



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE BIOLOGIA**

**Physiology of Ageing in Teleost Fish of the Genus**

***Nothobranchius***

**Fisiología del Envejecimiento en Peces Teleósteos**

**del Género *Nothobranchius***

**D. Alejandro Lucas Sánchez**

**Murcia 2014**



**Directores:**

- Dr. Jorge de Costa Ruiz (Profesor Titular, Universidad de Murcia, España)
- Dra. Pilar Mendiola López (Profesora Titular, Universidad de Murcia, España)
- Dr. Pedro Francisco Almáida Pagán (Investigador pos-doctoral, University of Stirling, Scotland, UK)

**Revisores externos:**

- Dr. Mino Belle (Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK)
- Dr. Nickolas Foulkes (Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology, Germany)

fi

fi

fi

fi

fi



La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada gracias a los contratos asociados a los proyectos “Desarrollo de aplicaciones clínicas de la termografía y actigrafía ambulatorias” por el Centro Médico Virgen de la Caridad, y por la “Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad RETICEF” por el Instituto de Salud Carlos III (RD06/0013/0019 y RD12/0043/0011). Otros proyectos que han financiado los trabajos aquí presentados han sido: “Envejecimiento prematuro y disrupción del sistema circadiano. Papel de la melatonina” por la CICYT (BFU2007-60658), “El ejercicio como factor modulador del envejecimiento. Efecto sobre el estrés oxidativo” por la Fundación Séneca (12005/PIV09), “Prevención de la cronodisrupción en el marcapasos central mediante iluminación saludable. Relevancia en el cáncer y el envejecimiento” por la CICYT (BFU2010-21945-C02-01) y por la Consejería de Agricultura y Agua de la Comunidad Autónoma de Murcia cofinanciado por los fondos FEDER.

fi

fi

fi

fi

fi

fi



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. JORGE DE COSTA RUIZ, Profesor Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGIA ANIMAL en el Departamento de FISIOLÓGIA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "FISIOLÓGIA DEL ENVEJECIMIENTO EN PECES TELEÓSTEOS DEL GÉNERO NOTHOBRANCHIUS", realizada por D. ALEJANDRO LUCAS SÁNCHEZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 29 de Noviembre de 2013

Mod:T-20







UNIVERSIDAD DE  
MURCIA.

D<sup>a</sup>. PILAR MENDIOLA LÓPEZ, Profesora Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGIA en el Departamento de FISIOLÓGIA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "FISIOLÓGIA DEL ENVEJECIMIENTO EN PECES TELEÓSTEOS DEL GÉNERO NOTHOBRANCHIUS", realizada por D. ALEJANDRO LUCAS SÁNCHEZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 29 de Noviembre de 2013

Pilar Mendiola

Mod:T-20

**fi**

**fi**



**UNIVERSITY OF  
STIRLING**

SCHOOL OF  
NATURAL SCIENCES

Institute of Aquaculture  
University of Stirling  
Stirling, FK9 4LA  
Scotland, UK

T: +44 (0) 1796 407078  
F: +44 (0) 1796 462133  
E: [aquaculture@stir.ac.uk](mailto:aquaculture@stir.ac.uk)

[www.stir.ac.uk](http://www.stir.ac.uk)

2-Diciembre-2013

D. PEDRO FRANCISCO ALMAIDA PAGÁN, Investigador post-doctoral Marie Curie del área de NUTRICIÓN del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "FISIOLOGÍA DEL ENVEJECIMIENTO EN PECES TELEÓSTEOS DEL GÉNERO NOTHOBRANCHIUS", realizada por D. ALEJANDRO LUCAS SÁNCHEZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Stirling, a 2 de Diciembre de 2013

fi

16<sup>th</sup> December 2013

RE: External advisor for the Thesis of D. Alejandro Lucas Sánchez of the University of Murcia

Dear Sir/Madame,

I am delighted to write this letter of support for the Doctoral Thesis of D. Alejandro Lucas Sánchez, entitled "Fisiología del envejecimiento en peces teleósteos del género *Nothobranchius*". This thesis consists of 4 experimental chapters where Alejandro investigates the effects of ageing on the circadian rhythms and physiology of the *Nothobranchius*. His work interrogated and assessed whether the *Nothobranchius* is a suitable model in which to study the ageing process, and age-related changes in the circadian system by using an array of physiological and behavioural measurements. In the last chapter, Alejandro reviewed the work done on the *Nothobranchius* and discussed future research directions and the suitability of this model in the study of ageing.

This work is original and highly relevant for age- and chronobiological-related research. It addresses fundamental questions and explores the suitability of a species with a short life span in which to study physiological and circadian rhythm changes associated with the ageing process.

This work is well presented, of a very high standard, with four chapters already in print. I therefore, strongly support its defense for a European PhD.

Sincerely yours,



Dr Mino Belle



**Institute of Toxicology and Genetics**

Head: Prof. Dr. Uwe Strähle  
Prof. Dr. Stefan Bräse

Hermann-von-Helmholtz-Platz 1  
76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

Prof. Dr. Nicholas S. Foulkes

Phone: +49 721 608 23394  
Fax: +49 721 608 23354  
Email: [nicholas.foulkes@kit.edu](mailto:nicholas.foulkes@kit.edu)  
Web: <http://www.kit.edu>

Our reference:  
Date: 27 January 2014

**Thesis report: Fisiología del Envejecimiento en Peces Teleosteos del Genero *Nothobranchius*.**

**Don Alejandro Lucas Sanchez. University of Murcia:**

The thesis of Don Alejandro Lucas Sanchez (Fisiología del Envejecimiento en Peces Teleosteos del Genero *Nothobranchius*) submitted for the degree of PhD to the University of Murcia, Spain, represents a high quality and important piece of work. It focuses on the use of the teleost *Nothobranchius* as an animal model to study the process of aging and in particular, the impact of aging on circadian timing system function. The extremely short generation time for this fish places it in a unique position to study aging processes within a realistic timeframe for biological studies.

This thesis project addresses several key issues:

Considerable age-related changes in the proportion of fatty acids correlated with a switch from a very high metabolic rate during early, accelerated development to a lower rate in senescent fish. The early period of very rapid development is associated with increased oxidative stress. Furthermore, there are age-related changes in the phospholipid composition of the mitochondrial membrane, also associated with changes in oxidative stress as well as in mitochondrial dysfunction and apoptosis.

The thesis project takes a closer look at the impact of the rapid aging process on behaviour: specifically a reduction in the amplitude and regularity of diurnal rhythms of locomotor activity, a property associated with aging in other species including humans. Interestingly the characteristic short sleep periods during the night period are unaffected in senescent fish. Sustained melatonin treatment by administration with food during the day-time results in a increase in the amplitude and robustness of locomotor activity rhythms. However, removal of melatonin treatment leads to a return to the impaired rhythms in the senescent fish. Finally the thesis work documents a characteristic breakdown of circadian timing function immediately prior to death.

This work is important since it prevails close similarity in the properties of the senescent circadian clock of *Nothobranchius* and that of other vertebrates including humans. Thus this model shows great potential to study in mechanistic detail how the clock ages and also strategies for how to reinforce the function of the aging clock.

Quite rightly, this work has been rewarded by several first author publications in international, peer-reviewed journals - a direct reflection of the quality and significance of this work. I therefore confidently recommend a high grade for this thesis work. Well done!!

Please do not hesitate to contact me if you require any additional information and I apologise for the delay in returning this report.

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Nicholas S. Foulkes". The signature is written in a cursive style with a prominent initial "N".

Nicholas S. Foulkes

Prof Dr. Nicholas S. Foulkes  
Responsible for the project.





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. Francisco Javier Martínez López, Profesor Titular de Universidad del Área de Fisiología y **Presidente Comisión Académica programa doctorado** \* Biología de Peces: Aspectos Básicos y Aplicados, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "Fisiología del envejecimiento en peces teleósteos del género *Nothobranchius*", realizada por D. Alejandro Lucas Sánchez, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Jorge de Costa Ruiz, D<sup>a</sup>. Pilar Mendiola López y D. Pedro Francisco Almada Pagán, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 22 de Enero de 2014, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 22 de Enero de 2014

**Doctorando: D. Alejandro Lucas Sánchez**

*\*Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

*\*Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*

Mod: T-40

fi

fi



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Vicerrectorado de  
Estudios

**D. ALEJANDRO LUCAS SÁNCHEZ**  
Dpto. Fisiología Animal. Facultad de Biología  
30100 ESPINARDO (MURCIA)

Vista la solicitud presentada el día 10 de junio de 2013, por D. ALEJANDRO LUCAS SÁNCHEZ, con D.N.I.: 48.519.291-D, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- el informe previo del Presidente de la Comisión Académica del Doctorado en "Biología de Peces: Aspectos básicos y aplicados", responsable de la autorización de la tesis doctoral en fase de elaboración, de esta Universidad, y
- el visto bueno de la Comisión de Ramas de Conocimiento de Ciencias,

resolvió, en su sesión de 19 de junio de 2013, **ACEDER** a lo solicitado por el interesado pudiendo, por lo tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

Lo que en cumplimiento del artículo 58 de la vigente Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, de 26 de noviembre, se **notifica** a D. ALEJANDRO LUCAS SÁNCHEZ, significándole que contra este acuerdo, y conforme a lo establecido en el artículo 21.2 de los Estatutos de la Universidad de Murcia, podrá interponer recurso de alzada ante el Sr. Rector Magfco de esta Universidad, en el plazo de un mes a partir del día siguiente a la recepción de la misma.

Murcia, 19 de junio de 2013  
Vicerrectora de Estudios y  
Presidenta de la Comisión General de Doctorado

Concepción Palacios Bernal

fi

fi

fi

fi

fi

## AGRADECIMIENTOS

Está hecho. Con estas palabras cierro una de las etapas, hasta el momento, más importantes de mi vida. Parafraseando a un buen amigo, cada persona recorre su propio camino, y cada camino tiene sus particularidades. En mi caso, no ha sido nada fácil llegar hasta aquí, pero la satisfacción de escribir estas palabras mitiga todo lo acontecido en este largo periodo de 5 años. Sin embargo, algo que ha sido imprescindible para acabar esta Tesis Doctoral es el apoyo de toda la gente cuyo camino se ha cruzado con el mío y compartimos el viaje que ya acaba.

En primer lugar, quiero agradecer a los que han sido durante muchos años una segunda familia para mí. A Jorge de Costa y Pilar Mendiola, por no ser solo unos directores más, sino las personas con las que puedes hablar de todo. Os agradezco enormemente la confianza que depositasteis en mí desde un principio, y que no ha vacilado en ningún momento, a pesar de los momentos difíciles que hayan podido surgir por el camino. Aunque esta etapa se cierra, los lazos que me unen a vosotros no desaparecerán. De igual manera quiero agradecerle a Pedro Francisco Almada por haber sido, desde incluso antes de acabar la carrera, un gran amigo y compañero, compartir todo su conocimiento conmigo y enseñarme a ser mejor investigador y mejor persona. La experiencia que he vivido y compartido con vosotros 3 es el mayor tesoro que he encontrado durante este viaje.

A Juan Antonio Madrid y Marian Rol, por contagiarme el gusto por la cronobiología y por la ciencia en general, y por su apoyo incondicional en todo momento. Esta “familia” ha sido la fuente de inspiración que necesitaba y que, gracias a todos ellos, puedo alcanzar la meta que me propuse hace ya 5 años.

A mis infatigables amigos y compañeros que han aguantado a mi lado y me han aguantado todo este tiempo, en la Universidad (Cristobal y Mila, Antonio, Alberto, Fran, Dani...) y fuera de ella (Cristian, Eloy y Carolina, Antofico...), y a los buenos amigos de mi paso por Escocia (Sean, Gus, Xristofos, Carina, Marie...). No os imagináis cómo habéis influido en mí para poder llegar a estas palabras.

Al Departamento de Fisiología Animal, sus profesores y alumnos, por haberme acogido y hacerme sentir como uno más de la familia, y al Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling, por recibirme con los brazos abiertos. Gracias por brindarme la oportunidad de realizar los trabajos que hoy os ofrezco en esta Tesis Doctoral.

Por último, quisiera agradecer a mi familia y a Laura todo el esfuerzo que han realizado y el apoyo que he recibido para que esta Tesis sea posible. Por darme el empujón que siempre he necesitado. Soy lo que soy gracias a ellos, y sin ellos no soy nada.

A todos, muchas gracias. Esta Tesis es tanto mía, como vuestra.

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi, ' | ] fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi



fi

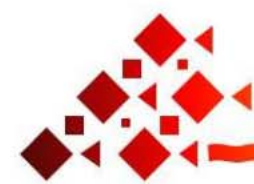
fi

fi

fi

fi

fi



## **RESUMEN GENERAL**

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

Con el paso del tiempo, todo ser vivo experimenta un deterioro generalizado de sus funciones fisiológicas. De forma progresiva e irreversible, el organismo va acumulando daños a nivel molecular, celular y tisular que le van dificultando el hacer frente a las variaciones del entorno en el que se desenvuelve. Dado el crecimiento exponencial en la esperanza de vida que la población mundial ha experimentado en los últimos años, el estudio del envejecimiento se ha convertido en uno de los grandes desafíos de la ciencia moderna. Si bien cada vez existe un mayor conocimiento de algunos de los mecanismos involucrados en el envejecimiento, aún se está lejos de alcanzar una teoría que los integre a todos en una cadena factible de causa-efecto, un saber que sería esencial para mejorar la calidad de vida de personas cada vez más longevas.

De todas las teorías propuestas para explicar el proceso del envejecimiento, la más aceptada hasta la fecha es la teoría del envejecimiento del estrés oxidativo, según la cual serían las formas reactivas del oxígeno (ROS), las principales causantes de los mecanismos asociados a aquel. Las ROS, generadas como producto del normal funcionamiento del metabolismo aerobio de la célula, atacarían a todas las moléculas colindantes (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), ocasionando un daño progresivo, acumulativo e irreversible que finalmente desembocaría en disfunción celular y apoptosis. Esto provocaría un deterioro generalizado de los tejidos del organismo y desembocaría en último lugar en la muerte del mismo. La mitocondria, como base energética de la célula que es, constituye el principal foco de producción de ROS en la célula. Como tal, es también la primera diana de daño oxidativo. Son las proteínas, lípidos y ADN mitocondriales, los primeros afectados por el ataque de las ROS. Sin embargo, de todas estas moléculas, los lípidos y, más concretamente, los ácidos grasos que los constituyen, son las más susceptibles al daño oxidativo debido a su

composición. La peroxidación lipídica constituye cuantitativamente el principal proceso asociado al daño oxidativo y afectaría en primer lugar a los lípidos de la membrana mitocondrial interna, situados muy próximos a los lugares de producción de ROS. La peroxidación lipídica, además, da lugar a toda una serie de derivados oxidados que propagarían el daño oxidativo al resto de moléculas de la organela. Esto desembocaría en última instancia en disfunción mitocondrial y apoptosis celular lo cual desencadenaría todos los procesos asociados al envejecimiento. Como ya se ha dicho, el deterioro de las células y tejidos de un organismo acabaría afectando con el tiempo, a su capacidad de organización y respuesta frente a los cambios del medio en que vive. Uno de los sistemas que intervienen en esta respuesta a las variaciones del entorno de un organismo, es el llamado reloj biológico. La estabilidad de los ciclos ambientales, fundamentalmente del ciclo de luz-oscuridad, mantenida durante millones de años en la Tierra, ha favorecido la organización de los procesos biológicos de forma rítmica. La mayoría de los seres vivos están dotados de un reloj interno que controla que cada proceso fisiológico suceda de forma sincronizada con los fenómenos cíclicos de la naturaleza, lo cual permite a los organismos anticiparse a los cambios periódicos. A los procesos que ocurren de forma rítmica en un organismo se les denomina ritmos biológicos y se habla de ritmos circadianos cuando esos procesos se repiten con un período próximo a las 24h. El reloj que regula estos ritmos es el llamado sistema circadiano el cual se compone de un reloj central, unas vías de entrada o aferentes de las señales ambientales y unas vías de salida que transmiten la información temporal desde el reloj central al conjunto del organismo a través de diversas señales integradoras. La secreción rítmica de melatonina constituye una de estas señales. Esta hormona se produce durante la noche proveyendo al organismo con una señal química de oscuridad. Con el paso del tiempo, tanto el ritmo de secreción de melatonina como todos los presentes en un organismo pueden verse

alterados, lo cual podría desembocar en un estado de cronodisrupción o desorganización temporal, con el consiguiente deterioro de las funciones del organismo y su capacidad para acomodarse al medio.

El estudio del envejecimiento, como el de otras disciplinas científicas, necesita de modelos animales en que llevar a cabo protocolos experimentales que no pueden ser usados en humanos. Los modelos de envejecimiento deben reunir dos características fundamentales, una esperanza de vida reducida y una distancia filogenética lo más corta posible con respecto al ser humano. La mayoría de mamíferos presentan esperanzas de vida largas y el costo de su mantenimiento en el laboratorio es elevado. Por estos motivos, se ha usado tradicionalmente modelos invertebrados como la mosca *Drosophila* y el gusano *Caenorhabditis elegans* cuyo ciclo vital es extremadamente reducido y pueden ser mantenidos en el laboratorio con muy poco gasto. El problema de estos modelos invertebrados es que la distancia filogenética con humanos es muy elevada lo que hace que los datos aportados deban ser tomados con cautela. Esta situación hace necesaria la búsqueda de nuevos modelos y, entre ellos, están tomando fuerza diversas especies de peces de ciclo vital corto, como es el caso del género *Nothobranchius*, peces de origen africano con un ciclo vital de entre 3 y 18 meses y que se han mostrado válidos para llevar a cabo toda una serie de estudios que pueden arrojar luz sobre los mecanismos que intervienen en el proceso del envejecimiento.

El objetivo de esta Tesis Doctoral es el de caracterizar el envejecimiento de dos especies del género *Nothobranchius* (*N. korthausae* y *N. rachovii*), considerando dos aspectos no estudiados en este género: las variaciones relacionadas con el envejecimiento en la composición de las membranas lipídicas mitocondriales, concretamente de los distintas especies fosfolipídicas y los ácidos grasos que las

integran, y los cambios en el sistema circadiano con la edad, considerando el ritmo de actividad locomotora como reflejo del estatus del sistema circadiano.

Las dos especies de *Nothobranchius* estudiadas mostraron cambios morfológicos fácilmente identificables de forma visual, como una pérdida patente de color, pérdida de peso y curvatura de la espina dorsal. A nivel bioquímico, *Nothobranchius* presentó membranas (plasmáticas y mitocondriales) altamente insaturadas, lo cual se ha relacionado con una elevada tasa metabólica. Este hecho ha sido asociado con situaciones de alto estrés oxidativo, típico de especies que, como ocurre en las dos estudiadas de *Nothobranchius*, presentan un crecimiento explosivo. Este alto estrés oxidativo aceleraría los procesos descritos asociados al progresivo deterioro de los tejidos de un animal con el envejecimiento. Por tanto, la rápida consecución de una talla adulta estaría asociada con una tasa de envejecimiento acelerada y una corta esperanza de vida. Además, la composición de las membranas mitocondriales de *Nothobranchius* cambió con la edad. Se observó un descenso en el nivel de cardiolipina, un fosfolípido de vital importancia para la función mitocondrial, así como un aumento en la proporción de esfingomielina. Estos cambios están asociados con apoptosis celular mediada por disfunción mitocondrial. La composición de ácidos grasos de los fosfolípidos mitocondriales también se vieron afectados con el envejecimiento. La mayoría de los fosfolípidos se volvieron más saturados con la edad. Se produjo una reducción significativa en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, sobre todo en el del ácido docosahexaenoico, el ácido graso más propenso a la peroxidación.

La alteración de la función celular y mitocondrial con el envejecimiento puede afectar al sistema circadiano. *Nothobranchius* presentó un ritmo fuertemente diurno, regular y estable que, con el paso del tiempo, fue perdiendo amplitud y comenzó a

fragmentarse. Se observó también que *Nothobranchius* experimenta periodos de sueño fácilmente identificables mediante el análisis del comportamiento locomotor de los animales durante la noche. Una vez caracterizada esa fase de sueño, se diseñó un método de fácil uso para identificar periodos de sueño en *Nothobranchius* empleando como indicador la actividad locomotora. En general, el sueño de *Nothobranchius* fue estable, con pocas interrupciones y de corta duración. Con el envejecimiento, el sueño sufre un ligero deterioro que puede ser revertido temporalmente mediante la administración de melatonina con el alimento. En la etapa final del ciclo vital, se identificó un deterioro progresivo y secuencial del ritmo de actividad locomotora hasta el momento de la muerte. Tras la caracterización de los últimos días previos a la muerte de *Nothobranchius*, se elaboró un método para identificar en qué estado de descomposición se encuentra el sistema circadiano de un individuo del género.

En general, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral junto con los ya aportados por otros laboratorios, pueden ser utilizados de forma conjunta para destacar el potencial de *Nothobranchius* para convertirse en una seria alternativa a los modelos de envejecimiento existentes hasta la fecha. La principal característica que lo define, su reducido ciclo vital, es esencial para este tipo de estudios. Si le añadimos el reducido costo para ser mantenido y criado en el laboratorio y el hecho de que sufre un proceso de envejecimiento progresivo, fácil de identificar y caracterizar, podemos concluir que nos encontramos ante una herramienta que puede contribuir de forma muy significativa en el futuro para avanzar y profundizar en nuestro conocimiento del envejecimiento.

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi



fi

fi

fi

fi

fi

fi



## **SUMMARY**

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi



Through time, all organisms experiment a generalized impairment of their physiological functions. In a progressive and irreversible way, the organism accumulates molecular, cellular and tissular damage making difficult to face the environment variations. Due to the exponential growth of the lifespan in the global population experienced in recent years, the study of ageing has become one of the biggest challenges of modern science. Nowadays there is a major knowledge concerning to mechanisms related to ageing, although a theory that integrates all the age-related factors as a cause-effect chain remains far. This would be essential knowledge to improve the life quality of people that live longer.

Between all theories proposed to explain the ageing process, the oxidative stress theory of ageing is the most widely accepted to date, which the reactive oxygen species (ROS) are the main cause associated to ageing mechanisms. ROS, generated as products of the normal cellular aerobic metabolism, will attack to all adjacent molecules (lipids, proteins and nucleic acids), causing progressive, cumulative and irreversible damage that finally will produce cellular dysfunction and apoptosis. This situation will produce a generalized impairment of the organism tissues and will finish with the death of it. The mitochondria, as a cellular energetic plant, constitute the main focus of ROS production in the cell, and also the first target of this oxidative damage. Proteins, lipids and mitochondrial DNA are the first affected by ROS. However, among these molecules, lipids, and more specifically, fatty acids that form them, are the most susceptible to oxidative damage due to their composition. Lipid peroxidation constitute quantitatively the main process associated to oxidative damage and affects in first place to the mitochondrial inner membrane lipids, placed close to the ROS production places. Lipid peroxidation, also, results in a variety of oxidized products which will spread the oxidative damage to the rest of the organela molecules. This will lead, at the

end, to mitochondrial dysfunction and apoptosis, which will trigger all the ageing associated processes. As already mentioned, the organism cells and tissues impairment will affect, as time goes by, the organisation capability and their response to changes of their environment. One of the systems involved in this response to environmental variations is the called circadian system. The stability of the environmental cycles, mainly light-dark cycle, maintained during millions of years on the Earth, has encouraged the organization of biological processes rhythmically. The majority of organisms have an internal clock which control each physiological process occurs by a synchronized form with the nature cycle clues. This constitutes an evolutionary advantage that allows the organisms to anticipate these periodical changes. Those processes which occur rhythmically in an organism are called biological rhythms, and when these rhythms occur with a period near to 24h are called circadian rhythms. These rhythms are controlled by the circadian system, which is formed by a central clock, input pathways that catch the environmental signals, and output pathways, which sends the temporal information from the central clock to the rest of the organism. For this, melatonin and its rhythmic secretion constitutes the most important signal. This hormone is produced during the night giving a darkness chemical signal to the organism. Over time, both melatonin secretion rhythm and all the different rhythms produced by the clock will be altered, which could lead in a chronodisruption situation or temporal disorganisation, with the consequent impairment of organism functions and its ability to cope with the environment.

The study of ageing, as others scientific disciplines, needs animal models to perform different experimental protocols which cannot be used in humans. Ageing models must have two essential characteristics: a reduced lifespan and filogenetic proximity as close as possible to humans. The majority of mammals have long

lifespans and the laboratory maintenance cost is elevated. That is why traditionally invertebrate animals have been used as models, as *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*, which extremely reduced lifespans and easily maintained in the laboratory. The main problem of using these animals is their elevated filogenetic distance with humans, so the data obtained from them should be treated with caution. Due to this, is necessary to search for new models. In this way, some fish species show a short life cycle, as the case of the genus *Nothobranchius*. These fish have an African origin, and due to their life cycle, from 3 to 18 months, varying by species, have been shown to perform adequately in a wide range of studies which can be useful to obtain a better understanding of the ageing process.

The objective of this Doctoral Thesis is to characterize the ageing process in two species of the genus *Nothobranchius* (*N. korthausae* and *N. rachovii*), considering two novel aspects never used in this genus. One is the age-related variations in the mitochondrial membrane lipid composition, specifically among the different phospholipidic classes and the fatty acids whose are composed of. Moreover, characterize all age-related changes in the circadian system, using the locomotor activity rhythm as a reflect of the circadian system status.

The two *Nothobranchius* species studied showed morphological changes easily recognizable visually, as colour loss, emaciation and spine curvature. At a biochemical level, *Nothobranchius* showed highly unsaturated membranes (plasmatic and mitochondrial), which has been related with an elevated metabolic rate. This fact has been associated with high stress situations, typical from species with an explosive growth, as occurs in these two *Nothobranchius* species. This high oxidative stress will speed up the described processes associated with the progressive impairment of the animal tissues with ageing. Therefore, obtaining an adult size as quickly as possible

will be associated with accelerated ageing and a reduced lifespan. Also, the mitochondrial membrane composition of *Nothobranchius* suffers changes with age. A decrease in cardiolipin has been observed, an essential phospholipid for the mitochondrial function, and an increase in sphingomyelin. These changes are associated with cellular apoptosis mediated by mitochondrial dysfunction. The fatty acid composition of mitochondrial phospholipids also suffers age-related changes. The majority of phospholipids became more saturated with age. A significant decrease has been described in the polyunsaturated fatty acid content, especially docosahexaenoic acid, the most susceptible fatty acid to be oxidized.

The alteration of both cellular and mitochondrial function with age could affect the circadian system. *Nothobranchius* shows a strong diurnal, regular and stable rhythm, which lose amplitude and the fragmentation is increased with age. Also it is observed that *Nothobranchius* have sleep periods easily recognizable by the behavior during the night. Once these sleep periods were defined, a simple method that use the locomotor activity rhythm to identify sleep was designed. In general, *Nothobranchius* sleep is described as stable, of short duration and with few interruptions. With ageing, sleep suffers a slight impairment that can be temporary restored by a melatonin treatment using food as a vehicle. At the end of the life cycle, it identified a progressive and sequential impairment of the locomotor activity rhythm to the moment of death. After the characterization of the circadian system breakdown during the last days of life of *Nothobranchius*, a method to identify in which moment of the sequential impairment is the circadian system in these fish.

In summary, the results obtained in this Doctoral Thesis alongside all the existing data about *Nothobranchius* performed over recent years, could be used all together to highlight the potential of *Nothobranchius* as an alternative to other ageing

models more widely used. Their reduced life cycle, which defines it, is essential to perform ageing studies. Moreover, the reduced cost of their maintenance and breeding in the laboratory, and the fact that they suffer a progressive ageing process, simply identified and characterised, it can be concluded that *Nothobranchius* is an interesting and useful tool which may contribute in an significant way to the future understanding of the ageing process.

fi

fi

fi

fi

fi

fi



fi

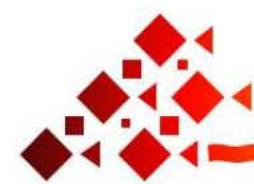
fi

fi

fi

fi

fi



## ÍNDICE

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

INTRODUCCIÓN.....	1
<i>El envejecimiento. Fundamentos teóricos.....</i>	<i>3</i>
<i>Implicación de los lípidos en el proceso de envejecimiento.....</i>	<i>8</i>
<i>Las membranas lipídicas como determinantes de la esperanza de vida. Teoría de envejecimiento del marcapasos de membrana.....</i>	<i>10</i>
<i>Los fosfolípidos de la membrana mitocondrial. Función e implicación en el envejecimiento.....</i>	<i>11</i>
<i>El sistema circadiano. El reloj de la vida.....</i>	<i>13</i>
<i>Envejecimiento del sistema circadiano.....</i>	<i>19</i>
<i>Los peces como modelos de estudio del envejecimiento. Género Nothobranchius.....</i>	<i>22</i>
OBJETIVOS.....	31
TRABAJO EXPERIMENTAL.....	37
Artículo 1.....	39
Artículo 2.....	41
Artículo 3.....	43
DISCUSIÓN GENERAL.....	45
<i>Esperanza de vida del género Nothobranchius.....</i>	<i>47</i>
<i>Cambios morfológicos con el envejecimiento en Nothobranchius.....</i>	<i>49</i>

<i>Composición lipídica. Modificaciones en las membranas con el envejecimiento.....</i>	<i>50</i>
<i>Cambios en el sistema circadiano de Nothobranchius con el envejecimiento.....</i>	<i>55</i>
<i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>69</i>
<i>CONCLUSIONS.....</i>	<i>75</i>
<i>REFERENCIAS.....</i>	<i>81</i>
<i>ANEXOS.....</i>	<i>111</i>
<i>Anexo I: Circadian activity rhythms during the last days of Nothobranchius rachovii's life. A predictive model of circadian system breakdown.....</i>	<i>113</i>
<i>Anexo II: Nothobranchius as a model for ageing studies. A review.....</i>	<i>143</i>
<i>Anexo III.....</i>	<i>175</i>
<i>Anexo IV.....</i>	<i>183</i>

fi

fi

fi

fi

fi

**fi**

## ABREVIATURAS

<b>ANT</b>	Translocador de adenina
<b>ApEn</b>	Entropía aproximada
<b>CFI</b>	Índice de funcionamiento circadiano
<b>CL</b>	Cardiolipina
<b>CS</b>	Sistema circadiano
<b>ETC</b>	Cadena de transporte de electrones
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenoico, 22:6n-3
<b>IS</b>	Estabilidad interdiaria
<b>IV</b>	Variabilidad intradiaria
<b>LA</b>	Ácido linoleico, 18:2n-6
<b>MIM</b>	Membrana interna mitocondrial
<b>mtDNA</b>	ADN mitocondrial
<b>OA</b>	Ácido oleico, 18:1n-9
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PI<sub>n</sub></b>	Índice de peroxidación
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>RA</b>	Amplitud relativa
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SM</b>	Esfingomielina

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

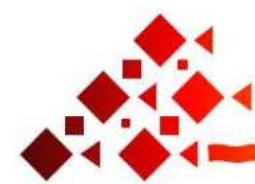
fi

fi

fi

fi

fi



## **INTRODUCCIÓN**

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi

fi



Según desde qué perspectiva intentemos definir “envejecimiento”, obtendremos una descripción diferente. Desde el punto de vista fisiológico, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define envejecimiento como “un proceso biológico que da lugar a una serie de cambios fisiológicos, característicos de cada especie, que tienen como consecuencia una limitación de la capacidad de adaptación del organismo al ambiente. Este proceso se inicia con el nacimiento y tiene como resultado final la muerte de ese organismo” (<http://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/>).

Todas las definiciones de envejecimiento van en la misma dirección: nos encontramos con que el envejecimiento es un proceso universal, que afecta a todos los seres vivos, y que consiste en un deterioro gradual, unidireccional e irreversible (intrínseco y deletéreo), aunque no necesariamente con la misma intensidad, de las estructuras que conforman los organismos (Strehler, 1977). Además, la tasa de envejecimiento y la esperanza de vida máxima vienen determinadas de forma endógena por el genotipo de cada especie, observándose diferencias muy considerables entre ellas.

### **El envejecimiento. Fundamentos teóricos.**

El deterioro con el paso del tiempo lógicamente afecta también a las funciones fisiológicas. De forma progresiva e irreversible, se acumulan cambios que dificultan al organismo el hacer frente y aclimatizarse a las variaciones del entorno en el que se desenvuelve. En el caso del ser humano, es sabido que las personas de edad avanzada comienzan a mostrar fragilidad en sus huesos y músculos así como problemas en el flujo sanguíneo y el mantenimiento de la presión arterial, disminución de la capacidad pulmonar o intolerancia a la glucosa, todos ellos sucesos

representativos de la pérdida en el mantenimiento de la homeostasis. Con la edad los seres humanos se hacen más susceptibles a sufrir enfermedades de diversa índole, infecciones y cáncer, apuntando a un deterioro del sistema inmunológico que resulta en algunos casos en problemas autoinmunes. Además, con el envejecimiento se pierden funciones neurológicas, manifestándose en aspectos como alteraciones sensoriales, visión y audición, y pérdida de memoria entre otros (Johnson *et al.*, 2005; Arking, 2006; Panno, 2009; Wolf, 2009; Masoro y Austad, 2010).

Debido a la pluralidad del proceso de envejecimiento, aún hoy no existe una clara explicación de cómo y por qué se produce. Así, el envejecimiento permanece como uno de los grandes desafíos de la ciencia. A lo largo de la historia reciente del ser humano, se han dedicado considerables esfuerzos a entender los mecanismos que llevan a semejante fallo en las funciones del organismo y muy diversas teorías han visto la luz, algunas de ellas en los últimos años. Teorías de envejecimiento como las de “resistencia a la insulina”, “autoinmunidad” o la del “soma desechable” han propuesto diferentes causas del envejecimiento pero falta una mayor integración de todas ellas para generar un paradigma único. De todas estas teorías propuestas, la más aceptada por la comunidad científica hasta la fecha ha sido la “Teoría de Envejecimiento por Estrés Oxidativo”. Esta teoría se derivó de otra teoría propuesta a principios del siglo XX, cuando Rubner (1908) observó que, según aumentaba el tamaño de una especie, mayor era su esperanza de vida, relacionando de forma indirecta el tamaño de un organismo con su tasa metabólica basal específica. Esta teoría pasó a llamarse “Teoría de Envejecimiento de la Tasa de Vida” y sirvió de base para que, a partir de 1954, se comenzara a considerar a los radicales libres como moléculas potencialmente tóxicas para el organismo (Gerschman *et al.*, 1954). No obstante, fue dos años después cuando, por primera vez, se relacionó el estrés

oxidativo con el envejecimiento (Harman, 1956). De acuerdo con la “Teoría de Envejecimiento de los Radicales Libres” propuesta por Harman, las especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas como resultado del funcionamiento normal del metabolismo aerobio de un organismo, tienen un papel fundamental en el proceso de envejecimiento dado que atacan a las moléculas de la célula (lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos) y generan un daño progresivo, acumulativo e irreversible que finalmente desemboca en la muerte de la célula con el consecuente daño en tejidos y órganos.

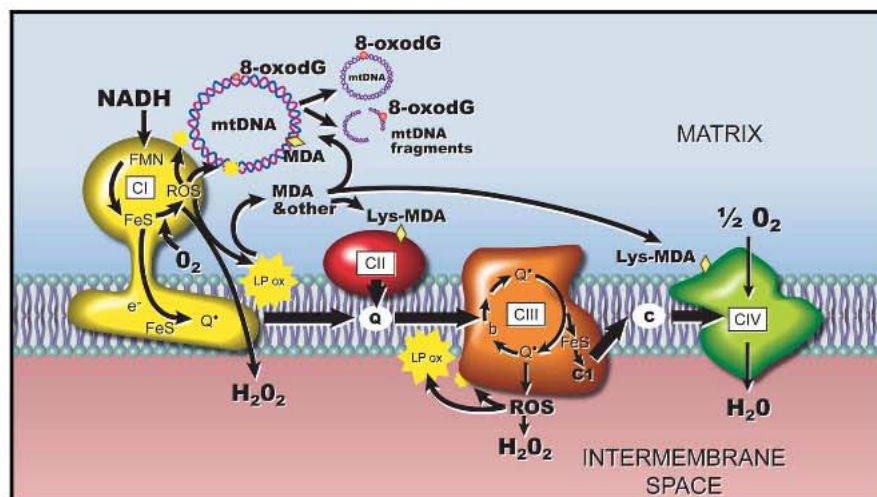


Figura 1. Diagrama de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. El esquema muestra a los complejos I y III como los principales generadores de radicales libres. Los radicales de oxígeno van a afectar a lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN mitocondrial, que se encuentran próximos a su lugar de liberación. Además, los productos de la peroxidación lipídica incluyen moléculas altamente reactivas que pueden propagar el daño oxidativo a lo largo de la membrana mitocondrial y a otras estructuras de la organela y la célula (tomado de Hulbert *et al.*, 2007b).

La mitocondria, como la planta energética de la célula que es, constituye el foco principal de ROS. Éstos se originan como resultado del funcionamiento normal de la cadena transportadora de electrones (ETC), localizada en la membrana mitocondrial interna (MIM) (Harman, 1972), que cataliza las reacciones de oxidación de moléculas

orgánicas con el resultado de la generación de gradientes protónicos a través de la membrana. La ETC está formada por 5 complejos de proteínas: NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinona-citocromo C oxidoreductasa (complejo III), citocromo C oxidasa (complejo IV) y ATP sintasa (complejo V) (Fig. 1). Los complejos I, III y IV son bombas de protones que crean un gradiente electroquímico de alto contenido energético que será utilizado por el complejo V para la síntesis de ATP, la moneda energética de la célula. En condiciones fisiológicas normales, los complejos I y III son los principales generadores de ROS, sobre todo de anión superóxido ( $O_2^-$ ) (Murphy, 2009).

La mitocondria, por tanto, no sólo es el principal foco de producción de ROS de la célula, sino que también resulta ser su primera y principal diana. De acuerdo con la “Teoría Mitocondrial del Envejecimiento” (Miquel *et al.*, 1980a), los ROS producidos por la ETC en condiciones fisiológicas normales van a atacar a las moléculas integrantes de la organela, principalmente aquéllas situadas más próximas a los lugares de producción de ROS, como los lípidos de membrana y el ADN mitocondrial (mtDNA) (Richter, 1995; Shigenaga *et al.*, 1994). La alteración, tanto de la composición de las membranas mitocondriales, esenciales para el funcionamiento de los complejos de la ETC, como del mtDNA, que codifica para 13 péptidos constituyentes de los complejos de la ETC, puede promover disfunción energética mitocondrial (Miquel *et al.*, 1980a; Pak *et al.*, 2003b) (Figura 1), la cual está asociada con apoptosis.

A pesar de que los ROS habían sido ya propuestos como posibles responsables del envejecimiento de los organismos, hasta el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en 1969 (McCord y Fridovich, 1969), no se comenzó a tener realmente en cuenta la teoría propuesta por Harman. Se trata de una



molécula altamente conservada en la evolución y con actividad antioxidante. Su descubrimiento condujo inmediatamente a la búsqueda de otras moléculas con actividad similar encontrándose que las células poseen todo un sistema de defensa antioxidante constituido por dos tipos principales de moléculas. El primero, conformado por diferentes enzimas como la propia SOD, la glutatión peroxidasa o la catalasa y el segundo, por especies no enzimáticas, cuya principal ventaja con respecto a las primeras es que, debido a su reducido peso molecular, pueden acceder a lugares donde aquéllas no podrían. Ejemplos de este segundo grupo serían el glutatión, el ascorbato y las vitaminas A y E. Estos dos grupos forman, junto a los mecanismos de reparación de la célula, la defensa contra los radicales libres producidos por la respiración mitocondrial. El descubrimiento de estos agentes antioxidantes reforzó la Teoría de los Radicales Libres. La tasa de envejecimiento de un organismo estaría determinada fundamentalmente por el balance entre los agentes oxidantes y antioxidantes presentes en sus mitocondrias, células y tejidos. Sin embargo, ha sido descrito que los animales con mayor esperanza de vida poseen niveles menores de defensas antioxidantes (Pérez-Campo *et al.*, 1998), por lo que debe haber otros factores que influyan en la determinación de la esperanza de vida.

A pesar de los numerosos estudios que apoyan la “Teoría del Envejecimiento del Estrés Oxidativo”, existe un creciente número de trabajos que cuestionan la generalidad de esta teoría. Nuevos datos apuntan, por ejemplo, a que la supresión de la SOD en *Caenorhabditis elegans* no acorta la esperanza de vida, a pesar de verse incrementado el daño oxidativo (Van Raamsdonk & Hekimi, 2010). Otros trabajos realizados en la misma especie, señalan que el aumento en la producción de ROS genera una esperanza de vida mayor en vez de reducirla (Heidler *et al.*, 2010; Yang y Hekimi, 2010). Similares resultados se encontraron en experimentos basados en la

manipulación de la expresión génica de diferentes enzimas antioxidantes en ratones: sobreexpresión de la catalasa y la Cu/ZnSOD citosólica, y de la Cu/ZnSOD y la MnSOD mitocondrial no produjeron ningún efecto en la esperanza de vida (Pérez *et al.*, 2009). Todos estos datos llevan a pensar que el proceso de envejecimiento es extremadamente complejo y que un hecho tan relativamente simple como es el daño por estrés oxidativo no es capaz de explicarlo por completo. Por este motivo, hoy en día continúan surgiendo teorías alternativas que tratan de responder a los numerosos interrogantes que el envejecimiento encierra.

### **Implicación de los lípidos en el proceso de envejecimiento**

Como se ha comentado anteriormente, se han relacionado numerosos procesos de deterioro con el envejecimiento, como el ocasionado en el ADN mitocondrial, afectando directamente a la ETC. Sin embargo, no existe hoy en día una teoría que integre todos estos procesos y permita establecer una secuencia lógica de causa-efecto entre ellos. Es indiscutible que los radicales de oxígeno generados por el metabolismo celular, pueden atacar a todos los tipos de macromoléculas: proteínas, ácidos nucleicos y lípidos integrantes de las membranas, si bien es cierto que la peroxidación lipídica es cuantitativamente el proceso más importante. Este hecho es debido a la alta susceptibilidad a la oxidación de los ácidos grasos altamente insaturados. Esta susceptibilidad viene determinada por dos factores fundamentalmente. El primero es que el oxígeno y muchos radicales libres son más solubles en las bicapas lipídicas que en medios acuosos (Moreau *et al.*, 2005). El segundo es que la presencia de dobles enlaces en la cadena carbonada de los ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos de membrana incrementa exponencialmente la

susceptibilidad de éstos a ser dañados por los ROS. La diana principal de los ROS en los ácidos grasos son los carbonos con enlaces simples entre dos carbonos con dobles enlaces (Halliwell y Gutteridge, 2007). Por tanto, cuantos más dobles enlaces porte un ácido graso, mayor será su susceptibilidad a ser dañado. Holman (1954) determinó, mediante medidas de consumo de oxígeno, la susceptibilidad relativa de diferentes cadenas acílicas, infiriendo que el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3), un ácido graso omega-3 conformado por 22 carbonos y seis dobles enlaces, es 8 veces más susceptible a ser oxidado que el ácido linoleico (LA, C18:2n-6), ácido graso omega-6 de 18 carbonos y sólo dos dobles enlaces, y 320 más susceptible a ser oxidado que el ácido oleico (OA, C18:1n-9), ácido graso omega-9 de 18 carbonos y un único doble enlace. Así, mediante la combinación de las susceptibilidades relativas de cada ácido graso y la composición de las membranas lipídicas, es posible calcular la susceptibilidad a la peroxidación de dicha membrana, utilizando el llamado Índice de Peroxidación (PIn) (Witting y Horwitt, 1964b):

$$PIn = 0.025 \times (\% \text{ ácidos grasos monoenoicos}) + 1 \times (\% \text{ ácidos grasos dienoicos}) + 2 \times (\% \text{ ácidos grasos trienoicos}) + 4 \times (\% \text{ ácidos grasos tetraenoicos}) + 6 \times (\% \text{ ácidos grasos pentaenoicos}) + 8 \times (\% \text{ ácidos grasos hexaenoicos})$$

La oxidación de un ácido graso provoca una pérdida de funcionalidad del fosfolípido que lo porta debido al daño estructural sufrido. Además, la reacción entre ROS y el carbono simple situado entre dos dobles enlaces provoca la modificación de dicho carbono, que pasa a tener un electrón desapareado, lo que le convierte en una molécula altamente reactiva que atacará a otras moléculas adyacentes y, de este modo, propagará el daño oxidativo iniciado por los ROS liberados por la ETC mitocondrial. Por lo tanto, la reacción inicial da lugar a un proceso autocatalítico y autopropagable, que va produciendo diversos y potentes ROS e hidroperóxidos, los

cuales, van a alterar la estructura de la membrana, su fluidez y otras propiedades funcionales de la misma (Hulbert *et al.*, 2007b).

### **Las membranas lipídicas como determinantes de la esperanza de vida. Teoría de envejecimiento del marcapasos de membrana**

Es fácil comprender por qué son imprescindibles las membranas lipídicas. Gracias a su capacidad de formar bicapas, hidrofóbicas en su interior e hidrofílicas en el exterior, forman los muros delimitantes de la célula y de diferentes orgánulos que forman el interior celular. Se ha sugerido que la distinta composición de las membranas lipídicas de las diferentes especies animales repercute en la susceptibilidad de éstas al estrés oxidativo, hecho que podría ser determinante en el proceso de envejecimiento y la esperanza de vida. Esta teoría, llamada “Teoría de envejecimiento del marcapasos de membrana”, constituye una extensión de la teoría del estrés oxidativo para la explicación del envejecimiento, y fue desarrollada por los trabajos de diferentes autores (Sanz *et al.*, 2006a; Hulbert *et al.*, 2007b; Hulbert, 2008).

En esencia, esta teoría explica cómo especies animales con membranas lipídicas muy insaturadas, lo cual resulta en una mayor fluidez de las mismas, presentan una elevada actividad metabólica gracias a la mayor movilidad de las proteínas de membrana, responsables de una buena parte del metabolismo, y tienen una alta producción de ROS, lo que hace que el daño a las biomoléculas y, en concreto, la peroxidación lipídica, por el alto nivel de insaturación, sea mayor, asociándose a un desequilibrio oxidativo elevado y a una mayor tasa de envejecimiento. Por el contrario, especies animales con membranas lipídicas con menor grado de insaturación presentan una actividad metabólica menor y un reducido



estrés oxidativo lo cual resulta en una menor tasa de envejecimiento (Figura 2) (Hulbert, 2005).

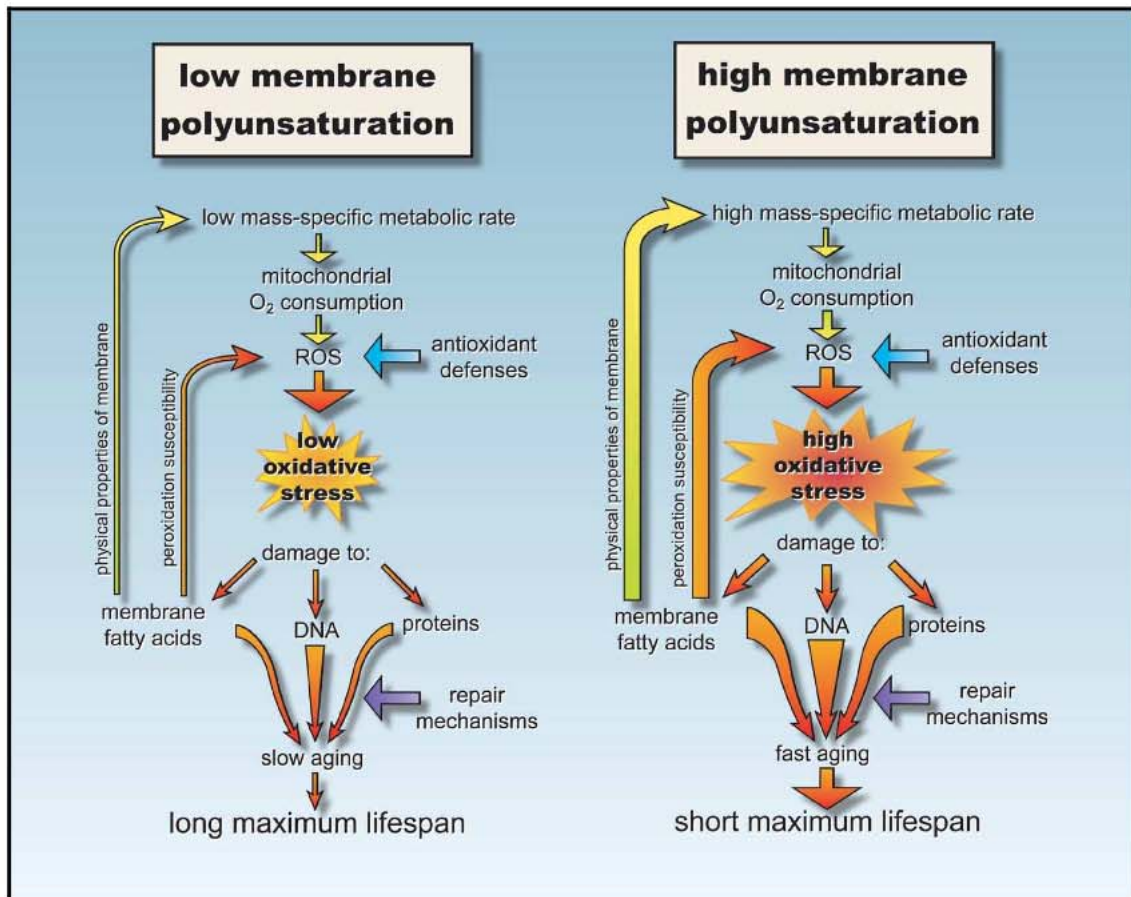


Figura 2. Esquema representando las bases de la teoría de envejecimiento del marcapasos de membrana, haciendo énfasis en la importancia de la composición de ácidos grasos de las membranas en la determinación de la esperanza de vida (tomado de Hulbert *et al.*, 2007b).

### Los fosfolípidos de la membrana mitocondrial. Función e implicación en el envejecimiento.

La MIM contiene un 20% de lípidos mientras que las proteínas, en su mayor parte componentes de la ETC, alcanzan casi un 80%. La particular composición en

clases lipídicas, fosfolípidos, glicolípidos y colesterol de la MIM está relacionada directamente con el metabolismo mitocondrial, consumo de oxígeno y obtención de energía (Hoch, 1992; Wiseman, 1996).

La principal característica que encontramos en la composición de la MIM, y que la hace única frente al resto de membranas, es la presencia del fosfolípido cardiolipina (CL). La cardiolipina (o difosfatidil-glicerol) es un fosfolípido que sólo se encuentra en membranas bacterianas y en la membrana mitocondrial y debe su nombre a que se identificó por primera vez en corazón (Pangborn, 1942), donde se encuentra en mayor concentración. Presenta una estructura particular (es una molécula dimérica, con 4 grupos acilos y 2 cargas negativas), con un alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente LA, y bajos niveles de ácidos grasos saturados (Schlame *et al.*, 2000). La CL tiene un papel fundamental en el funcionamiento de la mitocondria, ya que interacciona con numerosas proteínas, entre las que está el translocador de adenina (ANT), y los transportadores de citrato, fosfato y piruvato, además de anclar a la membrana los complejos I, III, IV y V de la ETC, contribuyendo al mantenimiento de la función mitocondrial así como a la permeabilidad e integridad de la membrana (Hoch, 1992). La alteración en la concentración de CL en la MIM así como en su composición de ácidos grasos puede llevar a la disfunción de la mitocondria y a la activación de la apoptosis (Shigenaga *et al.*, 1994; Chicco y Sparagna, 2007; Crimi y Esposti, 2011; Monteiro *et al.*, 2013).

Además de la CL, otro fosfolípido presente en las membranas celulares en general y en las mitocondriales en particular, y que resulta importante en el proceso de envejecimiento, es la esfingomielina (SM). La SM es un fosfolípido común en mamíferos cuya principal característica es la presencia de dos cadenas hidrocarbonadas, generalmente con bajo nivel de insaturaciones. Este hecho le

confiere la propiedad de dar rigidez a la membrana, pudiendo actuar ralentizando la propagación de los radicales libres generados por la peroxidación de los lípidos (Subbaiah *et al.*, 1999b). Además, la SM es un importante precursor para muchas señales celulares, algunas de ellas asociadas con la apoptosis (Hannun y Obeid, 2008). Otros fosfolípidos de membrana, como la fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilinositol (PI) son también importantes precursores de señales moleculares, algunas de ellas asociadas también con la apoptosis celular (Hannun y Obeid, 1997; Ulmann *et al.*, 2001; Mozzi *et al.*, 2003).

En los últimos años se han asociado numerosas situaciones relacionadas con el envejecimiento con alteraciones en la composición lipídica de las membranas de la célula, así como con la presencia de mitocondrias disfuncionales (Paradies *et al.*, 2010; 2011). Según la teoría del marcapasos de membrana, los ROS producidos como resultado del funcionamiento normal de la mitocondria, provocarían daños a las moléculas colindantes, especialmente a los lípidos de membrana. Ese daño, que dependería del grado de insaturación de las membranas, se iría acumulando de forma progresiva e irreversible, desembocando en disfunción mitocondrial y apoptosis. Debido a que cada tejido tiene una distribución de mitocondrias específica, no todos los sistemas van a sufrir el mismo grado de deterioro, ni a la misma velocidad, algo que va en consonancia con lo observado en los diferentes tejidos y órganos con el envejecimiento (Chaudhary *et al.*, 2011).

### **El sistema circadiano. El reloj de la vida**

Desde su aparición en este planeta, la vida ha estado sometida constantemente a ciclos ambientales que se repiten periódicamente. La rotación de la

Tierra sobre sí misma así como su traslación alrededor del Sol, producen un ciclo de luz-oscuridad de 24 horas (un día) y un ciclo de 365 días (un año). La presión evolutiva resultante de un medio ambiente dinámico, con cambios cíclicos, ha favorecido la aparición de mecanismos que suponen una ventaja adaptativa para la explotación de dichos cambios por parte de los organismos. La estructura encargada de la sincronización de los procesos que suceden en un organismo con el medio ambiente es el sistema circadiano (CS), también denominado reloj biológico o reloj circadiano. El término "reloj" se refiere a la función de dicho sistema, ya que esta estructura le otorga información temporal al organismo ( Refinetti, 2005; Madrid Pérez y Rol de Lama, 2006). El CS está presente, en mayor o menor medida, en todos los animales, y aunque su estructura puede variar entre diferentes grupos de especies, presenta un diseño general común: unas vías de entrada, constituidas por sensores que reciben la información de los sincronizadores ambientales o *zeitgebers* (principalmente el ciclo luz-oscuridad), y que envían la información al reloj o marcapasos central, situado en el sistema nervioso central. El reloj central transforma esa información en "pulsos temporales" que alcanzan, mediante las vías de salida, al resto del organismo, poniéndolo en hora (Figura 3). Haciendo una analogía, podríamos decir que el reloj biológico es como un reloj antiguo de cuerda que se desfasa unos minutos todos los días. Este reloj tenemos que ponerlo en hora todos los días mediante una señal externa o sincronizador. El reloj biológico posee un mecanismo de engranajes al que difícilmente podemos acceder, dejándonos ver sólo las manecillas del reloj, que nos indican la hora que es y qué proceso debe ocurrir en ese momento y que equivaldrían a las señales generadas por el reloj biológico y que podemos observar en los ritmos manifiestos (como el ritmo de secreción de algunas hormonas o el ciclo sueño-vigilia).

