Para ello se ha utilizado lisado N2 como control de cepa salvaje y lisado de cada cepa de los mutantes de la vía de la apoptosis, indicadas en Tabla 3, como control de cepa mutante. Se ha analizado un rango de 10 temperaturas distintas (50°C-70°C) para la etapa de anillamiento de los cebadores al ADN molde. En casos en que se observaron bandas inespecíficas en temperaturas altas, se empleó la mezcla reacción PCR con betaína (Sigma), agente isoestabilizante que facilita la separación de la doble cadena, aumenta el rendimiento de la reacción y la especificidad de los productos de PCR. Otra alternativa fue disminuir la concentración de cloruro de magnesio, co-factor de la ADN polimerasa, favoreciendo la especificidad del enzima.

Una vez se ha identificado la temperatura óptima de anillamiento de los cebadores, se procedió al genotipado de los candidatos. En este trabajo se ha empleado una mezcla de reacción y un

programa de PCR estándar, mostrado en la Tabla 7, sobre el cual, se realizarán las modificaciones pertinentes (Tabla 8).

Tabla 7. Mezcla Reacción PCR Estándar.

Mezcla Reacción PCR Estándar	
3µL	ADN molde
0.5µL	dNTPs (100mM, Promega)
0.5µL	Cebadores (25nM por cebador)
5µL	Tampón 10x (con MgCl ₂ 2.5µM, Kappa Biosystems)
1µL	Enzima Kappa Taq polimerasa 5U/µL, (Kappa Biosystems)
39.5µL	Agua de PCR
50µL	Volumen total

Tabla 8. Mezcla Reacción PCR Estándar con betaína.

Mezcla Reacción PCR Estándar con betaína	
1.5µL	ADN molde
0.5µL	dNTPs (100mM, Promega)
0.5µL	Cebadores (25nM por cebador)
2.5µL	Tampón 10x (con MgCl ₂ 2.5µM, Kappa Biosystems)
5µL	Betaína 5x (Sigma)
1.5µL	Enzima Kappa Taq polimerasa 5U/µL, (Kappa Biosystems)
13µL	Agua de PCR
25µL	Volumen total

En la Tabla 9 se muestra el programa de PCR empleado. Aparecen dos incógnitas (x e y) que hacen referencia respectivamente a la temperatura óptima de unión del cebador en cada caso para la reacción, obtenida mediante PCR de gradiente que viene indicada en la Tabla 6 y al tiempo de elongación necesario, que fue 1' para las sustituciones y 2'30'' para las deleciones debido a que el producto a amplificar era mucho mayor. Generalmente se utiliza un minuto de elongación por cada kilobase de ADN amplificado.

Tabla 6. Programa PCR Estándar.

Programa PCR Estándar		
Paso	Tº, Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C 2'	1
Desnaturalización	94°C 30''	35
Unión del cebador	x 30''	
Extensión	72°C y	
Extensión final	72°C 5'	1
	4°C	∞

3.5.3 Electroforesis en geles de agarosa

Para la resolución de las bandas de ADN se han empleado geles de agarosa al 1% visualizados con Gel Red (Biotium), un agente intercalante. El tampón de electroforesis utilizado ha sido TAE (Tris-acetato-EDTA) a una concentración 1X. Normalmente se ha utilizado un voltaje constante de 100-120 voltios durante todo el proceso.

El tiempo de proceso varió en función del tamaño de gel y el tamaño y número de bandas a visualizar. Para poder estimar el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos y poder seleccionar el tamaño deseado, se adicionó en cada gel unos 3 µl del marcador de pesos moleculares (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (LifeTechnologies)). Para la visualización de las bandas de ADN se utilizó un transiluminador de luz UV permitiendo la captura del gel en una fotografía.

3.5.4 Genotipado por secuenciación

De todos los candidatos mutantes y salvajes, una vez confirmada la presencia de producto de PCR vía electroforesis, se procedió a purificar estos productos de PCR y se prepararon a una concentración de 10ng/ μ L. Éstos se enviaron a secuenciar para confirmar los resultados obtenidos en el Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia. Este servicio emplea la secuenciación tipo Sanger, basado en el empleo de dideoxinucleótidos que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3', de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento, esta cadena no puede continuar elongándose. Esto es así ya que la ADN polimerasa necesita un grupo terminal 3' OH para añadir el siguiente nucleótido y el dideoxinucleótido incorporado carece de este grupo hidroxilo.

Concretamente, se utilizan dideoxinucleótidos marcados con compuestos fluorescentes (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1) llevando a cabo la reacción de secuenciación en termocicladores ABI GeneAmp PCR System 9700 cuya resolución y análisis de los productos marcados se realiza en un secuenciador capilar ABI 3100.

3.6 Ensayo de longevidad

3.6.1 Obtención de la población de estudio

Con el fin de obtener una población con un número de individuos suficientemente grande, sin contaminación y además sincronizada para llevar a cabo las curvas de longevidad, se realizó la sincronización por lejía llamada *Egg Preparation*. Este método (modificación de WORMBOOK, 2015) consiste en dejar crecer a los gusanos hasta obtener adultos con muchos huevos dentro sin llegar a acabarse la comida de la placa y someterlos a tres lavados con M9 1x centrifugando 2' a 2500 r.p.m. A continuación se añade la solución de *Egg Prep* (composición en Tabla 10) agitándolo en agitador de vórtice (*vortex*) durante 8 minutos para conseguir la rotura de los gusanos, mientras que la lejía de la solución descompone los tejidos del gusano, consiguiendo la liberación de los huevos. Después se centrifuga a 3200 r.p.m 5' para que precipiten los huevos preferentemente. Este paso se repite hasta llegar a un consenso entre gusanos rotos y huevos sin dañar y se retira la solución de *Egg Prep* sustituyéndola por M9 1x para 3 lavados sucesivos.

Tabla 10. Componentes de la solución de *Egg Prep* por cada 100mL.

Componente	Volumen
NaOCl (~37%)	5mL
KOH(5M)	3.2mL
H ₂ O MiliQ	91.8mL

Una vez realizada la *Egg Prep*, los huevos se dejaron crecer a 20°C en agitación (180rpm) durante 1 ó 2 noches en M9 1x, quedando los nematodos arrestados en el estadio de larva L1 hasta que se transfirieron a las placas NGM agar para el comienzo del estudio. Una peculiaridad de *C. elegans* es que las larvas en estadio larvario 1 (L1) son capaces de sobrevivir en ausencia de comida varios días. Esto se aprovecha para permitir que todos los embriones se desarrollen hasta alcanzar el estadio L1, sincronizando así la población.

En caso de que este método no funcionara por la sensibilidad de ciertas cepas a la lejía se obtuvo la población para el estudio mediante el método de puesta de huevos o *Egg Laying*, como se describe en Yee *et al.*, (2014), que consiste en dejar a los nematodos adultos poner huevos durante un corto periodo de tiempo en placas nuevas. A continuación, se eliminaron los adultos y se dejó a los huevos eclosionar, obteniendo así la población sincronizada.

3.6.2 Análisis de supervivencia

Una vez obtenida la población, se transfirieron a 15 placas 10 gusanos hermafrodita de la misma edad, obteniendo una n=150 para el estudio de cada cepa. Todas las cepas se mantuvieron a 20°C.

En estos ensayos se contrastó la longevidad de cada cepa mutante con su cepa salvaje de mismo fondo genético. Para ello, se contabilizó el número de gusanos vivos y muertos diariamente y a posteriori se calculó el porcentaje de animales vivos dando lugar a las curvas de Kaplan-Meier. Esto se llevó a cabo visualizando si se movían y, en caso de nematodos de edad avanzada cuando el músculo está más degenerado y dejan de moverse, mediante el toque suave de la cabeza del gusano con un pelo de pestaña, al cual reaccionan en caso de estar vivos.

Para mantener las condiciones óptimas necesarias para el estudio y que éstas tengan el mínimo efecto en la longevidad, que es el parámetro de interés a analizar, los nematodos fueron transferidos diariamente a placas nuevas con comida recién sembrada. Esto garantizaba que los gusanos tuvieran comida fresca siempre, evitando el paso al estadio de arresto *dauer* o el simple efecto que podía tener la privación de nutrientes en los mismos, así como el efecto perjudicial que puede tener la ingesta de bacterias demasiado crecidas sobre ellos o incluso que el agar estuviera demasiado seco. Además un punto crucial era conseguir mantener la población de estudio controlada, puesto que los gusanos descendientes pueden llegar a alcanzar un tamaño similar a los gusanos de interés si se dejan crecer unos días, y transfiriéndolos a placas nuevas se garantizaba el deshacerse de esas generaciones de descendientes que no eran de interés y podían distorsionar el análisis.

3.6.3 Eventos de muerte censurados

Según los métodos descritos por Lionaki & Tavernarakis (2013), se excluyeron ciertos gusanos del análisis cuando presentaban defectos obvios que interferían en el proceso normal de envejecimiento, o bien habían sido comprometidos por mal manejo experimental o accidentes. Ejemplos de estos eventos censurados son:

- Eclosión de huevo interna (fenotipo *bag-of-worms*): Son gusanos hermafrodita con huevos eclosionados en su interior moviéndose que, literalmente, devoran a la madre hasta que son capaces de escapar penetrando la cutícula.
- Protrusión de la vulva: Gusanos cuya vulva está desplazada hacia delante y sobresale de sus límites normales, interfiriendo así en el proceso normal de puesta de huevos.
- Rotura de la vulva: El intestino queda expuesto fuera de su cuerpo a través de la abertura de la vulva.
- Parálisis o movimiento descoordinado: Puesto que no van asociados al fenotipo, estos síntomas indican el daño o mal manejo experimental del gusano.
- Contaminación fúngica o bacteriana: Contaminación de las placas de NGM agar con bacterias ajenas a las intencionadas para la alimentación o hongos pueden tener un efecto negativo en la supervivencia del nematodo.

Con el fin de mantener una población de 150 gusanos por cepa, se llevó de manera paralela y en las mismas condiciones una reserva de gusanos sincronizados con los que reponer a los gusanos de estudio en caso de que sufrieran un evento de muerte censurado.

3.6.4 Curvas de longevidad

Se analizaron los datos mediante el software de GraphPad Prism v6.0, que genera una matriz en la que '1' es evento de muerte y '0' evento censurado, a los que hay que asignar día e individuo. Con estos datos, se dibujaron las curvas de longevidad y se sometieron a dos test estadísticos, el test Log-rank (Mantel-Cox) y el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon, para analizar su significatividad.

El test Log-rank (Mantel-Cox) es una técnica estadística para contrastar las funciones de supervivencia de dos poblaciones. Es una prueba no paramétrica que puede usarse en

presencia de datos censurados. La prueba de Mantel-Cox compara las estimaciones de la función de riesgo de dos grupos en cada unidad de tiempo en que ocurre un evento. Se construye comparando el número observado y esperado de sucesos en uno de los grupos en cada uno de esos momentos y agrupando los resultados para obtener un valor global.

El test de Gehan-Breslow-Wilcoxon da más peso a los eventos de muerte en tiempos tempranos, en contraste con lo que hace el test Log-rank que da el mismo peso en todos los tiempos.

El test Log-rank es el más estandarizado y potente de los dos, si la asunción de riesgos proporcionales es verdadera. Riesgos proporcionales implica que el ratio de funciones de riesgo (muertes por tiempo) es el mismo en todos los puntos. El test de Gehan-Breslow-Wilcoxon no requiere un ratio de riesgo constante, pero sí que un grupo tenga mayor riesgo consistentemente que el otro. Si las dos curvas se cruzan, un grupo tendrá mayor riesgo en tiempos tempranos y otro en tiempos tardíos. Eso podría ser sólo una coincidencia del muestreo aleatorio, y la asunción de riesgos proporcionales ser aún válida, lo que hace a este test útil en estos casos.

3.7 Ensayo de envejecimiento saludable (*healthspan*)

Se generó una población sincronizada de gusanos mediante *Egg Prep* (apartado 3.6.1) y se dejaron crecer a 20°C hasta alcanzar el estadio de adultos jóvenes. Desde entonces, cada 5 días, se sometieron a 4 pruebas descritas por Bansal, A. *et al* (2014) para tratar de dilucidar si el incrementar la longevidad implica incrementar también el periodo de vida saludable o simplemente se está prolongando el periodo de fragilidad con su respectivo aumento de incidencias de enfermedades relacionadas con la edad.

3.7.1 Estrés térmico

Cada 5 días, una palca con 30 gusanos fue transferida a 37°C y se evaluó la capacidad de los gusanos a resistir este estrés contabilizando las muertes cada 2 horas. El porcentaje de vivos y la supervivencia media bajo estrés térmico se calcularon.

3.7.2 Estrés oxidativo

Se prepararon placas de 24 pocillos con NGM agar y *E. coli* sobre las cuales se depositó 75µL de una solución de paraquat (36541 FLUKA) a una concentración de 0.25M, dejándolas en el agitador 1 hora y 2 horas en la cabina de flujo laminar para su completo secado. El paraquat es un agente oxidante que actúa sobre el sistema de membranas del Fotosistema I. Los electrones libres del Fotosistema I reaccionan con el ión de paraquat para darle forma de radical libre, que en presencia de oxígeno rápidamente se reconvierte y en ese proceso produce súper óxidos (PARAQUAT INFORMATION CENTER, 2015). Los súper óxidos atacan a los ácidos grasos insaturados de la membrana, abriendo rápidamente y desintegrando las membranas y tejidos de las células. Luego, el proceso del ión de paraquat / radical libre se recicla y produce más cantidades de súper óxido hasta que cesa el suministro de electrones libre

Cada 5 días, 30 gusanos en grupos de 10 fueron transferidos a estas placas para someterlos a estrés oxidativo, contabilizando las muertes cada 2 días, y transfiriéndolos a pocillos con medio, comida y paraquat nuevo cada 5 días. El porcentaje de vivos y la supervivencia media bajo estrés oxidativo se calcularon.

3.7.3 Locomoción en medio sólido

Cada 5 días, 15 gusanos se transfieren a placas nuevas individualmente dejándolos 5 minutos moverse a su antojo para después eliminarlos y fotografiar el recorrido en el colchón de bacteria comida añadiendo un patrón de 0.5cm para posibilitar el análisis y comparación de trayectorias. Las imágenes se analizaron con ImageJ (NIH) contabilizando la distancia media del recorrido realizado.

3.7.4 Locomoción en medio líquido

Cada 5 días, 15 gusanos se transfirieron individualmente a placas de 24 pocillos con 1mL de M9 1x en cada pocillo. Se dejaron 30 segundos para que el gusano se equilibrara y a

continuación se grabó el *thrashing* (movimiento del gusano en el que cambia completamente la dirección de su cabeza y/o cola hacia un mismo lado al nadar en medio líquido). La media de *thrashings* por minuto (frecuencia) fue calculada.

3.8 Técnicas de microscopía

En este trabajo ha sido necesario el uso de distintas técnicas de microscopía que han permitido la fácil manipulación y visualización de los nematodos. La lupa binocular (Leica, modelo MZ6 40x) es la más indispensable puesto que es la más accesible para el manejo eficiente de *C. elegans*. En los casos de cruzamientos detallados en el apartado 3.5.1, en los que había que llevar a cabo la selección de candidatos mutantes y salvajes mediante la visualización del reportero de GFP, se utilizó la lupa de fluorescencia 1FAxioZoom V16 112x (Zeiss). Esta lupa permitía visualizar la proteína GFP en las neuronas marcadas de los nematodos vivos.

Para los estudios de *healthspan* tanto las fotos como los vídeos fueron tomados con la lupa de fluorescencia nombrada anteriormente acoplada a la cámara AxioCam MRm Zeiss empleando el software de Zeiss ZEN pro 2011, para su obtención, y el ImageJ (NIH) para su procesamiento y posterior análisis como viene indicado en el apartado correspondiente 3.7.3.

4. RESULTADOS

4.1 Obtención de las cepas salvaje y mutante de fondo genético común

Las cepas generadas en este proyecto mediante cruces genéticos (apartado 3.5) están incluidas en la Tabla 3. Concretamente son las cepas NFB654, NFB655, NFB677, NFB678, NFB679, NFB680, NFB681 y NFB682.

Para garantizar la presencia de la mutación en homocigosis en las cepas es conveniente el genotipado de las mismas. El genotipado permite la identificación de individuos mutantes, salvajes y heterocigotos para la mutación. Los cebadores utilizados están incluidos en la Tabla A5 del Anexo II y las PCRs se pusieron a punto mediante PCR de gradiente como se especifica en el apartado 3.5.2. Se encontraron problemas para poner a punto las PCRs de *egl-1* y *ced-13* debido a que son mutaciones desconocidas o deleciones de varias kilobases respectivamente, por lo que no se pudieron genotipar dichas cepas y no se utilizaron en este trabajo.

En la Figura 8 se muestra un ejemplo de genotipado de la cepa salvaje y mutante para el gen *ced-4(n1162)*, que sirve de manera análoga para ilustrar lo observado en todos los casos en que la mutación era una sustitución (indicado en Tabla 3). En este caso se emplearon 10 placas F2 de los posibles candidatos y se incluyó un control positivo (C+; ADN procedente de un lisado de gusanos salvajes N2 que hubiese funcionado previamente en otras PCRs) y un control negativo (C-; mezcla de la reacción de PCR sin ADN)

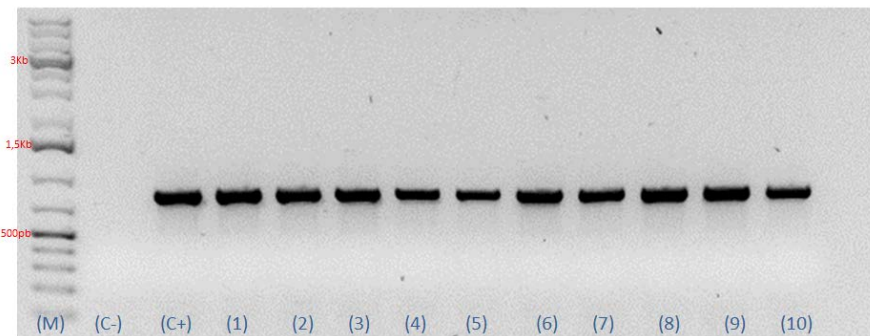


Figura 8. Gel de electroforesis para el genotipado del gen *ced-4*. Donde: (M) Marcador de pesos moleculares de 1Kb, (C-) control negativo, (C+) control positivo, (1-10) candidatos WT y mutantes. Según los cebadores diseñados, el tamaño de banda esperado es de 799 pb. En todos los casos se aprecia que el tamaño es el correcto. Puesto que es una sustitución, no se pueden apreciar diferencias entre cepas salvajes y mutantes en cuanto a tamaño del producto de PCR, el paso siguiente para distinguir entre wt, heterocigotos y mutantes fue mandar estas bandas a secuenciar.

El segundo tipo de genotipado fue el de las deleciones (Tabla 3), ejemplificado en la Figura 9. En este caso se mapeó la variación alélica *gk138* del gen *cep-1* que consiste en una deleción de 1304 pb. Los cebadores se diseñaron flanqueando la deleción, de modo que se amplificara una región de 2199 pb en la cepa salvaje y de 539 pb en la cepa mutante.

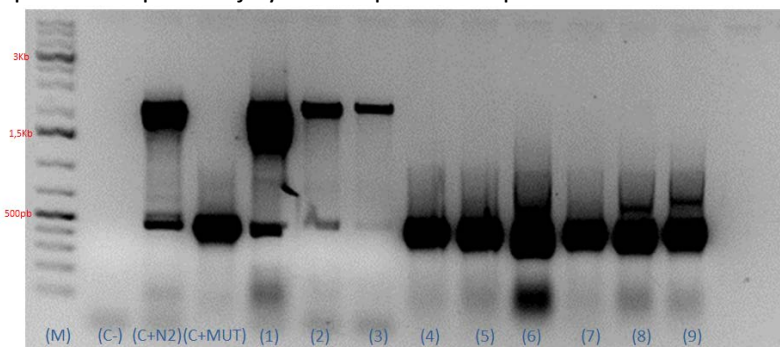


Figura 9. Gel de electroforesis para el genotipado del gen *cep-1*. Donde: (M) Marcador de pesos moleculares de 1Kb, (C-) control negativo (sin ADN), (C+N2) control positivo de cepa salvaje con una banda esperada de 2199pb, (C+MUT) control positivo del mutante de *cep-1*, variación alélica *gk138*, con

una banda esperada de 539pb correspondiente a mutante según los cebadores diseñados con una delección de 1304pb, (1-3) candidatos a cepa salvaje, (4-9) candidatos a cepa mutante. Para confirmar los resultados se procedió a secuenciar todos los candidatos.

Como se ha detallado en el apartado 3.5.4, todos los resultados obtenidos en gel de la Figura 8 se analizaron por secuenciación, obteniendo cromatogramas que fueron analizados como se muestra a continuación. La mutación *ced-4(n1162)* consiste en una sustitución de un nucleótido citosina (C) por uno timidina (T), simbolizando el cambio como C>T. Entre nuestros candidatos podríamos contemplar las tres casuísticas posibles: homocigoto salvaje (dos variantes alélicas C), heterocigoto (una variante alélica C y otra T) y homocigoto mutante (dos variantes alélicas T).

A continuación se muestra los resultados de la secuenciación para el gen *ced-4*. La Figura 11 muestra un fragmento de la secuencia del gen y en azul se resalta el nucleótido que varía en la mutación *n1162*. En este caso se observa una citosina, lo que indica que se trata de un individuo salvaje. Esto se corrobora en su correspondiente cromatograma (Figura 2) donde se aprecia un único pico correspondiente al nucleótido C.

En primer lugar, si el individuo fuera de tipo salvaje, el gen *ced-4(n1162)* tendría una C en la posición indicada, como se puede apreciar en la secuencia (Figura 10) y su respectivo cromatograma (Figura 11).



Figura 10. Resultado de la secuenciación para el gen *ced-4(n1162)* en cepa salvaje. En azul se muestra la citosina en su posición natural.

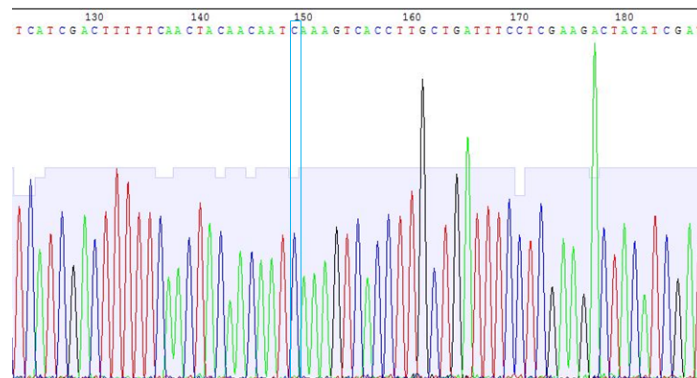


Figura 11. Cromatograma de la secuencia de *ced-4(n1162)* en cepa salvaje, con el nucleótido citosina encuadrado en azul, así como su respectivo pico.

De manera análoga se analizó el resto de candidatos identificando los mutantes como se ejemplifica en las Figuras 12 y 13.



Figura 12. Resultado de la secuenciación para el gen *ced-4(n1162)* en cepa mutante. En azul se muestra la timina mutada en la posición de la citosina natural.

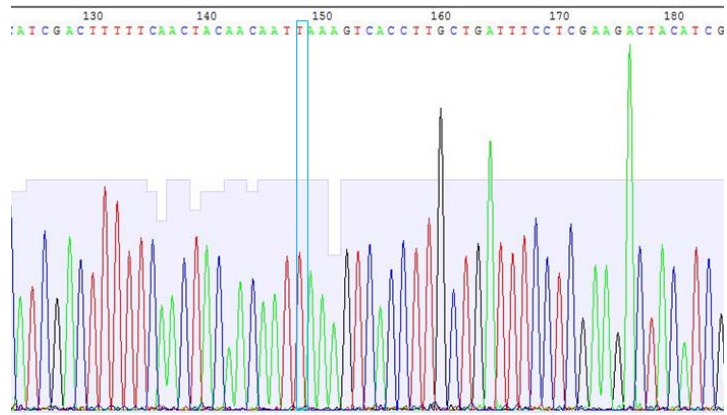


Figura 13. Cromatograma de la secuencia de *ced-4(n1162)* en cepa mutante con el nucleótido timina encuadrado en azul, así como su respectivo pico.

Por último, a pesar de la preselección por el fenotipo *cat-1::gfp* del PDE de los candidatos salvaje y mutante se dio la casuística de identificación de algún heterocigotos en los cuales, como era de esperar, se observó doble pico C/T como se indica a continuación en la Figura 14.

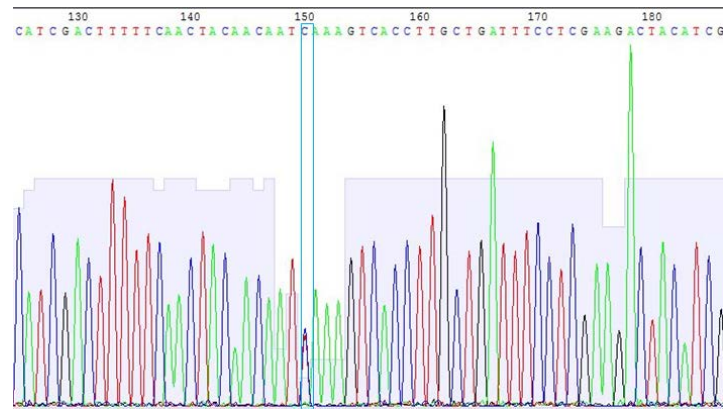


Figura 14. Cromatograma de la secuencia de *ced-4(n1162)* en la cepa heterocigoto. Señalado con el recuadro azul se observan dos picos solapados que corresponden a citosina y timina, indicando que es un individuo heterocigoto.

4.2 Curvas de longevidad

Se constató el efecto de las mutaciones de la vía de la apoptosis en la vida del nematodo obteniendo las siguientes curvas de longevidad donde se representa el porcentaje de animales vivos frente al tiempo (días). En las curvas se hace referencia a los animales salvajes con su término en inglés *wild type* (WT) y a los animales mutantes con el nombre del gen de la vía de la apoptosis correspondiente.

4.2.1 *ced-9(n1950)* alelo ganancia de función de Bcl-2

Puesto que el gen *ced-9* era de especial interés al ser el homólogo en *C. elegans* de Bcl-2, se realizaron dos réplicas biológicas del ensayo de longevidad.

En ambas réplicas, las curvas generadas (Figura 15) se sometieron al análisis estadístico mencionado en el apartado 3.6.4 y se obtuvo una diferencia significativa entre ambas. Los resultados resumidos se muestran en la Tabla 11.

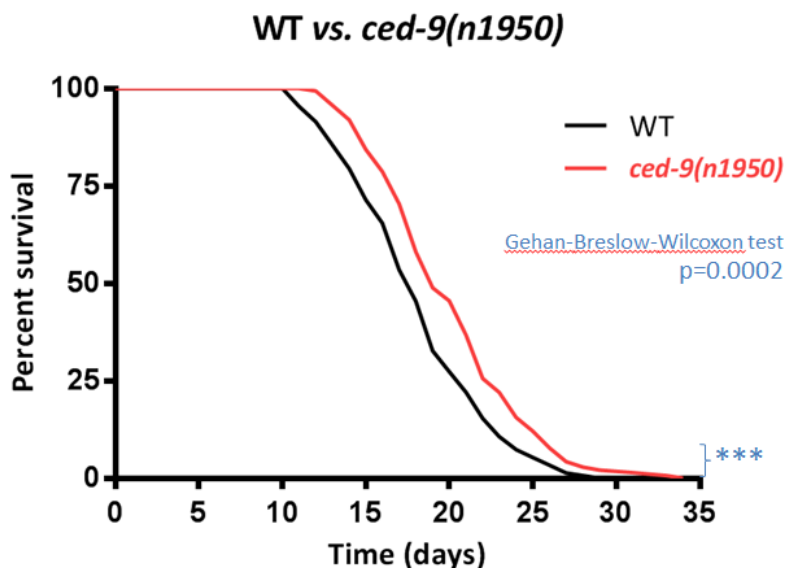


Figura 15. Curva de longevidad WT vs. *ced-9(n1950)* réplica 2.

Tabla 11. Resumen p-valor de la curva de longevidad WT vs. *ced-9(n1950)* réplica 1 y réplica 2.

	p-valor test Log-rank (Mantel-Cox)	p-valor test Gehan-Breslow-Wilcoxon	Resumen p-valor
Réplica 1	0.0010	0.0044	**
Réplica 2	0.0003	0.0002	***

De la misma manera, cuando se analizaron los parámetros relativos a la esperanza de vida, se encontró que entre la cepa salvaje y la mutante para *ced-9(n1950)* había una diferencia de un día en la vida media de la cepa silvestre y la mutante en ambas réplicas, cosa que para un organismo que vive una media de 19 días supuso una diferencia a recalcar, supone alrededor de un 4% de extensión en la esperanza de vida lo que equivale a aumentar en unos 3 años la esperanza de vida en humanos. Además, la supervivencia máxima, es decir, los gusanos más longevos que podrían ser considerados los ‘centenarios’ de estos ensayos y por tanto eran de interés, vivían en torno a 4 días más en estos mutantes que en la cepa silvestre como se muestra en la Tabla 12 (unos 12 años de más si se considera en escala humana).

Tabla 12. Datos de supervivencia media y supervivencia máxima de cepa silvestre vs. *ced-9(n1950)* en las réplicas 1 y 2.

	Supervivencia media (días)		Supervivencia máxima (días)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
WT	19	18	33	29
<i>ced-9(n1950)</i>	20	19	37	34

4.2.2 *ced-4(n1162)* alelo pérdida de función de Apaf

El análisis comparativo entre animales salvajes y mutantes *ced-4* resultó en una diferencia significativa entre ambas al realizar el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon. No obstante, con el test log-rank se obtuvo un $p=0.0938$, siendo no significativa. Esto puede deberse a las diferencias entre ambos test comentadas en el respectivo apartado 3.6.4. (Figura 16)

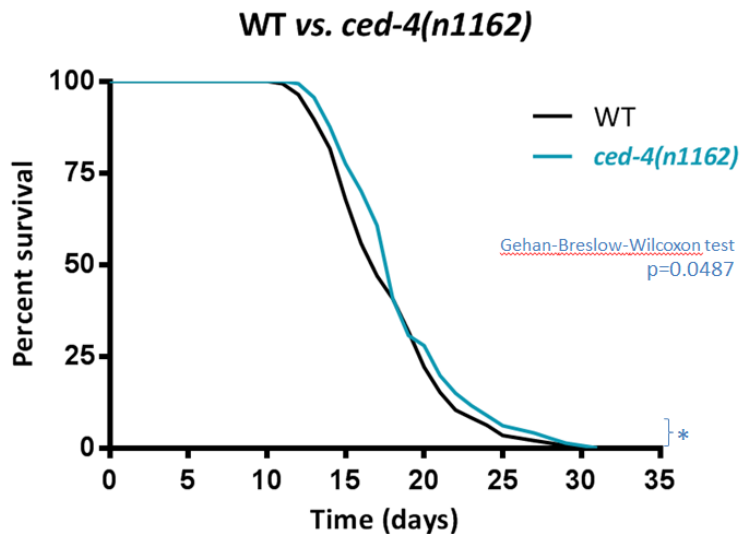


Figura 16. Curva de longevidad WT vs *ced-4*(n1162).

En esta ocasión, también se halló un día de diferencia en la supervivencia media de los animales y cinco en la supervivencia máxima como se ilustra en la Tabla 13.

Tabla 13. Datos de supervivencia media y supervivencia máxima de cepa tipo silvestre vs. *ced-4*(n1164).

	Supervivencia media (días)	Supervivencia máxima (días)
WT	18	29
<i>ced-4</i> (n1162)	19	34

4.2.3 *ced-3*(n717) alelo de pérdida de función de Caspasa 9

En este caso, las curvas de longevidad de los animales salvajes y mutantes para el gen *ced-3* no resultaron significativamente diferentes. Ninguno de los tests estadísticos desveló una diferencia significativa entre ambas curvas (Figura 17) y, de la misma manera, se encontró que la supervivencia media era la misma en ambas cepas. Sin embargo, la supervivencia máxima fue mayor en el mutante (Tabla 14).

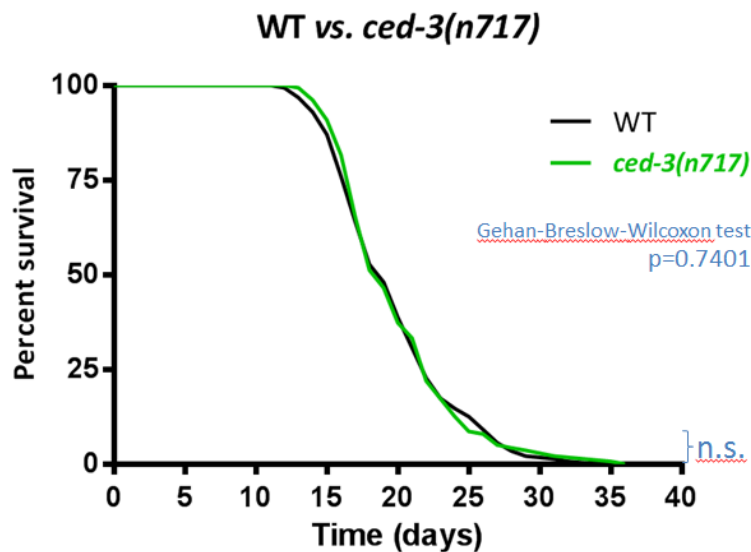


Figura 17. Curva de longevidad WT vs *ced-3*(n717).

Tabla 14. Datos de supervivencia media y supervivencia máxima de la cepa tipo silvestre vs. *ced-3(n717)*

	Supervivencia media (días)	Supervivencia máxima (días)
WT	19	34
<i>ced-4(n1162)</i>	19	36

4.2.4 *hus-1(op241)* alelo de pérdida de función del “check point” de ciclo celular *hus-1*

Sorprendentemente, el caso del gen *hus-1* reveló una diferencia significativa siendo más longevo el mutante que el tipo silvestre (Figura 18) con un valor de significación $p=0.0022$ en el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon y de $p=0.0262$ en el test Log-rank.

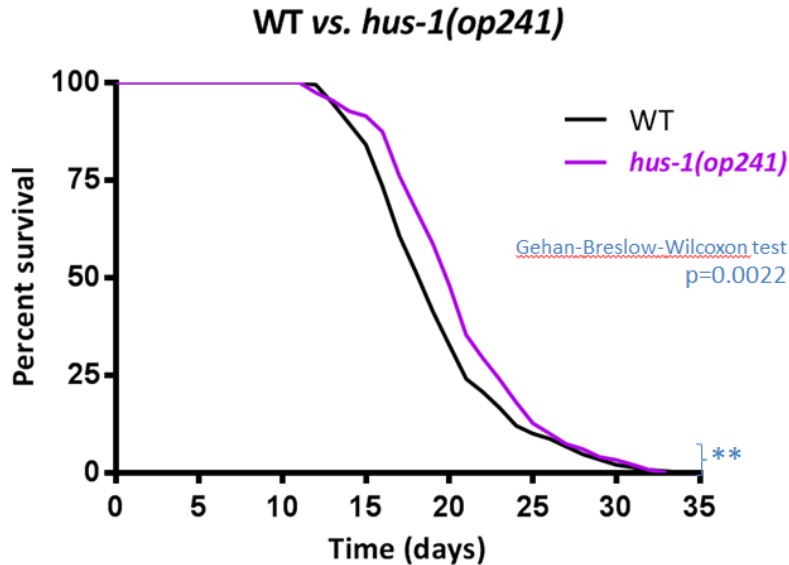


Figura 18. Curva de longevidad WT vs *hus-1(op241)*.

Los datos de supervivencia media desvelaron un día de diferencia entre animales salvajes y mutantes (Tabla 15), aunque esta vez la supervivencia máxima resultó ser mayor en la cepa salvaje.

Tabla 15. Datos de supervivencia media y supervivencia máxima de cepa tipo silvestre vs. *hus-1(op241)*.

	Supervivencia media (días)	Supervivencia máxima (días)
WT	19	34
<i>ced-4(n1162)</i>	19	36

4.3 Envejecimiento saludable

Puesto que se tenía especial interés en el posible papel de Bcl-2 como mediador de envejecimiento saludable, las pruebas de *healthspan* se realizaron comparando cepa salvaje y la cepa *ced-9(n1950)* (alelo ganancia de función de Bcl-2). Los resultados obtenidos en las pruebas descritas en el apartado 3.7 son los siguientes (Figura 19 A-D).

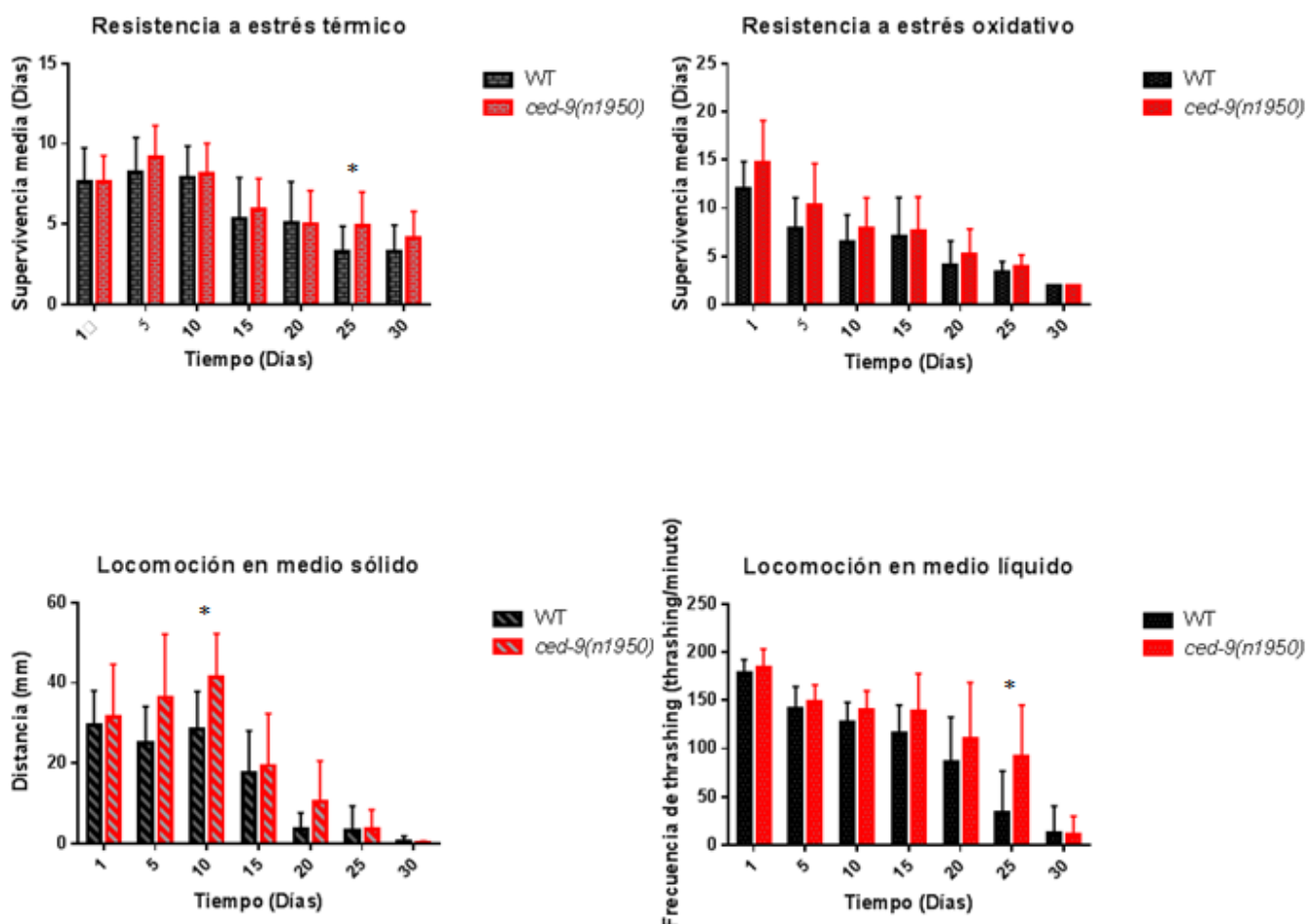


Figura 19. Resultado de las pruebas de envejecimiento saludable. (A) Resistencia a estrés térmico, (B) Resistencia a estrés oxidativo, (C) Locomoción en medio sólido, (D) Locomoción en medio líquido.

En un análisis estadístico preliminar realizado en GraphPad Prism v6.0 de análisis por grupos realizando múltiples t-test sin asumir una desviación típica constante, empleando el método de corrección para comparaciones múltiples de Holm-Sidak con $\alpha=5.000\%$ desveló que algunos de los resultados eran significativos (indicados con asteriscos). No obstante, se está buscando un mejor modelo estadístico que se ajuste al tipo de datos obtenidos y las características del estudio presente.

Pese a esto, y a ser una primera ronda de experimentos bastante preliminar, los resultados tienden a indicar que podría existir una tendencia en los mutantes de *ced-9(n1950)* de llevar un envejecimiento más saludable que en animales salvajes reteniendo una mayor tolerancia al estrés térmico y oxidativo y una mejor movilidad.

5. DISCUSIÓN

El estudio de los mecanismos que regulan envejecimiento, y más aún aquellos responsables de un envejecimiento saludable, es de gran interés ya que el conocimiento adquirido puede beneficiar la calidad de vida de muchas personas y familiares.

En el presente trabajo nos planteamos estudiar una posible relación entre niveles elevados de la proteína antiapoptótica Bcl-2/Bcl-xl (*ced-9* en *C. elegans*) con longevidad y elevado '*healthspan*'. El proyecto se plantea en base a unos resultados previos del laboratorio del Dr José Viña (*Borras et al.*, artículo en preparación) donde el estudio comparativo de los patrones de expresión entre centenarios, septuagenarios y jóvenes revela que los centenarios tienen activada la proteína Bcl-xl.

Para dar una base funcional a esta correlación nos planteamos el uso de *C. elegans* como modelo in vivo de longevidad.

En primer lugar, nos centramos en el estudio de *ced-9(n1950)* (ganancia de función de Bcl-2, proteína antiapoptótica). Nuestros resultados parecen indicar que podría ser que niveles altos de dicha proteína actuaran reprimiendo el proceso de apoptosis intrínseca (mitocondrial) y que esto tuviera un efecto mediando longevidad *in vivo*.

Por otra parte, estudios en cultivos celulares en que se infectaron fibroblastos embrionarios de ratón (*mouse embryo fibroblasts*, MEFs) con retrovirus que contenía un vector codificando Bcl-xL dieron lugar a una expresión reducida de reguladores del ciclo celular asociados con la edad en comparación con los MEFs control. Por añadido, en estas células la expresión de Bcl-xL disminuyó significativamente la actividad β -galactosidasa y Dcr2, marcadores de senescencia, y les confirió efectos protectores contra daño oxidativo (*Borras et al.*, artículo en preparación). Así pues, parece que la sobreexpresión de Bcl-xL tiene efectos antiapoptóticos y de antienvjecimiento celular, es decir, que la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas podría estar teniendo un efecto en envejecimiento saludable o bien 'envejecimiento excepcional'.

Para ahondar en el posible papel de niveles altos de Bcl-xl no solo en longevidad sino también en longevidad saludable realizamos nuestros ensayos de '*healthspan vs. gerospan*' en el mismo mutante *ced-9(n1950)*. Nuestros resultados, pese a que son preliminares, apoyan esta idea puesto que parece que los nematodos mutantes que tienen reprimida la apoptosis intrínseca no solo viven más, sino que parece entreverse que envejecen mejor como muestra su resistencia a calor extremo, estrés oxidativo y su mayor movilidad. Todas estas capacidades son claves en personas de avanzada edad para mantener una vida más autónoma y saludable.

Finalmente, los resultados obtenidos del análisis de los mutantes *ced-9* nos hicieron plantearnos hasta qué punto otros mediadores de apoptosis puedan tener un papel importante en longevidad. Hay multitud de genes que regulan apoptosis, en este trabajo, como primera aproximación nos centramos en estudiar la longevidad en mutantes de pérdida de función de tres proteínas pro-apoptóticas: la caspasa *ced-3*, el complejo Apaf-1 *ced-4* y la '*DNA damage checkpoint*' *hus-1*.

Nuestros resultados, aunque preliminares, parecen mostrar que mutantes tanto para *ced-4* como para *hus-1* tienen elevada longevidad. Esto refuerza la idea de que niveles bajos de apoptosis intrínseca son beneficiosos. Por otro lado, es interesante que mutantes de *ced-3* no parecen tener diferencias significativas respecto a animales salvajes, en un futuro realizaremos curvas de longevidad con otros alelos de *ced-3* para confirmar que nuestra observación inicial es cierta. De ser así, esto nos podría indicar que el efecto de *ced-9*, *ced-4* y *hus-1* en longevidad no son debidos específicamente a un bloqueo de apoptosis (que también ocurre en los mutantes de *ced-3*) y que ha de explicarse por otros mecanismos. Uno de esos posibles mecanismos sería la protección del estrés oxidativo y la integridad de la mitocondria ya que tanto *ced-9* como *ced-4* interaccionan con este orgánulo. De hecho, mutaciones en cyc-

1 (citocromo C oxidasa) tienen elevada longevidad (Lee *et al.*, 2003), lo que concuerda con el papel protector de las mutaciones *ced-9* y *ced-4* y una protección de la mitocondria.

En resumen, los resultados de este TFG son la primera demostración *in vivo* de que niveles reducidos de apoptosis intrínseca pueden asociarse a una mayor longevidad y, aún más importante a un envejecimiento más saludable. Por tanto, estos resultados serán incluidos en el artículo que el Dr. Viña está preparando y supondrán la primera publicación científica en que participe (Borras *et al.*, artículo en preparación). Además, estos resultados plantean muchas nuevas preguntas, y gracias a las herramientas que nos proporciona el uso de *C. elegans* en longevidad abren un nuevo proyecto que el laboratorio de la Dra. Nuria Flames se plantea abordar en el futuro.

6. CONCLUSIONES

- I. Se han obtenido 8 cepas para el estudio del efecto de las mutaciones en la vía de la apoptosis como mediadores de longevidad. Actualmente se está trabajando para genotipar las dos restantes cepas mutantes y sus correspondientes cepas salvajes de mismo fondo genético.
- II. *C. elegans* es un modelo útil y valioso para el estudio *in vivo* de longevidad y apoptosis. Su uso nos puede ayudar a desvelar mecanismos de control de la longevidad que estén filogenéticamente conservados.
- III. La mutación de ganancia de función de la proteína anti-apoptótica *ced-9* (homólogo de Bcl-2) resulta en un incremento en la supervivencia media y máxima del nematodo, así como en una tendencia a retener la capacidad de resistencia a estreses térmicos y oxidativos y a una mejor locomoción a lo largo del tiempo, aunque son necesarias más replicas biológicas para poder confirmar esto último. Este efecto podría deberse a una aparente represión de la apoptosis intrínseca en base a los estudios complementarios del laboratorio del Dr Viña mencionados en la discusión.
- IV. La mutación de pérdida de función en las proteínas pro-apoptóticas *ced-4* (Apaf-1) y *hus-1* ('*checkpoint protein*') resulta de la misma manera en un incremento en la supervivencia media del nematodo, sugiriendo igualmente que niveles bajos de apoptosis intrínseca son beneficiosos.
- V. La mutación de pérdida de función de la proteína pro-apoptótica *ced-3* (Caspasa 9) del alelo de referencia (n717) parece no tener efectos en la longevidad de *C. elegans*, lo que podría sugerir que el efecto observado en *ced-9*, *ced-4* y *hus-1* no vendría mediado por la vía canónica de la apoptosis. No obstante se debe comprobar esta afirmación para otros alelos y estudiar otros posibles mecanismos implicados.

7. BIBLIOGRAFÍA

AVERY, L. & HORVITZ, H.R. (1987) A cell that dies during wild-type *C. elegans* development can function as a neuron in a *ced-3* mutant. **Cell** 51, 1071-1078.

BANSAL, A.; ZHU, L.J.; YEN, K. & TISSENBAUM, H A. (2015) Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants. **Proc Natl Acad Sci U S A** [Internet].

BLUHER, M.; KAHN, B.B., & KAHN, C.R. (2003). Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. **Science** 299, 572-574.

BRENNER S. (1974). The Genetics of *Caenorhabditis elegans*, **Genetics**, 77, 71-94.

C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM. (1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology", **Science**, 282 (5396), 2012-2018.

CHINNAYIAN A.M. & DIXIT V.M. (1996) The cell-death machine. **Curr. Biol.** 6, 555-562.

CHRISTENSEN K; DOBLHAMMER G; RAU R & VAUPEL JW (2009) Ageing populations: The challenges ahead. **Lancet** 374(9696):1196–1208.

CLANCY, D.J.; GEMS, D.; HARSHMAN, L.G.; OLDHAM, S.; STOCKER, H.; HAFEN, E.; LEEVERS, S.J., & PARTRIDGE, L. (2001). Extension of life-span by loss of *CHICO*, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. **Science** 292, 104-106.

DILLIN, A.; CRAWFORD, D.K., & KENYON, C. (2002). Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*. **Science** 298, 830-834.

ELLIS, H.M. & HORVITZ, H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode. *C. elegans*. **Cell** 44,817-829.

ELLIS, R.E.; YUAN, J. & HORVITZ, H.R. (1991b) Mechanisms and functions of cell death. **Annu. Rev. Cell Biol.** 7,663-698.

FINCH, C.E. (1990). Longevity, Senescence, and the Genome, Paperback edition edn (Chicago: The University of Chicago Press).

FRIEDMAN, D.B. & JOHNSON, T.E. (1998) A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. **Genetics** 118, 75-86.

GARTNER, A. ; MILSTEIN S.; AHMED S; HODGKIN J & HENGARTNER, M. O. (2000). A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage – Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans* **State University of New York at Stony Brook**. 5, 435–443 .

GENEREVIEWS NCBI(2015) Genotyping entry.

HEKIMI, S.; BOUTIS, P., & LAKOWSKI, B. (1995) Viable maternal-effect mutations that affect the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics** 141, 1351-1364.

- HENDERSON, S.T., & JOHNSON, T.E. (2001). *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Curr. Biol.** *11*, 1975-1980.
- HENGARTNER, M.O.; ELLIS, R.E., & HORVITZ, H.R. (1992) *C. elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. **Nature** *356*, 494-499.
- HENGARTNER, M.O. & HORVITZ, H.R. (1994a) *C. elegans* cell death gene *ced-9* encodes a functional homolog of mammalian proto-oncogene *bcl-2*. **Cell** *76*, 665-676.
- HENGARTNER, M.O. & HORVITZ, H.R. (1994b) Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. **Nature** *369*, 318-320.
- HOFFMANN A; LEVCHENKO A; SCOTT ML & BALTIMORE D. (2002) The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. **Science**. 2002 Nov 8;298(5596):1241-5.
- HOLZENBERGER, M.; DUPONT, J.; DUCOS, B.; LENEUVE, P.; GELOEN, A.; EVEN, P.C.; CERVERA, P., & LE BOUC, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. **Nature** *421*, 182-187.
- JENKINS N. L.; MCCOLL G. & LITHGOW G. J. (2004) Fitness cost of extended lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Proc. R. Soc. Lond. B** *271*, 2523–2526.
- KATO, M.; PARANJAPET, T.; MULLER, R.U.; NALLUR, S.; GILLESPIE, E. & KEANE, K. (2009). The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response *in vivo* in *C. elegans* and *in vitro* in human breast cancer cells. **Oncogene** *28*, 2419–2424.
- KERR J.F.; WYLLIE A.H. & CURRIE A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. Aug;26(4):239-57.
- KENYON, C.; CHANG, J.; GENSCHE, E; RUDNER, A., & TABTIANG, R. A (1993) *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. **Nature** *366*, 461-464.
- KIMURA KD; TISSENBAUM HA; LIU Y. & RUVKUN G. (1997) *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Science**. 1997 Aug 15;277(5328):942-6.
- KORSMEYER, S.J.; SHUTTER, J.R.; VEIS, D.J.; MERRY, D.E. & OLTVAI, Z.N. (1993) Bcl-2/Bax: A rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. **Sem. Cancer Biol.** *4*, 327-333.
- LAKOWSKI, B. & HEKIMI, S. (1996) Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. **Science** *272*, 1010-1013.
- LEE, R.Y.; HENCH, J., & RUVKUN, G. (2001). Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHL1 by the *daf-2* insulin-like signaling pathway. **Curr. Biol.** *11*, 1950-1957.

LEE SS; LEE RY; FRASER AG; KAMATH RS; AHRINGER J & RUVKUN G. (2003) A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. **Nat. Genet.** **33**, 40–8.

LETTRE, G. & HENGARTNER, M. O. (2006) Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** **7**, 97.

LIONAKI E & TAVERNARAKIS N. Cell Senescence. (2013) Assessing Aging and Senescent Decline in *Caenorhabditis elegans* : Cohort Survival Analysis . **Humana Press**.

LIN, K.; DORMAN, J.B.; RODAN, A. & KENYON, C. (1997). *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. **Science** **278**, 1319-1322.

LIN, K.; HSIN, H.; LIBINA, N., & KENYON, C. (2001). Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. **Nat. Genet.** **28**, 139-145.

LINTS R. & HALL D.H. (2009). Chapter “Male introduction”. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.2.1

MEARA E.; WHITE C. & CUTLER DM. (2004) Trends in medical spending by age, 1963–2000. **Health Aff (Millwood)** **23**(4):176–183

MORRIS, J.Z.; TISSENBAUM, H.A. & RUVKUN, G. (1996) A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** **381**, 536-539.

OGG S.; PARADIS S.; GOTTLIEB S.; PATTERSON GI.; LEE L.; TISSENBAUM HA. & RUVKUN G. (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. **Nature**. 1997 Oct 30;389(6654):994-9.

OGG, S., & RUVKUN, G. (1998). The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. **Mol. Cell** **2**, 887-893.

PARADIS, S.; AILION, M.; TOKER, A.; THOMAS, J.H., & RUVKUN, G. (1999). A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Genes Dev.** **13**, 1438-1452.

PARADIS, S., & RUVKUN, G. (1998). *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. **Genes Dev.** **12**, 2488-2498.

PARAQUAT INFORMATION CENTER, (2015) <http://paraquat.com/>

RATTAN, S.; KRISTENSEN P. & CLARK B.(2006) Understanding and Modulating Aging, *Annals of the New York Academy of Sciences* Volume 1067, Understanding and Modulating Aging pages xv–xvi.

REED, J.C. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. **Cell Biol** **124**, 1-6.

ROBERTSON, A. & THOMSON, N. (1982) Morphology of programmed cell death in the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans* larvae. **J. Embryol. Exp. Morphol.** 67, 89-100.

SULSTON, J.E. & HORVITZ, H.R. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Dev. Biol.** 56, 110-156.

SULSTON, J.E.; SCHIERENBERG, E.; WHITE, J.G. & THOMSON, J.N. (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Dev. Biol.** 100, 64-119.

TATAR, M.; KOPELMAN, A.; EPSTEIN, D.; TU, M.P.; YIN, C.M. & GAROFALO, R.S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. **Science** 292, 107-110.

TROEN BR. (2003) The biology of aging. **Mt Sinai J Med.**

VAUX, D.L.; WEISSMAN, I.L., & KIM, S.K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. **Science** 258, 1955-1957.

WARNER, H. (2006) Apoptosis: A Two-edged Sword in Aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**

WARNER H; HODES RJ & POCINKI K, (1997) What does cell death have to do with aging? **Journal of the American Geriatrics Society** [45(9):1140-1146]

WHITE, J.G.; SOUTHGATE, E. & THOMSON, N.J. (1991) On the nature of undead cells in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 331, 263-271.

WILLIAMS BD; SCHRANK B; HUYNH C; SHOWNKEEN R. & WATERSTON RH. (1992) A Genetic Mapping System in *Caenorhabditis elegans* Based on Polymorphic Sequence-Tagged Sites. **Genetics.** 1992 Jul;131(3):609-24.

WONG, A.; BOUTIS, P., & HEKIMI, S. (1995) Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. **Genetics** 139, 1247-1259.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014). 10 Facts on Ageing and the Life Course. www.who.int/features/factfiles/ageing/en.

WORMBOOK(2015) *Germline survival and apoptosis*.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; & CURRIE, A.R; (1980) Cell death: The significance of apoptosis. **Int. Rev. Physiol. Biochem.** 68,251-306.

YEE C; YANG W & HEKIMI S. (2014) The Intrinsic Apoptosis Pathway Mediates the Pro-Longevity Response to Mitochondrial ROS in *C. elegans*. **Cell** 157, 897–909.