

**DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**



**EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE  
LA LONGEVIDAD DE  
*CAENORHABDITIS ELEGANS***

**EFFECT OF MELATONIN ON THE  
*CAENORHABDITIS ELEGANS* LIFE SPAN**

**LAURA MONTOYA GONZÁLEZ**

**MASTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**DIRECTORAS: SILVIA LÓPEZ BURILLO**

**MAYTE MONTERO ZOCCOLA**

**Valladolid, Julio, 2014**

# INDICE

pág.

1. INTRODUCCION	2 - 10
1.1. Melatonina	2 - 5
1.2 . <i>Caenorhabditis elegans</i>	6-10
1.2.1. Modelo para investigación	
1.2.2. Ciclo de vida y desarrollo	
1.2.3. Manipulación genética	
1.2.4. Sistema nervioso	
1.2.5. Aparato muscular (movimiento y faringe)	
1.2.6. Sistema digestivo	
1.3. Melatonina y <i>C.elegans</i>	10
1.4. Objetivos	10
2. MATERIALES Y METÓDOS	11- 13
2.1. Preparación placas	12
2.2. Preparación medio M9	12
2.3. Preparación de placas con melatonina	12
2.4. Preparación placas etanol	12
2.5. Preparación de solución FUDR	12
2.6. Obtención de huevos de <i>C.elegans</i> y sincronización	12-13
2.7. Metodología de trabajo	13
3. RESULTADOS Y DISCUSION	14-23
3.1. Curvas de tiempo de vida control	14-15
3.2. Curvas tiempo de vida en presencia de etanol	16-17
3.3. Curvas tiempo de vida en presencia de melatonina	18-19
3.4. Representación de la medias de los experimentos realizados	20-21
3.5. Tablas de los datos obtenidos	21-23
4. CONCLUSIONES	24
5. BIBLIOGRAFÍA	25 - 26

## RESUMEN

PALABRAS CLAVES: *C.elegans*, melatonina, envejecimiento

La melatonina es una sustancia que proviene de la serotonina, producida en la glándula pineal, retina, tracto gastrointestinal, médula ósea, plaquetas y piel. Durante el día la luz bloquea la producción de melatonina en la glándula pineal mientras que al anochecer en la retina se registra una disminución de la intensidad de luz que envía la información a la glándula pineal. En ese momento se elevan los niveles de melatonina en sangre y posteriormente en los demás tejidos del cuerpo, constituyendo el ciclo circadiano. *Caenorhabditis elegans* es un animal invertebrado que pertenece a la clase de los nematodos o gusanos de cuerpo cilíndrico sin segmentar. *C.elegans* es un modelo de organismo vivo para la investigación biológica en diferentes ámbitos de la misma. *C.elegans* en condiciones de crecimiento normales pasa por cuatro estadios larvarios y después pasa al estado adulto pero cuando existen condiciones desfavorables entra en una etapa de larva después larva llamada Dauer después del estadio L2. En este trabajo se estudia el efecto de distintas dosis de melatonina sobre el tiempo de vida de *C.elegans*, para lo cual se realizan tres grupo experimentales como son control, etanol y melatonina + etanol. Se siembran 50 gusanos y se van contando en días sucesivos para ver el porcentaje de supervivencia.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 La melatonina

La melatonina fue descubierta por el dermatólogo estadounidense Aaron Lerner hace 50 años en un extracto de glándulas pineal bovina. Tiene un importante papel fisiológico debido a que es una molécula altamente conservada evolutivamente. (Zawilska J.B y cols., 2009). Los ritmos circadianos son ciclos fisiológicos y conductuales con una periodicidad recurrente de aproximadamente 24 horas, generados por el marcapasos biológico endógeno, el núcleo supraquiasmático (SCN), situado en el hipotálamo anterior. (Zee P. y cols, 2013).



**Figura 1.** Estructura química de la melatonina ((Bubenik G.A y Konturek S.J., 2011).

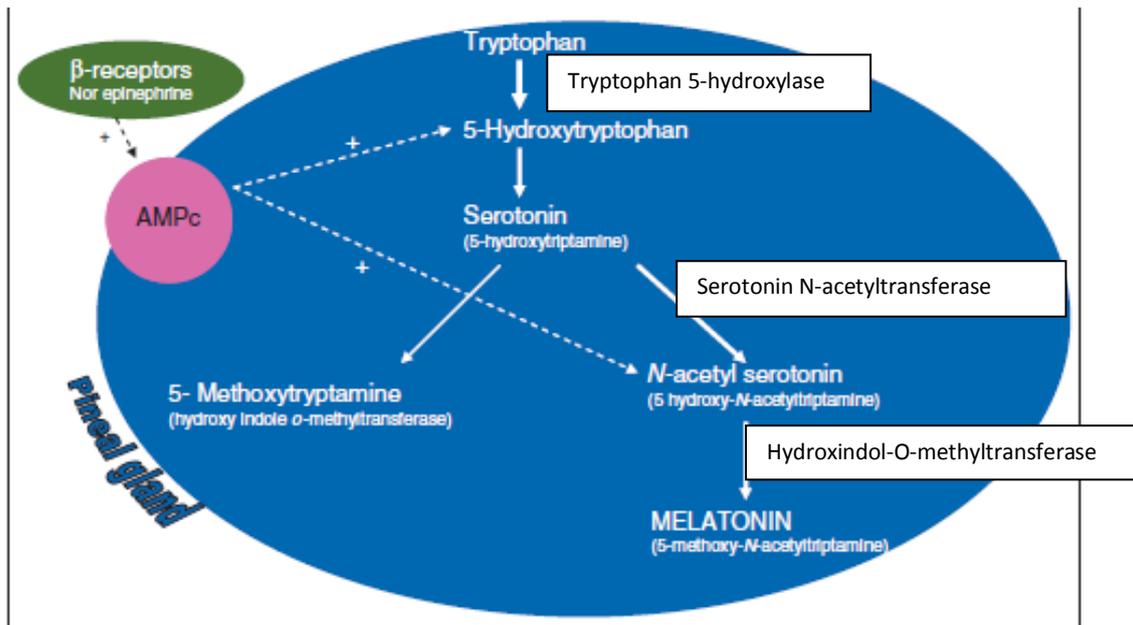
Diferentes procesos biológicos como el del sueño, la temperatura corporal, secreción de hormonas, alimentación, homeostasis de la glucosa y la regulación de ciclo celular, están controlados por estos ritmos circadianos. La luz es el estímulo más importante para la sincronización de estos ritmos circadianos. (Zee P. y cols, 2013)

La melatonina es una sustancia que proviene de la serotonina, producida en ciertos lugares del organismo incluyendo la glándula pineal, retina, tracto gastrointestinal, médula ósea, plaquetas y piel (Zawilska J.B y cols., 2009).

La melatonina también se llama N-acetil-metoxitriptamina y se sintetiza dentro de los pinealocitos a partir del aminoácido triptófano entre otros tejidos. La N-acetiltransferasa es la enzima limitante y su síntesis se encuentra promovida por la oscuridad y su actividad esta modulada por el núcleo supraquiasmático debido a múltiples interacciones neuronales. *Clock* and *BMAL1* controlan la síntesis de la melatonina a través de complejos de proteínas (Period y Cryptochrome). (Bellapart J, y Boots, R. 2012).

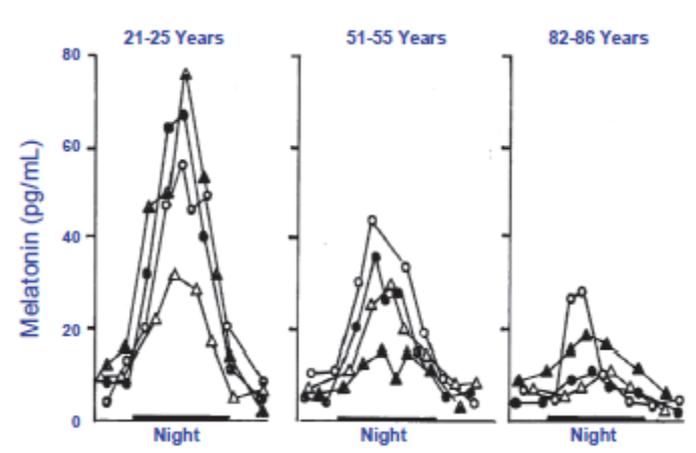
En el tracto gastrointestinal la melatonina se produce por las células enterocromafines, conteniendo este órgano mucha mayor cantidad de melatonina que la glándula pineal pero en este caso no se sabe si en el intestino la cantidad de melatonina también disminuye durante el día (Bubenik G.A y Konturek S.J., 2011). La melatonina se activa en su mayoría en el hígado (90%). (Zawilska J.B y cols., 2009). La melatonina reduce la temperatura corporal y está asociado al inicio del sueño (Bubenik G.A y Konturek S.J., 2011).

Además de la N-acetiltransferasa también es importante la triptófano hidroxilasa (Zawilska J.B y cols., 2009).



**Figura 2.** Síntesis de la melatonina. (Bellapart J, y Boots, R. 2012).

Durante el día la luz bloquea la producción de melatonina en la glándula pineal mientras que al anochecer en la retina se registra una disminución de la intensidad de luz que envía la información a la glándula pineal. En ese momento se elevan los niveles de melatonina en sangre y posteriormente en los demás tejidos del cuerpo, constituyendo el ciclo circadiano (Bubenik G.A y Konturek S.J., 2011). La liberación de la melatonina comienza sobre las 9 de la noche y es inhibida normalmente entre las 07:00-09:00, coincidiendo con el pico de cortisol endógeno. La inervación simpática es responsable de la secreción rítmica de melatonina endógena con la liberación de melatonina estimulada por norepinefrina a través de receptores tanto B1 y A1. (Bellapart J, y Boots, R. 2012).



**Figura 3.** Variaciones de la melatonina a lo largo del día. (Bubenik G.A y Konturek S.J., 2011).

La producción de melatonina se demostró también en órganos extrapineales y tejidos tales como el tracto gastrointestinal, ya mencionado, la retina y el cristalino, la piel, las células inmunes y hematopoyéticas, algunos órganos reproductivos, y las glándulas endocrinas.

Se cree que estas fuentes pueden contribuir a explicar los niveles locales y los efectos de la melatonina que podrían ser en parte o completamente independiente de la oscuridad. Estos incluyen el papel de la melatonina como factor intracrino, autocrino y / o factor paracrino en las funciones homeostáticas clave como el control del metabolismo energético (la melatonina actúa esencialmente como un factor anabólico), el crecimiento fisiológico, la diferenciación y la capacidad de respuesta al estrés (Lucchetti, F. y cols, 2010). La melatonina produce un aumento de células CD4, la reducción de las células CD8, la regulación de citoquinas, la señalización de células T, y posee efectos anti-inflamatorios por la baja regulación de la de óxido nítrico sintetasa neuronal, disminuyendo su actividad (Bellapart J, y Boots, R. 2012).

En las aves y vertebrados inferiores, el órgano pineal es directamente sensible a la luz. La cantidad de luz necesaria para suprimir la producción de melatonina durante la noche varía de una especie a otra. (Zawilska J.B y cols., 2009).

Debido a que esta hormona es altamente lipofílica no se almacena en los tejidos (Zawilska J.B y cols., 2009).

En los recién nacidos la glándula pineal no está completamente desarrollada sin embargo retransmiten las señales que les llegan a través de la leche materna. En el ser humano la melatonina aparece poco después del nacimiento (5-12 semanas), la producción constante de melatonina está asociada con el aumento de tamaño del cuerpo humano (Zawilska J.B y cols., 2009).

Los niveles máximos de melatonina se alcanzan entre los 3 y 4 años de edad. Desde la pubertad se produce un descenso constante hasta la vejez (Bubenik G.A y Konturek S.J., 2011). La melatonina que se produce en la glándula pineal se libera en el líquido cefalorraquídeo y en la circulación y cuando llega a los tejidos diana con receptor de la molécula ejerce diversas acciones biológicas (Zawilska J.B y cols., 2009).

La disminución de la melatonina se considera un factor que predispone a ciertas enfermedades como el Alzheimer. No se sabe si la pérdida de melatonina es una causa o una consecuencia en el proceso del envejecimiento. Es un gran antioxidante ya que es eficaz en la eliminación de radicales hidroxilo y mucho más eficaz que la vitamina E en la neutralización de los radicales peróxidos por lo que podría frenar el envejecimiento así como contrarrestar diferentes enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson (Bubenik G.A y Konturek S.J., 2011).

Las mujeres menopáusicas tienen problemas de sueño además de un sueño deficiente y problemas para quedarse dormidas, se despiertan con frecuencia. Estos problemas de sueño se relacionan con el estado de ánimo bajo y con la depresión. Este grupo de mujeres presenta una secreción nocturna de la melatonina más baja (Campos I. y cols 2013).

En la depresión existe un descenso en la amplitud del ritmo de la melatonina que se asocia con un aumento del cortisol (Zawilska J.B y cols., 2009).

Un aumento del riesgo de cáncer de mama se ha atribuido a una menor concentración de melatonina, sin embargo, los datos son incoherentes y en algunos casos pueden ser interpretados como una temporización alterada de la ritmo de la melatonina en lugar de la producción reducida (Zawilska J.B y cols., 2009).

La liberación de melatonina nocturna se reduce por los agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Los agentes anti-inflamatorios no esteroideos, la aspirina y el ibuprofeno, suprimen los niveles nocturnos de melatonina en plasma. Los fármacos antidepresivos, fluvoxamina (un inhibidor selectivo de 5-HT de la recaptación) y desipramina (un inhibidor de

la recaptación de NA/5-HT), aumentan las concentraciones de melatonina en plasma durante la noche y prolongan la duración de la secreción de melatonina respectivamente. (Zawilska J.B y cols, 2009).

El aumento de la melatonina por la noche se corresponde estrechamente con la apertura de la "puerta del sueño". (Zawilska J.B y cols, 2009).

Se ha querido usar la melatonina como un fármaco, debido a sus propiedades antiestrés, antienviejimiento y agente inmunomodulador, para ser usada para las disfunciones sexuales, piedras en la vesícula, obesidad e incluso el cáncer pero no se ha demostrado evidencias clínicas por el momento. Por lo que en la actualidad solo se usa para los trastornos del ritmo circadiano del sueño y la depresión, migrañas y cefaleas. Se espera que ejerza protección sobre las funciones celulares y la homeostasis del tejido en condiciones de estrés. (Luchetti, F. y cols, 2010).

Está descrito que la melatonina tiene funciones protectoras en las células que incluyen componentes de la maquinaria de autodefensa de la célula. La melatonina impide los efectos citotóxicos de ciertos fármacos como pueden ser la gentamicina (Luchetti, F. y cols, 2010).

No está todavía claro pero se cree que existe una conexión entre los ritmos circadianos y el envejecimiento, debido a un avance en el ciclo sueño-vigilia además de la amplitud en la secreción de la hormona y de la temperatura corporal. Estos cambios ocurren de manera natural en el envejecimiento que además pueden dar lugar a otros trastornos. (Campos I. y cols 2013).

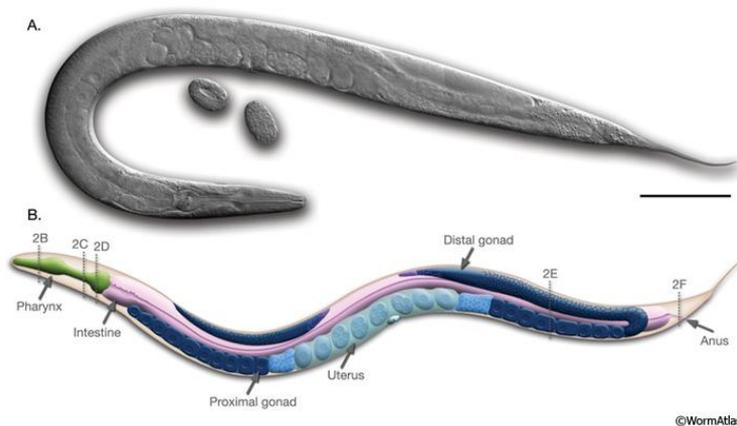
## 1.2 . *Caenorhabditis elegans*

### 1.2.1. Modelo para investigación

*Caenorhabditis elegans* es un animal invertebrado que pertenece a la clase de los nematodos o gusanos de cuerpo cilíndrico y sin segmentar. Está presente en muchas partes del mundo y su alimentación consiste en pequeños microorganismos, mayoritariamente bacterias. (<http://www.wormatlas.org/>). La secuenciación del genoma completo de *C.elegans* fue la primera de un organismo multicelular ( Zhou K. y cols, 2011).

La introducción de *C.elegans* en el laboratorio tuvo lugar en la década de los 60 en el Laboratorio de Biología Molecular del *Medical Research Council*, en Cambridge, Reino Unido, gracias a Sidney Brenner que recibió el Premio Nobel (2002) por ese hecho, compartiéndolo con John Sulston y Robert Horvitz, por sus estudios en la apoptosis en *C.elegans*. (<http://seresmodelicos.csic.es/cuc.html>).

*C.elegans* es un modelo de organismo vivo para la investigación biológica en diferentes ámbitos de la misma como pueden ser la genómica, la biología celular, la neurociencia o el envejecimiento. Posee numerosas ventajas por las que es usado en investigación debido a su ciclo de vida corto, genoma compacto, facilidad de propagación y pequeño tamaño. (Lapierre L. y Hansen M, 2012). Debido a la fácil obtención de progenie y a la cantidad de ella, este nematodo representa una fuente casi infinita de animales para la experimentación. (Dexter P y cols., 2012). Se puede cultivar fácilmente sobre placas de Petri en agar sembrado con *Escherichia coli* (OP50) y puede observarse fácilmente al microscopio electrónico por ser transparente. Es un organismo que ha sido estudiado intensamente debido también a su sistema de apareamiento androdioico (machos y hermafroditas autofértiles) (Thomas C y cols. 2012). El tiempo de desarrollo es corto, aproximadamente 3 días y su esperanza de vida es de unas 3 semanas siendo su tamaño cuando es adulto es de 1 mm.

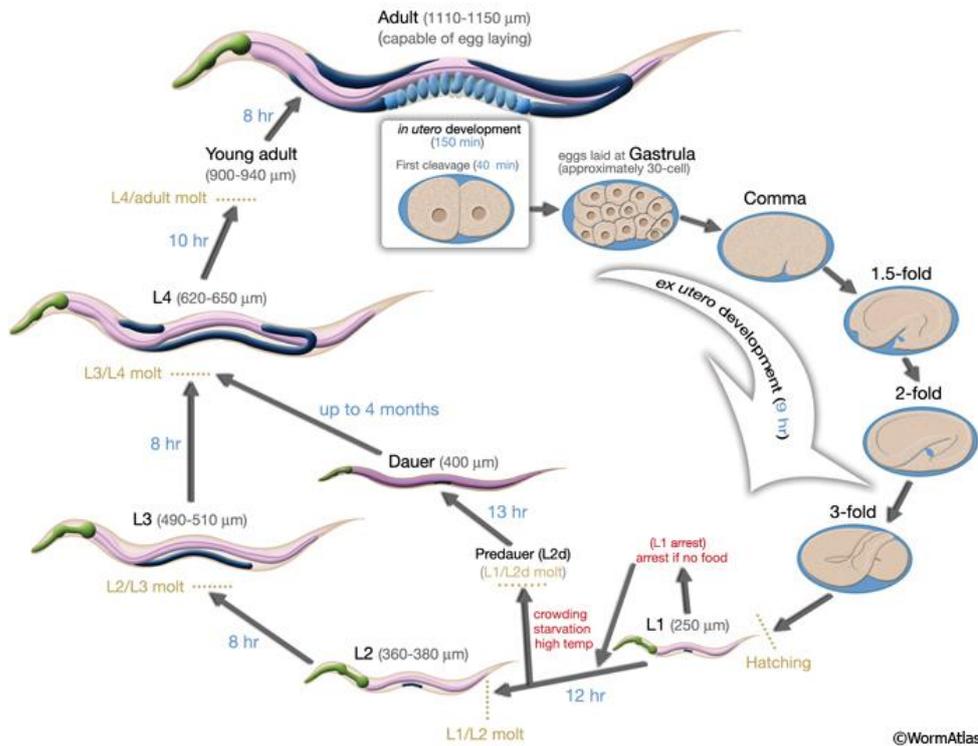


**Figura 4.** Anatomía de un adulto hermafrodita.

(<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>)

### 1.2.2. Ciclo de vida y desarrollo

*C.elegans* en condiciones de crecimiento normales pasa por cuatro estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) y después pasa al estado adulto pero en condiciones desfavorables como falta de comida entra en una etapa de larva después del estadio L2 llamada Dauer. Los gusanos Dauer se encuentran aislados del medio ambiente y son una etapa de supervivencia, con una cutícula gruesa y no se alimentan, incluso muestran cambios en su sistema nervioso. Cuando las condiciones de tornan favorables los Dauer continúan su crecimiento hacia L4, y de L4 a adulto (Tissenbaum H., 2012).



**Figura 5.** Ciclo de vida de

*C.elegans*. (<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/IMAGES/introfig6leg.htm>)

Después de la eclosión, de la ruptura de la membrana de quitina que protege el embrión, la cría se desarrolla y pasa a través de cuatro estadios larvales secuenciales (L1 a L4), muda su cutícula externa con cada etapa sucesiva. Después de la última muda emerge un adulto sexualmente maduro capaz de poner huevos, y el ciclo comienza de nuevo. (Pazdernik N y Schedl T., 2013)

Una propiedad muy importante es que su cuerpo es transparente durante toda su vida lo que permite ver todas sus células. Por otra parte entre el 60-80 % de los genes de *C.elegans* tienen homólogos humanos y de ellos un 40 % de los genes están conservados estando relacionados con enfermedades humanas y con sistemas de neurotransmisión (Lee, J. y cols, 2013).

El linaje de las células de *C.elegans* se conoce desde hace 2 décadas, posee 959 células somáticas de las que 302 son neuronas cuyo destino y conexiones sinápticas se encuentran

bien caracterizados (Dexter P y cols., 2012). Aunque el adulto posee 959 células, en los estadios iniciales este nematodo posee 1090 células, sin embargo 131 mueren de manera coordinada y programada durante el desarrollo. Esto fue descubierto en 1976 por John Sulston y Robert Horvitz demostrando con ello también que la muerte celular programada, apoptosis, es necesaria para la vida de los organismos. Además en *C.elegans* se descubrieron los genes *ced* que son los implicados en la muerte celular programada, *ced-3* y *ced-4* son necesarios para eliminar 131 células. (<http://seresmodelicos.csic.es/cuc.html>).

La embriogénesis de *C.elegans* se divide en dos etapas:

- Proliferación, ocurre minutos después de la fertilización e incluye todas las divisiones celulares que ocurren desde la primera célula. Está compuesta a su vez de dos fases, la primera desde la formación del cigoto y la segunda desde la gastrulación hasta el comienzo de la organogénesis. Al final de esta etapa, el embrión es un esferoide de células organizadas en tres capas germinales: ectodermo, que da lugar a hipodermis y neuronas; mesodermo, que genera la faringe y el músculo; y endodermo, que da lugar a la línea germinal y el intestino.
- Organogénesis/ morfogénesis, diferenciación celular sin apenas divisiones celulares.

### 1.2.3. Manipulación genética

Su facilidad de manipulación genética también hace atractivo a *C.elegans* para diferentes estudios ya que son susceptibles de cruces genéticos, así como utilizar la técnica de interferencia de ARN (ARNi) y microinyección de DNA para obtener progenie portadora de genes (Dexter P y cols., 2012). Cabe destacar que la técnica de interferencia con ARN (ARNi) fue descrita por primera vez en *C.elegans*. Este nematodo también fue pionero en el uso de la técnica con la proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP). Al ser un animal completamente transparente fue usado para el seguimiento in vivo de distintos procesos biológicos. (<http://seresmodelicos.csic.es/cuc.html>). La GFP, que procede de la medusa *Aequorea victoria*, emite fluorescencia teniendo lugar una transferencia de energía no radiactiva desde el estado excitado de la aequorina (proteína fotoluminiscente que emite fotones cuando une  $Ca^{2+}$ ) hacia la GFP y el fluorocromo absorbe esta energía convirtiéndola en fluorescencia verde. (Welter, K. 2008).

### 1.2.4. Sistema nervioso

Por otra parte, su sistema nervioso es simple pero los gusanos comparten vías celulares y moleculares con los organismos superiores. Además utilizan los mismos neurotransmisores que los seres humanos como pueden ser la dopamina, la serotonina, el ácido gamma-aminobutírico, también comparten iones y otros receptores. Incluso *C.elegans* es susceptible a muchas toxinas que se usan para inducir neurodegeneración en mamíferos, por lo que se puede utilizar como modelo para evaluar factores genéticos y químicos que modulan la respuesta a estas toxinas. (Dexter P y cols., 2012). Genéticamente este nematodo presenta

determinación genética del sexo, los machos tienen un solo cromosoma X y el sexo XX es el hermafrodita. Existen numerosos estudios relativos a la determinación del sexo de la línea germinal en *C.elegans*. (Thomas C y cols., 2012).

Durante el proceso de envejecimiento en *C.elegans*, el daño generado se acumula en el nematodo al azar, la exposición al estrés hace que aumenten los niveles de HSP-4 y HSP-16 (proteínas de choque térmico) que aumentan incluso más de lo necesario para reparar el daño, teniendo incluso funciones de protección a largo plazo, aumentando la longevidad y la tolerancia de *C.elegans* al estrés. La muerte se produce cuando su carga energética es demasiado baja para recuperar los daños causados por el estrés (Zhou K y cols., 2011).

Diferentes estudios demuestran que los genes implicados en la vía de señalización de insulina/IGF 1, la vía de la rapamicina y los genes que codifican para las proteínas implicadas en la respiración mitocondrial y enzimas antioxidantes, juegan un papel crítico en la respuesta al estrés y en el envejecimiento. Existe una correlación entre los niveles elevados de enzimas antioxidantes y la resistencia al estrés y longevidad (Zhou K y cols., 2011).

Se conocen muchos de los genes que contribuyen a la duración de la vida, aunque los mutantes que tienen cambios en esa duración no solo muestran cambios en ella, sino también en procesos adicionales como pueden ser que los genes de la vía de la insulina/IGF-1 (IIS) modulen además el metabolismo, el desarrollo y la resistencia al estrés (Tissenbaum H., 2012)

*Age-1* (codifica para la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol 3-quinasa) *daf-2* (codifica para el receptor de la insulina) y *daf-16* son genes implicados en el envejecimiento de *C.elegans*, mutaciones en *daf-2* (*daf-c*) causan que se formen Dauer incluso en condiciones favorables. Además existen mutantes *daf-d* que no pueden formar Dauer en condiciones desfavorables. ( Tissenbaum H., 2012).

### **1.2.5. Aparato muscular (movimiento y faringe)**

Con relación al sistema muscular del gusano son las células musculares de la pared las responsables del movimiento. Los gusanos se mueven en forma de onda en medios sólidos y con la edad esos movimientos cambian debido al deterioro de las células de la pared muscular del cuerpo, similar a la sarcopenia y fragilidad de los mamíferos (Tissenbaum H., 2012).

Con la edad se van acumulando dos compuestos fluorescentes como son la lipofuscina y los productos finales de la glicosilación. La lipofuscina al no poder ser degradado se acumula en las células posmitóticas por lo que se le suele llamar el "pigmento de envejecimiento". No se sabe si estos pigmentos son una parte causante del proceso de envejecimiento o una consecuencia. La integridad neuronal también se ve afectada en *C.elegans* con la edad ya que se producen cambios en la actividad eléctrica de las neuronas (Tissenbaum H., 2012).

La faringe de *C.elegans* para facilitar la alimentación sufre contracciones rítmicas que muestran declive según envejece el animal (Tissenbaum H., 2012). El músculo de la faringe se divide en tres partes: el corpus, el istmo y el bulbo terminal (TB). El sistema nervioso de la

faringe contiene 20 neuronas de 14 tipos diferentes. Son importantes los neurotransmisores como la acetilcolina, glutamato y la serotonina. El movimiento para recibir los alimentos se denomina bombeo que comienza con una contracción de los músculos de las diferentes partes de la faringe, esa contracción es seguida de una relajación que expulsa líquido pero atrapa las bacterias existe también una contracción peristáltica de los músculos del itsmo (Avery L. y You Y., 2013).

### **1.2.6. Sistema digestivo**

Las células intestinales de este nematodo poseen borde en cepillo en la parte apical además de tener microvellosidades y estar conectadas a una red de filamentos de actina y filamentos intermedios. Es importante mencionar que el intestino funciona como una primera línea de defensa frente a agentes patógenos y proporcionando a la vez el medio adecuado para la extracción, almacenamiento y absorción de nutrientes así como excreción de residuos. Por último el intestino es importante por ser un centro de señalización influyendo en otros tejidos. (Cabreiro F y Gems D., 2013).

### **1.3. Melatonina y *C.elegans***

Existen pocos estudios acerca de cómo afecta la melatonina al envejecimiento de *Caenorhabditis elegans*. Uno de ellos fue realizado por Bakaev y cols, en ellos el grupo control vivió de media 23,7 días con un vida máxima de 32 días. A concentraciones de 1 a 100 g / L de la hormona, disminuyó significativamente la duración media de la vida (por 31% a 55,7%,  $p < 0,05$ ). A una concentración de 10 mg / L, la melatonina no influye en la duración de la vida en el gusano *C. elegans* (Anisimov V, 2003).

En otro estudio se vio que la melatonina reducía la tasa de movilidad de manera dependiente de la dosis. Sin embargo la melatonina no influía en el envejecimiento de *C.elegans* (Tanaka D, y cols., 2007).

### **1.4. Objetivos**

Estudiar el efecto de distintas dosis de melatonina sobre el tiempo de vida de *C.elegans*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Preparación placas

Se preparan placas NGM (Nematode Growth Medium Agar), donde se van a sembrar los gusanos, en botellas de 500 ml se añaden 0,75 g de NaCl, 4,25 g de agar y 0,625 g de peptona. Se disuelven en 250 ml de agua desionizada y se autoclava 50 min. Pasados los 50 minutos se pasa a un baño a 55 °C unos 10 minutos.

Cuando las botellas han alcanzado los 55°C se añaden por este orden:

1. 250 µl de colesterol
2. 250 µl de CaCl<sub>2</sub> 1M
3. 250 µl de MgSO<sub>4</sub> 1M
4. 6,25 ml de buffer KPO<sub>4</sub>
5. 125 µl de FUDR (solo a las placas en las que no se quiere que los gusanos tengan descendencia para poder llevar el conteo a partir de los 50 gusanos iniciales. El FUDR bloquea la división celular).

Cada vez que se añade un compuesto se debe agitar la botella evitando así que el compuesto precipite. Una vez añadidas todas las soluciones a la botella se vierte el NMG en placas de petri (35 mm de diámetro) de manera rápida para evitar la solidificación dentro de la botella. Además este proceso debe realizarse cerca de la llama para evitar contaminaciones en las placas.

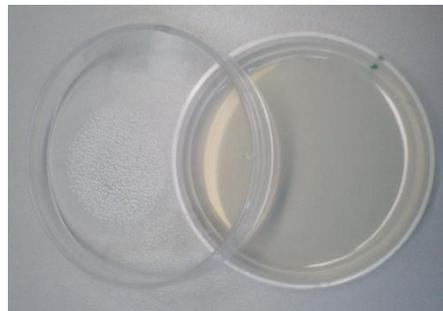


Imagen 1. Placas petri con NGM.



Imagen 2. Placas petri con NGM sembradas con OP50.

## 2.2. Preparación medio M9

Para 1 litro de medio M9: 6 g  $H_2KPO_4$ , 6 g de  $Na_2HPO_4$ , 5 g de NaCl y 1 ml de  $MgSO_4$ .

## 2.3. Preparación de placas con melatonina

Se parte de una solución madre de melatonina 250 mM, 58 mg/ml. Se disuelve en etanol, 58 mg de melatonina y 1 ml de etanol y de esa solución madre se cogen 25  $\mu$ l y se disuelven en 12,5 ml de agua. Después a cada placa se añaden 250  $\mu$ l de esa solución de melatonina 0,5 mM y se dejan secar hasta el día siguiente en el que se añaden las bacterias (*E.coli* OP50) que están preparadas con 15 ml de cultivo de *E.coli* más 15  $\mu$ l de la solución madre de melatonina, de esa mezcla (*E.coli* OP50 + melatonina 0,5 mM) se añadirán 250  $\mu$ l a las placas preparadas el día anterior. Las diluciones se deben hacer poco a poco y agitando con frecuencia para asegurar la total de la disolución de la melatonina. Todas las placas deben estar protegidas de la luz debido a que la melatonina se degrada con la misma, además deben guardarse en el incubador. En un principio se pretendía partir de una concentración de la solución madre de 500 mM (116 mg/ml) pero esa cantidad de melatonina no se disuelve en etanol. La concentración final de melatonina en las placas es de 0,5 mM.

## 2.4. Preparación placas etanol

Se preparan las placas control con el disolvente solo en las que se añaden 25  $\mu$ l de etanol a 12,5 ml de agua y de esa solución se añaden 250  $\mu$ l a cada placa. Se añade también en el disolvente (etanol) al OP50: se añaden 15  $\mu$ l de etanol a 15 ml de bacterias y se siembran las bacterias con etanol al día siguiente las placas anteriores con 250  $\mu$ l de esa solución.

## 2.5. Preparación de solución FUDR

FUDR es la Fluorodesoxiuridina que es un inhibidor de la síntesis de ADN que es usado para evitar que se desarrollen los huevos. El FUDR no interfiere en el metabolismo de los gusanos adultos (Mitchell DH y cols., 1979) y bloquea la eclosión del huevo (Lionaki E y Tavernarak N, 2013). FUDR también es un fármaco usado en oncología en el cáncer colorectal para evitar la proliferación celular. La concentración de FUDR es de 30 mM y se disuelve en agua.

## 2.6. Obtención de huevos de *C.elegans* y sincronización

Para que todos los gusanos tengan el mismo tiempo de vida en los diferentes experimentos se comienza por la obtención de huevos de *C.elegans*.

Se siembran en una placa unos 30 gusanos, y tres días después se añade 1,4 ml de agua a la placa, y se recoge con la pipeta todo el volumen posible, en un tubo eppendorf procurando pasar por toda la placa con el fin de recolectar el mayor número posible de gusanos. El tubo eppendorf con la suspensión de gusano se centrifuga a 2000 rpm durante 1 min, se elimina el

sobrenadante dejando lo mínimo posible, y a continuación se añaden a ese eppendorf 250  $\mu$ l de medio M9 y 150  $\mu$ l de NaOH/lejía (NaOH 5M : lejía, 1:2).

Posteriormente se mezcla con vortex el eppendorf 10 segundos y se descansan 2 min, se repite varias veces hasta 10 minutos. Pasados esos 10 minutos se centrifuga a 8000 rpm durante 1 min, se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur e cristal y se añaden 1 ml de medio M9, se vuelve a centrifugar a 8000 rpm durante 1 min y se dejan unos 100  $\mu$ l que se resuspendan bien para añadir unos 10-20  $\mu$ l de la suspensión a las placas donde se quieran obtener los gusanos.

Con este método los gusanos adultos mueren y liberan los huevos que son resistentes a la solución de lejía y sosa.

## 2.7. Metodología de trabajo

En este estudio se ha utilizado una línea *C.elegans* (AQ2038) que lleva integrado un gen que codifica para la proteína YC2.1 fluorescente sensible a  $Ca^{2+}$ , que deriva de la GFP, proteína fluorescente verde. Para ello se obtienen los huevos que se siembran en placas diferentes según el tipo de experimento a analizar. Después de dos días de la siembra de los huevos se cogen 50 gusanos en el estadio L4 de las placas y se pasan a las placas experimentales. En este caso se realizan tres grupos experimentales:

- Control, placas solo con las bacterias (*E.coli* OP50) que sirven de alimento a *C.elegans*.
- Experimental, placas con melatonina disuelta en etanol.
- Control del disolvente, placas solo con etanol. Para comprobar que los efectos en *C.elegans* son de la melatonina y no del etanol.

Se realizan 3 experimentos de cada tipo con tres réplicas de cada uno de ellos. Se cuenta el DIA 1, que es el día en que se pasan 50 gusanos a placas con FUDR ((placas donde no se desarrollan los huevos), al día siguiente se vuelven a pasar los gusanos a una nueva placa con FUDR (DIA 2), después se realiza la misma operación el DIA 5 y luego aproximadamente cada dos días se van cambiando a los gusanos de placa debido a que la melatonina se degrada por lo que las placas deberán ir preparándose día a día y para seguir con las mismas condiciones experimentales. A los otros dos grupos de estudio también se van cambiando los gusanos con la misma periodicidad. Los gusanos se pasan de placa con un pick hecho con una pipeta Pasteur y un alambre de platino que se funden y el alambre al final se deja plano mediante la llama y así poder coger los gusanos sin dañarlos, cada vez que se usa el pick se debe esterilizar en la llama. Las placas de *C.elegans* se guardan en un incubador a 20 °C y el laboratorio también debe permanecer a esa misma temperatura. Además las placas con melatonina se meten en una caja que se encuentra envuelta en papel de aluminio para evitar la degradación de la melatonina por la luz.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

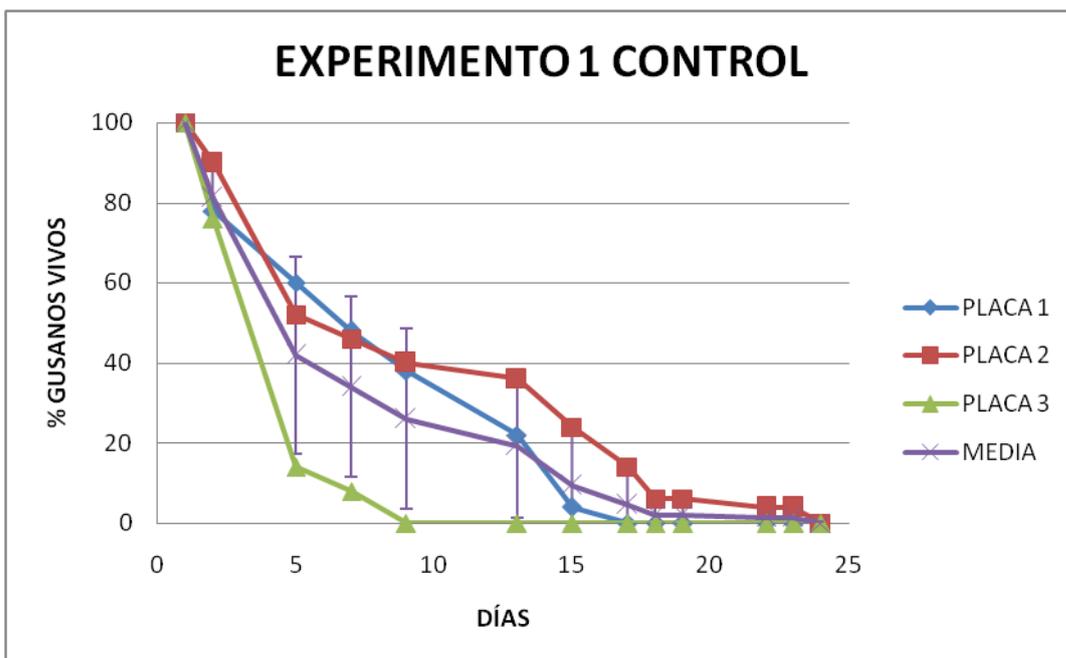
Como se ha comentado anteriormente se realizan tres grupos experimentales (control, melatonina en etanol y etanol) de los que se realizan tres réplicas de cada y cada réplica consiste en tres placas.

Para analizar los resultados primero se agrupan los datos de cada experimento por separado, se realizan las representaciones gráficas de cada grupo experimental y se representan porcentajes de gusanos vivos frente a tiempo en días.

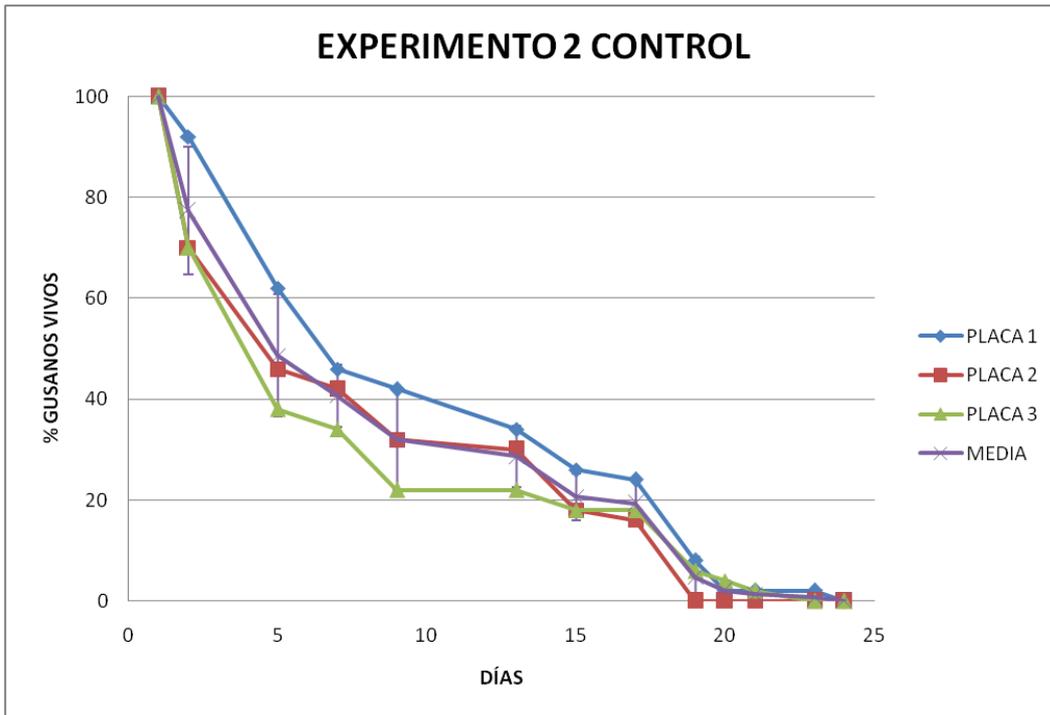
Para representar los porcentajes se toma como 100 % los 50 gusanos que se ponen en cada placa en el DIA 1, cuando los gusanos se pasan de una placa sin FUDR a una placa FUDR.

#### 3.1. CURVAS DE TIEMPO DE VIDA CONTROL

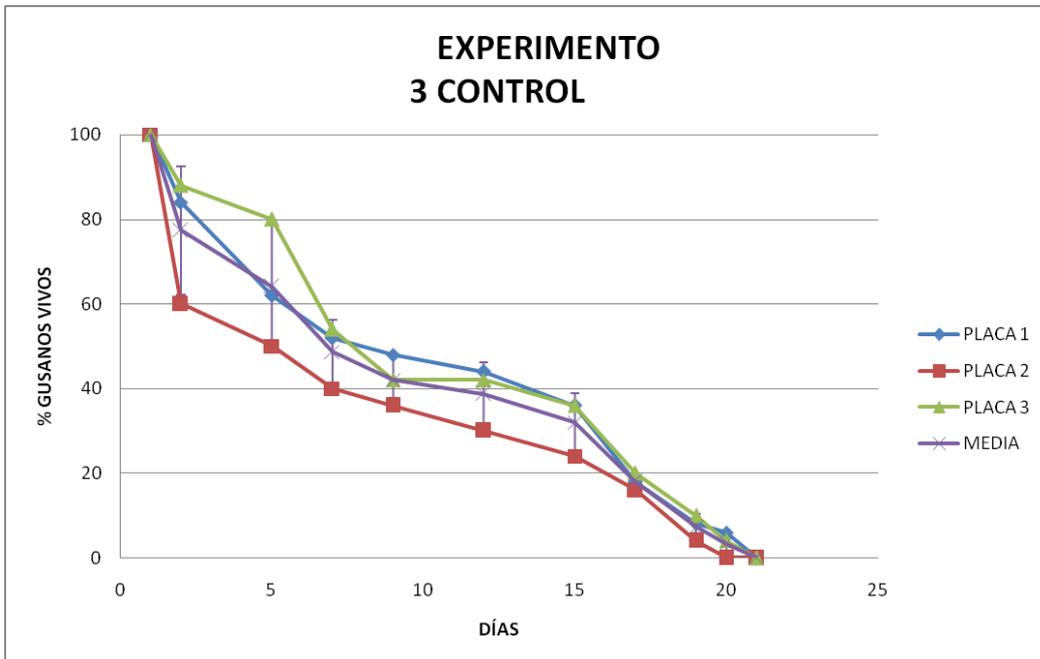
Se siembran 50 gusanos en cada placa con FUDR. Se representa en cada gráfica el porcentaje del tiempo de vida respecto a los días, se representan las 3 placas de cada experimento, además de la media de las mismas con su desviación estándar.



GRÁFICA 1. Tiempo de vida de *C. elegans* en situación control (experimento 1).



**GRÁFICA 2.** Tiempo de vida de *C.elegans* en la situación control (experimento 2).

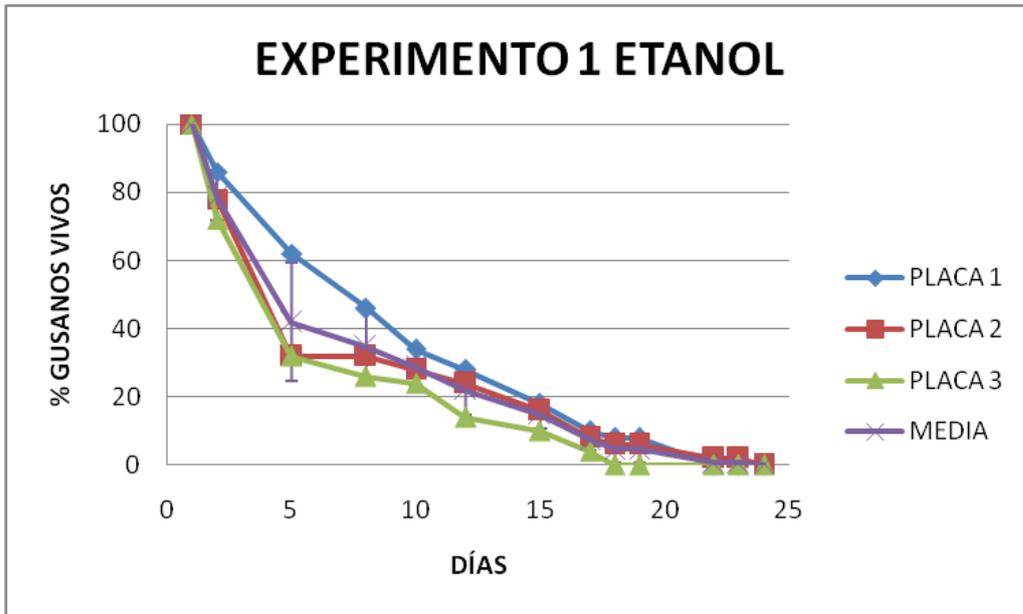


**GRÁFICA 3.** Tiempo de vida de *C.elegans* en la situación control (experimento 3).

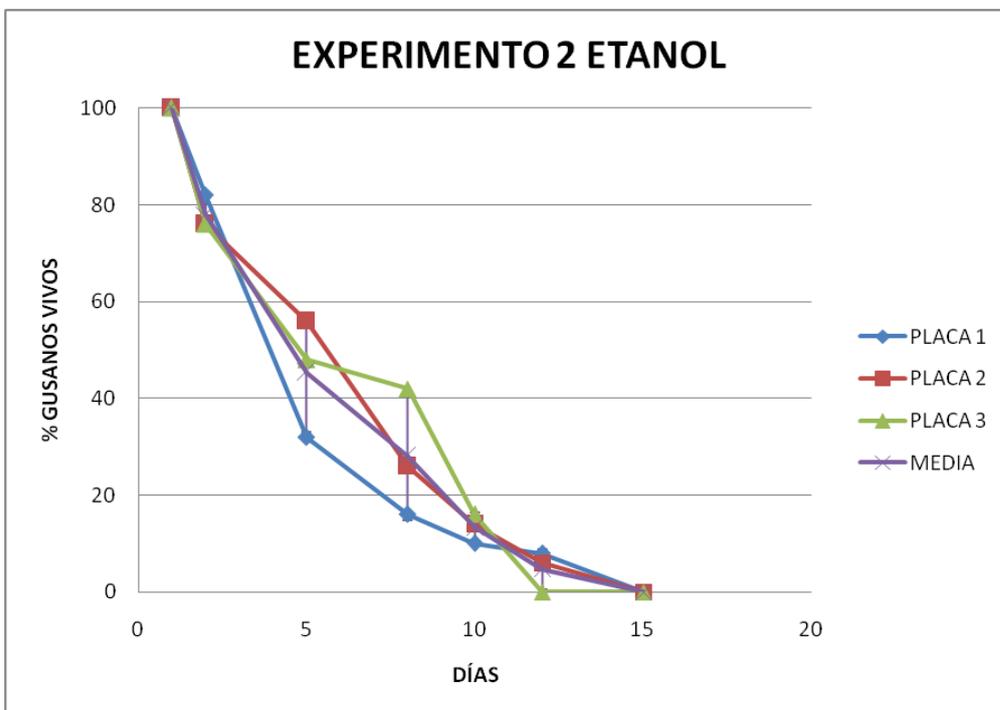
En el experimento 1 del control el número de días máximo que sobreviven los gusanos es de 23 días (ningún gusano pasa de los 23 días), lo mismo que en el experimento 2 mientras que en el experimento 3 llegan 5 gusanos hasta el día 20 y ninguno llega hasta el día 21.

### 3.2. CURVA TIEMPO DE VIDA EN PRESENCIA DE ETANOL

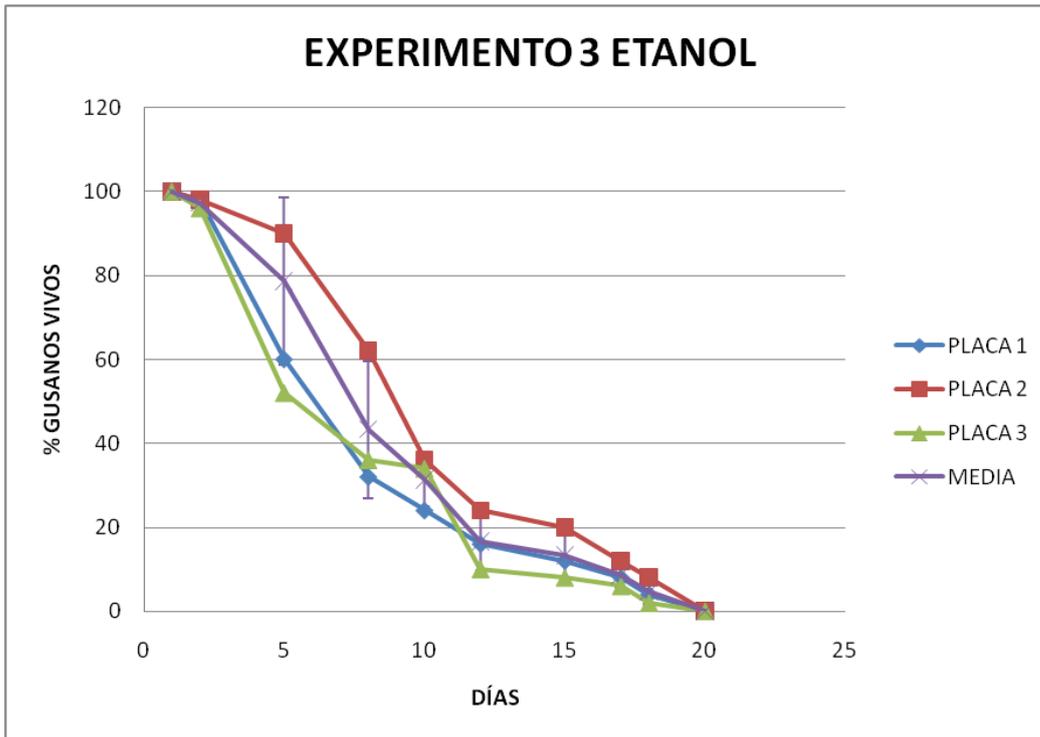
Se siembran 50 gusanos en cada placa con FUDR +etanol. Se representa en cada gráfica el porcentaje del tiempo de vida respecto a los días, se representan las 3 placas de cada experimento, además de la media de las mismas con su desviación estándar.



**GRÁFICA 4.** Tiempo de vida de *C.elegans* en situación control con etanol (disolvente) (experimento 1).



**GRÁFICA 5.** Tiempo de vida de *C.elegans* en situación control con etanol (disolvente) (experimento 2).

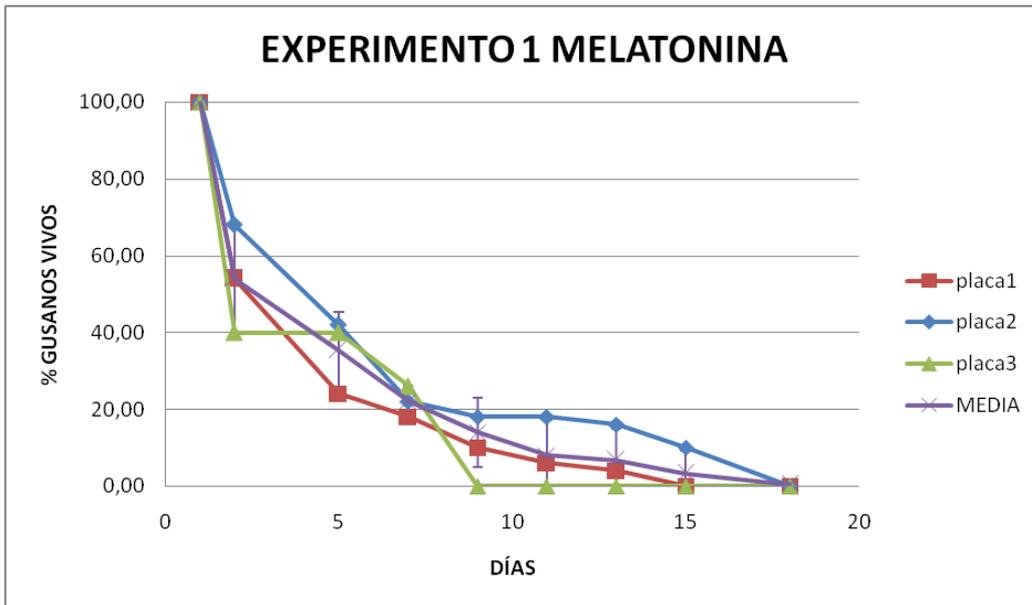


**GRÁFICA 6.** Tiempo de vida de *C.elegans* en situación control con etanol (disolvente) (experimento 3).

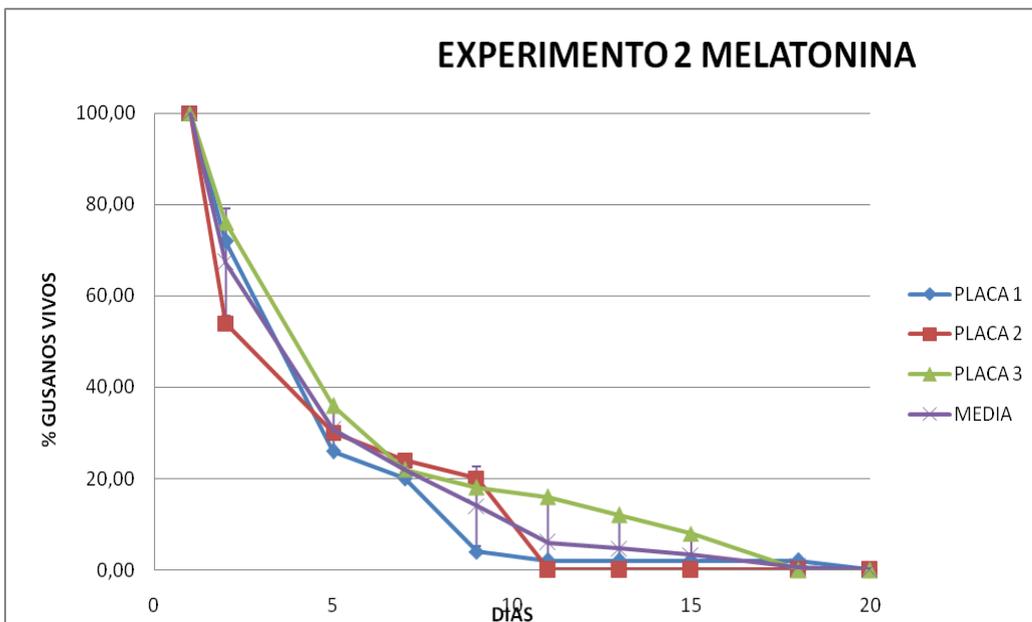
En el experimento 1 con etanol ningún gusano llega a los 24 días y a los días 22 y 23 llega solamente un gusano, y en el experimento 2 solo sobreviven hasta los 15 días mientras que en el experimento 3 sobreviven un intermedio entre ambos experimentos en este caso un total de 20 días.

### 3.3. CURVAS TIEMPO DE VIDA EN PRESENCIA DE MELATONINA EN ETANOL

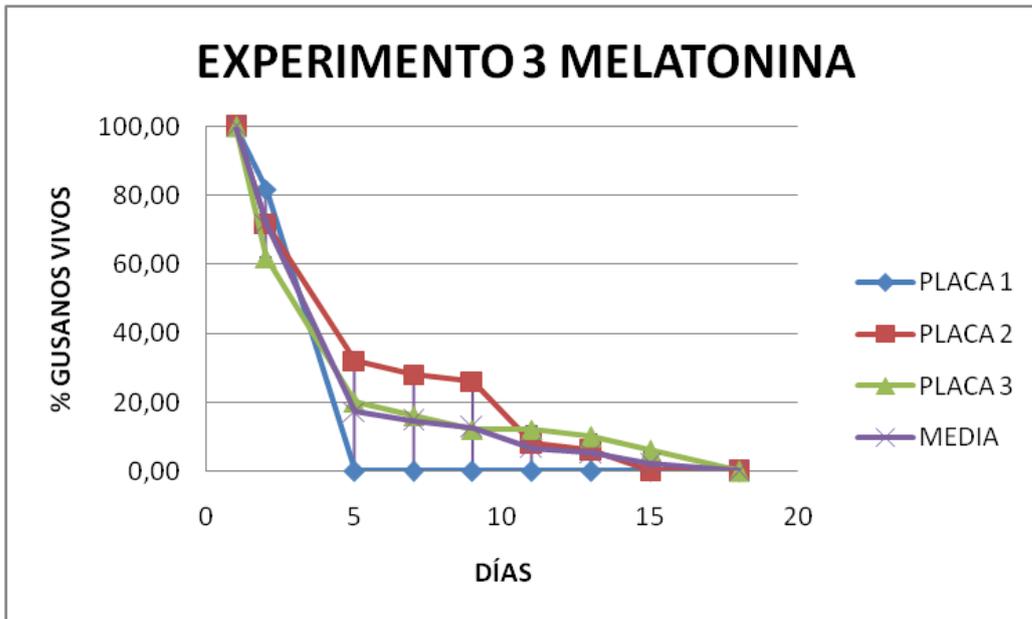
Se siembran 50 gusanos en cada placa con FUDR + etanol+melatonina. Se representa en cada gráfica el porcentaje del tiempo de vida respecto a los días, se representan las 3 placas de cada experimento, además de la media de las mismas con su desviación estándar.



**GRÁFICA 7.** Tiempo de vida de *C.elegans* en situación experimental con melatonina y etanol (disolvente) (experimento 1).



**GRÁFICA 8.** Tiempo de vida de *C.elegans* en situación experimental con melatonina y etanol (disolvente) (experimento 2).



**GRÁFICA 9.** Tiempo de vida de *C.elegans* en situación experimental con melatonina y etanol (disolvente) (experimento 3).

En el experimento 1 el número máximo de días que vivieron los gusanos fue de 18 y además en el DIA 15 sólo sobrevivían 5 gusanos en una de las placas. En el experimento 2 el número máximo de días que sobreviven los gusanos fue de 20 días pero a los 18 días solo sobrevivía un gusano en una de las placas. En el experimento 3 ningún gusano llega a los 18 días de vida lo mismo que en el experimento 1 y solo 3 llegan a los 15 días de vida.

Por lo que la mayoría de *C.elegans* había muerto antes de llegar a los 15 días de vida.

### 3.4. REPRESENTACION DE LAS MEDIAS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS

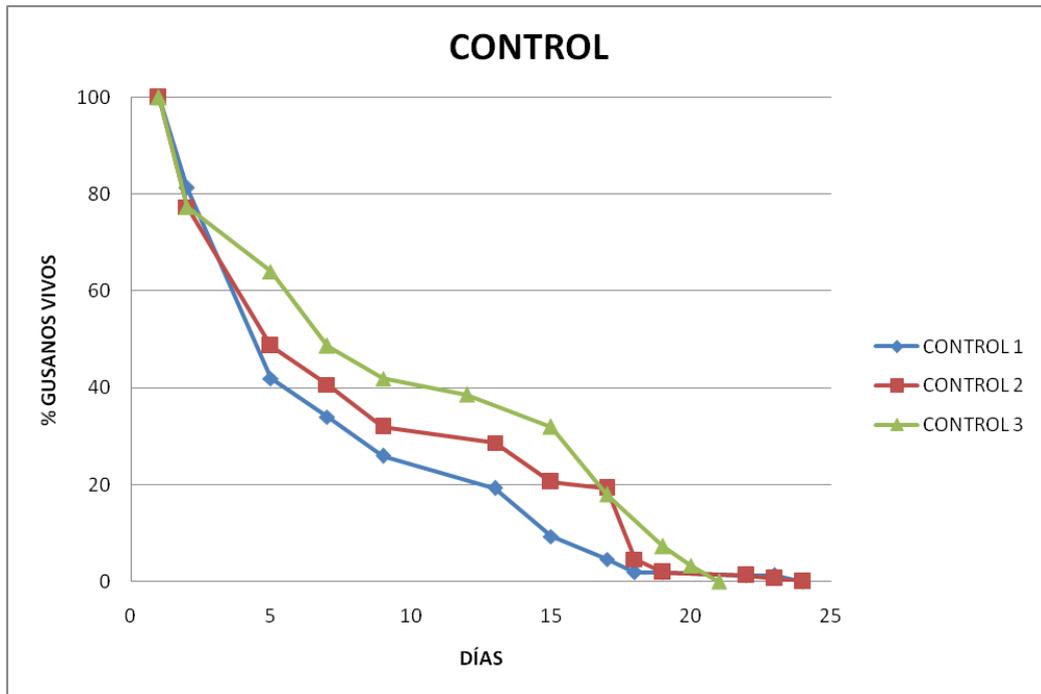
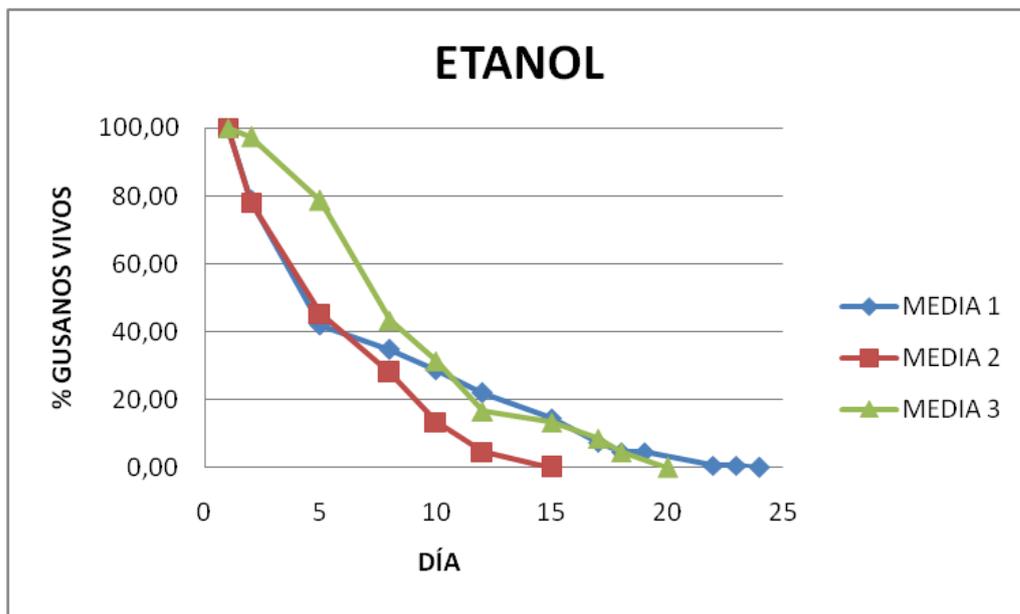
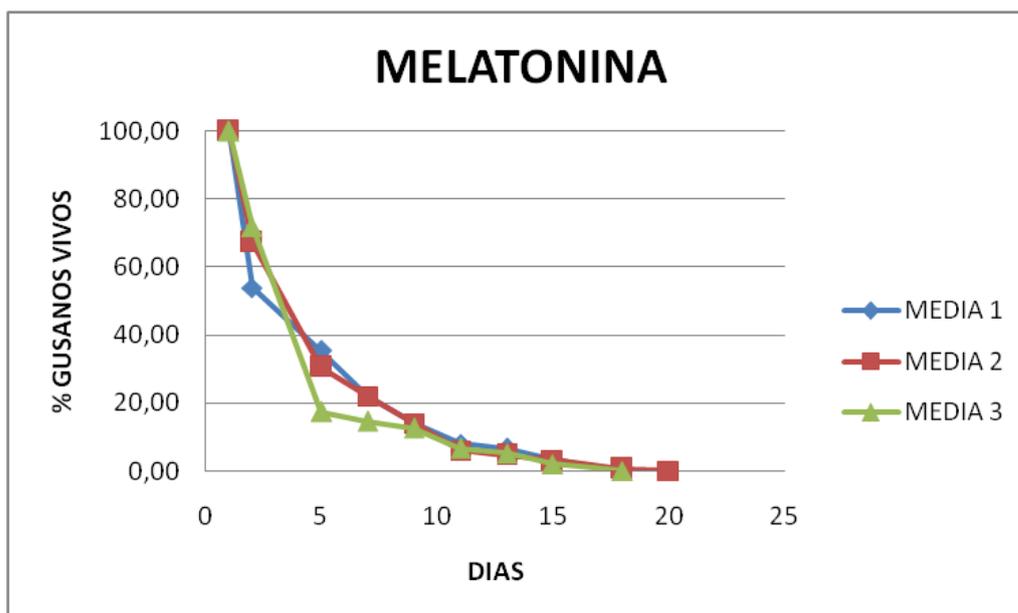


GRÁFICO 10. Tiempo de vida en la situación control (medias de los 3 experimentos)



GRÁFICA 11. Tiempo de vida en la situación con etanol solo (medias de los 3 experimentos)



**GRÁFICA 12.** Tiempo de vida en la situación con melatonina y etanol (medias de los 3 experimentos)

### 3.5. TABLAS DE LOS DATOS OBTENIDOS

DIAS/%GUSANOS VIVOS	CONTROL	ETANOL	MELATONINA +ETANOL
DIA 5	42	42	35,3
DIA 15	9,3	14,67	3,3
DIA 20	2	4,67	0

**TABLA 1.** MEDIAS DE LOS PORCENTAJES DE GUSANOS VIVOS DEL EXPERIMENTO 1

DIAS/%GUSANOS VIVOS	CONTROL	ETANOL	MELATONINA +ETANOL
DIA 5	48,67	45,3	30,6
DIA 15	20,7	0	3,3
DIA 20	2	0	0

**TABLA 2.** MEDIAS DE LOS PORCENTAJES DE GUSANOS VIVOS DEL EXPERIMENTO 2

DIAS/% GUSANOS VIVOS	CONTROL	ETANOL	MELATONINA +ETANOL
DIA 5	64	78,67	17,3
DIA 15	32	13,3	2
DIA 20	3,3	0	0

**TABLA 3.** MEDIAS DE LOS PORCENTAJES DE GUSANOS VIVOS DEL EXPERIMENTO 3

Respecto a los porcentaje, estudiamos que ocurre a día 15, en el experimento 1 del control vemos que de media en las 3 placas el porcentaje de gusanos vivos es de un 9,3 % respecto a los 50 gusanos iniciales, en el experimento 2 a esos mismos días es de 20,7 % y en el

experimento 3 el porcentaje de supervivencia es de un 32 % a esos 15 días. Si observamos los experimentos con etanol a esos 15 días en el experimento 1 el porcentaje de supervivencia es de 14,6 %, en el experimento 2 es del 0% y en el experimento 3 es de 13,3 %. Cuando se analizan los 15 días en los experimentos con melatonina se ven que los porcentajes de supervivencia en el experimento 1 es de 3,3 %, en el experimento 2 es de 3,3 % y en el experimento 3 es de un 2 %. Todos los datos en este caso son medias de los porcentajes de las 3 placas de cada experimento.

Por lo que viendo esos resultados se ven claras diferencias entre el porcentaje de supervivencia en el control y la supervivencia en presencia de 0,5 mM de melatonina. El porcentaje de supervivencia disminuye en cierta medida en el control con etanol aunque las diferencias más claras se ven en esa disminución en la melatonina (con etanol). Por lo que en estas condiciones ambos compuestos disminuyen el porcentaje de supervivencia de *C.elegans*.

	CONTROL	ETANOL	MELATONINA+ETANOL
<b>DIA 5</b>			
<b>Media</b>	51,56	51,56	27,78
<b>Desviación</b>	6,15	6,28	4,24
<b>p</b>	--	1,00	0,006
		Cont vs Et	Cont vs Mel+Et
		No signif	p < 0,01

**Tabla 4.** Análisis estadístico del porcentaje del tiempo de vida en el Día 5.

	CONTROL	ETANOL	MELATONINA+ETANOL
<b>DIA 15</b>			
<b>Media</b>	20,67	9,33	2,89
<b>Desviación</b>	4,15	2,65	1,34
<b>p</b>		0,04	0,0009
		Cont vs Et	Cont vs Mel+Et
		p < 0,05	p < 0,001

**Tabla 5.** Análisis estadístico del porcentaje del tiempo de vida en el Día 15.

	CONTROL	ETANOL	MELATONINA+ETANOL
<b>DIA 20</b>			
<b>Media</b>	2,44	1,56	0,00
<b>Desviación</b>	0,87	1,04	0,00
<b>p</b>		0,52153	0,0124
		Cont vs Et	Cont vs Mel+Et
		No signif	p < 0,05

**Tabla 6.** Análisis estadístico del porcentaje del tiempo de vida en el Día 20.

Se realiza un análisis estadístico ANOVA para ver si hay diferencias significativas entre el control y las otras dos condiciones experimentales.

Como se aprecia en las tablas anteriores (tablas 4,5 y 6) se ve que en el día 5 hay diferencias significativas entre el control y la condición melatonina con el etanol ( $p = 0,006$ ) mientras que en ese mismo día no hay diferencias significativas entre el control y el etanol ( $p = 1,00$ ). En el día 15 hay diferencias en ambos casos, es decir entre el etanol y el control ( $p = 0,04$ ) y entre el control y la melatonina con el etanol ( $p = 0,0009$ ). Por último en el día 20 hay diferencias

significativas entre el control y la situación con melatonina con etanol ( $p=0,0124$ ) mientras que no hay diferencias entre el etanol y el control (0,52153).

## **4. CONCLUSIONES**

En resumen se concluye que en estas condiciones experimentales, en las que existe un control, un control del disolvente (etanol) y un grupo experimental con melatonina y etanol, se ve que hay una disminución en el tiempo de supervivencia cuando se emplea el etanol, y que ese tiempo de supervivencia es aún menor cuando se observa el grupo melatonina y etanol.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Anisimov, V. 2003. Effects of Exogenous Melatonin—A Review. *Toxicologic Pathology*. 31:589–603.

Avery, L. y You, Y. 2013. *C. elegans* feeding\*. *WormBook*. 1–23.

Bellapart, J. y Boots, R. 2012. Potencial use of melatonin in sleep and delirium in the critically ill. *British Journal of Anaesthesia*. 108 (4): 572–80.

Bubenik, G. y Konturek, S. 2011. Melatonin and Aging: Prospects for human treatment. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 62,1,13-19.

Cabreiro, F. y Gems, D. 2013. Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Molecular Medicine*. 5, 1300–1310.

Campos, I., Nogueira, H. y Fernandes, L. 2013. Aging, circadian rhythms and depressive disorders: a review. *Am J Neurodegener Dis*. 2(4):228-246.

Dexter, P., Caldwell, K. y Caldwell, G. 2012. A Predictable Worm: Application of *Caenorhabditis elegans* for Mechanistic Investigation of Movement Disorders. *Neurotherapeutics*. 9:393–404

Lapierre, L. y Hansen, M. 2012. Lessons from *C.elegans*: Signaling pathways for longevity. *Trends Endocrinol Metab*. 23(12): 637–644.

Lee, J., Mukherjee, S., Yoon, K., Dwivedi, M. y Bandyopadhyay. 2013. The multiple faces of calcineurin signaling in *Caenorhabditis elegans*: Development, behaviour and aging. *Journal of Biosciences*. 38(2) 417–431.

Lionaki, E. y Tavernarakis N. Assessing Aging and Senescent Decline in *Caenorhabditis elegans* : Cohort Survival Analysis. *Cell Senescence: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 965, DOI 10.1007/978-1-62703-239-1\_31.

Luchetti, F., Canonico, B., Betti, M., Arcangeletti, M., Pilolli, F., Piroddi, M., Canesi, L., Papa, S. y Galli, F. 2010. Melatonin signaling and cell protection function. *The FASEB Journal*. 24, 3603–3624.

Mitchell DH, Stiles JW, Santelli J, Sanadi DR (1979) Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *J Gerontol*. 34, 28–36

Pazdernik, N. y Schedl. 2013. Introduction to Germ Cell Development in *C. elegans*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 757: 1–16.

Tanaka, D., Furusawa, K., Kameyama, K., Okamoto, H. y Doi, M. 2007. Melatonin signaling regulates locomotion behavior and homeostatic states through distinct receptor pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Neuropharmacology*. 53, 157-168.

Thomas, C., Woodruff, G. y Haag, E. 2012. Causes and consequences of the evolution of reproductive mode in *Caenorhabditis* nematodes. *Trends in Genetics*. 28(5): 213–220.

Tissenbaum, H. 2012. Genetics, Life Span, Health Span, and the Aging Process in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES*. 67A(5):503–510

Welter, K. 2008. La proteína verde fluorescente - una herramienta valiosa en la biomedicina. *Avances en Química*, 3(3), 99 – 103.

Zawilska, J., Skene, D. y Arendt, J. 2009. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacological Reports*. 61, 383-410.

Zee, P., Attarian, H. y Videnovic, A. 2012. Circadian Rhythm Abnormalities. *American Academy of Neurology*. 19(1):132–147.

Zhou, K., Pincus, Z. y Slack, F. 2011. Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans*. *Aging*. Vol.3 No.8.

<http://www.wormatlas.org/>

<http://seresmodelicos.csic.es/cuc.html>