

Doctorado en Ciencias Biológicas (subárea Genética) – PEDECIBA

**Patrones de senescencia molecular durante la ontogenia de peces anuales Sudamericanos del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)**



**MSc. Verónica Andrea Gutiérrez Coppetti**

**Director**

**Co-directores**

**Dra. Graciela García**

Sección Genética Evolutiva  
Facultad de Ciencias

**Dra. Ana Denicola**

Lab. Físicoquímica Biológica  
Facultad de Ciencias

**Dra. Nibia Berois**

Sección Biología Celular  
Facultad de Ciencias

Facultad de Ciencias – UdelaR  
Montevideo  
Diciembre 2014

## Índice general

Índice general.....	1
Índice de Figuras.....	5
Índice de Tablas.....	9
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	13
¿Qué es el envejecimiento?.....	13
Teorías sobre el envejecimiento.....	14
La mitocondria.....	16
Senescencia celular.....	20
Modelos animales en estudios sobre el envejecimiento.....	22
HIPÓTESIS GENERAL.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
ESTRATEGIA METODOLÓGICA EXPERIMENTAL TRANSVERSAL PARA LOS DIFERENTES ABORDAJES.....	27
Colecta de ejemplares en la naturaleza.....	27
Establecimiento de cruzamientos y obtención de progenies F1 de laboratorio.....	29
CAPITULO 1.....	31
CAPITULO 1 - Índice.....	32
INTRODUCCIÓN.....	34
El genoma mitocondrial de los peces Teleósteos.....	34
Replicación del ADNmt en vertebrados.....	35
Transcripción del ADNmt en vertebrados.....	36
Traducción del ADNmt en vertebrados.....	37
Mutaciones somáticas en el ADNmt con el envejecimiento.....	37
Acumulación de mutaciones y reparación del ADNmt en el envejecimiento.....	39
Evolución y divergencia de los genes mitocondriales en Cyprinodontiformes.....	40
Tasas de sustitución en el ADNmt de Cyprinodontiformes.....	41
Codificación de cisteína como marcador de la longevidad.....	41
Dinámica de los extremos cromosómicos durante el envejecimiento.....	42
Tecnologías de segunda generación en estudios del envejecimiento animal.....	43
HIPÓTESIS.....	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
MATERIALES y MÉTODOS.....	46

Secuenciación masiva del genoma mitocondrial en hermanos totales de <i>A. charrua</i> .....	46
Amplificación de la región control del ADNmt de <i>A. charrua</i> .....	47
Análisis de polimorfismos en las secuencias mitocondriales codificantes durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> .....	49
Secuenciación de 2 genes mitocondriales en poblaciones naturales y en cautiverio de <i>A. charrua</i> y <i>A. cheradophilus</i> .....	49
Estimación de la tasa de mutación del ADNmt en <i>Austrolebias</i> .....	52
Secuenciación masiva (NGS) parcial del genoma total de <i>A. charrua</i> y caracterización de proteínas candidatas asociadas al envejecimiento .....	52
Determinación de la actividad de la enzima telomerasa durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> .....	53
Análisis del acortamiento de los telómeros durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> mediante Southern blot .....	56
RESULTADOS.....	57
Organización, estructura y características del genoma mitocondrial de <i>A. charrua</i> .....	57
Presencia de polimorfismos en todas las secuencias mitocondriales codificantes durante la ontogenia de hermanos totales de <i>A. charrua</i> .....	62
Mutación y evolución del gen <i>cyt-b</i> durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> en la naturaleza y en cautiverio.....	64
Mutación y evolución del gen <i>cyt-b</i> durante la ontogenia de <i>A. cheradophilus</i> en la naturaleza y en cautiverio.....	70
Mutación y evolución del gen <i>cox-I</i> durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> en la naturaleza y en cautiverio.....	76
Mutación y evolución del gen <i>cox-I</i> durante la ontogenia de <i>A. cheradophilus</i> en el campo y en cautiverio.....	82
Tasas de mutación estimadas para los genes mitocondriales <i>cyt-b</i> y <i>cox-I</i> .....	89
Proteínas nucleares vinculadas al envejecimiento animal en <i>A. charrua</i> .....	90
Actividad de la telomerasa durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> .....	93
Estimación del acortamiento de los telómeros mediante la técnica de Southern-blot en <i>A. charrua</i>	97
DISCUSIÓN .....	101
El genoma mitocondrial de <i>A. charrua</i> .....	101
Evolución de las secuencias codificantes mitocondriales durante el envejecimiento de hermanos totales de <i>A. charrua</i> .....	103
Divergencia del gen <i>cyt-b</i> durante el envejecimiento de <i>Austrolebias</i> en la naturaleza.....	104
Divergencia del gen <i>cyt-b</i> durante el envejecimiento de <i>Austrolebias</i> en cautiverio .....	106
Divergencia del gen <i>cox-I</i> durante el envejecimiento de <i>Austrolebias</i> en la naturaleza .....	108

Divergencia del gen <i>cox-1</i> durante el envejecimiento de <i>Austrolebias</i> en cautiverio .....	108
Tasas de mutación de los genes mitocondriales <i>cyt-b</i> y <i>cox-1</i> en <i>Austrolebias</i> .....	109
Contenido de cisteína en las proteínas codificadas en el ADNmt de <i>Austrolebias</i> .....	110
Proteínas nucleares vinculadas al envejecimiento animal presentes en <i>A. charrua</i> .....	111
Dinámica de los extremos cromosómicos durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> .....	111
CONCLUSIONES .....	113
PERSPECTIVAS .....	114
CAPITULO 2 .....	115
CAPITULO 2 - Índice.....	116
INTRODUCCIÓN .....	117
Efectos del envejecimiento sobre la respiración mitocondrial.....	117
Daño oxidativo y disfunción mitocondrial.....	117
Proteínas carboniladas en el envejecimiento .....	118
HIPÓTESIS.....	120
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	120
MATERIALES y MÉTODOS .....	121
Diseño experimental con ejemplares obtenidos en cautiverio .....	121
Medidas del flujo de O <sub>2</sub> en un oxímetro de alta resolución .....	121
Determinación del acoplamiento mitocondrial en biopsias de hígado .....	123
Determinación de proteínas carboniladas: Oxyblot .....	124
RESULTADOS.....	126
Evaluación de la función mitocondrial en individuos de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio en 2012 .....	126
Evaluación de la función mitocondrial en individuos de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio en 2013 .....	130
Presencia de proteínas carboniladas durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> en cautiverio .....	134
DISCUSIÓN .....	135
Funcionalidad mitocondrial en el hígado durante el envejecimiento de <i>A. charrua</i> .....	135
Acumulación de proteínas oxidadas durante el envejecimiento de <i>A. charrua</i> .....	135
CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS.....	138
CAPITULO 3 .....	140
CAPITULO 3 - Índice.....	141
INTRODUCCIÓN .....	142
Senescencia celular y envejecimiento del organismo .....	142
La lipofuscina: biomarcador del envejecimiento .....	142

Acumulación de lipofuscina en diferentes órganos de peces teleósteos .....	143
HIPÓTESIS.....	144
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	144
MATERIALES y MÉTODOS .....	145
Fijación del tejido.....	145
Procesamiento del tejido para inclusión en parafina y cortes histológicos.....	145
Preparaciones histológicas para tinción con hematoxilina y eosina .....	145
Preparaciones histológicas y cuantificación de lipofuscina .....	145
RESULTADOS.....	146
Estructura del músculo esquelético de <i>A. charrua</i> .....	146
Detección de lipofuscina durante el envejecimiento de <i>A. charrua</i> en la naturaleza .....	146
DISCUSIÓN .....	150
Estructura del músculo esquelético de <i>A. charrua</i> .....	150
Acumulación de lipofuscina durante el envejecimiento de <i>A. charrua</i> .....	150
CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS.....	150
CONCLUSIONES GENERALES.....	151
AGRADECIMIENTOS .....	152
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153
Apéndice 1: Individuos analizados de <i>A. charrua</i> .....	165
Apéndice 2: Individuos analizados de <i>A. cheradophilus</i> .....	172
Apéndice 3: “Reads” de <i>A. charrua</i> con homología.....	176
Apéndice 4: Protocolos .....	180

## Índice de Figuras

Figura 1. Enzimas antioxidantes de las ROS. Las enzimas superóxido dismutasas catalizan la dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. La catalasa reacciona con el peróxido de hidrógeno para catalizar la formación de agua y oxígeno, mientras que la glutatión peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno con la consecuente oxidación del glutatión (GSH). Tomada de Lagouge and Larsson (2013). .....	15
Figura 2. a) Biogénesis de la fosforilación oxidativa. b) Esquema de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa en el cual se indican los sustratos de los diferentes complejos, el flujo de electrones (flechas rojas) y el flujo de protones. I: complejo <i>NADH deshidrogenasa</i> , II: complejo <i>succinato deshidrogenasa</i> , III: complejo <i>citocromo bc1</i> , IV: complejo <i>citocromo c oxidasa</i> , Q: ubiquinona. Tomadas de Larsson (2010).. .....	17
Figura 3. Representación del ADNmt de mamífero. En el exterior se representa la cadena H y en el interior la L. Los ARNt se representan por el código de una letra del aminoácido correspondiente. Se indican las posiciones de los orígenes de replicación de la cadena pesada (OH) y ligera (OL), así como los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (LSP y HSP). Tomada de Lauri et al. (2014). .....	19
Figura 4. La teoría eje mitocondria-lisosoma de envejecimiento. Tomada de Kurz et al. (2008). .....	21
Figura 5. Hábitat típico de los peces anuales. Charco temporal localizado en “La Coronilla” (Departamento de Rocha) .....	23
Figura 6. Ciclo de vida de los peces anuales. Adaptada de (Wourms 1972). .....	24
Figura 7. Ejemplares adultos de <i>A. charrua</i> . a) Hembra; b) Macho. ....	27
Figura 8. Ejemplares juveniles de <i>A. cheradophilus</i> . a) Hembra; b) Macho. ....	27
Figura 9. Esquema del diseño de los cruzamientos para la obtención de progenies en el laboratorio. ....	29
Figura 10. Genoma mitocondrial de <i>K. marmoratus</i> . En el exterior se representa la cadena H y en el interior la cadena L. Los ARNt se representan por el código de una letra del aminoácido correspondiente. Se indican las posiciones de los orígenes de replicación de la cadena pesada (OH) y ligera (OL). Las flechas indican la dirección de codificación de las proteínas mitocondriales: ND1-6; COI-III; ATP6; ATP8 y <i>Cyt-b</i> . Tomada de Lee et al. (2001). .....	34
Figura 11. Filogenia de la superfamilia Aplocheiloidei basada en caracteres morfológicos y comportamentales. En itálica se encuentran los géneros anuales. Tomada de Hrbek and Larson (1999). .....	35
Figura 12. Segregación mitótica del ADNmt. Un único evento mutacional en una molécula de ADNmt crea heteroplasmia en una célula. Moléculas de ADNmt mutado en rojo y normales en verde. La acumulación de ADNmt mutado por encima de un cierto nivel umbral (50%) conduce a una disfunción de la RC. Tomada de Lagouge and Larsson (2013). .....	38
Figura 13. a) Estructura química de la cisteína con el grupo tiol marcado en rojo. b) Estructura química de la cistina, formada luego de la oxidación del grupo tiol de la cisteína. En rojo está marcado el puente disulfuro. ....	42
Figura 14. Determinación de la actividad de la telomerasa mediante el kit TRAPEZE® .....	54
Figura 15. Esquema del montaje realizado para la transferencia del ADN a la membrana de nylon. ....	56
Figura 16. Gráfica correspondiente al alineamiento en el programa bl2seq del genoma mitocondrial de AUS7 con las secuencias de la RC amplificadas con los juegos de cebadores ACR-1 y ACR-2. ....	58
Figura 17. Representación visual del genoma mitocondrial de <i>A. charrua</i> creada con el programa Circos. El círculo más interno representa el %GC cada 5pb (las líneas más oscuras significan mayor %GC). El círculo externo representa las hebras H y L (fragmentos que aparecen hacia adentro del círculo) del ADNmt. En negro están indicadas las secuencias codificantes de proteínas, en rojo los ARNt, en marrón claro los ARNr y en marrón oscuro la región control. ....	59

- Figura 18. Estructura secundaria de los 22 ARNt presentes en el mitogenoma de *A. charrua*. El ARNt-Cys está resaltado con un recuadro rojo. ....61
- Figura 19. Porcentaje de individuos juveniles, adultos y seniles de *A. charrua* provenientes del campo y obtenidos en cautiverio en función de la posición nucleotídica en la secuencia del gen *cyt-b* que presenta un cambio. a) población de 2011; b) población de 2012; c) progenie 2012 y d) progenie 2013. Entre paréntesis se indica el número de individuos analizados en cada estadio ontogénico. ....67
- Figura 20. Alineamiento en el MEGA6 de las secuencias nucleotídicas parciales del gen *cyt-b* amplificadas en 19 individuos de *A. cheradophilus* colectados en la naturaleza en 2011. La flecha roja indica la inserción presente en 3 individuos provenientes de un charco ubicado en la zona de “La Charqueada”. ....71
- Figura 21. Porcentaje de individuos juveniles, adultos y seniles de *A. charrua* provenientes del campo y obtenidos en cautiverio en función de la posición nucleotídica en la secuencia del gen *cox-1* que presenta un cambio. a) población de 2011; b) población de 2012; c) progenie 2012 y d) progenie 2013. Entre paréntesis se indica el número de individuos analizados en cada estadio ontogénico. ....79
- Figura 22. Alineamiento en el programa Sequencher 4.10.1 de los cromatogramas de las secuencias *cox-1* obtenidas en 1 individuo joven, 1 adulto y 3 seniles provenientes de la Ruta 91. a) Transición (G/A) en la posición 30. b) Transversión (C/A) en la posición 105. c) Transición (G/A) en la posición 282 de la región amplificada. ....83
- Figura 23. Alineamiento en el programa Sequencher 4.10.1 de los cromatogramas de las secuencias *cox-1* obtenidas en 1 individuo adulto y 5 seniles provenientes del camino al Arrozal 33. a) Transición (T/C) en la posición 114. b) Transición (C/T) en la posición 255. c) Transición (G/A) en la posición 288 de la región amplificada. ....84
- Figura 24. Alineamiento en el programa Sequencher 4.10.1 de los cromatogramas de las secuencias *cox-1* obtenidas en 1 individuo juvenil y 4 seniles provenientes de la Zona de contacto. a) Transición (C/T) en la posición 60. b) Transición (G/A) en la posición 288. ....85
- Figura 25. Alineamiento en el programa Sequencher 4.10.1 de los cromatogramas de las secuencias *cox-1* obtenidas en 2 ejemplares jóvenes, 2 adultos y 2 seniles capturados en la Ruta 9 en 2012. En negrita se resalta el nucleótido diferente presente en la posición 390 de la región amplificada. ....86
- Figura 26. Análisis filogenético de unión de vecinos (Neighbor-joining) bajo el modelo de sustitución nucleotídica distancia-p para 3 proteínas nucleares aisladas en el genoma de *A. charrua*. a) IGF-1, b) Adcy5 y c) p53. Los soportes de los nodos fueron calculados mediante un análisis de Bootstrap (1000 réplicas). Como grupo externo se usó la secuencia de *Mus musculus*. Entre paréntesis se encuentra el número de acceso de las secuencias obtenidas del Genbank y en rojo están señalados los “reads” de *A. charrua* obtenidos de la secuenciación masiva. ....91
- Figura 27. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio, de los extremos teloméricos amplificados con el kit comercial “TRAPEZE® Telomerase Detection Kit” en 3 hembras jóvenes (1-5 y 7), 3 adultas (8-13) y 3 seniles (14-19) colectadas en la naturaleza durante el año 2012. En los pocillos 1, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 se sembraron las muestras con la telomerasa activa (+), mientras que en los restantes pocillos se sembraron las correspondientes muestras con la telomerasa inactivada por calor. En el pocillo 6 se sembró el marcador de peso molecular FastRuler™ Low Range DNA Ladder (FERMENTAS). La banda de 36pb corresponde al control interno del kit. ....94
- Figura 28. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio, de los extremos teloméricos amplificados con el kit comercial “TRAPEZE® Telomerase Detection Kit” en 3 hembras jóvenes (1-6), 3 adultas (8-13) y 1 senil (14-15) obtenidas en cautiverio durante el año 2012. En los pocillos 1, 3, 5, 8, 10, 12 y 14 se sembraron las muestras con la telomerasa activa (+), mientras que en los restantes pocillos se sembraron las correspondientes muestras con la telomerasa inactivada por calor. En el pocillo 7 se sembró el marcador de peso molecular FastRuler™ Low Range DNA Ladder (FERMENTAS). La banda de 36pb corresponde al control interno del kit. ....96
- Figura 29. Análisis genómico mediante Southern blot del acortamiento de los telómeros en machos y hembras de *A. charrua* obtenidos en cautiverio durante el 2013. Pocillos 2-5: hembras jóvenes; 7-8: machos jóvenes; 9-10: machos adultos; 13: hembra joven; 14: hembra senil; 16-17: machos jóvenes;

- 18-19: machos seniles. MPM: marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Invitrogen). El patrón de bandas del MPM se exportó de la foto del gel de agarosa correspondiente. .... 97
- Figura 30. Análisis genómico por Southern blot del acortamiento de los telómeros en hembras de *A. charrua* obtenidos en cautiverio durante el 2012 (carriles 2-10) y colectadas en la naturaleza (carriles 12-20). Pocillos 2-4: hembras jóvenes-F1; 5-7: hembras adultas-F1; 8-10: hembras seniles-F1; 12-14: hembras jóvenes-campo; 15-17: hembras adultas-campo; 18-20: hembras seniles-campo. MPM: marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Invitrogen). El patrón de bandas del MPM se exportó de la foto del gel de agarosa correspondiente. .... 99
- Figura 31. Concentración de O<sub>2</sub> (azul en el eje Y1) y flujo de O<sub>2</sub> (rojo en el eje Y2) en función del tiempo. El registro de datos se inició luego de la adición de una suspensión celular. Los eventos marcan el inicio de una nueva fase del análisis (por ej. luego de la adición de alguno de los reactivos) y se muestran mediante líneas verticales. Las marcas realizadas en las regiones más constantes de cada evento, se muestran mediante barras horizontales entre dos líneas verticales, con el nombre de la marca en la barra inferior. Superpuesta en la figura, se muestra la Tabla con los valores promedio de cada evento. Tomada de [www.bioblast.at/index.php/MiPNet19.01E\\_O2\\_Flux\\_Analysis](http://www.bioblast.at/index.php/MiPNet19.01E_O2_Flux_Analysis). .... 122
- Figura 32. Registro del consumo de oxígeno en el hígado de una hembra joven. La gráfica azul indica la concentración de oxígeno [nmol/ml] y la roja el flujo de oxígeno por masa de tejido [pmol/(s\*mg)] en función del tiempo. El registro de datos se inició después de la adición de la biopsia. Las flechas señalan el momento en que se adicionaron los diferentes reactivos. .... 127
- Figura 33. Gráfica de los valores promedio de RCR obtenidos en hígados de hembras (rosado) y machos (azul) juveniles de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2012. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar para cada set de datos. .... 129
- Figura 34. Gráfica de los valores promedio de RCR obtenidos en hígados de individuos jóvenes (naranja) y seniles (celeste) de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2012. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar para cada set de datos. .... 129
- Figura 35. Registro del consumo de oxígeno en el hígado de un macho joven. La gráfica azul indica la concentración de oxígeno [nmol/ml] y la roja el flujo de oxígeno por masa de tejido [pmol/(s\*mg)] en función del tiempo. El registro de datos se inició después de la adición de la biopsia. Las flechas señalan el momento en que se adicionaron los diferentes reactivos. .... 131
- Figura 36. Gráfica de los valores promedio de RCR obtenidos en hígados de hembras (rosado) y machos (azul) juveniles de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2013. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar para cada set de datos. .... 133
- Figura 37. Gráfica de los valores promedio de RCR obtenidos en hígados de individuos jóvenes (naranja) y seniles (celeste) de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2013. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar para cada set de datos. .... 133
- Figura 38. Presencia de proteínas carboniladas en el hígado de hembras de *A. charrua* durante su ontogenia en cautiverio. a) SDS-PAGE (12%) de las proteínas carboniladas detectadas por Western blot usando un anticuerpo anti-DNP, en 3 hembras juveniles y 3 adultas. b) Western blot para la proteína actina (control de carga). Marcador de peso molecular: Prestained Protein Molecular Weight Marker (#SM0441, FERMENTAS). .... 134
- Figura 39. Presencia de proteínas carboniladas en el hígado de hembras de *A. charrua* colectadas en la naturaleza. a) SDS-PAGE al 12% tenido con Coomassie Blue donde se observan las proteínas totales en cada una de las muestras. b) SDS-PAGE al 12% de las proteínas carboniladas detectadas por Western blot usando un anticuerpo anti-DNP, c) Western blot para la proteína actina que fue utilizada como control cuantitativo de cada muestra. En este análisis no se incluyó la hembra senil por disponibilidad de carriles. El marcador de peso molecular (MPM) sembrado fue el PageRuler™ Prestained Protein ladder (#SM0671, FERMENTAS). Como se indica en la figura, se analizaron dos concentraciones diferentes de proteínas totales: 1500 y 2.155 µg/mL. J= juveniles, A=adultos, S=seniles. .... 136
- Figura 40. Estructura del músculo estriado de *A. charrua*. Corte histológico teñido con HyE de una hembra de *A. charrua* colectada en la naturaleza al inicio de su ciclo de vida (20X). (A) corte transversal de una fibra muscular donde se distinguen los núcleos (azul/púrpura) localizados en la periferia del

sarcoplasma (rosa). (B) corte longitudinal de la fibra muscular con los núcleos localizados a lo largo del sarcoplasma. En estas fibras puede apreciarse la estriación característica de este tipo muscular. Escala=1000µm.....146

Figura 41. Acumulación de lipofuscina en el músculo esquelético de hembras de *A. charrua* colectadas en la naturaleza. Cortes histológicos transversales de las fibras musculares observados a una excitación de 488nm (40X). a) Hembra joven colectada al inicio del ciclo de vida, b) Hembra adulta colectada 2 meses después y c) Hembra senil colectada al final del ciclo de vida. En azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst (1:8000) y en verde opaco el sarcoplasma. En la periferia de la fibra, se observan regiones verdes fluorescentes que corresponden a la acumulación de lipofuscina (flecha blanca). Escala=1000µm.....147

Figura 42. Acumulación de lipofuscina en una de las fibras musculares de la figura 41c. En azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst (1:8000) y en verde opaco el sarcoplasma. En la periferia de la fibra, se observan regiones verdes fluorescentes que corresponden a la acumulación de lipofuscina. ....147

Figura 43. Acumulación de lipofuscina en el músculo esquelético de machos de *A. charrua* colectados en la naturaleza. Cortes histológicos de las fibras musculares observados a una excitación de 488nm (40X). a) Corte transversal del músculo de un macho adulto colectado en la mitad de su ciclo de vida, b) Corte longitudinal del músculo de un macho senil colectado al final del ciclo de vida. En azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst (1:8000) y en verde opaco el sarcoplasma. En la periferia de la fibra, se observan regiones verdes fluorescentes que corresponden a la acumulación de lipofuscina (flecha blanca). Escala=1000µm. ....147

Figura 44. Aumento de la lipofuscina en el músculo esquelético de hembras de *A. charrua* colectadas en la naturaleza. Gráfica del promedio de la intensidad de fluorescencia en cada estadio ontogenético ± el desvío estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). ....148

Figura 45. Aumento de la lipofuscina en el músculo esquelético de machos de *A. charrua* colectados en la naturaleza. Gráfica del promedio de la intensidad de fluorescencia en cada estadio ontogenético ± el desvío estándar. ....149

## Índice de Tablas

Tabla 1. Días en que se realizaron las colectas y número aproximado de ejemplares (n) de <i>A. charrua</i> capturados en la naturaleza.....	28
Tabla 2. Días en que se realizaron las colectas y número aproximado de ejemplares (n) de <i>A. cheradophilus</i> colectados en la naturaleza. ....	28
Tabla 3. Días en que se realizaron los procesamientos y edad aproximada de los ejemplares de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio.....	30
Tabla 4. Días en que se realizaron los procesamientos y edad aproximada de los ejemplares de <i>A. cheradophilus</i> obtenidos en cautiverio. ....	30
Tabla 5. Cebadores específicos diseñados para amplificar la RC del ADNmt de <i>A. charrua</i> .....	47
Tabla 6. Concentraciones de los diferentes reactivos en la mezcla de reacción para la región control. ....	48
Tabla 7. Concentraciones de los diferentes reactivos para las mezclas de reacción de los genes mitocondriales.....	50
Tabla 8. Mezcla de reacción empleada en la determinación de la actividad de la telomerasa con el kit comercial “TRAPEZE® Telomerase Detection Kit” (Millipore). ....	55
Tabla 9. Resultados obtenidos de la secuenciación en la plataforma Illumina Genome Analyzer Iix. ....	57
Tabla 10. Contenido nucleotídico del mitogenoma de <i>A. charrua</i> y contenido G+C de las secuencias codificantes localizadas en la hebra H. ....	58
Tabla 11. Organización y características del genoma mitocondrial de <i>A. charrua</i> . ....	60
Tabla 12. Cambios nucleotídicos en los genes mitocondriales amplificados en hermanos totales de <i>A. charrua</i> . El mitogenoma de AUS7 se usó de referencia y está resaltado en negrita. ....	62
Tabla 13. Cambios en las secuencias aminoacídicas de los genes mitocondriales.....	63
Tabla 14. Número de individuos de <i>A. charrua</i> de los cuales se extrajo ADN genómico total.....	64
Tabla 15. Número de individuos de <i>A. charrua</i> en los cuales se amplificó el gen <i>cyt-b</i> . ....	64
Tabla 16. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen <i>cyt-b</i> amplificadas en los individuos de <i>A. charrua</i> colectados en la naturaleza en 3 etapas de su ontogenia. ....	68
Tabla 17. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen <i>cyt-b</i> amplificadas en los individuos de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio. ....	69
Tabla 18. Número de individuos de <i>A. cheradophilus</i> de los cuales se extrajo ADN genómico total.....	70
Tabla 19. Número de individuos de <i>A. cheradophilus</i> en los cuales se amplificó el gen <i>cyt-b</i> .....	70
Tabla 20. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen <i>cyt-b</i> amplificadas en los individuos de <i>A. cheradophilus</i> colectados en la naturaleza.....	74
Tabla 21. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen <i>cyt-b</i> amplificadas en los individuos de <i>A. cheradophilus</i> obtenidos en cautiverio. ....	75
Tabla 22. Número de individuos de <i>A. charrua</i> en los cuales se amplificó el gen <i>cox-1</i> . ....	76
Tabla 23. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen <i>cox-1</i> amplificadas en los individuos de <i>A. charrua</i> colectados en la naturaleza. ....	80
Tabla 24. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen <i>cox-1</i> amplificadas en los individuos de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio. ....	81
Tabla 25. Número de individuos de <i>A. cheradophilus</i> en los cuales se amplificó el gen <i>cox-1</i> . ....	82
Tabla 26. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen <i>cox-1</i> amplificadas en los individuos de <i>A. cheradophilus</i> colectados en la naturaleza.....	88

Tabla 27. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen <i>cox-1</i> amplificadas en los individuos de <i>A. cheradophilus</i> obtenidos en cautiverio. ....	88
Tabla 28. Tasas de mutación estimadas para el gen <i>cyt-b</i> en poblaciones naturales y progenies de laboratorio de <i>A. charrua</i> y <i>A. cheradophilus</i> .....	89
Tabla 29. Tasas de mutación estimadas para el gen <i>cox-1</i> en poblaciones naturales y progenies de laboratorio de <i>A. charrua</i> y <i>A. cheradophilus</i> .....	90
Tabla 30. Concentración de proteínas totales en las hembras de <i>A. charrua</i> analizadas.....	93
Tabla 31. Peso de los hígados de los ejemplares de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio analizados en 2012. ....	126
Tabla 32. Valores de flujo de O <sub>2</sub> por masa de tejido [pmol/(s*mg)] luego de la adición de los sustratos, inhibidores y del desacoplante en individuos de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio en 2012. En amarillo se resaltan los valores obtenidos para el RCR y en verde para el UCR. ....	128
Tabla 33. Peso de los hígados de todos los ejemplares de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio analizados en el 2013. ....	130
Tabla 34. Valores de flujo de O <sub>2</sub> por masa de tejido [pmol/(s*mg)] luego de la adición de los sustratos, inhibidores y del desacoplante en individuos de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio en 2013. En amarillo se resaltan los valores obtenidos para el RCR y en verde para el UCR. ....	132

## RESUMEN

---

El envejecimiento es la acumulación de modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen con el paso de los años como consecuencia de la acción del tiempo sobre los seres vivos. Los órganos y sus funciones asociadas comienzan a deteriorarse paulatinamente favoreciendo la aparición y desarrollo de diferentes enfermedades. Actualmente, el proceso de envejecimiento se está investigando a nivel celular y molecular en diferentes especies animales. Los peces teleósteos presentan varias ventajas que los hace un excelente modelo para estudiar el envejecimiento debido a que comparten muchas vías de desarrollo, mecanismos fisiológicos y sistemas de órganos con los seres humanos y otros mamíferos. Como animales de experimentación, los peces son menos costosos de mantener y se adaptan fácilmente a las condiciones en cautiverio. En los últimos 10 años, diferentes grupos de investigación han estudiado diferentes aspectos del envejecimiento animal en peces teleósteos endémicos del continente africano que presentan un ciclo de vida anual (< 1 año) proponiéndolos como un excelente modelo para estudiar este proceso. En este sentido, en esta Tesis se realizó por primera vez un abordaje interdisciplinario sobre la hipótesis de que daños acumulativos en el ADN y el acortamiento de los telómeros pueden estar asociados con daños oxidativos producidos por las especies reactivas del oxígeno y vinculados a la senescencia celular e individual en especies de peces anuales del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Por primera vez se abordaron diferentes aspectos moleculares del envejecimiento animal, tales como acumulación de daños en el ADN, dinámica de los extremos cromosómicos, funcionalidad de la cadena respiratoria, presencia de daño oxidativo y disminución de la auto-fagocitosis, en diferentes etapas de la ontogenia (juvenil, adulta y senil) de poblaciones naturales y de progenies obtenidas en cautiverio de *Austrolebias*. Desde la genómica, los diferentes análisis de los genes mitocondriales (secuenciación masiva, análisis de poblaciones naturales y de pedigrí de laboratorio) fueron concordantes en la aparición de cambios nucleotídicos en etapas tempranas del ciclo de vida (juveniles), a pesar de los diferentes tipos de selección actuando sobre ellos en algunas etapas de la ontogenia. Se realizó por primera vez una aproximación a la estimación de la tasa de mutación por año (o generación) de los genes *cyt-b* y *cox-1*, tanto en poblaciones naturales como en pedigrís de laboratorio para el género *Austrolebias*, obteniéndose tasas estimadas considerablemente elevadas. La secuenciación masiva parcial del genoma de *A. charrua*, reveló por primera vez la presencia de genes nucleares codificantes de proteínas vinculadas al envejecimiento animal. Desde la proteómica, el análisis de la dinámica de los extremos cromosómicos sugirió que la actividad de la enzima telomerasa en el hígado de *A. charrua* no decae, mientras que reveló un posible acortamiento de las secuencias teloméricas en las células musculares durante el envejecimiento en la naturaleza y en cautiverio de esta especie. Por otro lado, se evaluó la funcionalidad mitocondrial

y la acumulación de proteínas carboniladas durante el envejecimiento de *A. charrua* en condiciones de cautiverio. Se observó que la tasa respiratoria es similar entre hembras y machos jóvenes y que puede haber una disminución significativa de la misma como consecuencia del envejecimiento. Sorprendentemente, se detectó una elevada presencia de proteínas carboniladas en el hígado de los individuos más jóvenes. Por último, se analizó la presencia del biomarcador lipofuscina en el músculo esquelético de hembras y machos de *A. charrua* procedentes de la naturaleza, detectándose este pigmento desde etapas tempranas del ciclo de vida y un aumento del mismo durante el envejecimiento de esta especie. A pesar de la detección precoz de diferentes marcadores moleculares vinculados al envejecimiento, los resultados preliminares obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis sugieren que las especies de *Austrolebias* presentan patrones típicos del envejecimiento de los vertebrados, por lo cual podrían ser un buen modelo de investigación para diferentes abordajes interdisciplinarios en esta temática tan compleja.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

---

Actualmente, los mecanismos que rigen el envejecimiento son el foco de extensas investigaciones que buscan desentrañar los principios de estos procesos. Sin embargo, entender los mecanismos moleculares del envejecimiento en los vertebrados todavía es un reto para la biología moderna y las ciencias biomédicas (Kishi, 2011).

Durante el proceso de envejecimiento, se acumulan diversos cambios fisiopatológicos, así como daño de tejidos y órganos específicos, y en consecuencia aparecen varias enfermedades crónicas a medida que avanza la edad (Busuttil et al., 2007; Cooper et al., 1983; Garcia et al., 2010). Aunque existen mecanismos de envejecimiento evolutivamente conservados que podrían desempeñar los mismos roles en diversos organismos, las manifestaciones del envejecimiento pueden diferir inter e intra especies. Por esto, diferentes modelos animales se han utilizado para estudiar diversos aspectos del envejecimiento animal y establecer el modelo óptimo sigue siendo uno de los desafíos más importantes.

Puesto que cada uno de los modelos existentes tienen ciertas restricciones, y estudiar el envejecimiento en un único modelo puede ser limitante debido a la complejidad del proceso, un enfoque integrador utilizando diversos sistemas ayudará a identificar los elementos comunes del envejecimiento de todos los organismos. Por ejemplo, algunos mecanismos del envejecimiento podrían estar evolutivamente conservados y ser comunes a los vertebrados, pero también hay mecanismos linaje específico. Por lo tanto, una biología comparativa del envejecimiento es necesaria para comprender y obtener un panorama más completo de las causas fundamentales del envejecimiento (Kishi, 2011). En este sentido están disponibles bases de datos conteniendo listados de genes y vías que pueden estar involucrados en el proceso de envejecimiento de organismos modelo y no-modelo (<http://genomics.senescence.info/species/index.html>).

## *¿Qué es el envejecimiento?*

Strehler (1959) propuso que para ser considerado parte del envejecimiento biológico (o fisiológico) un cambio ligado a la edad debe poseer los siguientes requisitos: a) universalidad (en todos los individuos de una especie); b) naturaleza intrínseca (para distinguir el envejecimiento natural de otras alteraciones que pueden surgir con el paso del tiempo a causa de factores nocivos del medio ambiente); c) carácter progresivo (porque se trata de un proceso y no de un fenómeno repentino), y d) efectos perjudiciales. Posteriormente, Miquel (2006) definió al envejecimiento normal de los metazoos como “un proceso de desorganización gradual e irreversible que ocurre con el paso del tiempo, causa una pérdida progresiva de la capacidad bioenergética y el rendimiento funcional e

imposibilita la supervivencia ilimitada de los sujetos humanos y miembros de otras especies de metazoos, incluso en un hábitat óptimo”.

### *Teorías sobre el envejecimiento*

Las causas del envejecimiento normal, posiblemente sean multifactoriales. Numerosas teorías han sido propuestas para explicar los mecanismos biológicos del envejecimiento, pero presentan dificultades inherentes a los fenómenos que proponen y la mayoría no son mutuamente excluyentes y hasta el presente, no hay evidencia de un único mecanismo responsable de la senectud.

Teniendo en cuenta que existen más de 300 teorías sobre el envejecimiento (Medvedev, 1990), aquí nos centraremos solamente en algunas de las que consideran el rol que tienen las mutaciones del ADN mitocondrial (ADNmt) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el envejecimiento animal.

#### La teoría de los radicales libres

La “teoría de los radicales libres” marcó un hito en la investigación molecular del envejecimiento y fue inicialmente propuesta por Harman (1956). Esta teoría postulaba que la producción intracelular de ROS y sus efectos perjudiciales sobre varios componentes celulares, eran determinantes de la longitud de vida.

Las ROS se generan en múltiples compartimentos celulares, pero alrededor del 90% se producen en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa (Balaban et al., 2005). Como se detallará más adelante, durante la respiración mitocondrial, los complejos *NADH deshidrogenasa* (I) y *bc1* (III) son los mayores generadores de ROS, principalmente del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). El radical superóxido se encuentra en equilibrio con su ácido conjugado, el radical perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ) el cual es más reactivo y puede dañar las membranas lipídicas. Si el  $O_2^{\cdot-}$  no es eliminado, puede generar por mecanismo Fenton radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) altamente reactivos que reaccionan rápidamente con la desoxirribosa de las bases del ADN. Generalmente, las bases modificadas son eliminadas por las enzimas involucradas en la reparación del ADN (Ashok and Ali, 1999).

Diferentes isoenzimas son responsables de la destoxicación de los radicales superóxido y se conocen como enzimas antioxidantes. El descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD), puso en evidencia la presencia de sistemas de barrido enzimáticos específicos que han evolucionado para desintoxicar el  $O_2^{\cdot-}$  y otros tipos de ROS (McCord and Fridovich, 1969). En la mitocondria, la enzima manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) cataliza la dismutación del superóxido en  $O_2$  y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), mientras que en el citoplasma celular esta reacción es catalizada por

la isoforma CuZn-SOD. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  posteriormente es reducido a  $\text{H}_2\text{O}$  mediante peroxidasas como la catalasa (CAT), la enzima glutatión peroxidasa (GPx) o peroxirredoxinas tiol-dependientes (Prx) tanto mitocondriales como citosólicas (Figura 1).

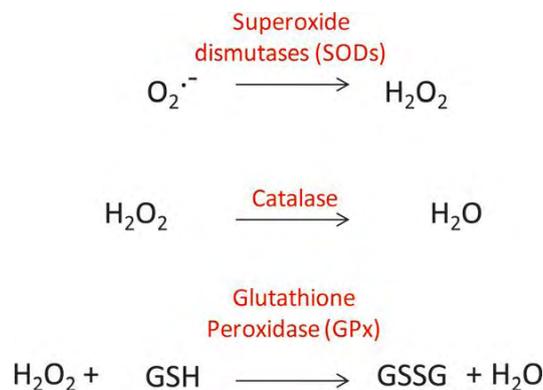


Figura 1. Enzimas antioxidantes de las ROS. Las enzimas superóxido dismutasas catalizan la dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. La catalasa reacciona con el peróxido de hidrógeno para catalizar la formación de agua y oxígeno, mientras que la glutatión peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno con la consecuente oxidación del glutatión (GSH). Tomada de Lagouge and Larsson (2013).

Un estudio realizado con ratones transgénicos con el gen que codifica la Mn-SOD inactivado mediante recombinación homóloga, reveló que los ratones homocigotas se morían dentro de los primeros 10 días de nacidos, sugiriendo que la Mn-SOD es necesaria para el funcionamiento biológico normal de los tejidos manteniendo la integridad de las enzimas mitocondriales susceptibles a la inactivación por el superóxido (Li et al. 1995).

Si los radicales libres son los principales responsables del envejecimiento, una reducción de sus niveles intracelulares mediante las enzimas antioxidantes debería retardar el envejecimiento incrementando la longitud de vida del organismo (Ashok and Ali 1999). Sin embargo, se ha observado que la actividad de estas enzimas disminuye con la edad cronológica en muchos tejidos y células en ratas (Gupta et al., 1991; Semsei et al., 1991; Zhu et al., 2006), en ratones (Kishido et al., 2007) y recientemente se ha demostrado en los peces anuales *Nothobranchius rachovii* y *N. guentheri* (Hsu et al. 2008; Liu et al. 2012).

## La teoría mitocondrial de los radicales libres

Como se verá más adelante, la cadena respiratoria mitocondrial (o cadena de transporte de electrones) es un sitio importante en la producción de ROS en la célula y por lo tanto se ha sugerido que las mitocondrias son los objetivos principales del daño oxidativo. El reconocimiento de la importancia del rol de las mitocondrias, llevó a un “refinamiento” de la teoría anteriormente planteada, convirtiéndose en la “teoría mitocondrial de los radicales libres” (Harman, 1972; Miquel et al., 1980). Esta nueva teoría considera a las mutaciones del ADNmt como el evento inicial del envejecimiento. Postula que este proceso es causado por la toxicidad de las ROS, iniciándose un “círculo vicioso” en el que el daño en el ADN mitocondrial y otros constituyentes mitocondriales conduce a la disfunción de la cadena respiratoria y esto a su vez conduce a un aumento en la generación de ROS facilitando un mayor daño al ADNmt y creando así un deterioro.

## *La mitocondria*

### Estructura de la mitocondria

La mitocondria se encuentra presente en prácticamente todas las células eucariotas y en su interior ocurren procesos metabólicos esenciales, tales como la oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs y algunas etapas de la biosíntesis de aminoácidos y del grupo hemo.

Dentro de las células, existen numerosas mitocondrias. Éstas forman dinámicas redes (o condrioma celular) que son colocadas en la ubicación subcelular correcta gracias a especializadas maquinarias de transporte. El número de mitocondrias dentro de cada célula, depende de las necesidades energéticas de la célula.

La morfología de la mitocondria es difícil de describir ya que son estructuras muy plásticas que se deforman, se dividen y se fusionan, pero normalmente se las representa en forma alargada u ovoide. Su tamaño oscila entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y hasta 7  $\mu\text{m}$  de longitud. Estos organelos poseen dos membranas claramente diferenciadas en sus funciones y actividades enzimáticas, la membrana externa y la interna, que delimitan dos compartimentos en su interior: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana externa, separa el espacio intermembrana del citoplasma, y es una bicapa lipídica permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos, debido a que contiene proteínas denominadas porinas, o VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje), que forman poros que permiten el paso de moléculas de hasta 10 kDa de masa y un diámetro aproximado de 2 nm. La membrana interna presenta gran abundancia de proteínas (80%) exclusivas de este organelo, carece de poros y es altamente selectiva. Contiene muchos complejos enzimáticos y sistemas de transporte transmembrana, que están implicados en la translocación de moléculas. Esta membrana forma

invaginaciones o pliegues (llamados crestas mitocondriales) que aumentan mucho la superficie para el anclaje de dichas enzimas. Si bien el número de mitocondrias por célula es constante para cada tipo celular (entre  $10^2$ - $10^5$ ) la densidad de las crestas es variable y depende principalmente de la demanda energética de la célula.

### Función de la mitocondria

La función principal de estos organelos citoplasmáticos es la de generar la energía química (en forma de ATP) necesaria para la actividad celular mediante la combustión de los nutrientes obtenidos de la dieta y el consumo de oxígeno, produciendo agua como producto final. Este proceso es conocido como fosforilación oxidativa (OXPHOS).

La cadena respiratoria se localiza en la membrana interna mitocondrial y está compuesta por cuatro complejos enzimáticos fijos (I al IV) y dos transportadores de electrones móviles responsables de generar el gradiente electroquímico de protones ( $H^+$ ) que impulsa la síntesis de ATP mediante la enzima *ATP sintasa* (Figura 2).

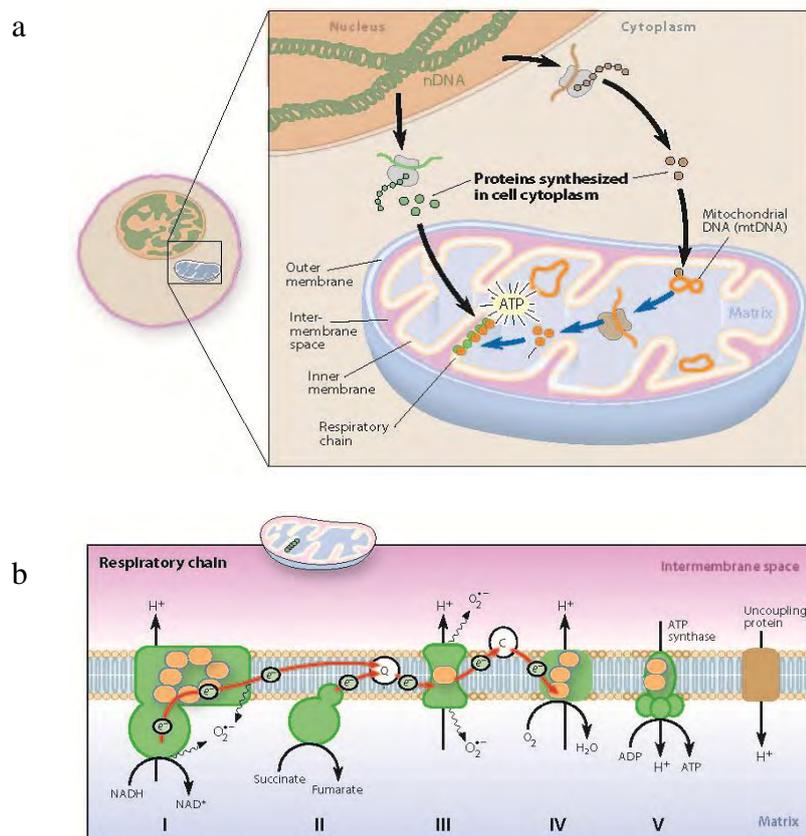


Figura 2. a) Biogénesis de la fosforilación oxidativa. b) Esquema de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa en el cual se indican los sustratos de los diferentes complejos, el flujo de electrones (flechas rojas) y el flujo de protones. I: complejo *NADH deshidrogenasa*, II: complejo *succinato deshidrogenasa*, III: complejo *citocromo bc1*, IV: complejo *citocromo c oxidasa*, Q: ubiquinona. Tomadas de Larsson (2010)..

El complejo I (o *NADH deshidrogenasa*) es el responsable de la transferencia de los 2 electrones del NADH al *coenzima Q* (o ubiquinona). Al capturar un electrón, la ubiquinona se reduce dando lugar al anión *semiquinona* con un radical libre que posteriormente se reduce originando el *ubiquinol* (QH<sub>2</sub>). Este flujo de electrones provoca el bombeo de 4H<sup>+</sup> desde el lado de la matriz al lado citosólico de la membrana interna mitocondrial. El complejo II (o *succinato deshidrogenasa*) es una proteína intrínseca de la membrana interna, que transfiere los electrones del FADH<sub>2</sub> (formado en el ciclo de Krebs por la oxidación del succinato a fumarato por medio de la succinato deshidrogenasa) al *coenzima Q*, pero no es una bomba de protones porque el cambio de energía libre de la reacción catalizada es demasiado pequeño. El complejo III (o *citocromo reductasa, ubiquinol-citocromo c*, o *citocromo bc1*) es la segunda bomba de protones de la cadena respiratoria y está formado por dos tipos de citocromos (proteínas transportadoras de electrones que contienen un grupo prostético hemo) llamados *b* y *c<sub>1</sub>* y una proteína Fe-S. Este complejo cataliza la transferencia de electrones desde el QH<sub>2</sub> al *citocromo c*, provocando el transporte de 2H<sup>+</sup> hacia el citosol a través de la membrana interna mitocondrial. El último complejo de la cadena respiratoria, el complejo IV (o *citocromo c oxidasa*) cataliza la transferencia de electrones desde el *ferrocitocromo c* (la forma reducida) hasta el O<sub>2</sub> molecular que es el aceptor final. La enzima logra la transferencia simultánea de 4 electrones al O<sub>2</sub> para formar H<sub>2</sub>O y se bombean 2H<sup>+</sup> desde la matriz hacia el citosol. Sin embargo, puede existir cierto escape de electrones que llevan a la reducción parcial del O<sub>2</sub> formando radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La transferencia de un único electrón al O<sub>2</sub> provoca su reducción parcial y genera el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), radical reactivo altamente destructivo (Lubert, 1995).

Finalmente, la síntesis de ATP, a partir de ADP y fosfato (Pi), ocurre en la matriz mitocondrial por medio de un complejo enzimático situado en la membrana mitocondrial interna, denominado *ATP sintasa* (o ATPasa mitocondrial). En 1961, Mitchell postuló la hipótesis quimiosmótica en la cual la síntesis de ATP por medio de la *ATP sintasa* estaba dirigida por una fuerza protomotriz a través de la membrana interna, inducida por el aumento de H<sup>+</sup> en el citosol ocasionado por la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria. Los flujos de ATP y ADP a través de la membrana interna están acoplados y ocurren por medio de un transportador específico, la *ATP-ADP translocasa* (o transportador de nucleótidos de adenina) (Lubert, 1995).

Por lo tanto, la fosforilación oxidativa mitocondrial involucra las reacciones que llevan a la síntesis de ATP utilizando la energía disponible tras la oxidación de sustratos en la cadena respiratoria. El acoplamiento de los dos procesos se realiza a través del gradiente de protones que es generado por el transporte de electrones en la cadena respiratoria.

## El genoma mitocondrial

Las mitocondrias poseen su propio material genético, en un número de copias que oscila entre uno y diez. El ADN mitocondrial (ADNmt) se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana mitocondrial interna denominados nucleoides (Bogenhagen et al., 2003; Garrido et al., 2003).

En los mamíferos (y vertebrados en general) el ADNmt es una molécula circular de doble hebra denominadas la hebra H (pesada o “heavy”) y la hebra L (liviana o “light”). Presenta un tamaño de aproximadamente de 17 Kb (16,6 Kb en humano y 16,3 Kb en el ratón). Codifica 2 ARN ribosomales (ARNr 12S y 16S), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 proteínas de la cadena respiratoria (7 subunidades del complejo *NADH deshidrogenasa* (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6), 1 subunidad del complejo III (*cyt-b*), 3 subunidades del complejo *citocromo oxidasa* (CO) (COI, II y III) y 2 subunidades de la *ATP sintasa* (ATPasa 6 y ATPasa 8)). La región control (o D-loop por “displacement loop”) es no codificante y contiene la promotores para las hebras H y L (HSP y LSP) y el origen de replicación de la hebra principal del ADNmt ( $O_H$ ) (Figura 3). Los genes nucleares codifican las proteínas restantes de la cadena respiratoria y otras proteínas que tienen diversas funciones en la mitocondria, tales como el mantenimiento y expresión del ADNmt (Falkenberg et al., 2007; Larsson, 2010).

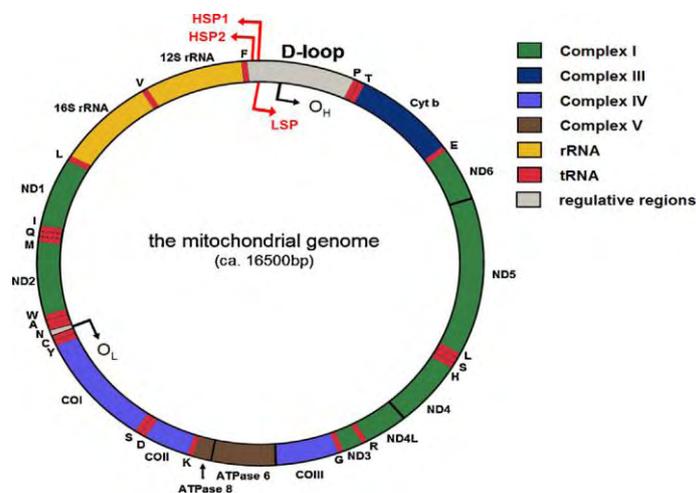


Figura 3. Representación del ADNmt de mamífero. En el exterior se representa la cadena H y en el interior la L. Los ARNt se representan por el código de una letra del aminoácido correspondiente. Se indican las posiciones de los orígenes de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ ) y ligera ( $O_L$ ), así como los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (LSP y HSP). Tomada de Lauri et al. (2014).

Los procesos de replicación, transcripción y traducción del genoma mitocondrial se detallan posteriormente en el capítulo 1.

## *Senescencia celular*

Actualmente, se conoce que el envejecimiento y eventualmente la muerte de los organismos multicelulares están relacionados con el daño producido por las ROS mitocondriales, que afectan principalmente a las células post-mitóticas, como las neuronas y los miocitos cardíacos.

La senescencia celular, fue descrita por Hayflick y Moorhead (1961) a partir de cultivos celulares de fibroblastos humanos normales que se replicaban un número limitado de veces (senescencia replicativa). Este proceso es desencadenado en respuesta a un daño no reparado en el ADN o al acortamiento de los telómeros. Dos tipos de daños en el ADN inducidos por niveles fisiológicos de ROS pueden tener un impacto significativo sobre la senescencia celular. Por un lado, un corte de simple hebra ineficientemente reparado en el ADN telomérico ocasiona el acortamiento de los telómeros. Por otro lado, daños en el ADNmt interrelacionados con la producción mitocondrial de ROS (Passos et al., 2007). Las células senescentes presentan una morfología aplanada y alargada, la cromatina condensada y cambios en los patrones de expresión génica (Funayama and Ishikawa, 2007).

Cuando las células son expuestas a potenciales estímulos oncogénicos, tales como daños en el ADN, acortamiento de los telómeros o expresión de algunos oncogenes, se inducen mecanismos supresores de tumores y las células dañadas detienen su ciclo celular. La proliferación celular, generalmente se detiene en la fase G1 del ciclo celular (Pignolo et al., 1998). En las células de mamíferos, los mecanismos de defensa mejor conocidos son la senescencia celular y la apoptosis (muerte celular programada). Si alguno de estos mecanismos falla, la célula adquiere un fenotipo maligno resultando en la formación de tumores (Takahashi, 2007).

Teniendo en cuenta que las células senescentes pueden tener efectos deletéreos, incluido el envejecimiento del organismo, es crucial poder diferenciarlas de las células saludables y quiescentes presentes en los tejidos normales. Para ello, se han identificado numerosos biomarcadores que permiten diferenciar los fenotipos moleculares de las células senescentes.

El marcador más utilizado es la  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- $\beta$ -galactosidasa). La SA- $\beta$ -galactosidasa es una hidrolasa localizada en los lisosomas que puede acumularse con la edad (Kurz et al., 2000; Lee et al., 2006). Este biomarcador es expresado en células senescentes y pre-senescentes, y es detectado mediante la hidrólisis del X-Gal que forma un precipitado de color azul (Dimri et al., 1995). Esta enzima se ha empleado ampliamente en diferentes modelos animales para examinar el proceso de envejecimiento celular de muchos tejidos somáticos y cultivos celulares (Dimri et al., 1995; Kishi et al., 2003; Genade et al., 2005).

Otro biomarcador ampliamente empleado es la lipofuscina. Es un pigmento autofluorescente intralisosomal compuesto por lípidos y fosfolípidos derivados de la peroxidación lipídica de las

membranas celulares que no puede ser degradado por las hidrolasas lisosomales ni ser exocitado (Terman and Brunk, 2004). La incapacidad inherente de la autofagia y de otros mecanismos celulares de degradación para eliminar estructuras dañadas, resultan en la acumulación progresiva de “la basura”, incluyendo agregados de proteínas citosólicas, mitocondrias defectuosas y lipofuscina. La lenta acumulación de lipofuscina dentro de los lisosomas parece disminuir la autofagia ocasionando una disminución del recambio por mitocondrias eficaces. Por lo tanto, se acumulan mitocondrias defectuosas, que no sólo son funcionalmente deficientes, sino que además producen una mayor cantidad de ROS. Esto se conoce como “la teoría del eje mitocondria-lisosoma” del envejecimiento y describe la relación entre la acumulación de lipofuscina, disminución de la autofagia, el aumento de la producción de ROS y el daño mitocondrial en las células post-mitóticas. Las mitocondrias son dañadas por el peróxido de hidrógeno de producción propia. En las células jóvenes, las mitocondrias dañadas son auto-fagocitadas rápidamente y degradadas por las enzimas lisosomales. Las pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno, que normalmente difunden a los lisosomas, conducen a un “cross-linking” del material intralisosomal y a la consecuente acumulación gradual de lipofuscina que no puede ser degradado en las células post-mitóticas. Finalmente, la consecuencia para la célula senescente post-mitótica es una acentuada disminución para la degradación por autofagia, una acumulación gradual de las mitocondrias dañadas, un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno, estrés oxidativo y la muerte celular apoptótica (Figura 4). El progreso de estos cambios parece ocasionar un aumento del estrés oxidativo, una disminución de la producción de ATP y el colapso de la maquinaria de catabolismo celular, que eventualmente es incompatible con la supervivencia celular (Kurz et al., 2008; Terman et al., 2010).

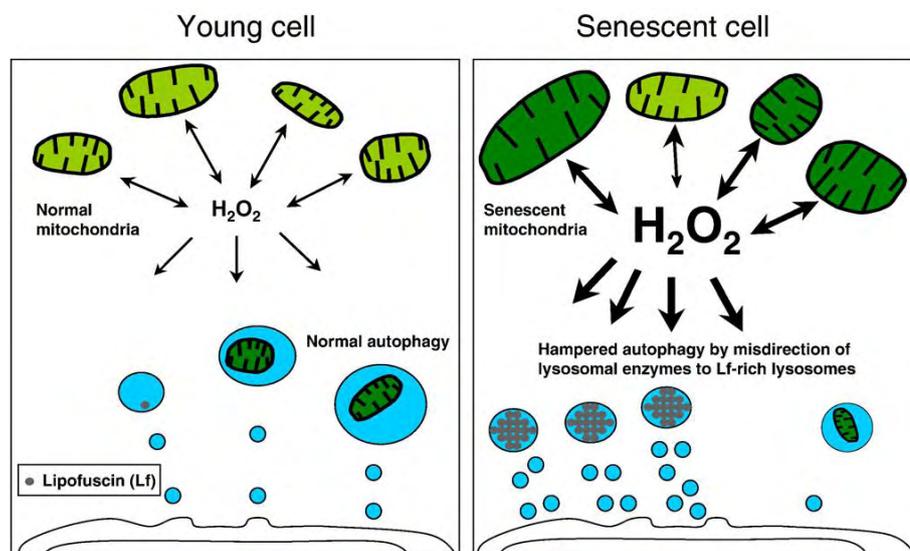


Figura 4. La teoría eje mitocondria-lisosoma de envejecimiento. Tomada de Kurz et al. (2008).

## *Modelos animales en estudios sobre el envejecimiento*

Diferentes modelos animales se han utilizado para estudiar diversos aspectos del envejecimiento animal. *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* se han empleado para estudiar la genética del envejecimiento y para identificar los genes involucrados en la longevidad (Guarente and Kenyon, 2000). Sin embargo, estos invertebrados no han permitido identificar genes involucrados en la longevidad de los vertebrados y por lo tanto diferentes análisis se han llevado a cabo en ratones (Rudolph et al., 1999) y en el pez *Danio rerio* (pez cebra) (Gerhard et al., 2002; Gerhard, 2003; Kishi et al., 2003; Kishi, 2004). Como ambos organismos poseen una vida relativamente larga (aproximadamente 3 años), se han evaluado otras especies de vertebrados como potenciales modelos para estudiar el envejecimiento (Herrera and Jagadeeswaran, 2004).

### Peces teleósteos como modelo para estudiar el envejecimiento

A diferencia de los modelos de invertebrados, los peces teleósteos presentan varias ventajas que los hace un excelente modelo para estudiar el envejecimiento. Como vertebrados, los peces comparten muchas vías de desarrollo, mecanismos fisiológicos y sistemas de órganos con los seres humanos y otros mamíferos. Como animales de experimentación, generalmente los peces son mucho menos costosos de mantener en el laboratorio que cualquier otro vertebrado y se adaptan fácilmente a las condiciones en cautiverio. Estas características, hacen que diferentes especies de peces sean cada vez más utilizadas como modelo de vertebrado en la investigación. Actualmente existen varios proyectos genoma en peces comúnmente utilizados en investigación básica tales como *Danio rerio* (<http://www.sanger.ac.uk/resources/zebrafish/genomeproject.html>), *Fugu rubripes* (<http://www.fugu-sg.org/>), *Tetraodon nigroviridis* (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetranew/>) y *Gasterosteus aculeatus* (<http://www.genome.gov/12512292>).

Desde hace unos años, los peces de la familia Rivulidae han recobrado la atención, y actualmente existen proyectos genoma en *Fundulus heteroclitus* (<http://whiteheadresearch.wordpress.com/research/>), en el pez hermafrodita *Kryptolebias marmoratus* (<http://stanford.edu/~jokelley/Site/Home.html>) y en el pez anual africano *Nothobranchius furzeri* como modelo genético para identificar la arquitectura genética del envejecimiento de los vertebrados (<http://web.stanford.edu/group/brunet/N%20furzeri.html>).

Debido a su pequeño tamaño y alta tasa de fecundación, los peces *D. rerio* y *Oryzias latipes* (medaka) han sido excelentes modelos de laboratorio debido a las ventajas de su manejo para analizar mecanismos del desarrollo. Si bien *D. rerio* es uno de los modelos empleado en estudios del desarrollo (Eisen, 1996), no es el más adecuado para estudiar el envejecimiento debido a que

posee un ciclo de vida relativamente largo entre 3 y 5 años (Herrera and Jagadeeswaran, 2004; Genade et al., 2005).

### Peces anuales en estudios del envejecimiento

A diferencia de los modelos tradicionales, los peces anuales (Cyprinodontiformes) presentan características particulares que los hacen un excelente modelo para estudios del desarrollo y del envejecimiento. Estos peces habitan masas de agua temporales que se evaporan con la llegada de la estación estival, ocasionando la muerte masiva de los adultos y juveniles (Figura 5).



Figura 5. Hábitat típico de los peces anuales. Charco temporal localizado en “La Coronilla” (Departamento de Rocha)

La supervivencia de las especies depende de los embriones, que son resistentes a la desecación, permanecen enterrados en el sustrato y presentan un patrón atípico de desarrollo temprano con la capacidad de experimentar hasta tres detenciones (diapausas). En la siguiente estación lluviosa, los huevos eclosionan y en pocas semanas los juveniles alcanzan la madurez sexual y los nuevos huevos fecundados son depositados en el sustrato (Figura 6) (Wourms, 1964, 1967, 1972; Berois et al., 2012).

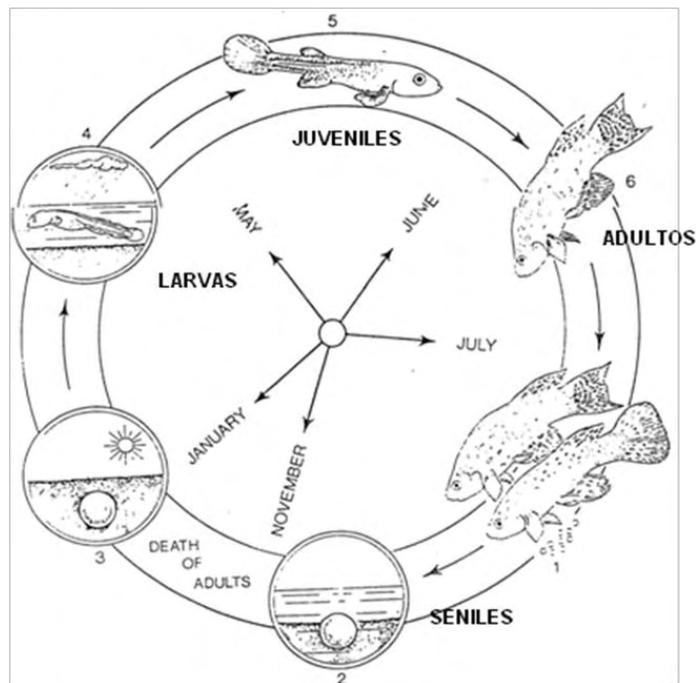


Figura 6. Ciclo de vida de los peces anuales. Adaptada de (Wourms 1972).

Debido a que estos peces presentan un ciclo de vida de unos pocos meses (< de 1 año) y degeneraciones histológicas y de órganos dependientes de la edad, en los últimos años, diferentes grupos de investigadores han demostrado que los peces anuales son un excelente modelo para estudiar y analizar diferentes aspectos del envejecimiento (Genade et al., 2005; Terzibasi et al., 2008).

En los últimos 10 años, diferentes especies de peces anuales endémicos del continente Africano pertenecientes al género *Nothobranchius* (Cyprinodontiformes: Nothobranchiidae) se han utilizado como modelo para estudiar el envejecimiento animal. Diferentes estudios demostraron que las diferentes especies de *Nothobranchius* presentan ciclos de vida de diferente duración. Por ejemplo, en *N. guentheri* es de 12 meses (Markofsky and Perlmutter, 1972) mientras que en *N. rachovii* es de 6 meses (Herrera and Jagadeeswaran, 2004) y en *N. furzeri* es de 9 semanas (Valdesalici and Cellerino, 2003). A nivel macroscópico, las especies de *Nothobranchius* también presentan fenotipos característicos de la edad, los cuales pueden observarse claramente mucho antes de que mueran. A lo largo de su ciclo de vida, estos peces van perdiendo peso gradualmente. Las hembras pierden su aspecto redondeado, luciendo escuálidas y con la espina curvada. Los machos además van perdiendo su llamativo colorido. También se ha observado que la fertilidad y la fecundidad disminuyen en ambos sexos (Genade et al., 2005). En *N. furzeri*, también se han aislado algunos genes relacionados al envejecimiento (IGF-I, MTP, p66shc y SIRT1) presentando una elevada similitud con los genes homólogos humanos (Genade et al., 2005).

Estos estudios, demuestran que los peces anuales son un excelente modelo para investigar los diferentes procesos involucrados en el envejecimiento de los vertebrados, incluido el hombre.

### El género *Austrolebias* en estudios del envejecimiento

Los peces anuales del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) son endémicos de América del Sur, con una distribución geográfica que abarca desde el noreste de Brasil hasta el noreste y sur de Argentina, Uruguay y Paraguay (Costa, 1996). Como todos los Cyprinodontiformes, estas especies presentan dimorfismo sexual (Vaz-Ferreira and Sierra, 1972, 1973). Las especies descritas de *Austrolebias* son gonocóricas (Arezo et al., 2005) y recientemente se ha establecido la diferenciación gonadal a escala morfológica y temporal en *A. charrua* y se ha identificado la estrategia sexual de esta especie, encontrándose que es inusualmente temprana por presentarse en estadios pre-eclosión (Arezo et al., 2007).

A la fecha, se han investigado unos pocos aspectos del envejecimiento de estos peces anuales. Diferentes estudios realizados en *A. adloffii* han demostrado que los individuos seniles exhiben cambios fenotípicos característicos (curvatura de la espina dorsal, córnea borrosa y disminución de la masa corporal) así como también notorios cambios morfológicos en algunos de sus órganos (timo, hígado y riñones) (Walford and Liu, 1965). Otros estudios realizados en poblaciones de *A. bellottii* mantenidas en cautiverio, revelaron que la duración de su ciclo de vida depende de la temperatura del agua (Liu et al., 1975).

## ***HIPÓTESIS GENERAL***

---

Daños acumulativos en el ADN y el acortamiento de los telómeros pueden estar asociados con daños oxidativos producidos por las especies reactivas del oxígeno y vinculados a la senescencia celular e individual en especies de peces anuales del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae).



## ***OBJETIVO GENERAL***

---

Estudiar diferentes aspectos moleculares del envejecimiento vinculados al proceso de senescencia celular (acumulación de daños en el ADN, dinámica de los extremos cromosómicos, funcionalidad de la cadena respiratoria, presencia de daño oxidativo y disminución de la auto-fagocitosis) en diferentes etapas de la ontogenia de peces anuales del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae).

## ***OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

---

Serán explicitados y desarrollados en cada capítulo.

# ***ESTRATEGIA METODOLÓGICA EXPERIMENTAL TRANSVERSAL PARA LOS DIFERENTES ABORDAJES***

---

## *Colecta de ejemplares en la naturaleza*

En el marco de esta Tesis se analizaron dos especies de *Austrolebias* (*A. charrua* y *A. cheradophilus*) que difieren morfológicamente y en su ubicación geográfica. Dentro de las *Austrolebias*, *A. charrua* (Figura 7) es considerada una especie de tamaño medio ya que los individuos pueden alcanzar tamaños de entre 3 y 4 cm, mientras que *A. cheradophilus* (Figura 8) puede alcanzar tamaños entre 4 y 6 cm aproximadamente y hasta hace unos años formaba parte del clado filogenético de las *Megalebias* (Costa, 2006).

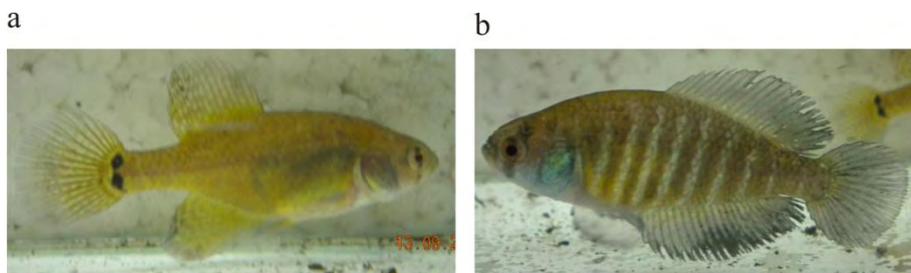


Figura 7. Ejemplares adultos de *A. charrua*. a) Hembra; b) Macho.

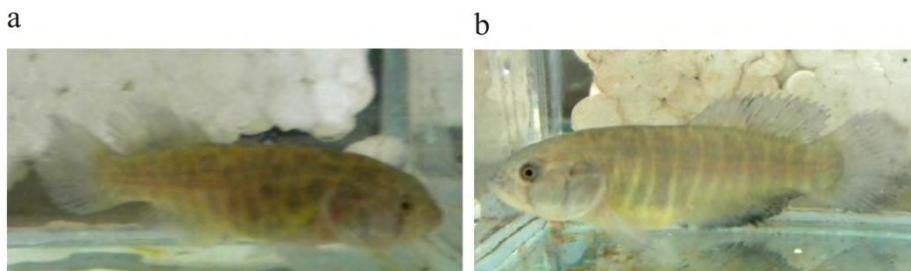


Figura 8. Ejemplares juveniles de *A. cheradophilus*. a) Hembra; b) Macho.

Como se mencionó anteriormente, los peces anuales tienen un ciclo de vida menor a 1 año. Dependiendo del inicio de la estación de lluvias en el año en curso, los meses en que los embriones eclosionan pueden variar dependiendo de cuando las condiciones del charco son óptimas para su nacimiento. Por esta razón, los meses que se colectaron los ejemplares juveniles de las 2 especies que se analizaron en esta Tesis varían de un año a otro (Tablas 1 y 2). Una vez capturados los individuos juveniles, se tomó como criterio volver al mismo charco luego de aproximadamente 2

meses para coleccionar los individuos adultos y posteriormente los seniles. En todas las colectas se intentó capturar aproximadamente el mismo número de hembras y de machos.

Los ejemplares de *A. charrua* fueron colectados en un mismo charco temporal ubicado en el balneario “La Coronilla” (Departamento de Rocha, Uruguay). Las fechas en que se realizaron las diferentes colectas se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Días en que se realizaron las colectas y número aproximado de ejemplares (n) de *A. charrua* capturados en la naturaleza.

AÑO	Juveniles	Adultos	Seniles
2011 (n ~ 350)	16 de junio	30 de agosto	4 de octubre
2012 (n ~ 160)	4 de julio	7 de setiembre	17 de octubre

Los individuos de *A. cheradophilus* fueron colectados en diferentes localidades, según la disponibilidad de individuos en los charcos muestreados. En el 2011, se capturaron individuos en diferentes charcos ubicados en la localidad de “La Charqueada” (Departamento de Treinta y Tres, Uruguay): sobre la Ruta 91 (próximo a Vergara), Camino al Arrozal 33 y en la zona de contacto (próximo al límite de los Departamentos de Rocha y Treinta y Tres). En 2012, se capturaron en un charco situado sobre la Ruta 9, en la localidad de “Barra Grande” (Departamento de Rocha, Uruguay). Las fechas en que se realizaron las diferentes colectas se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Días en que se realizaron las colectas y número aproximado de ejemplares (n) de *A. cheradophilus* colectados en la naturaleza.

AÑO	Juveniles	Adultos	Seniles
2011 (n ~ 60)	10 de mayo	15 de junio	26 de setiembre
2012 (n ~ 25)	24 de agosto	7 de setiembre	17 de octubre

Los individuos juveniles y adultos se mantuvieron algunos días en el laboratorio antes de ser procesados para las diferentes técnicas planteadas. Luego de un período de adaptación de aproximadamente 3 horas, se ubicaron en acuarios (30 litros de capacidad) con agua declorinada, burbujeo constante, temperatura ambiente de 19°C y fotoperíodo natural.

La lista detallada de los sitios de colecta de cada uno de los individuos trabajados, se muestra en los apéndices 1 y 2. Los individuos y tejidos están depositados en la Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

### *Establecimiento de cruzamientos y obtención de progenies F1 de laboratorio*

Un diseño paralelo se llevó a cabo en el laboratorio, mediante el cruzamiento de algunos individuos juveniles capturados en el campo. Se seleccionaron individuos de las 2 especies y se diseñaron 4 cruzamientos con parejas formadas por 1 macho y 1 hembra como se muestra en la Figura 9.

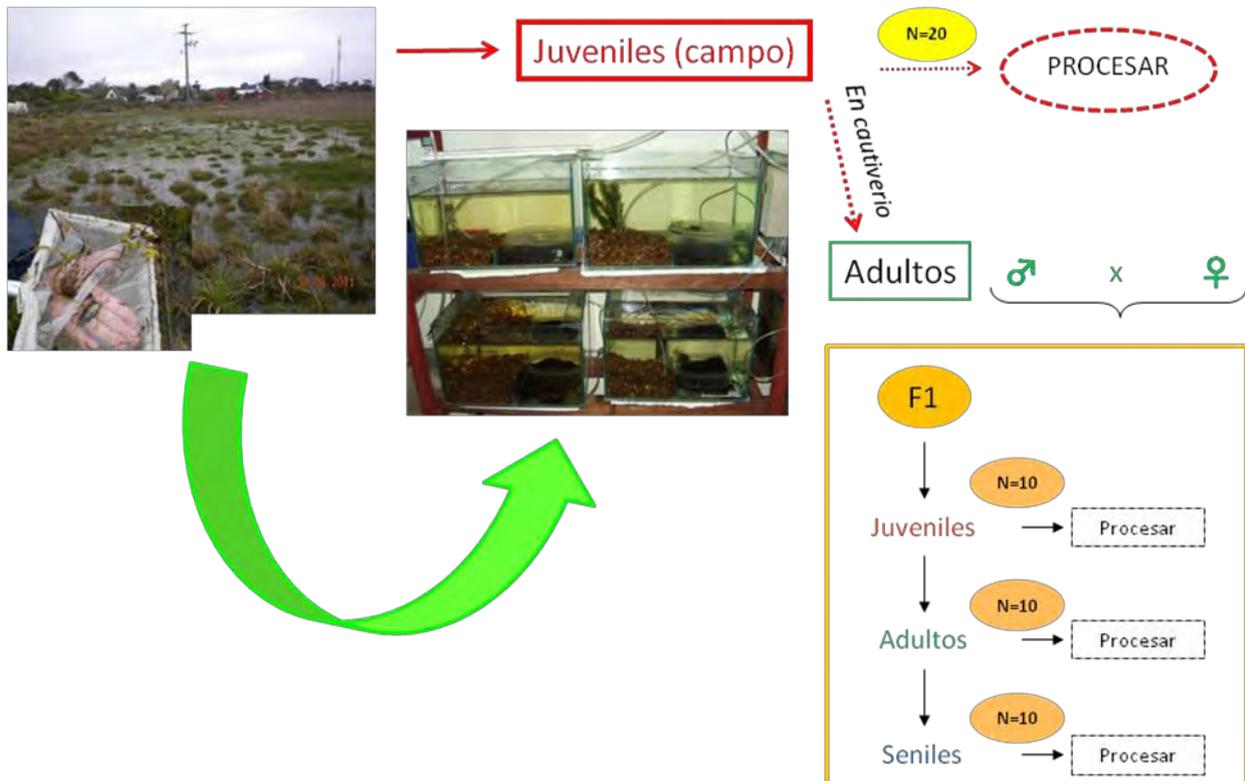


Figura 9. Esquema del diseño de los cruzamientos para la obtención de progenies en el laboratorio.

Al final del ciclo de vida se retiraron las turbas de los acuarios y se colocaron húmedas dentro de bolsas de nylon a fin de reproducir el período de sequía que sufren los embriones en la naturaleza. En marzo-abril del año siguiente, se colocaron las turbas en acuarios con agua declorinada, burbujeo constante, temperatura ambiente de 19°C y fotoperíodo natural. Transcurridas algunas horas, eclosionaron los embriones. Todas las progenies (F1) obtenidas, fueron mantenidas en cautiverio durante todo su ciclo de vida. Al igual que lo colectado en el campo, se procesaron ejemplares juveniles, adultos y seniles (Tablas 3 y 4).

Los parentales de la F1 de *A. charrua* obtenida en el 2012 fueron colectados en junio del 2011 y los de la 2013 en julio de 2012, ambos en el mismo charco ubicado en “La Coronilla”.

Tabla 3. Días en que se realizaron los procesamientos y edad aproximada de los ejemplares de *A. charrua* obtenidos en cautiverio.

AÑO (mes de nacimiento)	Juveniles	Adultos	Seniles
2012 (marzo)	18 de mayo (2 meses)	24 de junio (3 meses)	18 de octubre (7 meses)
2013 (marzo)	14 de junio (3 meses)	20 de agosto (5 meses)	7 de octubre (7 meses)

Los parentales de la F1 de *A. cheradophilus* obtenida en el 2012 fueron colectados en el charco ubicado sobre la Ruta 91 en mayo de 2011, y los de la generación 2013 fueron colectados en el charco ubicado sobre la Ruta 9 en agosto de 2012.

Tabla 4. Días en que se realizaron los procesamientos y edad aproximada de los ejemplares de *A. cheradophilus* obtenidos en cautiverio.

AÑO (mes de nacimiento)	Juveniles	Adultos	Seniles
2012 (abril)	18 de mayo (1 mes)	3 de agosto (4 meses)	19 de octubre (6 meses)
2013 (abril)	14 de junio (2 meses)	-	9 de octubre (6 meses)

## CAPITULO 1

---

*Cambios en el  
ADN y en los  
extremos  
cromosómicos  
durante el  
envejecimiento  
de Austrolebias*

## CAPITULO 1 - Índice

INTRODUCCIÓN .....	34
El genoma mitocondrial de los peces Teleósteos.....	34
Replicación del ADNmt en vertebrados .....	35
Transcripción del ADNmt en vertebrados .....	36
Traducción del ADNmt en vertebrados .....	37
Mutaciones somáticas en el ADNmt con el envejecimiento.....	37
Acumulación de mutaciones y reparación del ADNmt en el envejecimiento .....	39
Evolución y divergencia de los genes mitocondriales en Cyprinodontiformes .....	40
Tasas de sustitución en el ADNmt de Cyprinodontiformes.....	41
Codificación de cisteína como marcador de la longevidad.....	41
Dinámica de los extremos cromosómicos durante el envejecimiento .....	42
Tecnologías de segunda generación en estudios del envejecimiento animal.....	43
HIPÓTESIS.....	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
MATERIALES y MÉTODOS .....	46
Secuenciación masiva del genoma mitocondrial en hermanos totales de <i>A. charrua</i> .....	46
Amplificación de la región control del ADNmt de <i>A. charrua</i> .....	47
Análisis de polimorfismos en las secuencias mitocondriales codificantes durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> .....	49
Secuenciación de 2 genes mitocondriales en poblaciones naturales y en cautiverio de <i>A. charrua</i> y <i>A. cheradophilus</i> .....	49
Estimación de la tasa de mutación del ADNmt en <i>Austrolebias</i> .....	52
Secuenciación masiva (NGS) parcial del genoma total de <i>A. charrua</i> y caracterización de proteínas candidatas asociadas al envejecimiento .....	52
Determinación de la actividad de la enzima telomerasa durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> .....	53
Análisis del acortamiento de los telómeros durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> mediante Southern blot .....	56
RESULTADOS.....	57
Organización, estructura y características del genoma mitocondrial de <i>A. charrua</i> .....	57
Presencia de polimorfismos en todas las secuencias mitocondriales codificantes durante la ontogenia de hermanos totales de <i>A. charrua</i> .....	62
Mutación y evolución del gen <i>cyt-b</i> durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> en la naturaleza y en cautiverio.....	64

Mutación y evolución del gen <i>cyt-b</i> durante la ontogenia de <i>A. cheradophilus</i> en la naturaleza y en cautiverio.....	70
Mutación y evolución del gen <i>cox-1</i> durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> en la naturaleza y en cautiverio.....	76
Mutación y evolución del gen <i>cox-1</i> durante la ontogenia de <i>A. cheradophilus</i> en el campo y en cautiverio.....	82
Tasas de mutación estimadas para los genes mitocondriales <i>cyt-b</i> y <i>cox-1</i> .....	89
Proteínas nucleares vinculadas al envejecimiento animal en <i>A. charrua</i> .....	90
Actividad de la telomerasa durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> .....	93
Estimación del acortamiento de los telómeros mediante la técnica de Southern-blot en <i>A. charrua</i>	97
DISCUSIÓN .....	101
El genoma mitocondrial de <i>A. charrua</i> .....	101
Evolución de las secuencias codificantes mitocondriales durante el envejecimiento de hermanos totales de <i>A. charrua</i> .....	103
Divergencia del gen <i>cyt-b</i> durante el envejecimiento de <i>Austrolebias</i> en la naturaleza .....	104
Divergencia del gen <i>cyt-b</i> durante el envejecimiento de <i>Austrolebias</i> en cautiverio .....	106
Divergencia del gen <i>cox-1</i> durante el envejecimiento de <i>Austrolebias</i> en la naturaleza .....	108
Divergencia del gen <i>cox-1</i> durante el envejecimiento de <i>Austrolebias</i> en cautiverio .....	108
Tasas de mutación de los genes mitocondriales <i>cyt-b</i> y <i>cox-1</i> en <i>Austrolebias</i> .....	109
Contenido de cisteína en las proteínas codificadas en el ADNmt de <i>Austrolebias</i> .....	110
Proteínas nucleares vinculadas al envejecimiento animal presentes en <i>A. charrua</i> .....	111
Dinámica de los extremos cromosómicos durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> .....	111
CONCLUSIONES .....	113
PERSPECTIVAS .....	114

## INTRODUCCIÓN

### *El genoma mitocondrial de los peces Teleósteos*

La estructura y organización del ADNmt de los peces teleósteos son muy similares a las descritas en mamíferos y vertebrados en general. Dentro de los Cyprinodontiformes, se ha caracterizado el ADNmt para algunas especies, géneros y familias. El genoma de *Kryptolebias marmoratus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) es circular, presenta un tamaño de 17 Kb y a diferencia del humano presenta dos regiones control (RC) (Figura 10) (Lee et al., 2001).

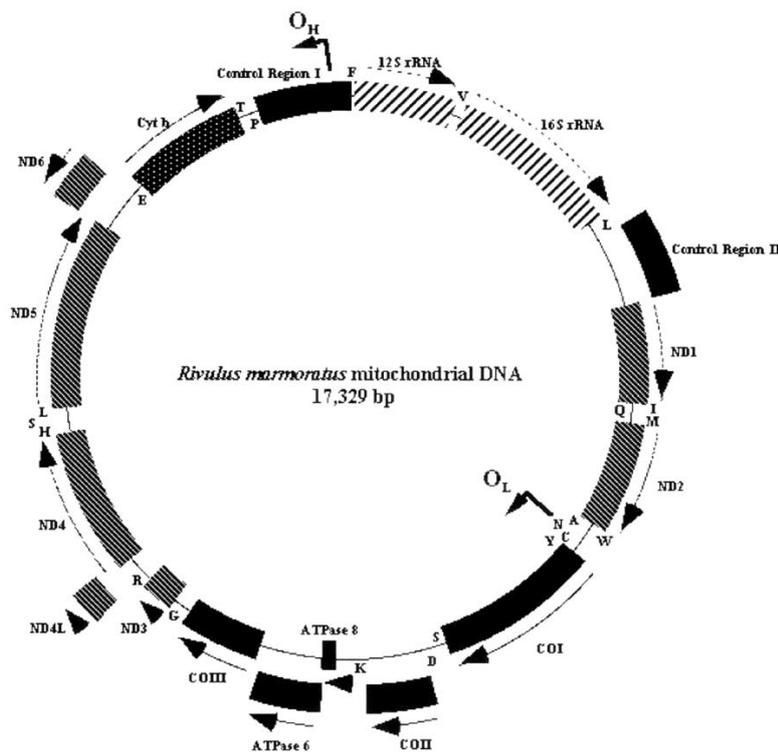


Figura 10. Genoma mitocondrial de *K. marmoratus*. En el exterior se representa la cadena H y en el interior la cadena L. Los ARNt se representan por el código de una letra del aminoácido correspondiente. Se indican las posiciones de los orígenes de replicación de la cadena pesada (OH) y ligera (OL). Las flechas indican la dirección de codificación de las proteínas mitocondriales: ND1-6; COI-III; ATP6; ATP8 y *Cyt-b*. Tomada de Lee et al. (2001).

*Kryptolebias marmoratus* (anteriormente conocido como *Rivulus marmoratus*) no presenta un ciclo de vida anual, pero está filogenéticamente relacionado con el género *Austrolebias* (Figura 11) (Parenti, 1981; Costa, 1989; Hrbek and Larson, 1999).

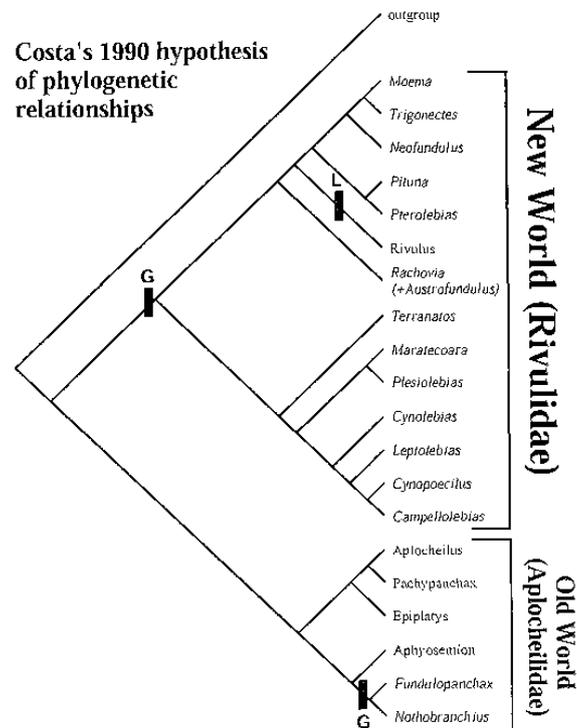


Figura 11. Filogenia de la superfamilia Aplocheiloidei basada en caracteres morfológicos y comportamentales. En *itálica* se encuentran los géneros anuales. Tomada de Hrbek and Larson (1999).

Dentro de los peces anuales, solamente se ha caracterizado el ADNmt de *N. furzeri* (Cyprinodontiformes: Nothobranchiidae). Este presenta un tamaño de 19,5 Kb y contiene una RC extensa que incluye el ARNt-Pro, una copia adicional del ARNt-Glu y dos secuencias casi idénticas (99% de identidad) que están separadas por 1075 pb (Hartmann et al., 2011).

El ADNmt de otros Cyprinodontiformes, tales como *Aplocheilus panchax*, *Fundulus olivaceus*, *F. heteroclitus* y *Cyprinodon rubrofluviatilis* presentan un genoma mitocondrial con la misma estructura descrita en otros vertebrados y tamaños genómicos un poco más pequeños en el orden de los 16 Kb (Setiamarga et al., 2008; Whitehead, 2009).

### *Replicación del ADNmt en vertebrados*

Si bien el número de mitocondrias por célula permanece constante en cada tipo celular, aparentemente la replicación del ADNmt no está estrictamente coordinada con la del ADN nuclear. El ADN nuclear sufre una única duplicación durante la fase S del ciclo celular, mientras que en

procesos como la embriogénesis y la diferenciación celular se produce más de una duplicación de ADNmt por ciclo celular. En tejidos post-mitóticos, como el músculo y el sistema nervioso, se produce replicación del ADNmt sin que exista división celular ni replicación del ADN nuclear (Poulton and Marchington, 2002).

Actualmente existen dos modelos para la replicación del ADNmt. El primer modelo fue descrito por D. A. Clayton y se conoce como “modelo de replicación asimétrica”. La replicación comienza en el origen de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ ) y cuando el D-loop originado llega al origen de replicación de la cadena ligera ( $O_L$ ) comienza la replicación de ésta en sentido opuesto (Clayton, 1982; Larsson, 2010). El otro modelo fue propuesto por I. J. Holt y colaboradores y propone que la replicación del ADNmt ocurriría de manera simétrica y simultánea en ambas cadenas desde múltiples orígenes situados en una amplia región cercana al origen  $O_H$  (Holt et al., 2000; Larsson, 2010). Actualmente, no existen evidencias experimentales que confirmen ninguno de los dos modelos y existe una gran controversia entre los investigadores (Bogehagen and Clayton, 2003; Holt and Jacobs, 2003). A pesar de esto, ambos modelos predicen la participación de 4 proteínas en la maquinaria de replicación del ADNmt: las dos subunidades (Pol  $\gamma A$  y Pol  $\gamma B$ ) que forman parte de la ADN polimerasa mitocondrial (Pol  $\gamma$  o PolG), una helicasa (Twinkle) y la proteína de unión a ADN de cadena sencilla (mtSSB).

### *Transcripción del ADNmt en vertebrados*

La transcripción de la hebra H produce los 2 ARNr, los 12 ARN mensajeros (ARNm) de las proteínas ND1-5, ND4L, Cyt b, COI-III, ATP6 y ATP8 y 14 ARNt. La transcripción a partir de la hebra L tiene una doble función ya que produce los cebadores de ARN necesarios para la iniciación de la replicación en  $O_H$  y el ARNm de ND6 junto con los ocho ARNt restantes.

Todas las proteínas involucradas en la transcripción y traducción del ADNmt son codificadas por genes nucleares e importadas a la mitocondria. La maquinaria basal de transcripción del ADNmt consiste en, una ARN-polimerasa mitocondrial (POLRMT) y los factores de transcripción B2 (TFB2M) y A (TFAM) mitocondriales (Falkenberg et al., 2002). Antes de ser importados a la mitocondria, los ARNm producidos en el núcleo son exportados al citoplasma y traducidos por los ribosomas citoplasmáticos. Las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo constituyen la mayoría de las subunidades de la fosforilación oxidativa, todas las proteínas necesarias para la expresión y el mantenimiento de ADNmt y todas las proteínas de los ribosomas mitocondriales. Las subunidades de la cadena respiratoria codificadas en el ADNmt y la ATP sintasa se ensamblan entre sí con las subunidades nucleares para formar un sistema de fosforilación oxidativa funcional (Falkenberg et al., 2007; Larsson, 2010).

### *Traducción del ADNmt en vertebrados*

A diferencia de los procesos descritos anteriormente, la traducción mitocondrial es un proceso poco conocido. La función de la maquinaria de traducción mitocondrial, es la síntesis de los trece polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial que forman parte del sistema de fosforilación oxidativa. Además de los 22 ARNt codificados en el ADNmt, este proceso requiere de la acción concertada de factores de traducción y ribosomas mitocondriales. La traducción mitocondrial, es más parecida a la de los procariotas que a la nuclear de una célula eucariota y presenta una serie de características interesantes. En primer lugar, las mitocondrias utilizan un código genético algo diferente al universal. Por ejemplo, los codones de terminación son AGG y AGA (arginina en el código universal), además de UAA y UAG. El codón UGA codifica el aminoácido triptófano y no es un codón de terminación y el codón AUA ha sido reasignado a la metionina en lugar de isoleucina (Osawa et al., 1992). En segundo lugar, los ARNm mitocondriales también tienen características inusuales: contienen pocos o ningún nucleótido en el extremo 5' no traducidos y contienen una cola poli (A) dentro o a continuación del codón de terminación. A diferencia de lo que ocurre en procariotas o en el núcleo eucariota, la subunidad pequeña de los ribosomas mitocondriales (mito-ribosomas) parece unirse fuertemente a estos ARNm de manera independiente y en ausencia de factores de iniciación. En tercer lugar, las mitocondrias utilizan un simplificado mecanismo de decodificación que permite la traducción de todos los codones con sólo 22 ARNt. En cuarto lugar, las mitocondrias de mamíferos utilizan un solo ARNt-Met, tanto para la iniciación como para la elongación (Smits et al., 2010).

### *Mutaciones somáticas en el ADNmt con el envejecimiento*

Actualmente existe evidencia que pone en duda algunos aspectos de la teoría “mitocondrial de los radicales libres”. Por ejemplo, se ha observado que en períodos de vida prolongados, cantidades adecuadas de copias de ADNmt no dañado persisten y son funcionalmente activas. La cantidad de mitocondrias funcionalmente activas es controlada continuamente por los sistemas de mantenimiento y de renovación celular (Terman et al., 2010). Rara vez, la frecuencia de mutación del ADNmt alcanza un umbral crítico para la disfunción mitocondrial y manifestaciones fenotípicas de los signos clínicos del envejecimiento (Larsson, 2010).

En mamíferos, el ADNmt es exclusivamente transmitido por vía materna y el oocito contiene aproximadamente  $10^5$  copias de ADNmt. En las células somáticas, que contienen entre  $10^3$  y  $10^4$  copias, una mutación que surge en una sola molécula de ADNmt puede expandirse clonalmente durante la replicación del ADNmt, debido a que no hay ningún mecanismo que asegure que cada

molécula de ADNmt se replique sólo una vez junto con la replicación del ADN nuclear durante cada ciclo celular. Este fenómeno, denominado “segregación somática o mitótica” lleva a una segregación al azar de las mutaciones a medida que las células se dividen (Bogehagen and Clayton, 1977) y puede dar lugar a células hijas que exhiben homoplasmia (sólo contienen ADNmt normal o mutado) o heteroplasmia (contienen una mezcla de moléculas de ADNmt normal y mutado). El principio de segregación mitótica explica cómo una célula que contiene bajo número de copias de ADNmt mutado puede dar lugar a células hijas con altos niveles de mutación (Figura 12) (Lagouge and Larsson, 2013).

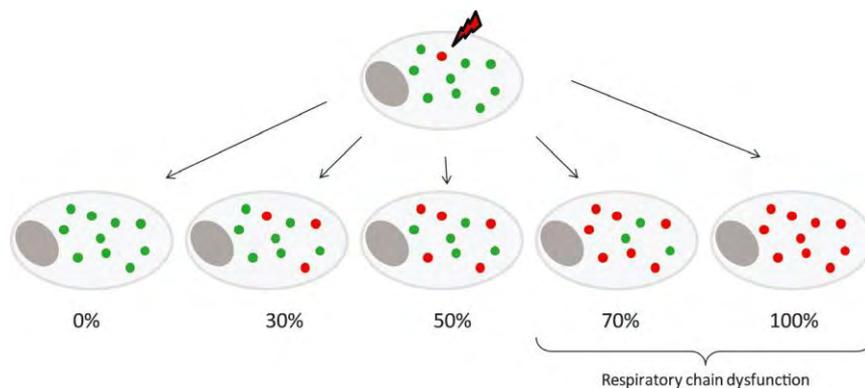


Figura 12. Segregación mitótica del ADNmt. Un único evento mutacional en una molécula de ADNmt crea heteroplasmia en una célula. Moléculas de ADNmt mutado en rojo y normales en verde. La acumulación de ADNmt mutado por encima de un cierto nivel umbral (50%) conduce a una disfunción de la RC. Tomada de Lagouge and Larsson (2013).

Este tipo de segregación mitótica se ha observado tanto para mutaciones puntuales como para grandes deleciones del ADNmt. Sin embargo, también hay algunas pruebas de que los polimorfismos, aparentemente neutrales, pueden segregarse de manera aleatoria y que la selección puede ser tejida específica (Jenuth et al., 1997).

En mamíferos, un gran número de mutaciones y deleciones del ADNmt se han asociado con diversas enfermedades (Tuppen et al., 2010). Un mínimo de mutaciones del ADNmt debe estar presente en una célula para causar una deficiencia de la cadena respiratoria. Diferentes tipos de mutaciones heteroplásmicas en el ADNmt generalmente tienen diferentes umbrales para la inducción de la deficiencia de la cadena respiratoria, que van desde 90% para algunas mutaciones en los ARNt hasta 60% para las grandes deleciones de los ADNmt. Los pacientes portadores de mutaciones heteroplásmicas en el ADNmt, a menudo tienen una amplia variedad de ADNmt mutado en diferentes órganos e incluso en diferentes células de un órgano determinado (Larsson and Clayton, 1995). Por ejemplo, un estudio realizado en ratones quimera con deficiencia de la cadena respiratoria en las neuronas piramidales de la neo-corteza, reveló que estos ratones

desarrollaban síntomas clínicos cuando la proporción de neuronas deficientes era  $> 20\%$  y que esto causaba mortalidad si la proporción de neuronas defectuosas alcanzaba  $> 60-80\%$  (Dufour et al., 2008).

### *Acumulación de mutaciones y reparación del ADNmt en el envejecimiento*

Se ha observado que moléculas de ADNmt mutado se acumulan a lo largo de los años. En principio, esta acumulación puede deberse a errores en la replicación y daños no reparados. En primer lugar, se ha sugerido que la replicación masiva del ADNmt durante la embriogénesis dará lugar a errores de replicación debido a la tasa de error inherente de la ADN polimerasa mitocondrial. Estos ADNmt mutados serán sometidos a segregación y expansión clonal en la vida postnatal (Larsson, 2010). En segundo lugar, alternativamente se ha propuesto que el daño acumulado, por ejemplo causado por las ROS, “abrumará” la maquinaria de reparación y dará lugar a la acumulación de mutaciones en el ADNmt. Según la “teoría mitocondrial de los radicales libres” del envejecimiento, la acumulación de daños creará un “círculo vicioso” que resultará en un aumento exponencial de las mutaciones del ADNmt a lo largo del tiempo (Lagouge and Larsson, 2013).

Teniendo en cuenta que todas las proteínas codificadas por el ADNmt participan exclusivamente en la producción de energía, los daños en el ADNmt afectarán la producción de ATP (Kowald, 2001). Diferentes estudios realizados en *C. elegans* (Melov et al., 1995) y en ratones (Wang et al., 1997) revelaron que las deleciones en el ADNmt aumentaban con la edad cronológica y que una baja tasa de acumulación estaba correlacionada con una vida más larga. Otras investigaciones observaron que tejidos con células post-mitóticas (músculo y cerebro) presentan mayor número de mitocondrias defectivas respecto a tejidos con una elevada tasa de división celular (hígado y dermis) (Cortopassi et al., 1992).

Si bien la mitocondria posee algunos mecanismos de reparación del ADN (Thyagarajan et al., 1996), éstos están menos desarrollados que en el núcleo y por lo tanto la acumulación de daños en el ADNmt es superior a la del ADN nuclear. Como se mencionó anteriormente, el ADNmt se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana mitocondrial interna denominados nucleoides (Bogenhagen et al., 2003; Garrido et al., 2003). Estos nucleoides tienen un diámetro medio de 100 nm y generalmente contienen una sola copia de ADNmt. Esta compactación probablemente proteja físicamente al ADNmt de eventuales daños químicos.

En mamíferos, el principal mecanismo de reparación en las mitocondrias es “la reparación por escisión de bases” (BER) (Boesch et al., 2011). Si bien los mecanismos que limitan o restringen la eficiencia de la maquinaria de reparación durante el envejecimiento siguen sin estar claros, una disminución en la capacidad de importación mitocondrial podría ser uno de esos mecanismos.

## *Evolución y divergencia de los genes mitocondriales en Cyprinodontiformes*

Actualmente poco se ha estudiado sobre los patrones de evolución de los genes mitocondriales en especies del Orden Cyprinodontiformes, y particularmente dentro de la familia Rivulidae.

En el género *Austrolebias*, el análisis de un fragmento del gen *cyt-b* amplificado en 14 especies diferentes, reveló que el sesgo en la composición de bases no es muy diferente al observado en otros vertebrados, que el 72% de las sustituciones ocurren en la tercera posición del codón (G=6,1%), que estas secuencias no presentan inserciones o deleciones y que las sustituciones de tipo transiciones son mayoritarias a las transversiones (Tv:Ts=1:3) (García et al., 2000). El elevado nivel de divergencia encontrado en *Austrolebias* es comparable al detectado previamente en *Rivulus* (Murphy and Collier, 1996) y el sesgo Tv:Ts determinado para estos dos géneros es similar al encontrado en el género *Fundulus* (Bernardi and Powers, 1995) pero difieren sustancialmente del sesgo 1:10 determinado en el ADNmt de mamíferos (Irwin et al., 1991).

A pesar de que el genoma mitocondrial del pez anual *Nothobranchius furzeri* está completamente secuenciado, no se han realizados estudios concernientes a la evolución de sus genes mitocondriales.

Por otro lado, el genoma mitocondrial de *F. heteroclitus* ha sido completamente secuenciado y se analizaron los patrones de sustitución en diferentes poblaciones naturales de este pez (Whitehead, 2009). El análisis de las tasas de mutación de las secuencias codificantes de proteínas, indicó que las proteínas evolucionan a tasas variables y que los patrones de sustitución difieren entre las poblaciones de *F. heteroclitus*. La relación de sustituciones sinónimas y no sinónimas indicó que los genes codificantes de las subunidades de la *NADH deshidrogenasa* (ND) evolucionan relativamente rápido, mientras que los genes codificantes de las subunidades de la *citocromo oxidasa* (CO) están evolucionando de manera relativamente lenta. Por lo tanto, a diferencia de los genes de la CO, en los genes ND la mayoría de los sitios están evolucionando de acuerdo a un modelo de evolución neutral (en contraste con un modelo de fuerte restricción selectiva). En promedio 1,79% de los sitios para los genes de la ND y 0,14% de los sitios para los genes de la CO. De acuerdo con que una fuerte restricción selectiva esté actuando sobre la evolución del mitogenoma, se encontraron valores muy bajos para la relación dN/dS (sustituciones sinónimas vs. no-sinónimas) en todos los linajes analizados. Los resultados obtenidos en estas poblaciones de *F. heteroclitus* sostienen el modelo acerca de que la evolución del mitogenoma está regida por la interacción entre una fuerte presión selectiva y parámetros demográficos, lo cual es consistente con los patrones de evolución determinados en otros organismos, tales como *D. melanogaster* (Ballard, 2000), ratas (Stewart et al., 2008) y humano (Elson et al., 2004).

### *Tasas de sustitución en el ADNmt de Cyprinodontiformes*

Las tasas de mutación se utilizan para estimar el momento de especiación, la separación de poblaciones y la divergencia de los linajes genéticos. Las estimaciones de la tasa media a la cual el ADNmt muta, varían dramáticamente dependiendo de los datos y el método utilizados para la estimación. Por ejemplo, en humanos las tasas estimadas en base a secuencias de ADNmt obtenidas de parientes cercanos (pedigrí) son casi un orden de magnitud mayores a las estimadas en base a una filogenia de especies de seres humanos y chimpancés (Henn et al., 2009).

Debido a la falta de registros fósiles y/o familias con pedigrí, aún no se han determinado las tasas de sustitución de los genes mitocondriales para ninguna especie de peces anuales. Los datos que existen hasta la fecha, fueron estimados para el género *Aphanius* (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae) utilizando 3263 pb del ADNmt de 49 poblaciones conformadas por 13 especies. Los genes analizados fueron los 2 ARNr (12S y 16S), 10 ARNt (valina, leucina, isoleucina, glutamina, metionina, triptófano, alanina, asparagina, cisteína y tirosina) y los genes ND1 y ND2. Por un lado, considerando una transgresión bien datada que sufrió el Mar Rojo hace 13 millones años (MA), estimaron una tasa de sustitución molecular para esta región del ADNmt en  $8,6 \pm 0,1 \times 10^{-9}$  sustituciones de pares de bases<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. Por otro lado, a partir de una evidencia fósil, los autores estimaron una tasa de sustitución alternativa de  $1,1 \pm 0,2 \times 10^{-8}$  sustituciones de pares de bases<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Hrbek and Meyer, 2003). Estas estimaciones son comparables con la tasa de sustitución estimada de  $7,4 \times 10^{-9}$  sustituciones de pares de bases<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> para la misma región en Rivúlidos no-anuales (Hrbek and Larson, 1999) y con la tasa de sustitución aceptada de  $7 \times 10^{-9}$  sustituciones de pares de bases<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en los vertebrados poiquiloterms (Martin and Palumbi, 1993).

### *Codificación de cisteína como marcador de la longevidad*

Si la pérdida gradual de la función mitocondrial mediante el ataque oxidativo es un factor determinante de la longevidad, a escala proteómica posiblemente exista alguna huella evolutiva sobre la acción de las ROS en las mitocondrias, que tendría que estar directamente relacionada a la esperanza de vida máxima de una especie.

La cisteína (Cys o C) es un  $\alpha$ -aminoácido hidrofóbico (Figura 13a) que presenta un grupo tiol altamente susceptible a la oxidación, dando lugar a la formación de puentes disulfuros en la cistina (Figura 13b).

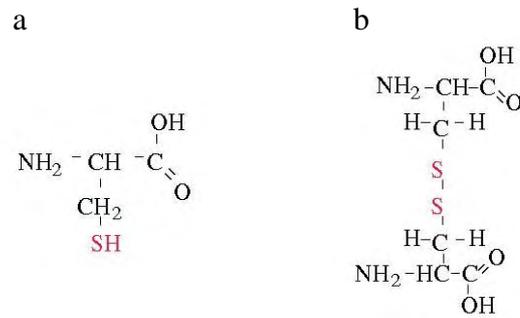


Figura 13. a) Estructura química de la cisteína con el grupo tiol marcado en rojo. b) Estructura química de la cistina, formada luego de la oxidación del grupo tiol de la cisteína. En rojo está marcado el puente disulfuro.

Los resultados obtenidos en un análisis realizado en varios modelos animales con diferente longitud de vida, revelaron que la frecuencia con la cual el aminoácido cisteína es codificada por el ADNmt es un indicador molecular específico y filogenéticamente universal de la longevidad (Moosmann and Behl, 2008). Los autores analizaron las secuencias aminoacídicas codificadas por el ADNmt de las especies animales mejor caracterizadas y observaron que una disminución relativa del aminoácido Cys era la anomalía más pronunciada encontrada y que mostraba una correlación firme con la esperanza de vida máxima del animal correspondiente. Observaron que especies con una extensa longitud de vida, sintetizan complejos de la cadena respiratoria que carecen de Cys. Estos autores confirmaron que las cisteínas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial son blancos del ataque oxidativo, generando proteínas no funcionales (Moosmann and Behl, 2008).

### *Dinámica de los extremos cromosómicos durante el envejecimiento*

Como se mencionó anteriormente, la senescencia celular puede ser desencadenada en respuesta a un daño en el ADN no reparado, o al acortamiento de los telómeros.

La telomerasa es una transcriptasa reversa capaz de sintetizar los repetidos terminales teloméricos (TTAGGG) de los extremos cromosómicos y en humanos se ha observado que su actividad disminuye con el transcurso de los años (Morin, 1989; Wright et al., 1996). A medida que una célula normal se divide, la ausencia de actividad de la telomerasa ocasiona un acortamiento de los telómeros, resultando en el cese del crecimiento, o senescencia celular (Hayflick, 1965).

En peces, la actividad de la telomerasa ha sido estudiada en *D. rerio* (Kishi et al., 2003), en *Fugu rubripes* (Yap et al., 2005), en *Oncorhynchus mykiss* (Ossum et al., 2004), en especies del género *Oryzias* (Au et al., 2009), entre otros. Recientemente se ha evaluado su actividad en los peces anuales *N. rachovii* (Hsu et al., 2008), *N. guentheri* (Liu et al., 2012) y *N. furzeri* (Hartmann et al., 2009; Graf et al., 2013). Todos estos análisis mostraron que la actividad de la telomerasa

aparentemente no está relacionada con el incremento de los años y por lo tanto no concuerdan con lo observado en humanos (Morin, 1989; Wright et al., 1996).

Los telómeros son complejos ADN-proteína especializados localizados en los extremos de los cromosomas. Consisten en ADN repetido cuya secuencia es (TTAGGG)<sub>n</sub> en mamíferos (Moyzis et al., 1988) y en muchos modelos animales, incluido el hombre, se ha observado que durante las sucesivas divisiones celulares, los telómeros se van acortando progresivamente (Harley et al., 1990; Kipling, 2001). En humanos, se ha observado un acortamiento de los telómeros en las células del hígado, en la corteza renal y en el bazo, pero no se observó un acortamiento significativo en las células de la corteza cerebral y del miocardio, sugiriendo que los diferentes órganos sufren un proceso de envejecimiento distinto (Takubo et al., 2002).

El análisis de este fenómeno se ha llevado a cabo solamente en algunas especies del género *Nothobranchius*, y se ha confirmado que, al igual que en los mamíferos, la longitud de los telómeros disminuye con el avance de la edad en *N. rachovii* (Hsu et al., 2008) y en células musculares y dermis de *N. furzeri* (Hartmann et al., 2009; Graf et al., 2013). Por lo tanto, estos estudios revelaron que en estos peces anuales africanos, no existe una correlación entre la actividad de la telomerasa y el acortamiento de los extremos cromosómicos, ya que durante su envejecimiento disminuye la longitud de las secuencias teloméricas sin disminuir la actividad de la enzima telomerasa en un mismo tejido.

### *Tecnologías de segunda generación en estudios del envejecimiento animal*

Así como diferentes mutaciones en el ADNmt se acumulan a lo largo de los años en diferentes tejidos, también se han detectado mutaciones en genes codificantes nucleares que pueden generar proteínas disfuncionales y ser letales para el organismo.

Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (NGS, "Next-generation sequencing") fueron impulsadas por la secuenciación inicial de genomas utilizando el método tradicional de Sanger. Estas nuevas técnicas permiten la secuenciación del ADN a gran escala, en menor tiempo, con alto rendimiento y están dirigiendo la investigación biomédica actual (Church, 2006; Mardis, 2008). Sin embargo, un factor limitante de esta nueva tecnología sigue siendo el alto costo para la obtención de resultados con un alto rendimiento, aunque en comparación con el tradicional método de Sanger, el costo por base nucleotídica es varios órdenes de magnitud menor (Ansorge, 2009). La enorme cantidad de datos generados con estas nuevas tecnologías (> 1Gb por corrida) presenta un nuevo desafío en el desarrollo de algoritmos y de programas informáticos más eficientes (Ansorge, 2009). La reducción en los costos y la gran cantidad de información que aportan estas nuevas tecnologías de secuenciación, han impulsado su uso en diferentes estudios enfocados al envejecimiento animal.

La posibilidad de secuenciar completamente el genoma a lo largo de la vida de un organismo, permite obtener un mapa de las mutaciones somáticas en el ADN mitocondrial y nuclear que se acumulan en los diferentes tejidos con la edad (Busuttill et al., 2007; Salipante and Horwitz, 2007). Así mismo, estas técnicas pueden revelar cambios epigenéticos generados en el transcurso de la vida, cuantificar cambios transcripcionales ocurridos con la edad y detectar cambios en el ADN, desde mutaciones nucleotídicas puntuales hasta grandes reordenamientos cromosómicos (de Magalhães et al., 2010). Desde hace años, existe un gran interés por descubrir genes que están vinculados a diferentes enfermedades relacionadas con el envejecimiento. En este sentido, se han conseguido grandes progresos con la identificación de genes asociados a enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004; Satake et al., 2009; Pasanen et al., 2014), a la diabetes de tipo 2 (Sladek et al., 2007; Hara et al., 2014) y a la degeneración macular (Klein et al., 2005; Weber et al., 2014) entre otras. La ventaja de secuenciar masivamente un genoma es que permite a los investigadores identificar el/los nucleótido/s específico/s asociado/s a un fenotipo dado (de Magalhães et al., 2010). El hallazgo de una posible asociación entre la longevidad y las posibles enfermedades relacionadas al envejecimiento, utilizando técnicas de secuenciación masiva, desempeñará un papel fundamental en la identificación de nuevas variantes determinantes de la longevidad, la susceptibilidad a ciertas enfermedades y en cómo determinados factores ambientales interactúan con los genes que influyen en los fenotipos seniles (de Magalhães et al., 2010). La rápida secuenciación de genomas completos enriquecerá enormemente el campo de la genómica comparativa. Teniendo en cuenta la alta variación en las tasas de longevidad y envejecimiento entre y dentro especies, la biología comparativa del envejecimiento tiende a beneficiarse enormemente con estas nuevas plataformas (Austad, 2009; de Magalhães et al., 2010; Richardson and Schadt, 2014). Por ejemplo, estudios sobre las tasas de evolución molecular pueden permitir a los investigadores identificar genes con patrones de selección asociados a la evolución de la vida de las especies (de Magalhães and Church, 2007).

## HIPÓTESIS

---

La acumulación de mutaciones somáticas en el genoma y el acortamiento de los telómeros pueden estar vinculados al envejecimiento de especies de peces anuales del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- a. Caracterizar por primera vez el genoma mitocondrial de *A. charrua* a los efectos de detectar cambios durante la ontogenia, en un diseño de secuenciación masiva entre hermanos totales.
- b. Determinar las tasas de mutación del ADN mitocondrial codificante de dos proteínas de la cadena respiratoria (*CYT-B* y *COI*) en tres etapas de la ontogenia (juvenil, adulta y senil) de dos especies de *Austrolebias*, en un diseño de campo y progenies de laboratorio en paralelo.
- c. Analizar el contenido de cisteínas (Cys) en las proteínas codificadas por el ADNmt mediante el análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas previamente.
- d. Realizar un análisis de los niveles de conservación de algunas proteínas nucleares candidatas por su implicancia en el envejecimiento animal.
- e. Contrastar la hipótesis de asociación entre el acortamiento de telómeros y la senescencia, mediante la determinación de la actividad de la telomerasa y el acortamiento de los telómeros en las diferentes ventanas de la ontogenia.

## MATERIALES y MÉTODOS

---

Todos los tejidos analizados en esta Tesis fueron obtenidos de individuos anestesiados con una sobredosis de una solución al 1% de 2-phenoxyethanol (Sigma) según un protocolo aprobado por la CNEA (Comisión Nacional de Experimentación Animal).

### *Secuenciación masiva del genoma mitocondrial en hermanos totales de A. charrua*

#### Diseño experimental y aislamiento de mitocondrias

Se partió de aproximadamente 50 mg de músculo esquelético conservado a 4°C en etanol (EtOH) 95%. Se procesaron 5 individuos juveniles (3 hembras y 2 machos), 5 adultos (5 hembras) y 5 seniles (4 hembras y 1 macho) de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en el 2012 (ver Apéndice 1). Se siguió el protocolo estándar de fraccionamiento sub-celular que se detalla en el Apéndice 4.

#### Extracción del ADNmt con fenol-cloroformo

La extracción del ADNmt se realizó a partir de las mitocondrias aisladas en el paso anterior, empleando el protocolo que se detalla en el Apéndice 4.

La calidad del ADNmt extraído fue analizada mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa (ICN Biomedicals Inc.) al 1% en buffer 1X TAE teñido con bromuro de etidio (0,05 µl /mL). Se dejó correr a 80V durante 40 minutos. La concentración del ADNmt fue estimada mediante su comparación con la banda de 1636 pb del marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Invitrogen) que representa una concentración de 100 ng/µl.

#### Secuenciación y anotación del mitogenoma de A. charrua

Los 15 ADNmt extraídos previamente, se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo para su secuenciación en la plataforma Illumina Genome Analyzer IIx.

El ensamblado y la anotación de las secuencias nucleotídicas resultantes (en adelante “reads”) lo realizaron en la Unidad de Bioinformática del Instituto Pasteur de Montevideo. Luego del ensamblado, los contigs resultantes fueron analizados usando como referencia la base de datos de mitogenomas de diferentes Cyprinodontiformes disponible en la página web Mitofish (<http://mitofish.ori.u-tokyo.ac.jp/>) y la anotación se realizó utilizando la herramienta on-line

MitoAnnotator (Iwasaki et al., 2013). La representación visual del ADNmt de *A. charrua* fue creada con el programa Circos (Krzywinski et al., 2009). Los ARNt fueron anotados según su estructura secundaria de trébol usando la herramienta MiTFi (Jühling et al., 2012) la cual permite localizar correctamente los ARNt dentro del mitogenoma. MiTFi se corre dentro del programa MitoAnnotator (Iwasaki et al., 2013).

### *Amplificación de la región control del ADNmt de A. charrua*

#### Diseño de cebadores

Los mitogenomas obtenidos luego del ensamblado de los “reads” presentaron algunas diferencias en cantidad de pares de bases, entre las secuencias de la región control (RC) de algunos hermanos totales de la progenie secuenciada. Por lo tanto, el tamaño y secuencia de la RC no-codificante se confirmó mediante amplificación *in vitro* por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) usando cebadores específicos diseñados para este genoma. Las secuencias nucleotídicas de la RC obtenidas de la secuenciación masiva, se alinearon con el programa ClustalW implementado en el MEGA6 (Tamura et al., 2013) y se diseñaron 2 juegos de cebadores para cubrir desde el ARNt-Pro hasta el ARNt-Phe (Tabla 5):

Tabla 5. Cebadores específicos diseñados para amplificar la RC del ADNmt de *A. charrua*

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Longitud (pb)	Tm (°C)	% GC	Longitud del producto amplificado (pb)
ACR-1F	ACCTGTTCTCTAGCACCCA	20	60,5	55,0	1156
ACR-1R	TGTAGGAGGCATTTAAGGTGCA	22	60,3	45,5	
ACR-2F	TTTCTGGCCCACAAGAGACC	20	60,5	55,0	1016
ACR-2R	TGCTCATGAACTTTTTAGGGTTT	24	58,4	33,3	

Los cebadores se diseñaron con el programa Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Ambos juegos de cebadores fueron sintetizados en la empresa MACROGEN (Seúl, Corea).

Amplificación *in vitro* mediante PCR de la región control

Se analizaron dos individuos para los cuales se obtuvo el genoma mitocondrial completo (AUS1 y AUS7). Para ambos juegos de cebadores, las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático PTC-100 (MJ Research, Inc.) bajo las condiciones que se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentraciones de los diferentes reactivos en la mezcla de reacción para la región control.

Componente	Concentración inicial	Concentración final
10X buffer	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM
dNTPs	10 mM	0,2 mM
Cebador (F)	10 μM	0,4 μM
Cebador (R)	10 μM	0,4 μM
Taq DNA polimerasa (Invitrogen)	5 U/μl	0,5 U/μl
ADN genómico	100 ng	10 ng

El programa de amplificación utilizado fue el siguiente:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial:	94°C	5 min	
Desnaturalización:	94°C	45 seg	35
Annealing:	62°C	45 seg	
Extensión:	72°C	1 min	
Extensión final:	72°C	7 min	

Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa (ICN Biomedicals Inc.) al 1% en buffer 1X TAE teñido con bromuro de etidio (0,05 μl/mL). El tamaño del producto amplificado se estimó mediante su comparación con el marcador de peso molecular (FastRuler High Range DNA Ladder, Fermentas). Se dejó correr a 80V durante 40 minutos.

Secuenciación y análisis de las RC amplificadas

Los productos amplificados fueron enviados a purificar y secuenciar a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea) (secuenciador: Applied Biosystems 3730XL). La longitud y secuencia de la región

control se confirmó mediante el alineamiento de las secuencias resultantes con las secuencias previamente obtenidas de la secuenciación masiva del genoma, en el programa BLASTN 2.2.29+ (Zhang et al., 2000).

### *Análisis de polimorfismos en las secuencias mitocondriales codificantes durante la ontogenia de A. charrua*

Los “reads” obtenidos para cada una de las muestras, se mapearon con el mitogenoma de referencia a fin de identificar la presencia de nucleótidos variables e indels dentro y entre los mitogenomas de los hermanos totales de *A. charrua*. Estos análisis, así como la determinación de la composición nucleotídica (%GC) en las 12 secuencias codificantes presentes en la hebra H (pesada o “heavy”) los realizaron en la Unidad de Bioinformática del Instituto Pasteur de Montevideo.

### *Secuenciación de 2 genes mitocondriales en poblaciones naturales y en cautiverio de A. charrua y A. cheradophilus*

#### Diseño experimental

Secuencias parciales de los genes mitocondriales codificantes de las proteínas *Cyt-b* (*cyt-b*) y COI (*cox-1*) fueron amplificadas en individuos juveniles, adultos y seniles de *A. charrua* y *A. cheradophilus* capturados en la naturaleza y obtenidos en cautiverio. Se procesaron aproximadamente 20 individuos en cada estadio ontogenético (ver Apéndices 1 y 2).

#### Extracción de ADN genómico total sin fenol-cloroformo

Se realizó una extracción de ADN genómico total a partir de aproximadamente 50 mg de músculo esquelético conservado a 4°C en EtOH 95%. El protocolo empleado fue modificado del propuesto por Medrano et al. (1990) y se detalla en el Apéndice 4.

La calidad del ADN genómico total extraído fue analizada mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa (ICN Biomedicals Inc.) al 1% en buffer 1X TAE teñido con bromuro de etidio (0,05 µl /mL). Se dejó correr a 80V durante 40 minutos. La concentración del ADN fue estimada mediante su comparación con la banda de 1636 pb del 1kb DNA ladder que representa una concentración de 100 ng/µl.

Amplificación *in vitro* vía PCR de los genes mitocondriales *cyt-b* y *cox-1*

Mediante la técnica de PCR, amplificamos un fragmento de los genes mitocondriales *cyt-b* y *cox1*. La mezcla de reacción utilizada fue la misma para ambos genes (Tabla 7) y las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador automático PTC-100 (MJ Research, Inc.). La amplificación del gen mitocondrial *cyt-b* se realizó usando los oligonucleótidos universales Gludg-L y CB3-H (Palumbi, 1991) y la del gen *cox-1* usando los oligonucleótidos Lco1490 y Hco2198 (Vrijenhoek, 1994).

Tabla 7. Concentraciones de los diferentes reactivos para las mezclas de reacción de los genes mitocondriales

Componente	Concentración inicial	Concentración final
10X buffer	1X	10X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,2 mM
Cebador (F)	10 μM	0,4 μM
Cebador (R)	10 μM	0,4 μM
Taq DNA polimerasa (Invitrogen)	5 U/μl	0,05 U/μl
ADN genómico	100 ng	10 ng

En algunos casos, las condiciones generales de la reacción de PCR se modificaron para optimizar ambas reacciones.

El programa de amplificación utilizado para amplificar el gen *cyt-b* fue el siguiente:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial:	94°C	3 min	
Desnaturalización:	94°C	1 min	4
Annealing:	42°C	1 min	
Extensión:	72°C	1 min	
Desnaturalización:	94°C	1 min	29
Annealing:	50°C	1 min	
Extensión:	72°C	1 min	
Extensión final:	72°C	7 min	

El programa de amplificación utilizado para amplificar el gen *cox-1* fue el siguiente:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial:	95°C	5 min	
Desnaturalización:	95°C	1 min	35
Annealing:	45°C	1 min	
Extensión:	72°C	1,5 min	
Extensión final:	72°C	7 min	

Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa (ICN Biomedicals Inc.) al 1% en buffer 1X TAE teñido con bromuro de etidio (0,05 µl/mL). Se sembraron 5 µl del producto amplificado con 2 µl de buffer de corrida. También se sembró marcador de peso molecular (1kb DNA ladder, Invitrogen). Se dejó correr a 80V durante 40 minutos. La concentración de cada producto de PCR fue estimada mediante su comparación con la banda de 1636 pb del 1kb DNA ladder (Invitrogen) que representa una concentración de 100 ng/µl.

#### Secuenciación y análisis de las secuencias parciales de los genes *cyt-b* y *cox-1*

Los productos amplificados de ambos genes mitocondriales se enviaron a purificar y secuenciar con sus respectivos cebadores a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea). Para cada uno de los genes, las secuencias nucleotídicas resultantes fueron alineadas y analizadas en los programas informáticos MEGA6 (Tamura et al. 2013) y Sequencher 4.10.1 (Codes, 2011).

Se determinó el número de cambios nucleotídicos (sitios variables) en cada uno de los individuos analizados, así como dentro y entre cada estadio ontogenético analizado, tanto en las 2 generaciones colectadas en el campo como en las obtenidas en cautiverio. Debido a que las progenies analizadas consistieron en hermanos totales descendientes de parejas formadas por 1 macho y 1 hembra (seleccionados al azar entre los juveniles colectados en el campo el año anterior), la comparación de estas secuencias con las de sus progenitores permitió descartar aquellos sitios variables producto de la heteroplasmia debida a la herencia diferencial del genoma mitocondrial desde alguno de los progenitores. Por lo tanto, los sitios nucleotídicos variables entre hermanos, pero presentes en alguno de los parentales no fueron considerados polimórficos y no se tuvieron en cuenta al momento de cuantificar los cambios nucleotídicos entre los 3 estadios ontogenéticos analizados.

Los análisis de polimorfismos y de divergencia nucleotídica se realizaron en el programa DnaSP v5 (Librado and Rozas, 2009).

Análisis de las secuencias aminoacídicas codificadas por los genes *cyt-b* y *cox-1*

Las secuencias nucleotídicas parciales obtenidas previamente para los genes mitocondriales *cyt-b* y *cox-1* amplificadas en las dos especies analizadas, fueron traducidas usando el código genético mitocondrial de vertebrados y se determinó el porcentaje de cada aminoácido codificado usando el programa MEGA6 (Tamura et al. 2013). Debido a su posible vinculación con la longevidad de los organismos, analizamos específicamente la presencia del aminoácido cisteína (Cys) en las secuencias amplificadas.

Estimación de la tasa de mutación del ADNmt en *Austrolebias*

Debido a que las especies analizadas en esta Tesis son anuales (no se solapan diferentes generaciones en un mismo intervalo de tiempo) y a que contamos con dos generaciones de hermanos totales obtenidos en cautiverio (pedigrí), se estimó la tasa de mutación por año (o generación) de los genes mitocondriales *cyt-b* y *cox-1* en *A. charrua* y *A. cheradophilus*. A partir de las secuencias nucleotídicas parciales amplificadas en los individuos colectados en el campo y en las progenies de laboratorio, la “tasa de mutación por año” se calculó según la ecuación:

$$\text{Tasa de mutación} = \text{n}^\circ \text{ de sitios variables} / \text{n}^\circ \text{ total de sitios secuenciados} / \text{n}^\circ \text{ total de individuos analizados}$$

Secuenciación masiva (NGS) parcial del genoma total de *A. charrua* y caracterización de proteínas candidatas asociadas al envejecimientoSecuenciación parcial del genoma total de *A. charrua*

El ADN genómico total (aislado previamente para el análisis de los genes mitocondriales) de una hembra adulta de *A. charrua* colectada en el campo en el 2012 (ver Apéndice 1) se envió a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea) para su secuenciación mediante una corrida de 1/8 de región en una plataforma de tipo GS-FLX Titanium.

Identificación de secuencias codificantes de proteínas asociadas al envejecimiento

El archivo con los “reads” obtenidos en *A. charrua* fue analizado mediante un BLAST (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>) contra la base de datos disponible de

proteínas de *Danio rerio* ([ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/D\\_rerio/protein/](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/D_rerio/protein/)) a fin de identificar las secuencias codificantes de proteínas en el genoma parcial secuenciado de *A. charrua*.

Se descargó la lista de proteínas vinculadas al envejecimiento en *Mus musculus* del sitio web AnAge: The Animal Ageing and Longevity Database

(<http://genomics.senescence.info/genes/search.php?organism=Mus+musculus&show=4>) y se buscaron las proteínas homólogas en *D. rerio* mediante BLASTp ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=OGP\\_7955\\_9557&LINK\\_LOC=blasttab&LAST\\_PAGE=blastn](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=OGP_7955_9557&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn)).

Luego, los números de acceso de las proteínas de *D. rerio* se buscaron en el archivo resultante del BLAST anterior y se identificó el/los correspondientes “read/s” de *A. charrua* codificantes de esa proteína.

#### Análisis de los niveles de conservación de proteínas nucleares candidatas asociadas al envejecimiento en varios modelos animales

Entre todas las proteínas de *D. rerio* (homólogas a las de *Mus musculus*) que se encontraron en los “reads” de *A. charrua*, se seleccionaron solamente tres que están involucradas en diferentes vías moleculares del envejecimiento animal. Las proteínas seleccionadas fueron la adenilato ciclase-5 (Adcy5), el factor de crecimiento insulínico tipo-1 (IGF-1) y la p53.

Para cada una de estas proteínas, se realizó un alineamiento múltiple de los “reads” aislados en *A. charrua* con secuencias homólogas en otros peces teleósteos obtenidas del GenBank, en el programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013).

El grado de relación de estas proteínas nucleares con sus homólogas en otros peces teleósteos, se determinó mediante un análisis filogenético de unión de vecinos (Neighbor-joining) usando el modelo de sustitución nucleotídica distancia-p, en el programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013). El soporte de los nodos se calculó mediante un análisis de Bootstrap (1000 réplicas) y los árboles fueron enraizados siguiendo el criterio de grupo externo, usando como tales las secuencias correspondientes de *Mus musculus*.

#### *Determinación de la actividad de la enzima telomerasa durante la ontogenia de A. charrua*

Se determinó la actividad de la enzima telomerasa mediante la amplificación de los repetidos teloméricos usando el método TRAP (“Telomere Repeat Amplification Protocol”) descrito por Kim et al. (1994). Este método se basa en la amplificación *in vitro* de los extremos teloméricos mediante

PCR. El resultado esperado es una escalera (ladder) de productos que difieren en 6 pb, comenzando en 50 nucleótidos (50, 56, 62, 68, etc.) (Figura 14). Para este análisis se utilizó el kit comercial “TRAPEZE® Telomerase Detection Kit” (Millipore) y se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante como se detalla en el Apéndice 4.

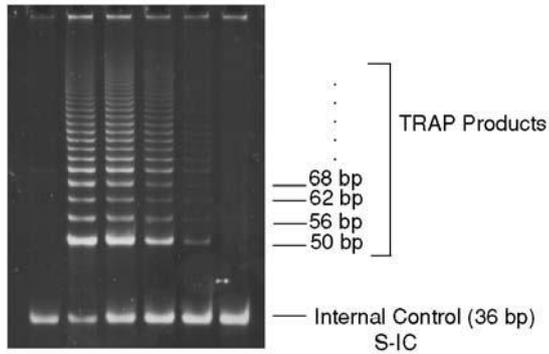


Figura 14. Determinación de la actividad de la telomerasa mediante el kit TRAPEZE®

#### Diseño experimental y obtención de la muestra

Se determinó la actividad de la telomerasa en hígados frescos (conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) de 3 hembras de *A. charrua* en cada uno de los 3 estadios ontogenéticos, colectadas en el charco temporal de “La Coronilla” en el 2012 y obtenidas en cautiverio en el mismo año (ver Apéndice 1).

Se evaluó la actividad de esta enzima en hígados de hembras, ya que las células de este tejido están en constante renovación (tejido mitótico) y éste órgano es el responsable de la producción de la proteína vitelogenina que es incorporada en los ovocitos para comenzar proceso de vitelogénesis (Arezo et al., 2007; Tyler and Sumpter, 1996).

#### Cuantificación de proteínas totales en la muestra

La concentración de proteínas totales presente en cada una de las muestras se determinó mediante el método de Bradford. Se realizaron diluciones seriadas de la muestra y se les midió la absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 595nm en un lector de placa (Varioskan, Thermo Electron Co.). Estas mediciones se hicieron por triplicado.

En paralelo, se realizó una curva de calibración a partir de un stock de BSA (Bovine serum albumin) de concentración conocida. La concentración de proteínas en cada muestra se determinó interpolando en la curva de calibración las absorbancias obtenidas para cada una de las diluciones. Posteriormente se realizaron diluciones de la solución “madre” a fin de obtener una concentración de proteínas entre 0.01 - 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  que es el rango óptimo para que la reacción de amplificación sea eficiente.

Amplificación *in vitro* vía PCR de los extremos teloméricos

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático Corbett Palm-Cycler gradient thermal (Corbett Life Science) en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  bajo siguiendo condiciones sugeridas en el kit comercial que se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Mezcla de reacción empleada en la determinación de la actividad de la telomerasa con el kit comercial “TRAPEZE® Telomerase Detection Kit” (Millipore).

Componente (kit)	Volumen final ( $\mu\text{l}$ )
10X TRAP buffer	2,5
50X dNTPs	0,5
Cebador TS	0,5
Mezcla de cebadores TRAP	0,5
Taq DNA polimerasa (Invitrogen)	0,2
Muestra [0.01 - 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	1,0

El programa de amplificación utilizado fue el sugerido por el fabricante y consistió en:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Incubación inicial:	30°C	30 min	
Desnaturalización:	94°C	30 seg	33
Annealing:	59°C	30 seg	
Extensión:	72°C	1 min	
Extensión final:	72°C	5 min	

Los productos amplificados se sometieron a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% en buffer 0,5X TBE (Tris-Borato-EDTA). Se sembraron 10  $\mu\text{L}$  del producto amplificado con 5  $\mu\text{l}$  de buffer de corrida y 5  $\mu\text{l}$  de marcador de peso molecular (FastRuler™ Low Range DNA Ladder, FERMENTAS). La corrida electroforética se realizó a 300V durante aproximadamente 2 horas.

Finalizada la corrida, el gel fue sumergido durante 30 minutos en una solución de bromuro de etidio (1:10.000) y luego desteñido sumergiéndolo en  $\text{H}_2\text{O}$  durante 20 minutos y visualizado en un transiluminador UV.

*Análisis del acortamiento de los telómeros durante la ontogenia de A. charrua mediante Southern blot*

Se analizaron hembras de *A. charrua* en cada uno de los 3 estadios ontogénicos, colectadas en el charco temporal de “La Coronilla” en el 2012 y obtenidas en cautiverio en el mismo año, así como también machos y hembras obtenidos en cautiverio en 2013 (ver Apéndice 1).

El acortamiento de los telómeros se evaluó mediante la técnica de Southern blot que se describe en el Apéndice 4. La transferencia del ADN a la membrana de nylon Hybond-N+ se llevó a cabo durante aproximadamente 20 horas según el esquema de la Figura 15. La sonda utilizada fue un fragmento homólogo a las secuencias teloméricas de vertebrados (AATCCC)<sub>4</sub>.

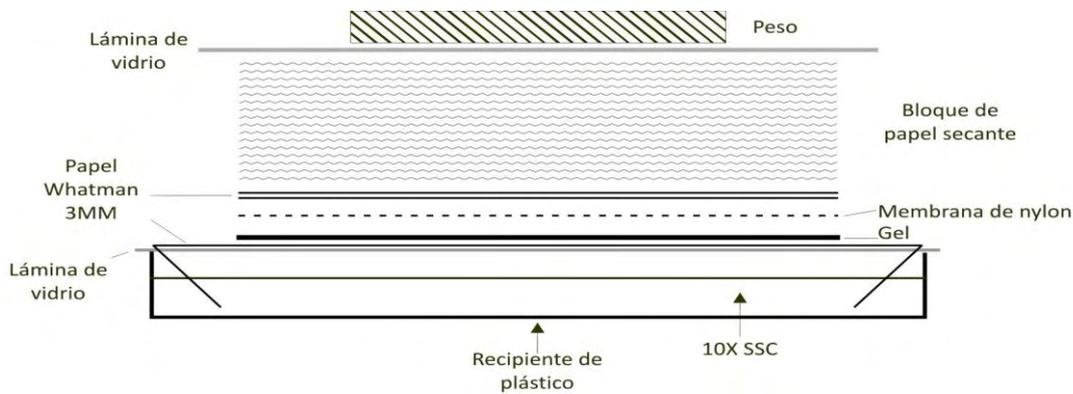


Figura 15. Esquema del montaje realizado para la transferencia del ADN a la membrana de nylon.

## RESULTADOS

### *Organización, estructura y características del genoma mitocondrial de A. charrua*

#### Secuenciación del mitogenoma en hermanos totales de A. charrua

La presente descripción del genoma mitocondrial de *A. charrua* representa el primer mitogenoma completo obtenido para una especie de peces anuales dentro de la familia Rivulidae. De los 15 hermanos totales secuenciados, se pudo ensamblar y anotar, total o parcialmente, el genoma mitocondrial en un total de 11 individuos: 5 juveniles (AUS1, AUS2, AUS3, AUS4 y AUS5), 4 adultos (AUS6, AUS7, AUS8 y AUS9) y 2 seniles (AUS11 y AUS13) (ver Apéndice 1). El número de “reads” obtenidos para los restantes 5 individuos fue muy bajo o nulo, por lo que no se pudieron ensamblar ni anotar (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados obtenidos de la secuenciación en la plataforma Illumina Genome Analyzer Iix.

Estadio ontogenético	Individuo secuenciado	Número de “reads”	Número de contigs con secuencias mitocondriales*	Longitud del/los contig/s	Observaciones
Juvenil	AUS1	5883822	1	17.037	
	AUS2	7000637	1	17.037	
	AUS3	10245110	1	17.034	
	AUS4	9490242	1	17.034	
	AUS5	6917778	2	5.341 / 11.724	
Adulto	AUS6	11218507	1	17.034	
	AUS7	5580271	1	17.103	
	AUS8	6881095	2	1.379 / 15.105	
	AUS9	3917824	2	8.967 / 8.091	
	AUS10	438	0	0	No funcionó.
Senil	AUS11	6101487	2	15.664 / 1.382	
	AUS12	1859775	0	0	No funcionó.
	AUS13	9833295	2	15.676 / 1.381	
	AUS14	11787	0	0	No funcionó.
	AUS15	0	0	0	No funcionó.

\*Similitud determinada por Blastn contra la base de datos de mitogenomas de Cyprinodontiformes; los 16 contigs presentaron una similitud de aproximadamente un 73% y un E-value cercano a cero con el genoma de *K. marmoratus* ([NC\\_003290](https://ncbi.nlm.nih.gov/nucl/NC_003290)).

### Secuenciación de la región control

En los genomas de los individuos AUS1 y AUS7, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1100 pb con cada uno de los juegos de cebadores ACR-1 y ACR-2.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas resultantes con la secuencia de referencia de AUS7 (Figura 16) confirmó la secuencia y longitud (1349 pb) de la RC en el mitogenoma de *A. charrua*.

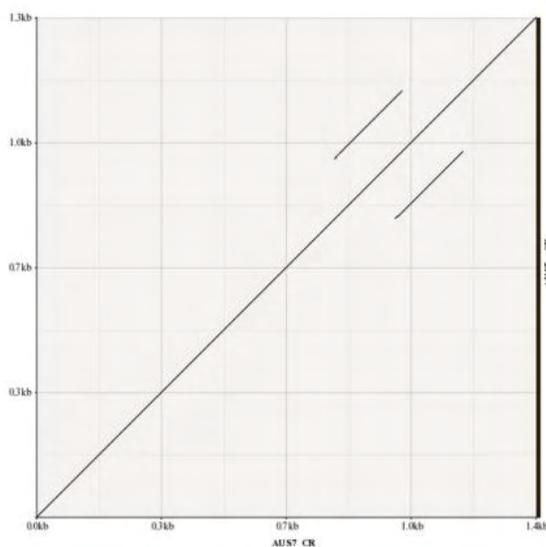


Figura 16. Gráfica correspondiente al alineamiento en el programa bl2seq del genoma mitocondrial de AUS7 con las secuencias de la RC amplificadas con los juegos de cebadores ACR-1 y ACR-2.

### Estructura y características del genoma mitocondrial de *A. charrua*

Confirmada la secuencia de la región control, obtuvimos la organización y estructura final del mitogenoma de *A. charrua*. El ADNmt circular resultante presenta un tamaño de 17.271 pb e incluye 13 secuencias codificantes de proteínas, 22 ARN de transferencia (ARNt), 2 ARN ribosomales (ARNr 16S y 12S) y una región control no-codificante (Figura 17). Las secuencias codificantes presentes en la hebra H, presentan un contenido de G+C del 37%, un sesgo GC [sesgo GC:  $(G-C)/(G+C)$ ] y un sesgo AT [sesgo AT:  $(A-T)/(A+T)$ ] negativos, los cuales estarían indicando una asimetría en la composición nucleotídica (Tabla 10).

Tabla 10. Contenido nucleotídico del mitogenoma de *A. charrua* y contenido G+C de las secuencias codificantes localizadas en la hebra H.

Especie	A	C	G	T	Sesgo GC	Sesgo AT	Contenido de G+C
<i>Austrolebias charrua</i>	0,28	0,22	0,15	0,35	-0,21	-0,10	0,37

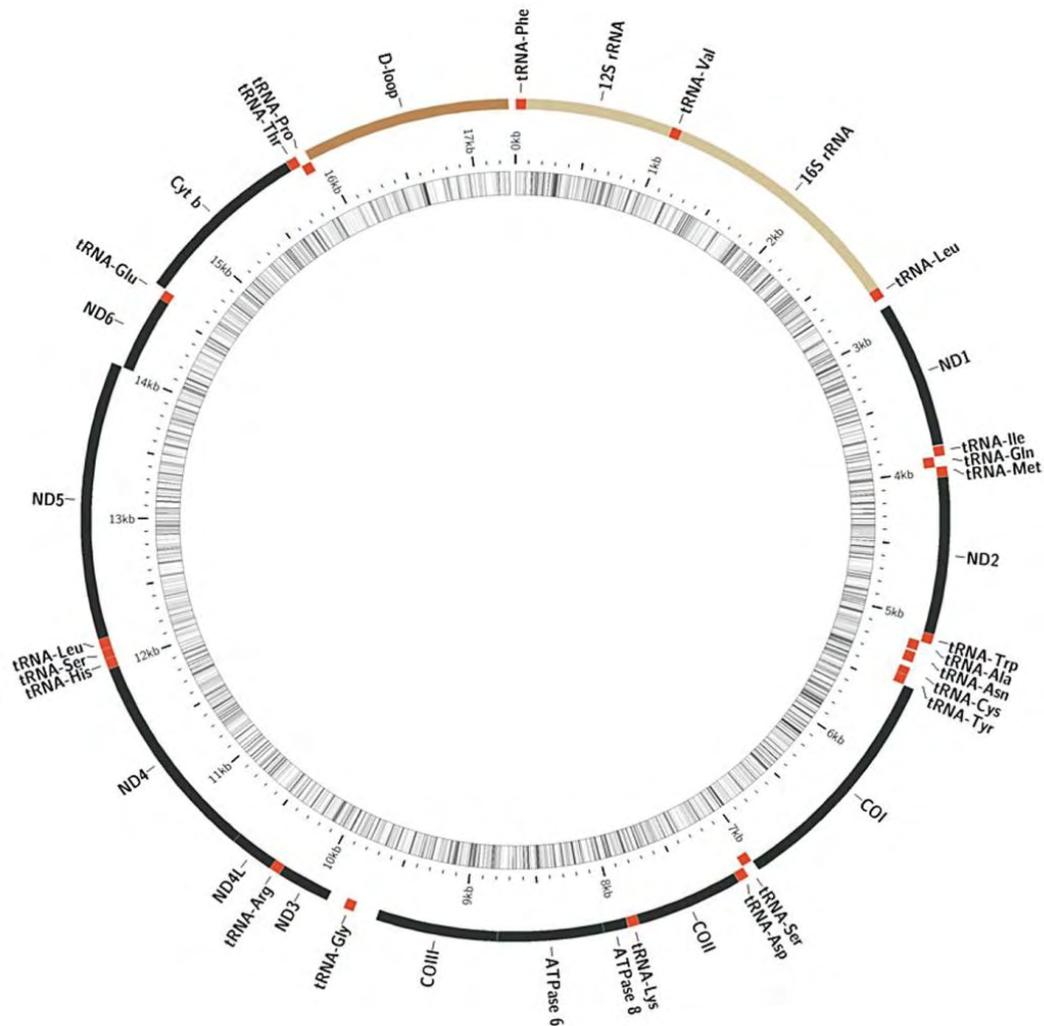


Figura 17. Representación visual del genoma mitocondrial de *A. charrua* creada con el programa Circos. El círculo más interno representa el %GC cada 5pb (las líneas más oscuras significan mayor %GC). El círculo externo representa las hebras H y L (fragmentos que aparecen hacia adentro del círculo) del ADNmt. En negro están indicadas las secuencias codificantes de proteínas, en rojo los ARNt, en marrón claro los ARNr y en marrón oscuro la región control.

En la Tabla 11 se presenta la organización del mitogenoma de *A. charrua*. Sólo ocho ARNt (ARNt-Gln, ARNt -Ala, ARNt-Asn, ARNt-Cys, ARNt -Tyr, ARNt-Ser (1), ARNt-Glu y ARNt-Pro) y ND6 son codificados por la hebra L (liviana o “light”), mientras que los demás genes son codificados en la hebra H. Las secuencias codificantes presentan el codón de iniciación ATG, menos la secuencia del gen COI cuyo codón de inicio es el GTG. Codones stop completos tipo TAA están presentes en las secuencias codificantes de ND1, COI, ATPase8, COIII, ND4L, ND5 y Cyt b y tipo TAG en ND6. Las demás secuencias codificantes presentan codones stop incompletos de tipo T o TA.

Tabla 11. Organización y características del genoma mitocondrial de *A. charrua*.

Gen	Localización		Tamaño		Codones		Nucleótidos intergénicos (pb)*	Hebra
	Inicio	Final	Nucleótidos (pb)	Aminoácidos	Inicio	Stop		
ARNt-Phe	1	69	69					H
ARNr 12S	70	1016	947				0	H
ARNt-Val	1017	1084	68				0	H
ARNr 16S	1085	2715	1631				0	H
ARNt-Leu	2716	2789	74				0	H
ND1	2854	3828	975	324	ATG	TAA	64	H
ARNt-Ile	3835	3902	68				6	H
ARNt-Gln	3902	3972	71				-1	L
ARNt-Met	3972	4040	69				-1	H
ND2	4041	5085	1045	348	ATG	T--	0	H
ARNt-Trp	5086	5153	68				0	H
ARNt-Ala	5152	5221	70				-2	L
ARNt-Asn	5234	5306	73				12	L
ARNt-Cys	5343	5399	57				36	L
ARNt-Tyr	5399	5464	66				-1	L
COI	5466	7022	1557	518	GTG	TAA	1	H
ARNt-Ser	7026	7096	71				3	L
ARNt-Asp	7100	7168	69				3	H
COII	7170	7860	691	230	ATG	T--	1	H
ARNt-Lys	7861	7932	72				0	H
ATPase 8	7934	8101	168	55	ATG	TAA	1	H
ATPase 6	8092	8774	683	227	ATG	TA-	-10	H
COIII	8775	9560	786	261	ATG	TAA	0	H
ARNt-Gly	9711	9778	68				150	H
ND3	9894	10242	349	116	ATG	T--	115	H
ARNt-Arg	10243	10311	69				0	H
ND4L	10312	10608	297	98	ATG	TAA	0	H
ND4	10602	11991	1390	463	ATG	T--	-7	H
ARNt-His	11992	12060	69				0	H
ARNt-Ser	12061	12127	67				0	H
ARNt-Leu	12127	12198	72				-1	H
ND5	12199	14043	1845	614	ATG	TAA	0	H
ND6	14040	14561	522	173	ATG	TAG	-4	L
ARNt-Glu	14562	14629	68				0	L
Cyt b	14634	15782	1149	382	ATG	TAA	4	H
ARNt-Thr	15784	15853	70				1	H
ARNt-Pro	15853	15922	70				-1	L
Región control	15923	17271	1349				0	H

\*Número de nucleótidos que separan los genes. Los números negativos indican nucleótidos solapantes.

Todos los ARNt presentan la característica estructura secundaria tipo trébol (Figura 18) y su longitud varía desde 66 pb hasta 74pb, a excepción del ARNt-Cys que tiene una longitud de 57pb y no presenta el bucle (o brazo) D.

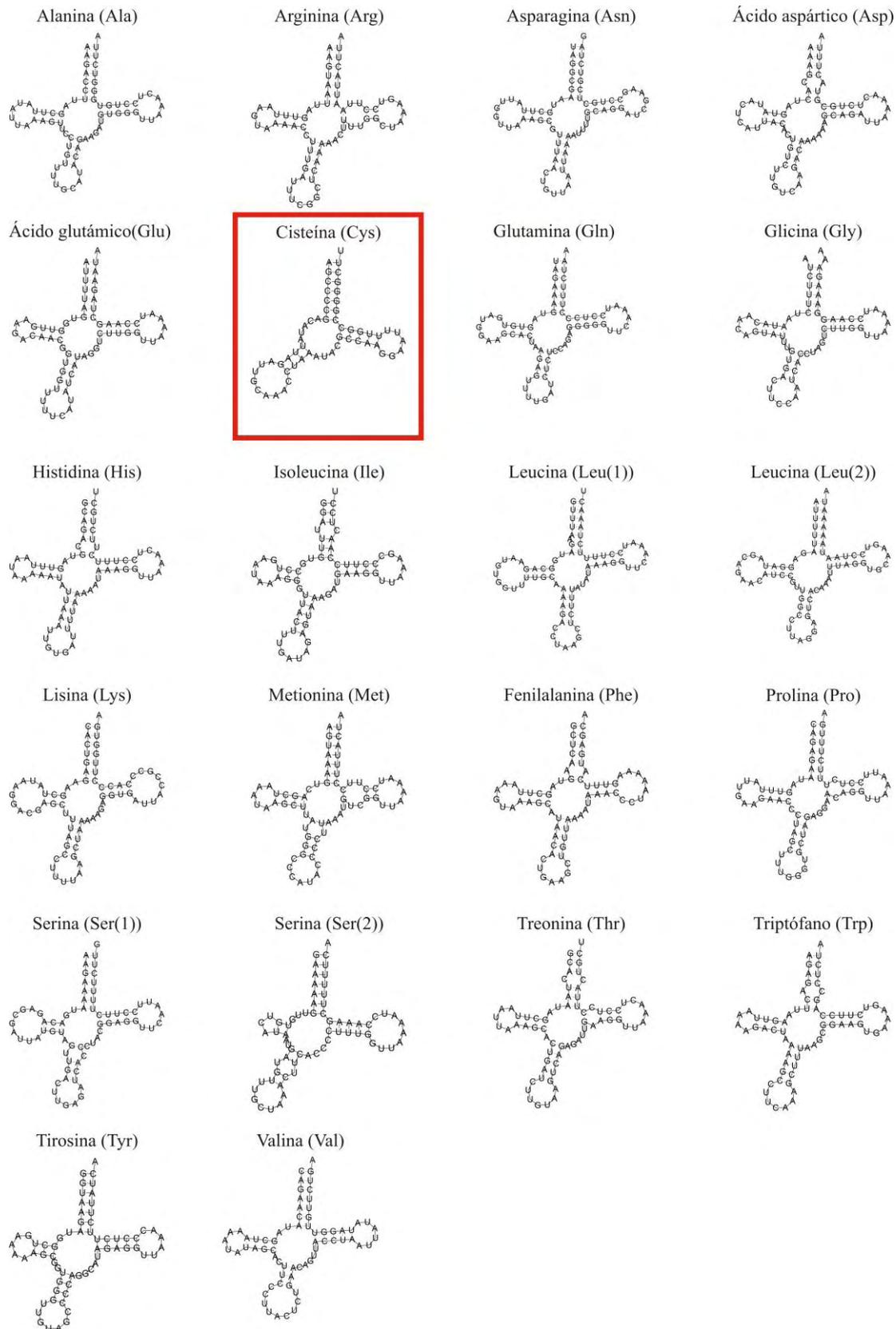


Figura 18. Estructura secundaria de los 22 ARNt presentes en el mitogenoma de *A. charrua*. El ARNt-Cys está resaltado con un recuadro rojo.

*Presencia de polimorfismos en todas las secuencias mitocondriales codificantes durante la ontogenia de hermanos totales de A. charrua*

Se utilizó el mitogenoma obtenido en el individuo adulto AUS7 como genoma de referencia en el análisis de polimorfismos en las secuencias codificantes de proteínas durante la ontogenia de hermanos totales de *A. charrua* (Tabla 12). Se analizaron los 5 individuos juveniles (AUS1, AUS2, AUS3, AUS4 y AUS5), los 3 adultos (AUS6, AUS8 y AUS9) y los 2 seniles (AUS11 y AUS13) para los cuales se obtuvieron secuencias mitocondriales en la secuenciación masiva.

Tabla 12. Cambios nucleotídicos en los genes mitocondriales amplificados en hermanos totales de *A. charrua*. El mitogenoma de AUS7 se usó de referencia y está resaltado en negrita.

		Juveniles					Adultos				Seniles	
Gen	Posición	AUS1	AUS2	AUS3	AUS4	AUS5	AUS6	<b>AUS7</b>	AUS8	AUS9	AUS11	AUS13
COI	5690	0	0	0	TaA	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0
ND3	10059	0	0	0	0	0	Delección	<b>0</b>	0	0	0	0
	10220	0	0	0	AaG	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0
ND5	12505	0	0	0	0	TaC	0	<b>0</b>	0	0	0	0
	12764	0	0	0	0	CaT	0	<b>0</b>	0	0	0	0
	13842	0	GaA	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0
Cyt b	15735	TaC	TaC	TaC	TaC	TaC	TaC	<b>0</b>	TaC	TaC	TaC	TaC

De manera llamativa, las secuencias mitocondriales codificantes no están totalmente conservadas durante la ontogenia de hermanos totales de *A. charrua* y se identificaron hasta 6 cambios nucleotídicos en etapas tempranas de su ciclo de vida. De las 13 secuencias codificantes analizadas, solamente se encontraron cambios nucleotídicos en 4 (COI, ND3, ND5 y Cyt b). La secuencia COI es la más conservada, y solamente se detectó una transversión (T/A) en la posición 5690 del genoma del individuo juvenil AUS4. Dentro de las secuencias codificantes de las diferentes subunidades del complejo NADH deshidrogenasa, en ND3 se detectó una delección en la posición 10059 del genoma del adulto AUS6 y una transición (A/G) en la posición 10220 del juvenil AUS4, mientras que en ND5 se encontraron 2 transiciones (T/C y C/T) en las posiciones 12505 y 12764 respectivamente del genoma del juvenil AUS5 y otra (G/A) en la posición 13842 del juvenil AUS2. Por último, en la posición 15735 del genoma de todos los individuos comparados, se encontró la transición (T/C) en la secuencia codificante del gen Cyt b.

A nivel de las secuencias aminoacídicas, estos cambios nucleotídicos tienen diversos efectos que se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13. Cambios en las secuencias aminoacídicas de los genes mitocondriales.

Gen	Posición en el genoma	Cambio nucleotídico	Número del codón afectado	Posición en el codón	Cambio de codón	Aminoácido Resultante
COI	5690	T/A	75	3	ATT a AAA	Ile a Met
ND3	10059	Delección	56	1	TTT	-
	10220	A/G	109	3	CAA a CAG	Gln a Gln
ND5	12505	T/C	103	1	TCT a CCT	Ser a Pro
	12764	C/T	189	2	GCC a GCT	Ala a Ala
	13842	G/A	548	3	TTG a TTA	Leu a Leu
Cyt b	15735	T/C	368	1	TTT a CTT	Phe a Leu

Como se observa en la Tabla 13, la transversión encontrada en el gen COI, así como la transición en el gen Cyt b y una de las detectadas en el gen ND5 son no sinónimas, ocasionando un cambio en el aminoácido codificado. La delección observada en el gen ND3 del individuo AUS6 ocasiona un corrimiento en el marco de lectura.

El análisis de las 13 secuencias codificantes identificadas en el genoma mitocondrial de hermanos totales de *A. charrua* reveló que algunas de ellas (COI, ND5 y Cyt b) son propensas a las sustituciones nucleotídicas y que éstas tienden a ocurrir en etapas tempranas del ciclo de vida de estos peces. Como se observa en las Tablas 12 y 13, la mayoría de los cambios encontrados son transiciones y los cambios de codón generados ocasionan un cambio en el aminoácido resultante.

*Mutación y evolución del gen cyt-b durante la ontogenia de A. charrua en la naturaleza y en cautiverio*

Extracción del ADN y amplificación del gen cyt-b

Se extrajo el ADN genómico de 123 individuos de *A. charrua* colectados en el charco temporal ubicado en “La Coronilla” en 2011 y 2012 y de 80 individuos obtenidos en cautiverio en 2012 y 2013 (Tabla 14) (números de catálogo en el Apéndice 1).

Tabla 14. Número de individuos de *A. charrua* de los cuales se extrajo ADN genómico total.

	CAMPO (2011)	CAMPO (2012)	Progenie (2012)	Progenie (2013)
Juveniles	20	20	21	20
Adultos	20	22	18	-
Seniles	21	20	14	7
Total	61	62	53	27

Un fragmento de aproximadamente 750 pb (correspondientes al 65% del gen mitocondrial *cyt-b* caracterizado anteriormente por secuenciación masiva del ADNmt) se amplificó en 110 individuos de *A. charrua* colectados en la naturaleza y en 70 obtenidos en cautiverio (Tabla 15).

Tabla 15. Número de individuos de *A. charrua* en los cuales se amplificó el gen *cyt-b*.

	CAMPO (2011)	CAMPO (2012)	Progenie (2012)	Progenie (2013)
Juveniles	20	20	20	14
Adultos	19	16	17	-
Seniles	19	16	12	7
Total	58	52	49	21

Todas las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas mediante el programa BLASTn comprobándose su homología con el gen mitocondrial *cyt-b* aislado en otras especies de *Austrolebias*.

### Niveles de polimorfismo en el gen *cyt-b* durante la ontogenia de *A. charrua* en la naturaleza y en cautiverio

Se determinó el nivel de polimorfismo para el gen *cyt-b* en las dos poblaciones de *A. charrua* colectadas en el charco temporal de “La Coronilla” y en las dos progenies obtenidas en el laboratorio. Mediante un análisis pareado de todas las secuencias parciales amplificadas, se determinó el número de cambios nucleotídicos presente en cada uno de los individuos analizados. En la Figura 19 se observa el porcentaje de individuos de cada estadio ontogenético que presentan cada uno de los diferentes cambios detectados. En el análisis de las progenies, no se consideraron los sitios nucleotídicos con heteroplasmia debida a la herencia diferencial del genoma mitocondrial desde algunos de los 2 progenitores.

En el set de secuencias de la población natural de 2011, se detectaron en total 28 sitios variables, el 29% de los cuales corresponde a transiciones y el 71% a transversiones (Figura 19a). La mayoría de estas sustituciones son no-sinónimas y generan un 8% de aminoácidos variables. Como se observa en la Figura 19a, 8 de estos sitios variables están presentes en las secuencias de los individuos jóvenes, 9 en las de los adultos y 21 en las de los seniles. La mayoría de los cambios detectados en los juveniles están presentes en los adultos y en los seniles (i.e. en las posiciones 528, 702, 729, 730, 739 y 758), mientras que algunos cambios presentes en los adultos están ausentes en los juveniles (i.e. en las posiciones 523, 540, 566, 575, 687 y 695) y el 46% de los cambios encontrados en los individuos más viejos son exclusivos de esta etapa ontogenética (i.e. en las posiciones 295, 298, 353, 355, 484, 526, 567, 591, 595, 619, 620, 672, 738). Cabe destacar que la mayoría de los cambios “exclusivos” (aquellos que no están presentes en otros individuos del mismo estadio, ni en los individuos de las otras dos etapas ontogenéticas) fueron encontrados en el individuo juvenil GP2167, en el adulto GP2183 y en el senil GP2335.

Por otro lado, el análisis de las secuencias amplificadas en los ejemplares de la población de 2012, reveló un total de 7 sitios nucleotídicos variables, de los cuales solamente 1 corresponde a una transición (posición 528) (Figura 19b). Por lo tanto, al igual que en la población anterior, en estos individuos predominan las transversiones y la mayoría de las sustituciones son no-sinónimas. De los 5 cambios encontrados en los juveniles, 3 también están presentes en los seniles (i.e. en las posiciones 528, 702 y 730), mientras que sólo 1 individuo adulto (GP3094) presenta un cambio ausente en los juveniles y en los seniles (posición 646). Por último, la mayoría de los cambios encontrados en las secuencias de los ejemplares más viejos están presentes en los más jóvenes, a excepción de la transversión detectada en la posición 48.

Estos resultados sugieren que esta región del gen *cyt-b* amplificada en las 2 poblaciones naturales de *A. charrua* presenta principalmente sustituciones nucleotídicas de tipo transversiones que están presentes desde etapas tempranas del ciclo de vida. Así mismo, revelan que los sitios 528, 702 y 730 son variables en ambas poblaciones y que no existe un claro aumento de los cambios nucleotídicos durante el envejecimiento de esta especie en la naturaleza.

El análisis pareado de las secuencias parciales del gen *cyt-b* amplificadas en los individuos obtenidos en cautiverio en 2012 muestra que en las posiciones nucleotídicas 672 y 675 algunos juveniles presentan el mismo nucleótido que su madre, mientras que el resto de sus hermanos presentan el nucleótido presente en el genoma del padre (Figura 19c). Esto es lo que hemos designado como heteroplasma debido al sexo del progenitor. Por otro lado, se ha encontrado un cambio en la posición 528 solo en la secuencia aislada en el padre, y dos cambios (en las posiciones 617 y 647) presentes solamente en el gen *cyt-b* materno. Cabe destacar que en estas dos últimas posiciones, todos los ejemplares de la progenie presentan el nucleótido presente en la secuencia paterna. Sin considerar las sustituciones nucleotídicas compartidas con alguno de los progenitores, se encontraron un total de 12 en este set de datos, de las cuales solamente 7 ocasionan un cambio en el aminoácido resultante. Al igual que lo observado en las poblaciones naturales, en esta progenie las transiciones (25%) son inferiores a las transversiones (75%) y están distribuidas entre 1 individuo juvenil y 4 adultos. Si bien las sustituciones encontradas en los adultos no están presentes en los juveniles, cabe destacar que las secuencias nucleotídicas de los individuos más viejos coinciden con las secuencias de la mayoría de los jóvenes y de los adultos.

Por último, el análisis de las secuencias amplificadas en 14 individuos juveniles y 7 seniles de la progenie obtenida en 2013, reveló que las secuencias amplificadas son idénticas entre sí, con excepción de 3 individuos juveniles que presentaron los mismos nucleótidos que la secuencia parental en las posiciones 528 y 730 (Figura 19d).

Al igual que lo observado en las 2 poblaciones naturales analizadas, los resultados obtenidos en la progenie de 2012 revelan que esta región del gen *cyt-b* presenta una acumulación de cambios (principalmente transversiones) desde los juveniles hasta los adultos. Esto puede deberse a un incremento de copias mutadas en los individuos adultos. Como se observa en la Figura 19c y d, al igual que en las poblaciones naturales los sitios 528, 702 y 730 también son variables.

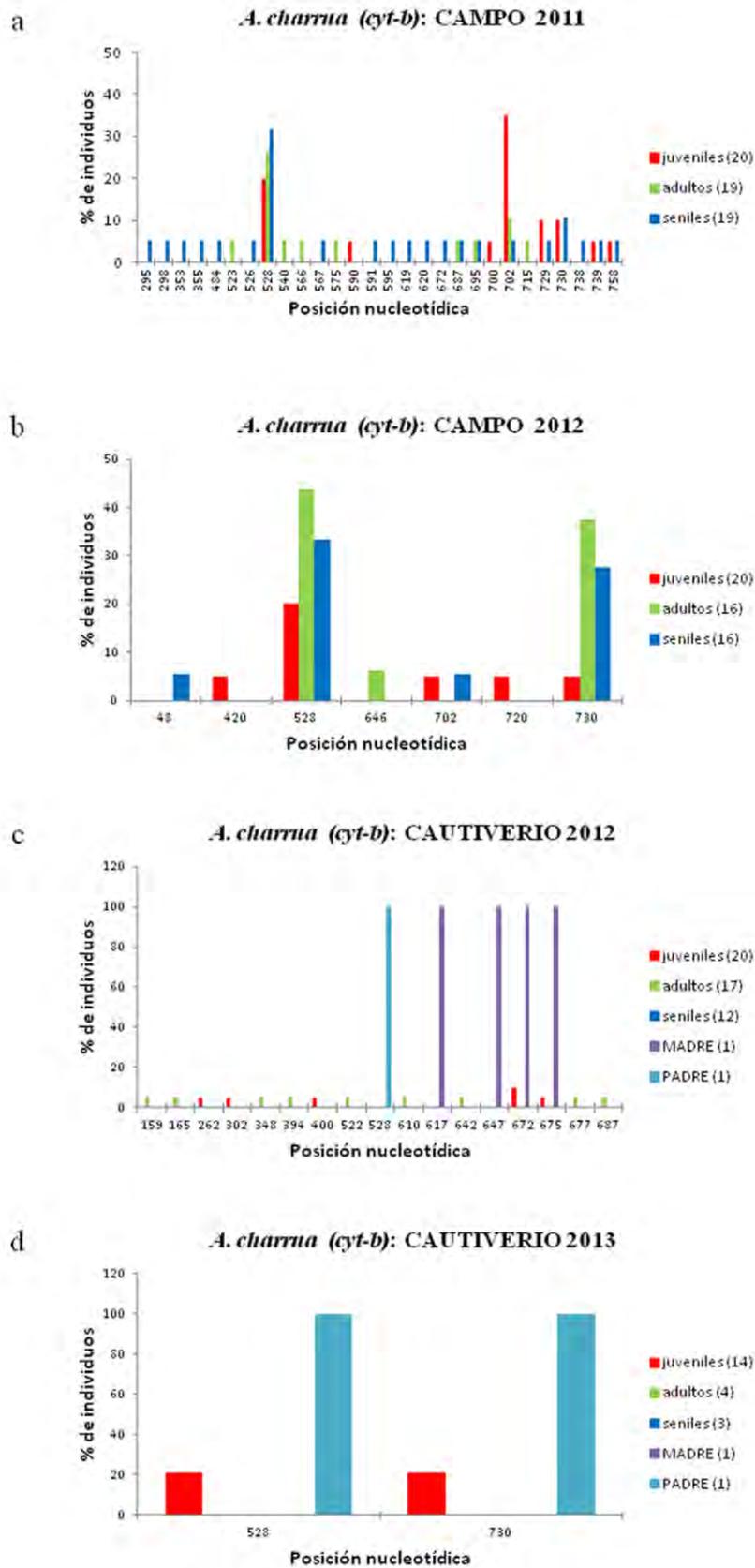


Figura 19. Porcentaje de individuos juveniles, adultos y seniles de *A. charrua* provenientes del campo y obtenidos en cautiverio en función de la posición nucleotídica en la secuencia del gen *cyt-b* que presenta un cambio. a) población de 2011; b) población de 2012; c) progenie 2012 y d) progenie 2013. Entre paréntesis se indica el número de individuos analizados en cada estadio ontogenético.

Niveles de divergencia en el gen *cyt-b* durante la ontogenia de *A. charrua* en el campo y en cautiverio

Las secuencias nucleotídicas parciales del gen *cyt-b* amplificadas en todos los individuos de *A. charrua* analizados, se alinearon con el programa ClustalW implementado en el MEGA6 (Tamura et al. 2013) y se determinaron los niveles de divergencia para cada etapa ontogenética (juvenil, adulto y senil) por separado (Tablas 16 y 17).

El análisis de las 2 poblaciones naturales de *A. charrua* sugiere que la selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) estaría actuando sobre el fragmento del gen mitocondrial *cyt-b* amplificado en esos individuos (Tabla 16). En los individuos jóvenes y adultos de la población de 2011, la divergencia nucleotídica sinónima ( $Ks$ ) es mayor a la no-sinónima ( $Ka$ ), mientras que en los individuos seniles  $Ks=0$  y predominan las sustituciones no-sinónimas. Si bien este gen también se encuentra bajo selección purificadora en la población de 2012, el patrón de sustituciones es diferente. En los estadios juvenil y adulto de esta población,  $Ka=0$  y en los seniles  $Ks > Ka$ . Por otro lado, los valores obtenidos para el sesgo en el uso de codones ( $CBI \sim 0,500$ ) sugieren que en las 2 poblaciones naturales, la selección está menos relajada en el uso de codones sinónimos en esta región del gen.

Tabla 16. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen *cyt-b* amplificadas en los individuos de *A. charrua* colectados en la naturaleza en 3 etapas de su ontogenia.

<i>A. charrua</i>		Número de individuos totales analizados	C	V	Pi	Relación Ka/Ks	CBI
CAMPO 2011	Juveniles	20	782	8	5	0,099	0,504
	Adultos	19	832	9	1	0,070	0,510
	Seniles	19	813	21	3	-	0,506
CAMPO 2012	Juveniles	20	737	5	1	0,000	0,497
	Adultos	16	775	3	2	0,000	0,495
	Seniles	16	778	4	2	0,075	0,494

C: sitios invariables

V: sitios variables

Pi: sitios filogenéticamente informativos (contienen al menos dos nucleótidos diferentes, y al menos dos de ellos se producen con una frecuencia mínima de dos)

(-): no se pudo calcular la relación  $Ka/Ks$  porque  $Ks=0$ .

Por otro lado, el análisis de las secuencias aisladas en los individuos de *A. charrua* obtenidos en cautiverio sugiere que la selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) estaría actuando sobre el fragmento del gen mitocondrial *cyt-b* amplificado en esos individuos (Tabla 17). En estos análisis no se tuvieron en cuenta los sitios variables compartidos con alguno de los progenitores. En los individuos

juveniles de la progenie de 2012,  $K_s=0$ , por lo que predomina la divergencia en sustituciones no-sinónimas ( $K_a$ ). En los adultos,  $K_s$  es un poco superior a  $K_a$  ( $K_a/K_s < 1$ ) y en los seniles ambas divergencias son cero. Por otro lado, en los ejemplares juveniles de la progenie de 2013  $K_s > K_a$  pero la divergencia ocurre en sitios nucleotídicos que son compartidos con uno de los progenitores. En los individuos más viejos de esta progenie,  $K_s$  y  $K_a$  son cero al igual que en la progenie anterior.

Tabla 17. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen *cyt-b* amplificadas en los individuos de *A. charrua* obtenidos en cautiverio.

<i>A. charrua</i>		Número de individuos totales analizados	C	V	Pi	Relación $K_a/K_s$	CBI
F1 / 2011 (2012)	Juveniles	20	737	4	1	-	0,499
	Adultos	17	730	10	1	0,191	0,495
	Seniles	12	741	1	0	0,000	0,489
F1 / 2012 (2013)	Juveniles	14	739	2	2	0,314	0,489
	Adultos	0	-	-	-	-	-
	Seniles	7	741	0	0	0,000	0,489

C: sitios invariables

V: sitios variables

Pi: sitios filogenéticamente informativos (contienen al menos dos nucleótidos diferentes, y al menos dos de ellos se producen con una frecuencia mínima de dos)

(-): no se pudo calcular la relación  $K_a/K_s$  porque  $K_s=0$ .

A pesar de las diferencias observadas entre ambas progenies, la presencia mayoritaria de cambios no-sinónimos estaría indicando que la selección está más relajada en la eliminación de estos cambios. Los valores obtenidos para el sesgo en el uso de codones en cada estadio ontogenético (CBI ~ 0,500) sugieren que la selección está menos relajada en el uso de codones sinónimos en este fragmento del *cyt-b* amplificado en las progenies obtenidas en cautiverio.

#### Codificación del aminoácido cisteína en el fragmento del gen *cyt-b* amplificado en *A. charrua*

El análisis de las secuencias nucleotídicas traducidas, mostró que el aminoácido cisteína solamente representa el 1% de todos los aminoácidos codificados por este fragmento del gen *cyt-b* aislado en todos los individuos de *A. charrua* analizados, tanto colectados en el campo como obtenidos en cautiverio.

*Mutación y evolución del gen cyt-b durante la ontogenia de A. cheradophilus en la naturaleza y en cautiverio*

Extracción del ADN y amplificación del gen cyt-b

Se extrajo el ADN genómico de 45 individuos de *A. cheradophilus* colectados en el campo en 2011 y 2012 y de 37 individuos obtenidos en cautiverio en 2012 y 2013 (Tabla 18) (números de catálogo en el Apéndice 2).

Tabla 18. Número de individuos de *A. cheradophilus* de los cuales se extrajo ADN genómico total.

	CAMPO (2011)	CAMPO (2012)	Progenie (2012)	Progenie (2013)
Juveniles	3	7	6	11
Adultos	4*	14	5	-
Seniles	13**	2	8	7
Total	20	23	19	18

\* Dos de estos individuos fueron colectados como juveniles y mantenidos en cautiverio hasta que alcanzaron el estadio adulto.

\*\* 4 fueron colectados juveniles, 7 fueron colectados adultos y solamente 2 individuos fueron colectados seniles. Los juveniles y adultos fueron mantenidos en cautiverio hasta que alcanzaron casi el final de su ciclo de vida.

Al igual que en *A. charrua*, un fragmento de aproximadamente 750 pb se amplificó en 41 individuos de *A. cheradophilus* colectados en la naturaleza y en 36 obtenidos en cautiverio (Tabla 19).

Tabla 19. Número de individuos de *A. cheradophilus* en los cuales se amplificó el gen cyt-.

	CAMPO (2011)	CAMPO (2012)	Progenie (2012)	Progenie (2013)
Juveniles	3	7	6	10
Adultos	4	13	5	-
Seniles	12	2	8	7
Total	19	22	19	17

Las 77 secuencias nucleotídicas amplificadas fueron analizadas mediante el programa BLASTn comprobándose su homología con el gen mitocondrial *cyt-b* aislado en otras especies de *Austrolebias*.

Niveles de polimorfismo en el gen *cyt-b* durante la ontogenia de *A. cheradophilus* en la naturaleza y en cautiverio

Se determinó el nivel de polimorfismo para el gen *cyt-b* en las dos poblaciones de *A. cheradophilus* colectadas en el campo y en las dos progenies obtenidas en el laboratorio. Debido a que en el año 2011 se colectaron individuos de *A. cheradophilus* en diferentes charcos temporales ubicados en la localidad de “La Charqueada” (Departamento de Treinta y Tres), se analizó la presencia de sustituciones nucleotídicas durante la ontogenia de esta especie en las diferentes zonas muestreadas: Ruta 91, Camino al Arrozal 33 y Zona de contacto, detalladas en la sección “colecta de ejemplares en la naturaleza” (páginas 27 y 28). Mediante un análisis pareado de todas las secuencias parciales amplificadas, se determinó el número de cambios nucleotídicos presente en cada uno de los individuos analizados. A diferencia de lo observado en las secuencias de *A. charrua*, en esta especie se encontró un elevado nivel de polimorfismo en las poblaciones naturales (como se describirá más adelante), por lo que no fue posible presentar los resultados gráficamente.

El análisis de las 19 secuencias parciales del gen *cyt-b* amplificadas en los individuos de *A. cheradophilus* capturados en los diferentes charcos de “La Charqueada” en 2011 reveló que existe un elevado polimorfismo poblacional entre los diferentes charcos muestreados (Figura 20). En 3 individuos colectados como adultos en el charco A13 de esa localidad, y que fueron mantenidos en cautiverio hasta el final de su ciclo de vida, se observa una inserción de 6 nucleótidos. El bajo número de individuos colectados en cada uno de los charcos muestreados no permitió determinar el número de sitios variables dentro y entre cada estadio ontogenético. A pesar de esto, nuestros resultados evidencian por primera vez un elevado polimorfismo poblacional en esta región del gen *cyt-b* amplificada en individuos salvajes de esta especie de gran tamaño.



Figura 20. Alineamiento en el MEGA6 de las secuencias nucleotídicas parciales del gen *cyt-b* amplificadas en 19 individuos de *A. cheradophilus* colectados en la naturaleza en 2011. La flecha roja indica la inserción presente en 3 individuos provenientes de un charco ubicado en la zona de “La Charqueada”.

Por otro lado, el número de cambios nucleotídicos en el set de 22 secuencias del gen *cyt-b* aisladas en los individuos capturados en 2012 en la Ruta 9 (“Barra Grande”) fue sustancialmente elevado. Se analizaron 7 ejemplares juveniles, 13 adultos y solamente 2 seniles, en los cuales se detectaron en total 78 sitios variables. La mayoría de estas sustituciones nucleotídicas son no-sinónimas y generan un 18% de aminoácidos variables. Se encuentran distribuidas entre los individuos juveniles y adultos, ya que solamente 4 de ellas están presentes en las secuencias de los seniles. Casi todos los cambios detectados en los juveniles están presentes en los adultos, mientras que algunos cambios presentes en los adultos están ausentes en los juveniles y seniles. Cabe destacar que 3 de los cambios “exclusivos” de los individuos seniles fueron encontrados en el individuo senil GP3161. Estos resultados sugieren que esta región del gen *cyt-b* amplificada en las 2 poblaciones naturales de *A. cheradophilus* presenta un elevado nivel de polimorfismo nucleotídico y una acumulación de mutaciones a lo largo de su ontogenia, desde la etapa de juveniles hasta adultos. Si bien se observa un aumento del número de sitios variables en los individuos adultos de la población de 2012, debido al polimorfismo detectado no se puede concluir que éstos sean consecuencia del envejecimiento de la especie.

El análisis de sitios variables en esta región del gen *cyt-b* amplificada en 19 hermanos totales de *A. cheradophilus* obtenidos en cautiverio en el 2012, reveló la presencia de muy pocas sustituciones nucleotídicas. Sin considerar los cambios nucleotídicos compartidos con alguno de los progenitores, se detectaron en total 4 sitios variables correspondientes a 1 transversión no-sinónima en 1 individuo juvenil (en la posición 70), una transición sinónima y una transversión no-sinónima en 1 individuo adulto (en las posiciones 326 y 394 respectivamente) y una transversión sinónima en otro individuo adulto (en la posición 408), no encontrándose cambios nucleotídicos en los 8 individuos seniles analizados. Teniendo en cuenta que existe un aumento de las sustituciones en los adultos y que éstas no están presentes en los juveniles, los resultados obtenidos en esta progenie de *A. cheradophilus* en cautiverio sugieren que los cambios nucleotídicos encontrados en los adultos podrían estar asociados al envejecimiento.

Por último, el análisis de las sustituciones nucleotídicas presentes en las secuencias del gen *cyt-b* amplificadas en 10 hermanos totales juveniles y 7 seniles de *A. cheradophilus* obtenidos en cautiverio en 2013, reveló la presencia de 36 sitios variables (4 transiciones y 5 transversiones). Nueve de ellos están presentes en las secuencias de los juveniles, principalmente en el individuo GP3746. Dentro de los seniles, el individuo GP3757 contiene 28 de estos cambios nucleotídicos. Los 6 individuos viejos restantes no presentaron cambios en su secuencia respecto a los juveniles. Considerando el elevado nivel de polimorfismo detectado en las secuencias del gen *cyt-b* de la población natural de 2012 de la cual prevenían los parentales de esta progenie, los cambios

nucleotídicos presentes en el ejemplar senil GP3757 podrían deberse al envejecimiento de la especie o bien a la heteroplasmia poblacional.

Estos resultados sugieren que esta región del gen *cyt-b* amplificada en las 2 progenies de *A. cheradophilus* analizadas presenta principalmente sustituciones nucleotídicas de tipo transversiones que están presentes desde el estadio juvenil. Por lo tanto, no existe un claro aumento de los cambios nucleotídicos durante el envejecimiento de esta especie en cautiverio. A diferencia de lo observado en las progenies de *A. charrua*, en *A. cheradophilus* no se encontró ningún sitio nucleotídico más propenso a la acumulación de cambios.

#### Niveles de divergencia y patrones de sustitución en el gen *cyt-b* durante la ontogenia de *A. cheradophilus* en poblaciones naturales y en cautiverio

Al igual que lo realizado en *A. charrua*, las secuencias nucleotídicas parciales del gen *cyt-b* amplificadas en todos los individuos de *A. cheradophilus* analizados, se alinearon con el programa ClustalW implementado en el MEGA6 (Tamura et al. 2013) y se determinaron los niveles de divergencia para cada etapa ontogenética (juvenil, adulto y senil) por separado (Tablas 20 y 21).

El análisis de las poblaciones naturales de *A. cheradophilus* colectadas en la localidad de “La Charqueada” en 2011 sugiere que la selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) estaría actuando sobre el fragmento del gen mitocondrial *cyt-b* amplificado en esos individuos (Tabla 20). En los 3 estadios ontogenéticos analizados  $Ka=0$ . Por otro lado, si bien este gen también se encuentra bajo selección purificadora en los individuos juveniles de la población de la Ruta 9 colectada en 2012, en los individuos adultos y seniles no existe presión selectiva ( $Ka/Ks \sim 1$ ) y presentan valores similares de sustituciones sinónimas y no-sinónimas. Los valores obtenidos para el sesgo en el uso de codones (CBI  $\sim 0,400$ ) sugieren que en todas las poblaciones naturales analizadas, la selección está menos relajada en el uso de codones sinónimos en esta región del gen.

Los mismos análisis de polimorfismos y divergencia descritos para las poblaciones naturales, se realizaron para las secuencias *cyt-b* aisladas de los individuos de *A. cheradophilus* obtenidos en cautiverio (Tabla 21). Los parentales de la progenie nacida en el 2012 fueron colectados en el 2011 en un charco temporal ubicado sobre la Ruta 91 (“La Charqueada”) y los de la progenie de 2013 fueron colectados en el charco sobre la Ruta 9 (“Barra grande”) en 2012. El análisis de las secuencias aisladas en los individuos de la progenie obtenida en 2012 sugiere que la selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) estaría actuando sobre el fragmento del gen mitocondrial *cyt-b* amplificado (Tabla 21). En los individuos juveniles  $Ks=0$ , por lo que predomina la divergencia en sustituciones no-sinónimas, mientras que en los adultos,  $Ks$  es un poco superior a  $Ka$  ( $Ka/Ks < 1$ ) y en los seniles

ambas divergencias son cero. Por otro lado, el análisis de la progenie obtenida en 2013 muestra que no existe presión selectiva ( $Ka/Ks \sim 1$ ) en la región del gen *cyt-b* amplificada en los individuos juveniles y seniles, por lo que presentan valores similares de sustituciones sinónimas y no-sinónimas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la muestra colectada en el 2012, de la cual provenían los parentales de esta progenie. En ambas poblaciones obtenidas en cautiverio, el sesgo en el uso de codones (CBI  $\sim 0,400$ ) sugiere que la selección está menos relajada en el uso de codones sinónimos en esta región del gen.

Tabla 20. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen *cyt-b* amplificadas en los individuos de *A. cheradophilus* colectados en la naturaleza.

<i>A. cheradophilus</i>		Número de individuos totales analizados	C	V	Pi	Relación Ka/Ks	CBI
CAMPO 2011 (Ruta 91)	Juveniles	2	709	1	0	0,000	0,427
	Adultos	2	709	1	0	0,000	0,427
	Seniles	4	708	2	0	0,000	0,426
CAMPO 2011 (Camino al Arrozal 33)	Juveniles	0	-	-	-	-	-
	Adultos	2	701	2	0	0,000	0,436
	Seniles	4	681	4	0	0,000	0,463
CAMPO 2011 (Zona de contacto)	Juveniles	1	-	-	-	-	-
	Adultos	0	-	-	-	-	-
	Seniles	4	679	3	0	0,000	0,429
CAMPO 2012 (Barra Grande)	Juveniles	7	711	18	1	0,449	0,417
	Adultos	14	666	63	32	0,941	0,411
	Seniles	2	724	4	0	0,937	0,403

C: sitios invariables

V: sitios variables

Pi: sitios filogenéticamente informativos (contienen al menos dos nucleótidos diferentes, y al menos dos de ellos se producen con una frecuencia mínima de dos)

(-): no se pudo calcular la relación Ka/Ks por la falta de individuos.

Tabla 21. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen *cyt-b* amplificadas en los individuos de *A. cheradophilus* obtenidos en cautiverio.

<i>A. cheradophilus</i>		Número de individuos totales analizados	C	V	Pi	Relación Ka/Ks	CBI
F1 / 2011 (2012)	Juveniles	6	709	1	0	-	0,431
	Adultos	5	705	3	0	0,319	0,468
	Seniles	8	732	0	0	0,000	0,438
F1 / 2012 (2013)	Juveniles	10	720	9	0	0,895	0,414
	Adultos	-	-	-	-	-	-
	Seniles	7	701	28	0	0,955	0,410

C: sitios invariables

V: sitios variables

Pi: sitios filogenéticamente informativos (contienen al menos dos nucleótidos diferentes, y al menos dos de ellos se producen con una frecuencia mínima de dos)

(-): no se pudo calcular la relación Ka/Ks por la falta de individuos o Ks=0.

#### Codificación del aminoácido cisteína en el fragmento del gen *cyt-b* amplificado en *A. cheradophilus*

Al igual que en la especie *A. charrua*, el análisis de las secuencias nucleotídicas traducidas, mostró que el aminoácido cisteína solamente representa el 1% de todos los aminoácidos codificados por este fragmento del gen *cyt-b* aislado en todos los individuos de *A. cheradophilus* analizados, tanto colectados en el campo como obtenidos en cautiverio.

*Mutación y evolución del gen *cox-1* durante la ontogenia de *A. charrua* en la naturaleza y en cautiverio*

Extracción del ADN y amplificación del gen *cyt-b*

Se utilizaron los mismos ADN extraídos anteriormente (Tabla 14) (números de catálogo en el Apéndice 1).

Un fragmento de aproximadamente 640 pb, correspondientes al 41% del gen mitocondrial *cox-1* caracterizado previamente mediante secuenciación masiva del ADNmt se amplificó en 120 individuos de *A. charrua* colectados en la naturaleza y en 71 obtenidos en cautiverio (Tabla 22).

Tabla 22. Número de individuos de *A. charrua* en los cuales se amplificó el gen *cox-1*.

	CAMPO (2011)	CAMPO (2012)	Progenie (2012)	Progenie (2013)
Juveniles	20	20	20	14
Adultos	20	19	17	0
Seniles	21	20	13	7
Total	61	59	50	21

Como era la primera vez que el gen *cox-1* se aislaba en una especie del género *Austrolebias*, todas las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas mediante el programa BLASTn para corroborar su homología con este gen mitocondrial aislado en otras especies.

### Niveles de polimorfismo en el gen *cox-1* durante la ontogenia de *A. charrua* en la naturaleza y en cautiverio

Al igual que lo descrito anteriormente para el gen *cyt-b*, se determinó el nivel de polimorfismo para el gen *cox-1* en las dos poblaciones de *A. charrua* colectadas en el charco temporal de “La Coronilla” y en las dos progenies obtenidas en el laboratorio. Mediante un análisis pareado de todas las secuencias parciales amplificadas, se determinó el número de cambios nucleotídicos presente en cada uno de los individuos analizados. En la Figura 21 se observa el porcentaje de individuos de cada estadio ontogenético que presentan cada uno de los diferentes cambios detectados. En el análisis de las progenies, no se consideraron los sitios nucleotídicos con heteroplasmia debida a la herencia diferencial del genoma mitocondrial desde algunos de los 2 progenitores.

En los 3 estadios ontogenéticos analizados de la población natural colectada en 2011, se encontraron 2 sitios nucleotídicos (posiciones 105 y 144) susceptibles al cambio (Figura 21a). El cambio observado en la posición 105 corresponde a una transversión (G/C) y el de la posición 144 a una transición (T/C) y ambos son sinónimos. Ambas sustituciones están presentes en un 20% de los individuos juveniles, 20% de los adultos y 33% de los seniles. Si bien el número de sitios variables permanece constante en este fragmento del gen *cox-1* amplificado, su frecuencia aumenta en los individuos más viejos. Por otro lado, el análisis de las 49 secuencias parciales del gen *cox-1* amplificadas en los individuos colectados en 2012 mostró el mismo patrón de sustituciones que la generación anterior (Figura 21b). Si bien predominan los cambios nucleotídicos en las posiciones 105 y 144, también se detectó una transición (G/A) en el sitio 76 de la secuencia correspondiente al individuo adulto GP3096 y una transición (T/C) en el sitio 423 de la secuencia del individuo senil GP3273. La transición en la posición 76 ocasiona un cambio en el aminoácido resultante, mientras que las otras 3 son sinónimas. Estos resultados sugieren la presencia de 2 sitios susceptibles al cambio que no están presentes en los individuos más jóvenes y que los cambios en las posiciones 105 y 144 son más frecuentes en las etapas más avanzadas del ciclo.

Por otro lado, el análisis de las secuencias parciales del gen *cox-1* amplificadas en los hermanos totales de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2012 reveló la presencia de 11 sitios nucleotídicos variables (5 transiciones y 6 transversiones) (Figura 21c). La mayoría de estas sustituciones (64%) no son sinónimas y casi el 100% de ellas se encuentran en los individuos adultos y seniles. Como puede observarse en la Figura 21c, un ejemplar juvenil (GP2809) tiene el mismo nucleótido presente en la secuencia de su progenitor masculino en las posiciones 105 y 144, mientras que el resto de sus hermanos presentaron la misma base que en el genoma de su madre. A diferencia de lo

observado en las poblaciones naturales, las posiciones 105 y 144 de esta región del gen *cox-1* amplificada no son muy variables en esta generación en cautiverio. Así mismo, estos resultados reflejan un llamativo aumento del número de sitios variables a medida que aumenta la edad de los individuos.

Por último, el análisis de las secuencias amplificadas en 14 individuos juveniles y 7 seniles de la progenie obtenida en 2013, reveló que las secuencias amplificadas son idénticas entre sí, con excepción de 3 individuos juveniles que presentaron los mismos nucleótidos que la secuencia parental en las posiciones 105 y 144 (Figura 21d).

Los resultados obtenidos en las 2 progenies de hermanos totales de *A. charrua* nacidas y mantenidas en cautiverio, aún con variaciones anuales, permitirían sugerir una tendencia en el aumento de las tasas de mutación en el gen *cox-1*. Esto es evidente en la generación del 2012 y no se visualizó en la siguiente progenie 2013. Es de destacar que el tamaño muestral del año 2013 fue sustancialmente menor al de la progenie obtenida en 2012, con lo cual el azar podría estar afectando, de manera importante, los resultados observados. También este comportamiento errático de los datos en dos años consecutivos diferentes, podría estar indicando un efecto aleatorio en la acumulación de cambios en generaciones diferentes y con número de progenies limitadas.

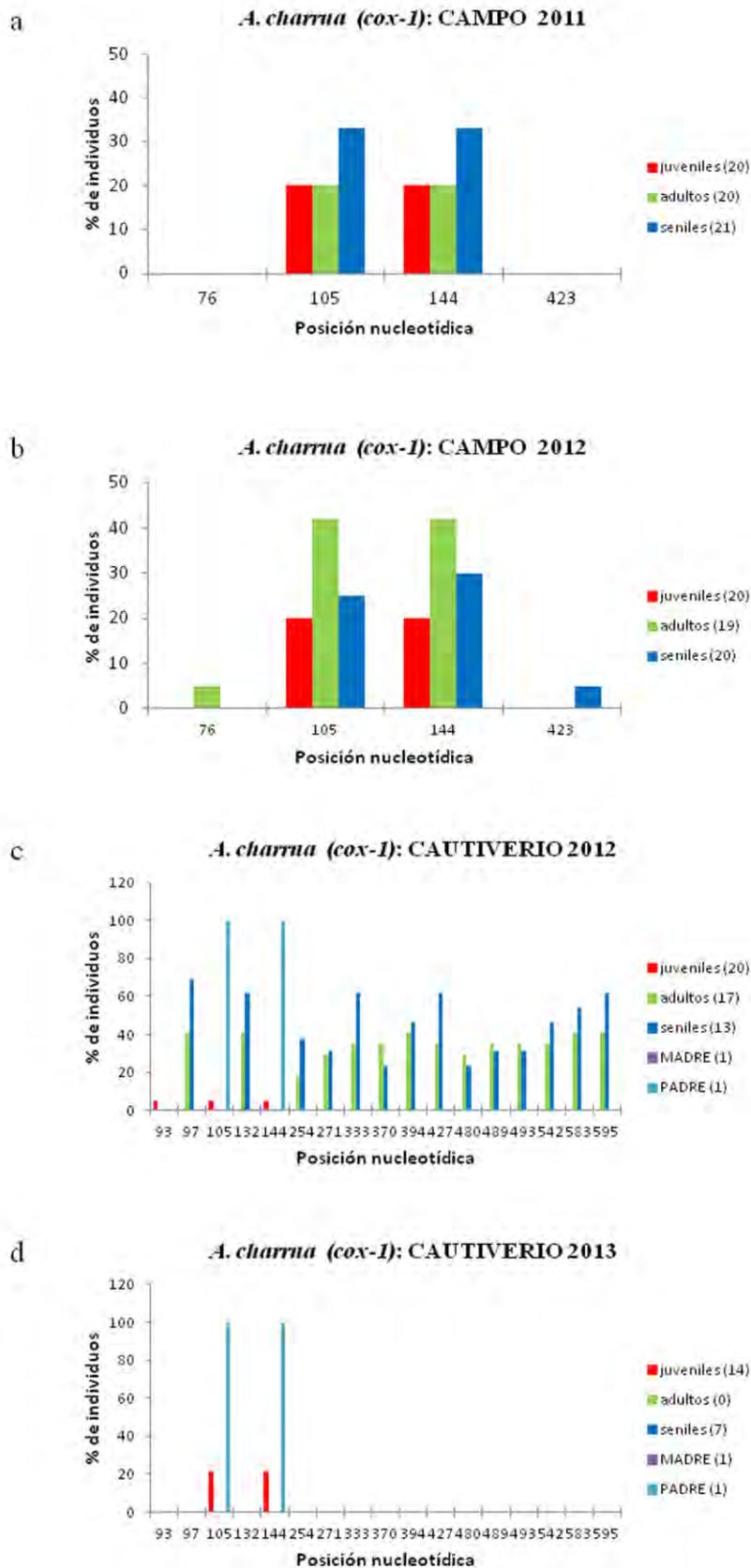


Figura 21. Porcentaje de individuos juveniles, adultos y seniles de *A. charrua* provenientes del campo y obtenidos en cautiverio en función de la posición nucleotídica en la secuencia del gen *cox-1* que presenta un cambio. a) población de 2011; b) población de 2012; c) progenie 2012 y d) progenie 2013. Entre paréntesis se indica el número de individuos analizados en cada estadio ontogenético.

Niveles de divergencia y patrones de sustitución en el gen *cox-1* durante la ontogenia de *A. charrua* en poblaciones naturales y en cautiverio

Las secuencias nucleotídicas parciales del gen *cox-1* amplificadas en todos los individuos de *A. charrua* analizados, se alinearon con el programa ClustalW implementado en el MEGA6 (Tamura et al. 2013) y se determinaron los niveles de divergencia para cada etapa ontogenética (juvenil, adulto y senil) por separado (Tablas 23 y 24).

El análisis de las 2 poblaciones naturales de *A. charrua* sugiere que la selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) estaría actuando sobre el fragmento del gen mitocondrial *cox-1* amplificado en esos individuos (Tabla 23). En los 3 estadíos analizados en las dos muestras de campo, la divergencia nucleotídica no-sinónima ( $Ka$ ) fue nula, salvo en los individuos adultos de la población de 2012 donde  $Ks > Ka$ . Por otro lado, los valores obtenidos para el sesgo en el uso de codones ( $CBI \sim 0,500$ ) sugieren que en las 2 poblaciones naturales, la selección está menos relajada en el uso de codones sinónimos en esta región del gen *cox-1*.

Tabla 23. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen *cox-1* amplificadas en los individuos de *A. charrua* colectados en la naturaleza.

<i>A. charrua</i>		Número de individuos totales analizados	C	V	Pi	Relación Ka/Ks	CBI
CAMPO 2011	Juveniles	20	639	2	2	0,000	0,479
	Adultos	20	639	2	2	0,000	0,479
	Seniles	21	639	2	2	0,000	0,480
CAMPO 2012	Juveniles	20	639	2	2	0,000	0,479
	Adultos	18	638	3	2	0,035	0,478
	Seniles	20	638	3	2	0,000	0,478

C: sitios invariables

V: sitios variables

Pi: sitios filogenéticamente informativos

Al igual que los resultados obtenidos para los individuos colectados en la naturaleza, en los individuos juveniles de la progenie obtenida en 2012,  $Ka=0$  en el fragmento del gen mitocondrial *cox-1* aislado y la selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) podría estar actuando sobre este gen (Tabla 24). Sin embargo, a diferencia de lo observado en los individuos de campo, los individuos adultos y seniles de esta generación presentan valores similares de divergencia nucleotídica sinónima y no-sinónima ( $Ka/Ks \sim 1$ ) por lo cual no existe presión selectiva en esta región del gen *cox-1*. Por último, en los 2 estadíos de la progenie obtenida en cautiverio en 2013  $Ka=0$ . Esto sugiere que la

selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) estaría actuando sobre este fragmento del gen. En ambas progenies obtenidas en cautiverio, el sesgo en el uso de codones (CBI ~ 0,500) sugiere que la selección está menos relajada en el uso de codones sinónimos en este fragmento del gen *cox-1*.

Tabla 24. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen *cox-1* amplificadas en los individuos de *A. charrua* obtenidos en cautiverio.

<i>A. charrua</i>		Número de individuos totales analizados	C	V	Pi	Relación Ka/Ks	CBI
F1 / 2011 (2012)	Juveniles	20	638	3	0	0,00	0,478
	Adultos	17	631	10	10	0,730	0,471
	Seniles	13	631	10	0	0,788	0,470
F1 / 2012 (2013)	Juveniles	14	639	2	2	0,00	0,478
	Adultos	0	-	-	-	-	-
	Seniles	7	641	0	0	0,00	0,479

C: sitios invariables

V: sitios variables

Pi: sitios filogenéticamente informativos

#### Codificación del aminoácido cisteína en este fragmento del gen *cox-1* amplificado en *A. charrua*

El análisis de las secuencias nucleotídicas traducidas, reveló que esta región del gen *cox-1* amplificada en todos los individuos de *A. charrua* analizados, tanto de campo como de cautiverio, no codifica el aminoácido cisteína por lo cual se encuentra bajo una fuerte selección purificadora contra la presencia de este aminoácido.

## *Mutación y evolución del gen *cox-1* durante la ontogenia de *A. cheradophilus* en el campo y en cautiverio*

### Extracción del ADN y amplificación del gen *cox-1*

Se utilizaron los mismos ADN extraídos anteriormente (Tabla 18) (números de catálogo en el Apéndice 2).

Al igual que en *A. charrua*, un fragmento de aproximadamente 640 pb se amplificó en 42 individuos de *A. cheradophilus* colectados en la naturaleza y en 35 obtenidos en cautiverio (Tabla 25).

Tabla 25. Número de individuos de *A. cheradophilus* en los cuales se amplificó el gen *cox-1*.

	CAMPO (2011)	CAMPO (2012)	Progenie (2012)	Progenie (2013)
Juveniles	3	7	6	9
Adultos	4	13	5	-
Seniles	13	2	8	7
Total	20	22	19	16

Las 78 secuencias nucleotídicas amplificadas también fueron analizadas mediante el programa BLASTn para comprobar su homología con el gen mitocondrial *cox-1* aislado en otras especies.

### Polimorfismo poblacional en el gen *cox-1* durante la ontogenia de *A. cheradophilus* en la naturaleza y en cautiverio

Siguiendo los mismos criterios empleados en los análisis del gen *cyt-b* descritos anteriormente, se determinó el nivel de polimorfismo para el gen *cox-1* en las poblaciones de *A. cheradophilus* colectadas en el campo y en las dos progenies obtenidas en el laboratorio. Las poblaciones colectadas en 2011 en diferentes charcos temporales ubicados en la localidad de “La Charqueada” (Departamento de Treinta y Tres), se analizaron independientemente. Mediante un análisis pareado de todas las secuencias parciales amplificadas, se determinó el número de cambios nucleotídicos presente en cada uno de los individuos analizados. Si bien no se encontró un elevado nivel de

polimorfismo (como en las secuencias del gen *cyt-b*), el bajo número de individuos analizados y los pocos cambios nucleotídicos hallados no permitieron presentar los resultados gráficamente.

En el análisis pareado de las 8 secuencias parciales del gen *cox-1* amplificadas en los individuos de *A. cheradophilus* provenientes del charco ubicado sobre la Ruta 91, se observa la presencia de 3 cambios nucleotídicos presentes solamente en algunos individuos seniles (Figura 22).

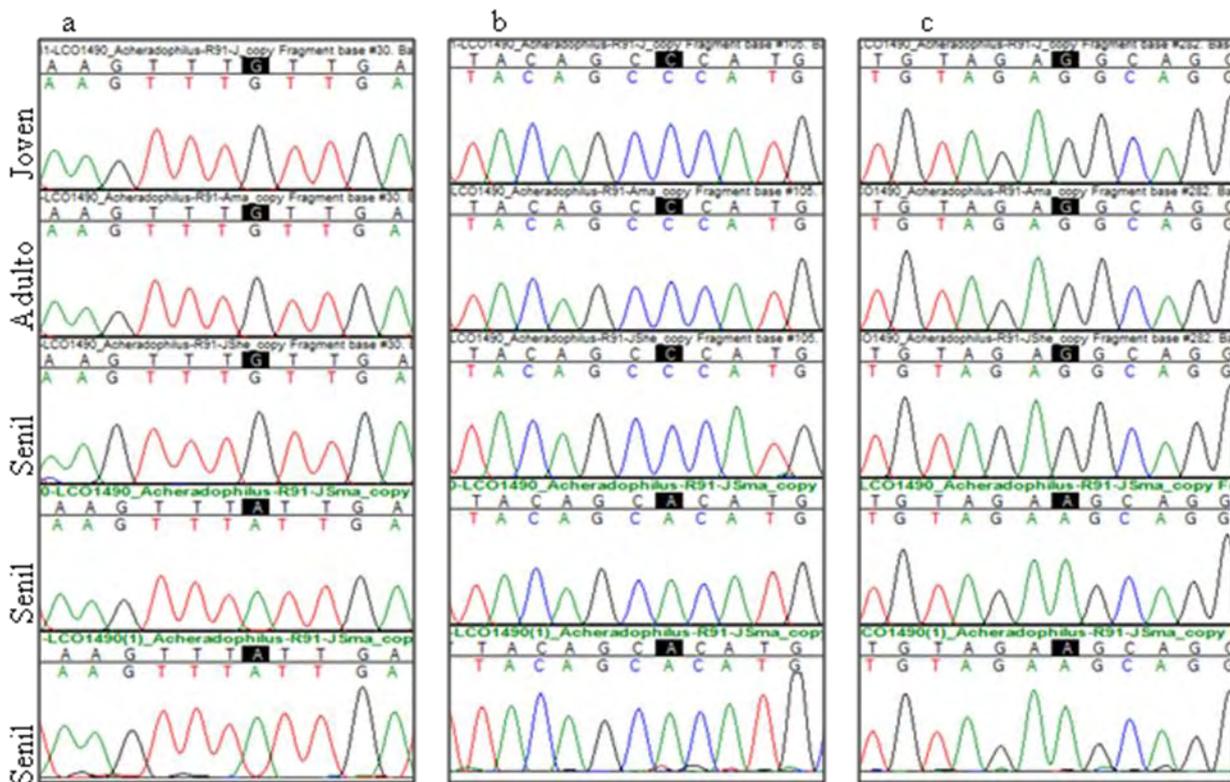


Figura 22. Alineamiento en el programa Sequencher 4.10.1 de los cromatogramas de las secuencias *cox-1* obtenidas en 1 individuo joven, 1 adulto y 3 seniles provenientes de la Ruta 91. a) Transición (G/A) en la posición 30. b) Transversión (C/A) en la posición 105. c) Transición (G/A) en la posición 282 de la región amplificada.

Las 3 sustituciones nucleotídicas encontradas son sinónimas y corresponden a una transición (G/A) en la posición 30, a una transversión (C/A) en la posición 105 y a otra transición (G/A) en la posición 282 de la región amplificada. Los 3 sitios variables están presentes en 2 de los 3 individuos seniles y no en los individuos más jóvenes. Por lo tanto, podrían estar asociadas al proceso de envejecimiento de los individuos, pero al no estar presentes en el otro individuo senil también podrían corresponder a la existencia de polimorfismo poblacional.

Los individuos de *A. cheradophilus* capturados en un charco ubicado sobre el camino al Arrozal 33 fueron colectados como adultos y algunos de ellos fueron mantenidos en cautiverio hasta su estadio senil. El análisis pareado de estas 7 secuencias parciales del gen *cox-1* aisladas en estos ejemplares reveló la presencia de 3 cambios nucleotídicos presentes solamente en algunos individuos seniles (Figura 23).

En la región amplificada del gen *cox-1* se identificaron únicamente 3 transiciones (T/C, C/T y G/A) sinónimas en los sitios variables 114, 255 y 288 respectivamente. Dos de ellas (en las posiciones 114 y 255) están presentes en 4 de los 5 individuos seniles, mientras que la sustitución detectada en la posición 288 está presente en todos los ejemplares viejos. Por lo tanto, esta última podría ser consecuencia del envejecimiento de los individuos, pero las 2 primeras también podrían deberse al polimorfismo poblacional.

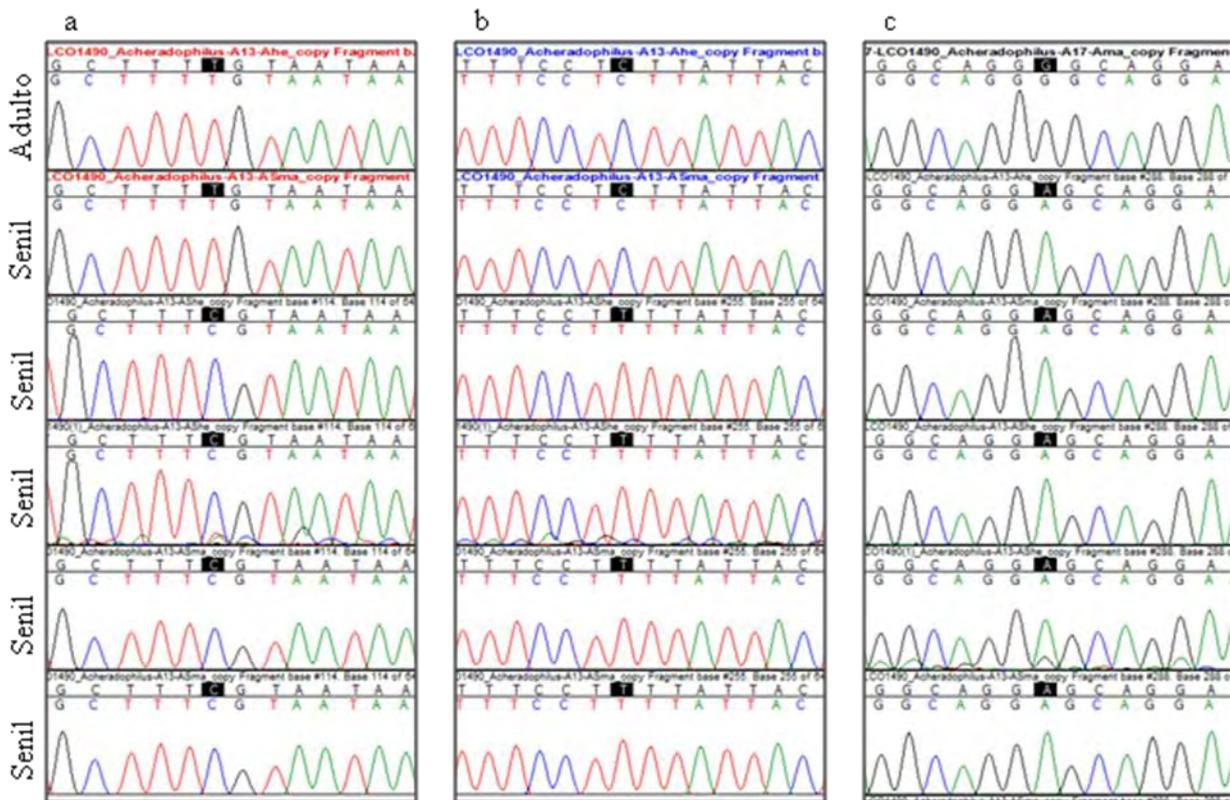


Figura 23. Alineamiento en el programa Sequencher 4.10.1 de los cromatogramas de las secuencias *cox-1* obtenidas en 1 individuo adulto y 5 seniles provenientes del camino al Arrozal 33. a) Transición (T/C) en la posición 114. b) Transición (C/T) en la posición 255. c) Transición (G/A) en la posición 288 de la región amplificada.

Por último, en la Zona de contacto se capturó 1 individuo juvenil, 2 adultos (que se mantuvieron en cautiverio hasta casi el final de su ciclo de vida) y 2 seniles. El análisis de las secuencias parciales *cox-1* amplificadas en estos individuos reveló la presencia de 2 cambios nucleotídicos presentes solamente en algunos individuos seniles (Figura 24).

En la región del gen *cox-1* amplificada en los individuos colectados en la Zona de Contacto, se encontraron 2 transiciones (C/T y G/A) sinónimas en los sitios nucleotídicos 60 y 288 respectivamente. Las 2 sustituciones nucleotídicas que se observan en la Figura 24, están presentes en 2 individuos seniles diferentes. Por lo tanto, en esta población no se encontraron cambios

nucleotídicos asociados al envejecimiento de los individuos ya que las transiciones encontradas podrían deberse al polimorfismo poblacional.

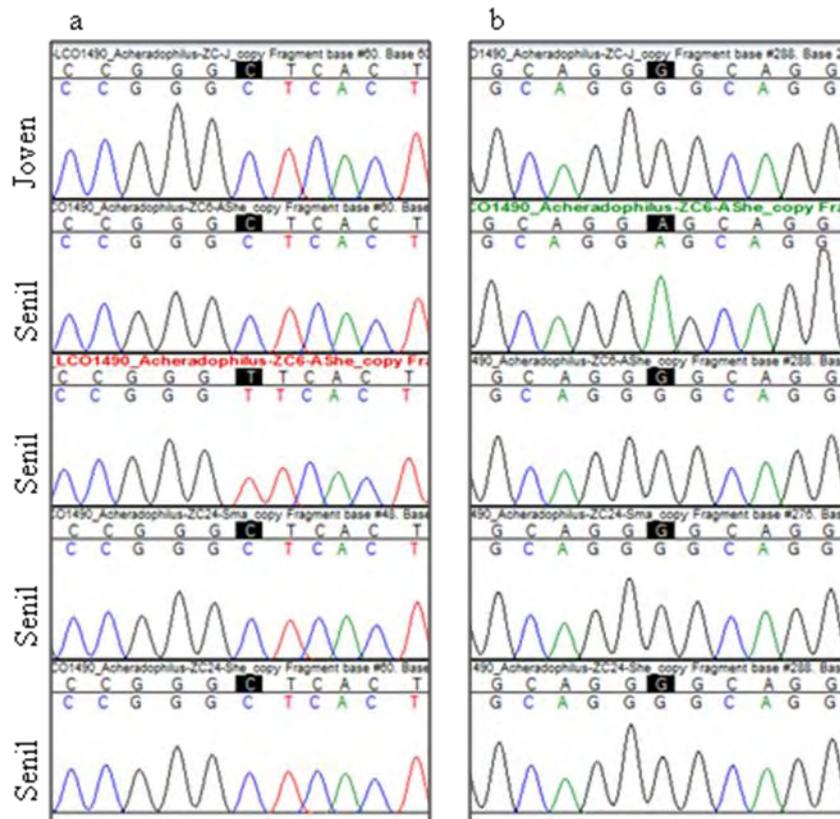


Figura 24. Alineamiento en el programa Sequencher 4.10.1 de los cromatogramas de las secuencias *cox-1* obtenidas en 1 individuo juvenil y 4 seniles provenientes de la Zona de contacto. a) Transición (C/T) en la posición 60. b) Transición (G/A) en la posición 288.

El análisis de las 22 secuencias parciales del gen *cox-1* aisladas en los individuos de *A. cheradophilus* capturados en 2012 en la localidad de “Barra Grande”, mostró que esta región del gen está bastante conservada en esta población. Se encontró 1 individuo joven (GP2880) con muchos nucleótidos diferentes respecto a los demás individuos analizados. También, se encontró 1 sola transición (C/T) sinónima en la posición 390 presente en individuos de los 3 estadios ontogenéticos analizados (Figura 25).

Los resultados obtenidos para la población capturada en 2012 en el charco ubicado sobre la Ruta 9 (Departamento de Rocha) coinciden con los obtenidos en las otras poblaciones naturales capturadas el año anterior en la localidad de “La Charqueada” (Departamento de Treinta y Tres). Con excepción del individuo joven con una elevada tasa de polimorfismo en su secuencia parcial del gen *cox-1*, las secuencias nucleotídicas de los demás individuos analizados fueron idénticas.

Estos resultados sugieren que esta región del gen *cox-1* amplificada en las poblaciones naturales de *A. cheradophilus* está mucho más conservada que el gen *cyt-b* amplificado en los mismos

individuos. Presenta principalmente sustituciones nucleotídicas de tipo **transiciones** que están presentes desde etapas tempranas del ciclo de vida. Así mismo, no se observó un notorio aumento de las sustituciones nucleotídicas durante el envejecimiento de *A. cheradophilus* transcurrido en la naturaleza.

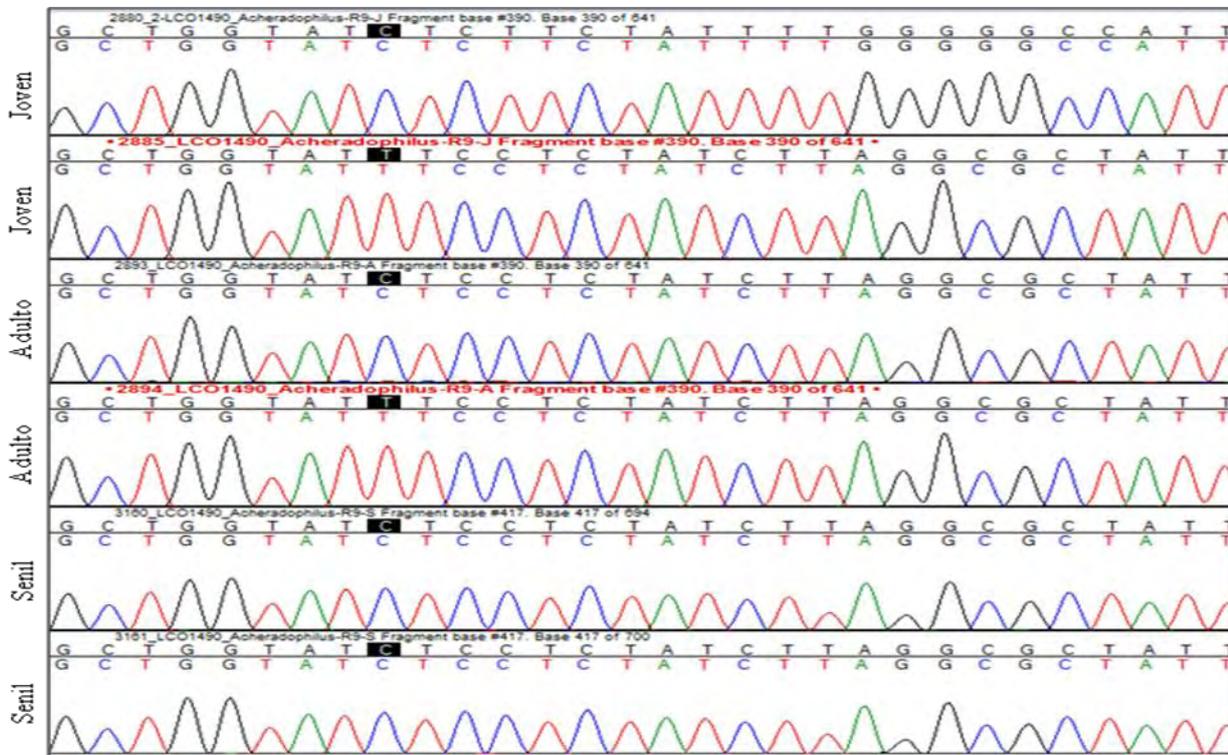


Figura 25. Alineamiento en el programa Sequencher 4.10.1 de los cromatogramas de las secuencias *cox-1* obtenidas en 2 ejemplares jóvenes, 2 adultos y 2 seniles capturados en la Ruta 9 en 2012. En negrita se resalta el nucleótido diferente presente en la posición 390 de la región amplificada.

Por otro lado, el análisis de los sitios variables en las secuencias parciales del gen *cox-1* amplificado en las 2 progenies de *A. cheradophilus* obtenidas en cautiverio, reveló un alto nivel de conservación en estas secuencias nucleotídicas. Todas las secuencias *cox-1* amplificadas en la progenie de 2012 fueron idénticas entre sí. En la progenie de 2013, solamente el individuo senil GP3762 presenta una transición no-sinónima en las posiciones 626 y 627.

Estos resultados sugieren un elevado grado de conservación de la secuencia nucleotídica del gen *cox-1* durante el envejecimiento de hermanos totales de *A. cheradophilus* obtenidos y mantenidos en cautiverio.

Niveles de divergencia y patrones de sustitución en el gen *cox-1* durante la ontogenia de *A. cheradophilus* en la naturaleza y en cautiverio

Al igual que lo realizado en *A. charrua*, las secuencias nucleotídicas parciales del gen *cox-1* amplificadas en todos los individuos de *A. cheradophilus* analizados, se alinearon con el programa ClustalW implementado en el MEGA6 (Tamura et al. 2013) y se determinaron los niveles de divergencia para cada etapa ontogenética (juvenil, adulto y senil) por separado (Tablas 26 y 27).

El análisis de todas las poblaciones naturales de *A. cheradophilus* colectadas en 2011 y 2012 sugiere que la selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) estaría actuando sobre el fragmento del gen mitocondrial *cox-1* amplificado en estos individuos (Tabla 26). En todos los estadíos analizados la divergencia nucleotídica no-sinónima ( $Ka$ ) fue igual a cero. Los valores obtenidos para el sesgo en el uso de codones (CBI  $\sim 0,500$ ) sugieren que en todas las poblaciones naturales analizadas, la selección está menos relajada en el uso de codones sinónimos en esta región del gen.

Los mismos análisis realizados para las generaciones de campo, se llevaron a cabo para las secuencias *cox-1* aisladas de los individuos de *A. cheradophilus* obtenidos en cautiverio (Tabla 27). Como se menciona anteriormente, las secuencias *cox-1* amplificadas en los individuos de la progenie nacida en 2012 son idénticas entre sí, por lo cual no existe ningún tipo de sustituciones en este fragmento ( $Ka=0$  y  $Ks=0$ ). Al igual que lo observado en la población natural colectada en la Ruta 91 de la cual provienen los parentales de esta progenie, la selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) podría estar actuando en esta región del gen *cox-1*. Por último, las secuencias *cox-1* de la progenie obtenida en 2013 a partir de parentales colectados en un charco de la Ruta 9, también presentan una relación  $Ka/Ks < 1$ . La relación  $Ka/Ks=0,331$  obtenida para los individuos seniles de esta progenie se debe a los cambios nucleotídicos presentes en el ejemplar GP3762. En ambas progenies, la selección purificadora estaría actuando sobre este fragmento del gen *cox-1* donde la selección está menos relajada en el uso de codones sinónimos (CBI  $\sim 0,500$ ).

Tabla 26. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen *cox-1* amplificadas en los individuos de *A. cheradophilus* colectados en la naturaleza.

<i>A. cheradophilus</i>		Número de individuos totales analizados	C	V	Pi	Relación Ka/Ks	CBI
CAMPO 2011 (Ruta 91)	Juveniles	2	639	1	0	0,000	0,529
	Adultos	2	640	1	0	0,000	0,529
	Seniles	4	638	3	2	0,000	0,538
CAMPO 2011 (Camino al Arrozal 33)	Juveniles	0	-	-	-	-	-
	Adultos	2	639	2	0	0,000	0,529
	Seniles	5	639	2	0	0,000	0,521
CAMPO 2011 (Zona de contacto)	Juveniles	1	-	-	-	-	-
	Adultos	0	-	-	-	-	-
	Seniles	4	638	2	0	0,000	0,525
CAMPO 2012 (Barra Grande)	Juveniles	7	559	82	1	0,007	0,511
	Adultos	13	640	1	1	0,000	0,515
	Seniles	2	641	0	0	0,000	0,512

C: sitios invariables

V: sitios variables

Pi: sitios filogenéticamente informativos (contienen al menos dos nucleótidos diferentes, y al menos dos de ellos se producen con una frecuencia mínima de dos)

(-): no se pudo calcular la relación Ka/Ks por la falta de individuos o Ks=0.

Tabla 27. Análisis de polimorfismos y divergencia nucleotídica de las secuencias del gen *cox-1* amplificadas en los individuos de *A. cheradophilus* obtenidos en cautiverio.

<i>A. cheradophilus</i>		Número de individuos totales analizados	C	V	Pi	Relación Ka/Ks	CBI
F1 / 2011 (2012)	Juveniles	6	641	0	0	0,000	0,529
	Adultos	5	641	0	0	0,000	0,528
	Seniles	8	641	0	0	0,000	0,528
F1 / 2012 (2013)	Juveniles	9	641	0	0	0,000	0,509
	Adultos	-	-	-	-	-	-
	Seniles	7	639	2	0	0,331	0,511

C: sitios invariables

V: sitios variables

Pi: sitios filogenéticamente informativos (contienen al menos dos nucleótidos diferentes, y al menos dos de ellos se producen con una frecuencia mínima de dos)

(-): no se pudo calcular la relación Ka/Ks por la falta de individuos o Ks=0.

### Codificación del aminoácido cisteína en el fragmento del gen *cox-1* amplificado en *A. cheradophilus*

Al igual que lo observado en la especie *A. charrua*, el análisis de las secuencias nucleotídicas traducidas, mostró que la región del gen *cox-1* amplificada en todos los individuos de *A. cheradophilus* analizados, tanto de campo como de cautiverio, no codifica el aminoácido cisteína por lo cual se encuentra bajo una fuerte selección purificadora contra la presencia de este aminoácido.

### *Tasas de mutación estimadas para los genes mitocondriales *cyt-b* y *cox-1**

Las “tasas de mutación por año” del gen mitocondrial *cyt-b*, obtenidas para cada población colectada en el campo y para cada generación obtenida en cautiverio (pedigrí) se muestran en la Tabla 28. La tasa de mutación promedio obtenida para el gen *cyt-b* en las poblaciones naturales de *A. charrua* fue de  $5,17 \times 10^{-4}$  y de  $2,76 \times 10^{-3}$  en las poblaciones de *A. cheradophilus*. Tasas de mutación similares se obtuvieron para este gen en las progenies de laboratorio. El valor cero obtenido en la progenie de 2013 de *A. charrua* se debe a que este set de secuencias no presentó sitios variables, como se comentó anteriormente.

Tabla 28. Tasas de mutación estimadas para el gen *cyt-b* en poblaciones naturales y progenies de laboratorio de *A. charrua* y *A. cheradophilus*

	<i>A. charrua</i>	<i>A. cheradophilus</i>
Campo 2011	$8,40 \times 10^{-4}$	$6,62 \times 10^{-4}$
Campo 2012	$1,95 \times 10^{-4}$	$4,86 \times 10^{-3}$
Progenie 2012	$3,43 \times 10^{-4}$	$2,88 \times 10^{-4}$
Progenie 2013	0,00	$2,90 \times 10^{-3}$

Por otro lado, las tasas de mutación del gen mitocondrial *cox-1*, obtenidas para cada población colectada en el campo y para cada progenie obtenida en cautiverio se muestran en la Tabla 29. La tasa de mutación promedio calculada para el gen *cox-1* aislado en las poblaciones naturales de *A. charrua* fue de  $8,93 \times 10^{-5}$ , mientras que en las poblaciones de *A. cheradophilus* fue de  $3,08 \times 10^{-4}$ . En las progenies de las dos especies, las tasas de mutación promedio estimadas para este gen son del

orden de  $10^{-4}$ . Al igual que para el gen *cyt-b*, los valores obtenidos iguales a cero corresponden a que las secuencias amplificadas fueron idénticas.

Tabla 29. Tasas de mutación estimadas para el gen *cox-1* en poblaciones naturales y progenies de laboratorio de *A. charrua* y *A. cheradophilus*.

	<i>A. charrua</i>	<i>A. cheradophilus</i>
Campo 2011	$5,11 \times 10^{-5}$	$5,46 \times 10^{-4}$
Campo 2012	$1,27 \times 10^{-4}$	$7,09 \times 10^{-5}$
Progenie 2012	$4,13 \times 10^{-4}$	0,00
Progenie 2013	0,00	$1,95 \times 10^{-4}$

### *Proteínas nucleares vinculadas al envejecimiento animal en A. charrua*

Con la secuenciación de 1/8 de región del genoma de *A. charrua* se obtuvieron 134.390 “reads” (o secuencias nucleotídicas) con un total de 47.614.338 pb. La longitud promedio de cada “read” fue de 354,3 nucleótidos. La búsqueda de secuencias homólogas a estos “reads” en el genoma de *Danio rerio* reveló que en esta porción del genoma de *A. charrua* existen muchos genes con función conocida en otros vertebrados.

Por otro lado, en el genoma de *D. rerio* identificamos 140 proteínas homólogas a las 144 que están vinculadas al envejecimiento de *Mus musculus* y dentro de ellas se encontraron 26 presentes en los “reads” obtenidos por secuenciación masiva parcial en *A. charrua* (ver apéndice 3).

Los análisis filogenéticos de unión de vecinos (Neighbor-joining) usando el modelo de sustitución nucleotídica distancia-p, realizados para las tres proteínas seleccionadas (IGF-1, Adcy5 y p53) (Figura 26) revelaron un elevado grado de relacionamiento de las secuencias de *A. charrua* con las de otros peces teleósteos.

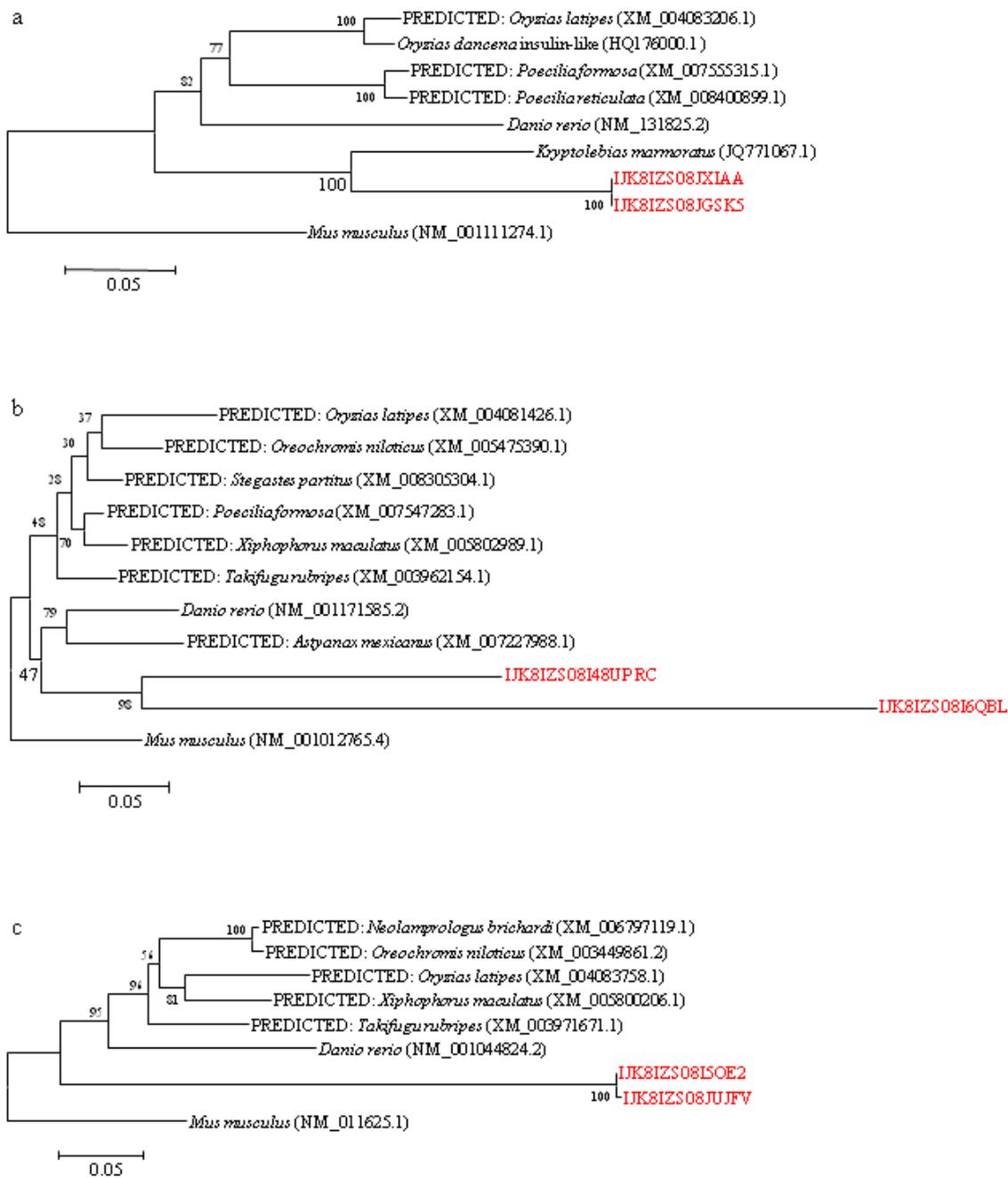


Figura 26. Análisis filogenético de unión de vecinos (Neighbor-joining) bajo el modelo de sustitución nucleotídica distancia-p para 3 proteínas nucleares aisladas en el genoma de *A. charrua*. a) IGF-1, b) Adcy5 y c) p53. Los soportes de los nodos fueron calculados mediante un análisis de Bootstrap (1000 réplicas). Como grupo externo se usó la secuencia de *Mus musculus*. Entre paréntesis se encuentra el número de acceso de las secuencias obtenidas del Genbank y en rojo están señalados los “reads” de *A. charrua* obtenidos de la secuenciación masiva.

Los “reads” aislados en el genoma total de *A. charrua*, presentan una elevada homología y están filogenéticamente relacionados con las secuencias nucleotídicas de la proteína IGF-1 amplificadas en otros peces teleósteos y principalmente con *K. marmoratus* (100% de soporte del nodo) otro género de la familia Rivulidae al igual que *Austrolebias* (Figura 26a).

Por otro lado, si bien no presentan un soporte estadístico robusto en el nodo, se puede inferir que los “reads” aislados en *A. charrua* homólogos a las secuencias de la proteína Adcy5 y p53 están filogenéticamente relacionados a estas secuencias amplificadas en otros peces teleósteos (Figura 26b y c).

Por lo tanto, teniendo en cuenta el grado de homología y el relacionamiento filogenético entre los “reads” aislados en el genoma total de *A. charrua* y las secuencias homólogas aisladas en otros peces teleósteos, se podrán diseñar juegos de oligonucleótidos específicos para amplificar las secuencias codificantes de las proteínas nucleares IGF-1, Adcy5 y p53 en el genoma de *A. charrua* y otras especies de *Austrolebias*. Considerando que generalmente el genoma nuclear presenta múltiples copias de estas secuencias codificantes, la estrategia planteada permitirá amplificar una única copia, sobre la cual se podrán analizar los patrones de sustitución nucleotídica y de selección en estos genes nucleares durante la ontogenia de estas especies.

*Actividad de la telomerasa durante la ontogenia de A. charrua*

Se determinó la actividad de la enzima telomerasa en el hígado de hembras jóvenes, adultas y seniles de *A. charrua* capturadas en la naturaleza y obtenidas en cautiverio en 2012.

Concentración de proteínas totales en la muestra

En la Tabla 30 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación proteica en cada una de las muestras analizadas.

Tabla 30. Concentración de proteínas totales en las hembras de *A. charrua* analizadas.

		Número de catálogo (GP)	Conc. Proteínas totales ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
CAMPO (2012)	Juveniles	2830	0,52
		2831	0,58
		2832	0,67
	Adultas	2870	2,45
		2871	1,09
		2872	2,05
	Seniles	3151	1,51
		3152	0,99
		3153	0,77
F1 / 2011 (2012)	Juveniles	2790	1,55
		2791	2,03
		2792	1,42
	Adultas	2812	2,32
		2813	2,25
		2814	2,32
	Seniles	3149	1,68

Actividad de la telomerasa en el hígado hembras de *A. charrua* colectadas en el campo

En la Figura 27 se observa la amplificación de los repetidos teloméricos en 3 hembras jóvenes, 3 adultas y 3 seniles de *A. charrua* capturadas en el charco temporal ubicado en “La Coronilla” (Departamento de Rocha) durante el 2012 (ver Apéndice 1). En el gel no se incluyeron los controles negativos y positivos de la PCR debido al número de pocillos disponibles.

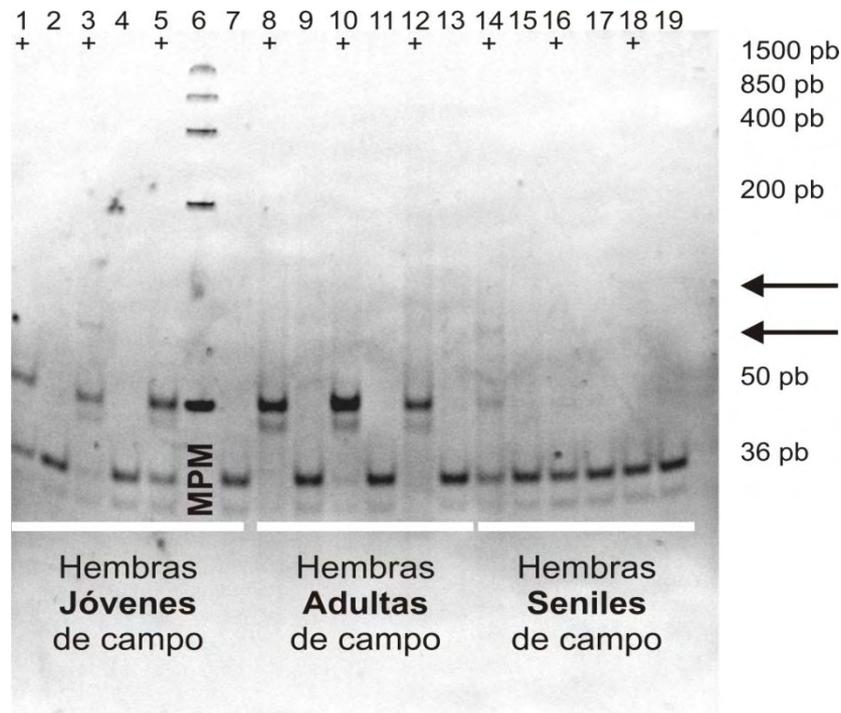


Figura 27. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio, de los extremos teloméricos amplificados con el kit comercial “TRAPEZE® Telomerase Detection Kit” en 3 hembras jóvenes (1-5 y 7), 3 adultas (8-13) y 3 seniles (14-19) colectadas en la naturaleza durante el año 2012. En los pocillos 1, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 se sembraron las muestras con la telomerasa activa (+), mientras que en los restantes pocillos se sembraron las correspondientes muestras con la telomerasa inactivada por calor. En el pocillo 6 se sembró el marcador de peso molecular FastRuler™ Low Range DNA Ladder (FERMENTAS). La banda de 36pb corresponde al control interno del kit.

En las hembras jóvenes (pocillos: 1, 3 y 5) la enzima telomerasa se encuentra activa ya que el patrón de bandas observado se corresponde con el esperado según las indicaciones del kit. Se observa una banda intensa de aproximadamente 50pb y otras más tenues de tamaños un poco mayores. En los pocillos 2, 4 y 7 (que corresponden a las muestras 1, 3 y 5 respectivamente pero inactivadas por calor) solamente se observa la banda de 36pb del control interno, lo que prueba que la telomerasa permaneció inactivada luego del tratamiento con calor.

Los mismos resultados se observaron en las 3 hembras adultas. La telomerasa también está activa en este estadio ontogenético. En los pocillos 8, 10 y 12 también se observa la banda intensa de

aproximadamente 50pb y otras más tenues de mayor tamaño. En los pocillos correspondientes a las muestras adultas con la telomerasa inactivada (pocillos: 9, 11 y 13) solamente se observa la banda de 36pb correspondiente al control interno.

Finalmente, la enzima telomerasa también está débilmente activa en una de las hembras seniles (pocillo 14). Si bien la intensidad de la banda de aproximadamente 50pb no es tan intensa como en las juveniles y adultas, igual puede observarse el patrón de bandas esperado. En el pocillo 15, correspondiente a la muestra sembrada en el pocillo 14, pero con la telomerasa previamente inactivada por calor, solamente se observa la banda de 36pb del control interno. En las hembras seniles sembradas en los pocillos 16 y 18 solamente se observa la banda de 36pb. La ausencia del patrón de bandas esperado indica que la telomerasa no está activa en estas muestras. Esto puede deberse a la pérdida de actividad de la enzima como consecuencia del envejecimiento del individuo. Alternativamente, la explicación más plausible para este resultado podría ser que la molécula de ARN asociada a la enzima, que usa uno de los cebadores del kit como molde para desencadenar la reacción, sea muy lábil y se haya degradado debido a que estos hígados de los individuos seniles fueron conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Si bien no se amplificaron los repetidos teloméricos en algunas hembras seniles, estos resultados sugieren que la actividad de la telomerasa no decae durante el envejecimiento de las hembras de *A. charrua* transcurrido en la naturaleza, ya que se ha detectado su actividad en individuos en las 3 etapas analizadas del ciclo de vida.

Actividad de la telomerasa en el hígado de hembras de *A. charrua* obtenidas en cautiverio

Los repetidos teloméricos se amplificaron en 3 hembras jóvenes, 3 adultas y 1 senil de *A. charrua* nacidas y mantenidas en cautiverio durante el 2012 (Figura 28) (ver Apéndice 1). Al igual que en el gel de las muestras de campo, en éste tampoco se incluyeron los controles negativos y positivos de la PCR debido al número de pocillos disponibles.

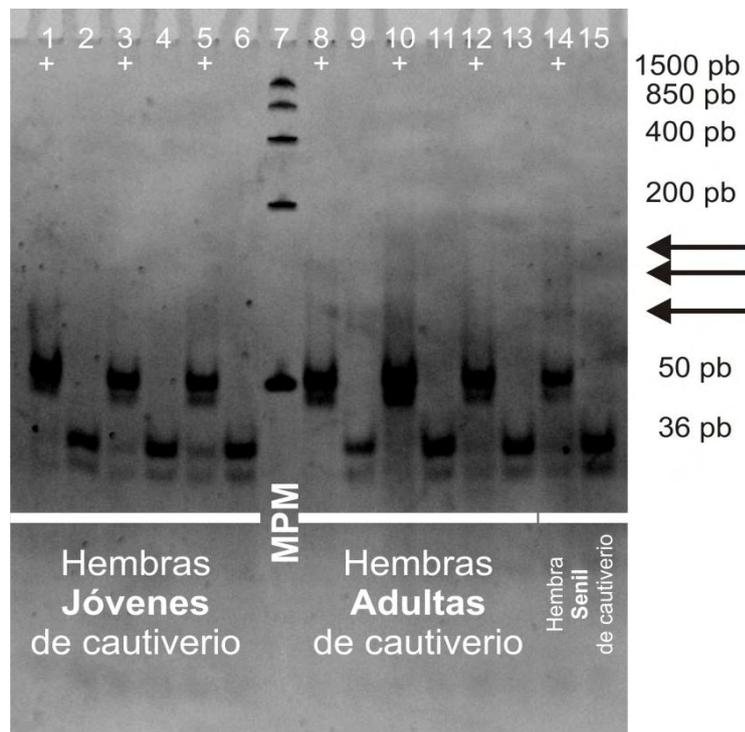


Figura 28. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio, de los extremos teloméricos amplificados con el kit comercial “TRAPEZE® Telomerase Detection Kit” en 3 hembras jóvenes (1-6), 3 adultas (8-13) y 1 senil (14-15) obtenidas en cautiverio durante el año 2012. En los pocillos 1, 3, 5, 8, 10, 12 y 14 se sembraron las muestras con la telomerasa activa (+), mientras que en los restantes pocillos se sembraron las correspondientes muestras con la telomerasa inactivada por calor. En el pocillo 7 se sembró el marcador de peso molecular FastRuler™ Low Range DNA Ladder (FERMENTAS). La banda de 36pb corresponde al control interno del kit.

Los resultados obtenidos entre hermanos totales obtenidos en cautiverio concuerdan con los resultados de las muestras de campo. En las hembras jóvenes nacidas en cautiverio (pocillos: 1, 3 y 5) la enzima telomerasa se encuentra activa. Se observa la banda intensa de aproximadamente 50pb y otras más tenues con mayores tamaños. Un resultado similar se obtuvo en las hembras adultas nacidas y mantenidas en cautiverio (pocillos: 8, 10 y 12) y en la hembra senil (pocillo 14). En las 3 muestras, la banda de aproximadamente 50pb aparece muy intensa y se observan otras bandas muy tenues de tamaños más grandes. En los controles negativos para la actividad de la telomerasa de las

hembras jóvenes (pocillos 2, 4 y 6), adultas (pocillos: 9, 11 y 13) y senil (pocillo 15) solamente se observa la banda de 36pb del control interno.

Estos resultados sugieren que la actividad de la telomerasa no decae como consecuencia del envejecimiento de *A. charrua* en hembras de la progenie de laboratorio.

### *Estimación del acortamiento de los telómeros mediante la técnica de Southern-blot en A. charrua*

#### Acortamiento de los telómeros durante la ontogenia de *A. charrua* transcurrida en cautiverio en 2013

El ADN genómico extraído de muestras de músculo esquelético de machos y hembras de *A. charrua* nacidos y mantenidos en cautiverio durante el 2013 fue digerido con las enzimas de restricción Hinf-I y Rsa-I y se analizó por Southern blot utilizando como sonda un fragmento homólogo a los repetidos teloméricos de vertebrados (Figura 29). Los individuos juveniles tenían 3 meses, los adultos 5 meses y los seniles 7 meses de vida.

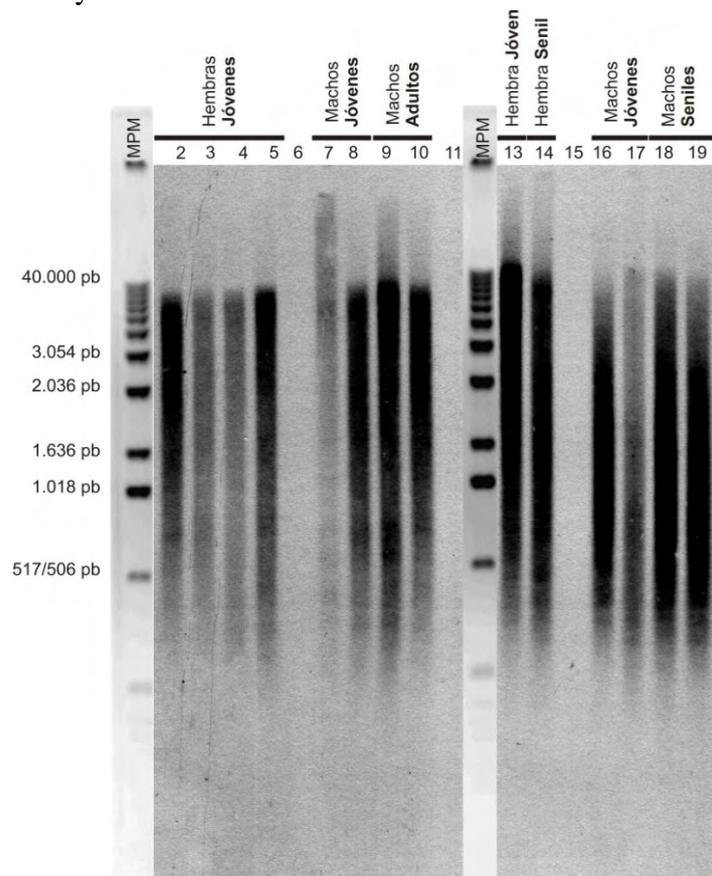


Figura 29. Análisis genómico mediante Southern blot del acortamiento de los telómeros en machos y hembras de *A. charrua* obtenidos en cautiverio durante el 2013. Pocillos 2-5: hembras jóvenes; 7-8: machos jóvenes; 9-10: machos adultos; 13: hembra joven; 14: hembra senil; 16-17: machos jóvenes; 18-19: machos seniles. MPM: marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Invitrogen). El patrón de bandas del MPM se exportó de la foto del gel de agarosa correspondiente.

Tamaño de los telómeros en las hembras juveniles:

Las primeras 4 hembras juveniles analizadas (carriles 2 al 5) presentan un patrón de hibridación de la sonda telomérica bastante similar, por lo que el tamaño de los telómeros es constante en este estadio ontogenético. Las diferencias en la intensidad observada puede deberse a diferencias en la cantidad de ADN genómico que fue transferido a la membrana o a la presencia de varios fragmentos teloméricos del mismo tamaño en las regiones de mayor intensidad.

Tamaño de los telómeros en machos juveniles vs. adultos:

El patrón de hibridación obtenido en los 2 machos jóvenes (carriles 7 y 8) no es homogéneo. El macho sembrado en el carril 7 presenta fragmentos teloméricos de mayor tamaño (>40.000pb) que el sembrado en el carril 8. En este caso las diferencias de intensidad pueden deberse a las mismas razones detalladas anteriormente. Por otro lado, el patrón observado en los 2 machos adultos (carriles 9 y 10) es similar entre ellos y la intensidad de la señal también. Al comparar los patrones de hibridación de los machos juveniles con los adultos, se observa que uno de los individuos adultos (9) presenta mayor número de fragmentos de pequeño tamaño (<517/506pb) respecto a los machos jóvenes, lo que podría estar sugiriendo un acortamiento de las regiones teloméricas.

Tamaño de los telómeros en hembra juvenil vs. senil:

El análisis de los patrones de hibridación obtenidos en la hembra joven (carril 13) y senil (carril 14) revela un resultado similar al obtenido anteriormente entre los machos jóvenes y adultos. La hembra juvenil presenta un mayor número de fragmentos teloméricos con tamaños >40.000pb, mientras que la hembra vieja presenta mayor concentración de fragmentos de tamaños pequeños (<517/506pb). Este resultado también podría estar indicando que existe un acortamiento de la región telomérica durante el envejecimiento de las hembras en cautiverio.

Tamaño de los telómeros en machos juveniles vs. seniles:

Por último, los patrones de hibridación obtenidos en 2 machos juveniles (carriles 16 y 17) y 2 seniles (carriles 18 y 19) también sugieren un leve acortamiento de los telómeros a medida que los machos envejecen en cautiverio. El individuo senil del carril 19 presenta un número mayor de fragmentos de pequeño tamaño (<517/506pb) respecto a los individuos jóvenes.

El análisis genómico de los telómeros en individuos de *A. charrua* nacidos y mantenidos en cautiverio, sugiere una posible disminución del tamaño de los extremos cromosómicos durante el envejecimiento del músculo esquelético en esta especie.

Acortamiento de los telómeros durante la ontogenia de hembras de *A. charrua* en la naturaleza y en cautiverio en 2012

El ADN genómico extraído de muestras de músculo esquelético de las hembras de *A. charrua* nacidas y mantenidas en cautiverio durante el 2012 y colectadas en el charco temporal de “La Coronilla” el mismo año, fue digerido con las enzimas de restricción Hinf-I y Rsa-I y se analizó mediante Southern blot utilizando como sonda un fragmento homólogo a los repetidos teloméricos de vertebrados (Figura 30). Los individuos juveniles obtenidos en cautiverio tenían 2,5 meses, los adultos 5 meses y los seniles 7 meses de vida.

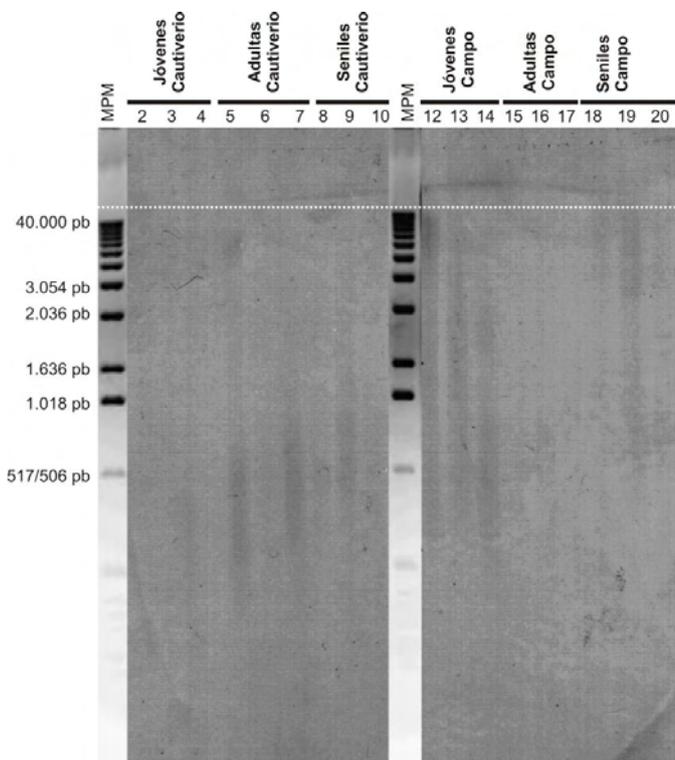


Figura 30. Análisis genómico por Southern blot del acortamiento de los telómeros en hembras de *A. charrua* obtenidos en cautiverio durante el 2012 (carriles 2-10) y colectadas en la naturaleza (carriles 12-20). Pocillos 2-4: hembras jóvenes-F1; 5-7: hembras adultas-F1; 8-10: hembras seniles-F1; 12-14: hembras jóvenes-campo; 15-17: hembras adultas-campo; 18-20: hembras seniles-campo. MPM: marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Invitrogen). El patrón de bandas del MPM se exportó de la foto del gel de agarosa correspondiente.

Al igual que lo observado en las hembras de la generación 2013 (Figura 29), se puede sugerir un acortamiento de los extremos teloméricos en las hembras obtenidas en cautiverio en 2012. Si bien la intensidad del patrón de hibridación obtenido en este análisis fue inferior al obtenido en la generación 2013, en la Figura 30 se observa un patrón de bandas de pequeño tamaño en las hembras adultas (carriles 5-7) y en algunas de las seniles (carriles 8-10). A pesar de no observar repetidos teloméricos de gran tamaño (>3.054pb) en todas las hembras adultas obtenidas en cautiverio en 2012, éstos están presentes en la hembra del carril 5 y en ninguna de las hembras seniles analizadas

se observan estos fragmentos. Por otro lado, un patrón similar se puede inferir en las hembras colectadas en el campo en 2012, aunque la intensidad de hibridación fue muy débil y no permite determinar con certeza un posible acortamiento de los telómeros en estos individuos.

## DISCUSIÓN

---

### *El genoma mitocondrial de A. charrua*

El genoma mitocondrial de *A. charrua* descrito en esta Tesis representa el primer mitogenoma completo obtenido para un pez anual de la familia Rivulidae (Cyprinodontiformes). Presenta una estructura y organización como la mayoría de los mitogenomas de vertebrados (Boore 1999) y su tamaño (17.271 pb) es similar al descrito en *Kryptolebias marmoratus* (17.329 pb) otra especie de la familia Rivulidae que no presenta un ciclo de vida anual, y un poco inferior al del pez anual africano *Nothobranchius furzeri* (19.527pb). Otros Cyprinodontiformes como *Aplocheilichthys panchax*, *Fundulus olivaceus*, *F. heteroclitus* y *Cyprinodon rubrofluviatilis* presentan ADNmt con tamaños un poco más pequeños en el orden de los 16.500pb (Setiamarga et al. 2008; Whitehead 2009).

A diferencia del genoma mitocondrial de *K. marmoratus* que presenta 2 regiones control (Figura 10) (Lee et al. 2001), el mitogenoma de *A. charrua* presenta una sola RC pero su localización entre los ARNt-Pro y ARNt-Phe (Figura 17) coincide con una de las RC de *K. marmoratus*. La presencia de 1 sola RC en el ADNmt de *A. charrua* concuerda con lo encontrado en otras especies del género Rivulidae (Lee et al. 2001). Por otro lado, el genoma mitocondrial del pez anual *N. furzeri* contiene una RC muy extensa que incluye el ARNt-Pro, una copia adicional del ARNt-Glu y dos secuencias casi idénticas (99% de identidad) que están separadas por 1075pb (Hartmann et al. 2011). Por lo tanto, actualmente la estructura y organización del ADNmt de *A. charrua* es única dentro del género Rivulidae y de los peces anuales.

El análisis del contenido de G+C en las secuencias codificantes de la hebra H, reveló que el encontrado en *A. charrua* (37%) es similar al de *N. furzeri* (39%) y un poco inferior al de *K. marmoratus* (43%). Así mismo, los valores negativos obtenidos para los sesgos de GC y AT son similares a los de las otras dos especies (Tabla 10). Por lo tanto, las secuencias codificantes del mitogenoma de *A. charrua* (a excepción de ND6 que está localizada en la hebra L) presentan un exceso de C y T, al igual que el otro pez anual *N. furzeri* y el otro Rivulidae *K. marmoratus*. Los valores de *K. marmoratus* y de *N. furzeri* se obtuvieron mediante el análisis de sus genomas mitocondriales NC\_003290 y NC\_011814 respectivamente.

Al igual que los genes codificantes de proteínas del genoma mitocondrial de *K. marmoratus*, 12 genes codificantes presentan el codon de iniciación ATG, menos el gen COI que inicia con el codón GTG (Tabla 11). Otra similitud encontrada entre ambos mitogenomas es que la mayoría de los genes presentan el codón de finalización TAA, a excepción de ND2, COII, ND3 y ND4 que presentan codones de finalización incompletos (T- o TA-). La diferencia entre ambos genomas es

que en *A. charrua* el gen ATPasa6 presenta un codón stop incompleto, mientras que en *K. marmoratus* esta característica está presente en los genes COIII y *Cyt-b* (Lee et al. 2001). Luego de la transcripción y procesamiento, los codones de terminación incompletos son convertidos a TAA mediante poliadenilación (Chang and Tong, 2012). Estas características parecen ser una tendencia en los genomas mitocondriales de peces (Miya and Nishida 1999; Miya et al. 2003).

Por otro lado también se han encontrado diferencias en la estructura y secuencia de algunos ARN de transferencia (Figura 18). En el ADNmt de *A. charrua*, el ARNt-Cys es el más corto dentro de los ARNt-Cys anotados en otros Cyprinodontiformes y no presenta el bucle en el brazo D. Se han descrito dos ejemplos de ARNt “truncados” (sin los brazos D y/o T) en el genoma mitocondrial de varios metazoarios. Ambos tipos de estructuras han sido descritas en nematodos y artrópodos, mientras que en los mamíferos solamente se han detectado ARNt sin el brazo D (Fujishima and Kanai 2014). A pesar de su estructura “truncada”, estos ARNt son funcionales y se ha demostrado cierta adaptación de los ribosomas mitocondriales para su aceptación. Sin embargo, es posible que ocurra una reducción en la eficiencia de la translación respecto a la síntesis de proteínas con ARNt “canónicos”, como se ha observado en el ADNmt bovino donde el ARNt-Ser (GCU) carece del brazo D y ocasiona una síntesis proteica sustancialmente inferior (Watanabe 2010; Wende et al. 2014).

Debido a que la estructura del ARNt-Cys de *A. charrua* fue inferido a partir del genoma mitocondrial mediante análisis bioinformático, y no se ha encontrado una estructura similar en otros peces, ni vertebrados en general, habría que corroborar su funcionalidad. Para ello se podrían implementar los criterios usados en nemátodos del género *Enoplea*, tales como a) un elevado grado de conservación entre la secuencia y la estructura secundaria dentro del género *Austrolebias*, b) una perfecta conservación del anticodón y c) la persistencia de este tipo de estructuras en diferentes reordenamientos genómicos que los ubiquen entre diferentes genes flanqueantes (Jühling et al. 2012).

## *Evolución de las secuencias codificantes mitocondriales durante el envejecimiento de hermanos totales de A. charrua*

Hasta el presente, no existen estudios sobre la acumulación de cambios en genes mitocondriales durante la ontogenia de otras especies, tanto a nivel poblacional como entre hermanos totales. Considerando que la ocurrencia de deleciones en el ADNmt es una característica del envejecimiento debido que se acumulan con la edad en diversos organismos (Melov et al. 1995; Yui et al. 2003; Schon et al. 2012), realizamos un diseño de secuenciación masiva del ADNmt de hermanos totales a fin de determinar la acumulación de cambios nucleotídicos en las secuencias codificantes de genes a medida que esta especie envejece en cautiverio. Observamos que estas secuencias mitocondriales no están totalmente conservadas en la ontogenia, ya que los patrones de sustitución difieren entre los 3 estadios ontogenéticos analizados (Tabla 12). Se encontraron más cambios nucleotídicos en los individuos juveniles de *A. charrua*, y solamente en las secuencias codificantes COI, ND3, ND5 y Cyt b. Dentro de las secuencias codificantes de las subunidades del complejo *NADH deshidrogenasa*, las subunidades ND3 y ND5 son las más variables. Las sustituciones encontradas son todas transiciones y solamente una de ellas (en ND5) es no-sinónima cambiando el aminoácido serina a una prolina. Al igual que lo observado en *N. furzeri* (Hartmann et al. 2011) en el músculo esquelético de *A. charrua* tampoco se encontró evidencia de deleciones en la secuencia ND4, durante el envejecimiento. La secuencia COI es la más conservada. Solamente se detectó una transversión no-sinónima (Ile → Met). Estos resultados concuerdan con lo observado en peces del género *Fundulus* (Whitehead 2009) y hasta en mamíferos (Stewart et al. 2008) donde se ha observado que las secuencias de las subunidades de la *NADH deshidrogenasa* evolucionan relativamente rápido, mientras que los genes codificantes de las subunidades de la *citocromo oxidasa* lo hacen relativamente lento. La transición encontrada en el gen *Cyt-b* está presente en todos los individuos analizados y genera un cambio de aminoácido (Phe → Leu). En humanos, muchas enfermedades y síndromes están ligados a mutaciones en el ADNmt, pero ninguna de las sustituciones encontradas en el mitogenoma de *A. charrua* coinciden con las reportadas hasta el presente (Tuppen et al., 2010).

A diferencia de lo observado en otros organismos tales como ratón y *D. melanogaster* (Vermulst et al., 2007; Itsara et al., 2014), en el músculo esquelético de *A. charrua* la mayoría de las sustituciones nucleotídicas en las secuencias mitocondriales codificantes, ocurren en los individuos más jóvenes. En la especie *A. viarius* se ha demostrado que los individuos de 2 semanas de vida presentan la tasa metabólica más alta y que ésta va disminuyendo a lo largo del ciclo de vida (Cardozo, 1999). Si bien no se han determinado las tasas metabólicas en *A. charrua*, esta especie presenta un tamaño similar a *A. viarius* (Costa, 2006) por lo que su tasa metabólica podría ser

similar. Por lo tanto, y considerando que la tasa metabólica es una de las variables que pueden afectar las tasas de sustitución nucleotídica (Martin and Palumbi, 1993), una elevada tasa metabólica en etapas tempranas del ciclo de vida de *A. charrua* podría ser la responsable del elevado número de sustituciones nucleotídicas encontrado en los individuos jóvenes de esta especie.

### *Divergencia del gen cyt-b durante el envejecimiento de Austrolebias en la naturaleza*

A la fecha, no existen estudios sobre la acumulación de cambios durante la ontogenia en el gen mitocondrial *cyt-b* en otras especies, tanto a nivel poblacional como entre hermanos totales. Por esto, esta Tesis representa el primer intento de testear la hipótesis de acumulación de daños mutacionales en el genoma mitocondrial ligados a los procesos de envejecimiento en un diseño experimental comparando poblaciones naturales y en cautiverio de la misma especie. Teniendo en cuenta lo discutido en el punto anterior, este análisis se llevó a cabo en dos especies de *Austrolebias* que presentan tamaños corporales sustancialmente diferentes. *Austrolebias charrua* es una especie de tamaño medio (3-4cm) mientras que *A. cheradophilus* puede alcanzar tamaños entre 4-6cm aproximadamente y hasta hace unos años formaba parte del clado filogenético de las *Megalebias* (Costa, 2006).

En las dos poblaciones naturales de *A. charrua* analizadas, los patrones de sustitución nucleotídicos observados fueron bastante similares (Figura 19a y b). En ambas poblaciones, los sitios nucleotídicos 528, 702 y 730 de la región del gen *cyt-b* amplificada, son variables en los 3 estadios ontogénicos analizados, y dos de ellos (702 y 730) son transversiones no-sinónimas. Este patrón de sustitución ( $T_s < T_v$ ) se encontró en todos los sitios variables detectados. Estos resultados no concuerdan con lo reportado previamente para el gen *cyt-b* en otras especies de *Austrolebias*, donde el análisis del gen aislado en diferentes especies del género reveló una tasa  $T_v:T_s = 1:3$  (García et al., 2000). Si bien resulta llamativo la prevalencia de las transversiones en nuestro set de datos, los análisis de divergencia nucleotídica (Tabla 16) revelaron que este gen se encuentra bajo selección purificadora ( $K_a/K_s < 1$ ) que sería responsable de eliminar los polimorfismos aminoacídicos que pudieran causar una disminución o eliminación de la proteína involucrada. Por otro lado, en la población capturada en 2011 se observó un aumento del número de sitios nucleotídicos variables en los individuos adultos y seniles respecto a los juveniles. La presencia de cambios nucleotídicos en individuos de mayor edad podría estar relacionada al envejecimiento, pero no se puede descartar la posibilidad de que se deban a la heteroplasmia presente dentro del tejido (St John, 2014) o ser consecuencia del medioambiente donde la selección natural ha favorecido la variación del genoma mitocondrial como respuesta adaptativa a los desafíos fisiológicos impuestos por la vida en un ambiente marino (Whitehead, 2009). Como se ha descrito en otras especies de *Austrolebias*, para

asegurar su supervivencia estos peces requieren adaptarse a condiciones ambientales muy variables tales como la sequía, los bajos niveles de oxígeno y las amplias fluctuaciones de temperatura (Liu and Walford, 1966; Liu et al., 1975; Errea and Danulat, 2001). La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el desarrollo temprano de los peces y se ha demostrado que este factor influye en la reproducción (Arenzon et al., 2002), la duración del desarrollo embrionario (Arezo et al., 2007), el crecimiento (Walford and Liu, 1965; Liu et al., 1975; Errea and Danulat, 2001; Volcan et al., 2012) y la longevidad (Liu and Walford, 1966; Liu et al., 1975; Walford and Liu, 1965) de peces de la familia Rivulidae.

Por otro lado, no se ha encontrado evidencia sobre la vinculación de estos sitios variables con alguna patología descrita en humanos (Tuppen et al. 2010) por lo que es altamente probable que sean eliminados por la selección purificadora que estaría actuando en esta región del gen *cyt-b*.

A diferencia del patrón de sustitución observado durante el envejecimiento de *A. charrua* en la naturaleza, en todas las poblaciones naturales de *A. cheradophilus* analizadas (especie de mayor tamaño corporal) las transiciones predominaron sobre las transversiones. En las poblaciones colectadas en 2011 en la localidad de “La Charqueada” (Departamento de Treinta y Tres) todas las sustituciones nucleotídicas fueron sinónimas sugiriendo que una fuerte selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) está actuando en esta región del gen *cyt-b* en contra de aminoácidos polimórficos que afecten la funcionalidad de esta proteína (Tabla 20). Por otro lado, en la población capturada en 2012 en la localidad de “Barra Grande” (Departamento de Rocha) se observó un mayor polimorfismo poblacional y también una prevalencia de las transiciones sobre las transversiones. En esta población, también se detectó un elevado número de sitios variables en los individuos juveniles. Como se explicó anteriormente esto podría deberse a la elevada tasa metabólica en esta etapa del ciclo de vida ya el fragmento del gen *cyt-b* aislado en estos individuos se encuentra bajo selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ). Sin embargo, contrariamente a lo estipulado acerca de la selección natural actuando sobre las proteínas mitocondriales codificantes (Bazin et al., 2006; Huang et al., 2014) en los individuos adultos y seniles se obtuvo una relación  $Ka/Ks \sim 1$  (Tabla 20), lo que estaría indicando que la selección es casi neutra en este fragmento del gen. Por lo tanto, estos resultados sugieren diferentes fuerzas selectivas actuando sobre el gen *cyt-b* en las diferentes etapas de la ontogenia de *A. cheradophilus* en este charco, estando más relajada a la presencia de sitios polimórficos en etapas avanzadas del ciclo de vida.

### *Divergencia del gen *cyt-b* durante el envejecimiento de *Austrolebias* en cautiverio*

A fin de evitar las variaciones medioambientales y el polimorfismo poblacional, analizamos los patrones de sustitución nucleotídicos en un fragmento del gen *cyt-b* durante la ontogenia de hermanos totales de *A. charrua* y *A. cheradophilus*. Los individuos analizados nacieron y fueron mantenidos en cautiverio durante todo su ciclo de vida, en acuarios con agua de clorinada, burbujeo constante, temperatura ambiente de 19°C, fotoperíodo natural y alimentación diaria.

Los resultados obtenidos para la progenie de *A. charrua* nacida en 2012, mostraron un aumento de las mutaciones durante el envejecimiento de los individuos (Figura 19c). En la región del gen *cyt-b* analizada, se encontraron cambios nucleotídicos en los individuos jóvenes y adultos, pero no en los más viejos. A pesar de no haber detectado sustituciones nucleotídicas en los individuos seniles, en los adultos si se detectaron cambios nucleotídicos que no están presentes en los juveniles. Por lo tanto, si bien los resultados obtenidos en esta progenie en cautiverio sugieren que los cambios encontrados en los individuos adultos podrían estar vinculados al envejecimiento no podemos descartar la posibilidad de que se deban a la heteroplasma presente dentro del tejido (St John, 2014). Al igual que lo observado en la población natural de la cual fueron seleccionados los parentales, en esta progenie las transversiones superan a las transiciones y el 58% de ellas ocasionan un cambio en el aminoácido resultante. Sin embargo esta región del gen se encuentra bajo selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) que estaría actuando en contra de sustituciones no-sinónimas (Tabla 17). Por otro lado, se encontraron 2 sitios variables (672 y 675) en los cuales la mayoría de los individuos (en los 3 estadíos) presentaban el mismo nucleótido presente en el genoma mitocondrial de su progenitor masculino. Teniendo en cuenta que el genoma mitocondrial se hereda por vía materna, la presencia en la progenie de estos nucleótidos comunes al genoma paterno podría sugerir que en esta especie existe herencia paterna o bien son sitios altamente variables y el azar favoreció el cambio de nucleótido.

En la progenie de *A. charrua* obtenida en 2013, no se detectaron cambios nucleotídicos durante el envejecimiento de los individuos (Figura 19d). Solamente se encontraron 3 individuos juveniles que compartían el mismo nucleótido con el genoma de su progenitor masculino en las posiciones (528 y 730). La falta de sustituciones nucleotídicas en estas secuencias podría deberse a una fuerte selección purificadora actuando sobre ellas y/o a la falta de factores medioambientales que ocasionen variaciones en el ADNmt (Whitehead, 2009). Cabe destacar que, al igual que en las poblaciones naturales analizadas, en las 2 generaciones obtenidas en cautiverio, las posiciones nucleotídicas (528 y 730) también constituyen sitios variables.

Por otro lado, el análisis de las secuencias del gen *cyt-b* amplificadas en la progenie de *A. cheradophilus* obtenida en 2012, reveló la presencia de sólo 4 sustituciones nucleotídicas distribuidas en los genomas de un individuo juvenil y dos adultos. Las secuencias nucleotídicas de los individuos seniles fueron idénticas a las de los ejemplares más jóvenes. Los cambios presentes en los adultos no están en los juveniles, y esto podría sugerir un aumento de las sustituciones a causa del envejecimiento de la especie. Sin embargo, al igual que en la progenie de *A. charrua*, también podrían ser producto de la heteroplasma presente en el tejido (St John 2014). Tres de estas sustituciones son transversiones, dos de las cuales generan un cambio en el aminoácido resultante. Al igual que en la progenie 2012 de *A. charrua*, en ésta las transversiones fueron superiores a las transiciones. Sin embargo, el análisis de la divergencia nucleotídica en los 3 estadios ontogenéticos reveló que este fragmento del gen se encuentra bajo selección purificadora (Tabla 21) y por lo tanto estaría actuando en contra de los cambios aminoacídicos que pudieran afectar la funcionalidad de la proteína.

Finalmente, la comparación de las secuencias parciales del gen *cyt-b* amplificadas en individuos juveniles y seniles de la progenie de *A. cheradophilus* obtenida en 2013, mostró que las sustituciones nucleotídicas se localizaban principalmente en un individuo joven y en uno viejo. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la progenie anterior, donde las transversiones son superiores a las transiciones y la mayoría de ellas son no-sinónimas. Sin embargo, en esta generación la relación  $Ka/Ks \sim 1$  (Tabla 21) estaría indicando que la selección actuando en esta fracción del gen es neutra y podría estar favoreciendo el aumento de sustituciones observadas en el individuo senil.

A pesar de mantener a los peces en un ambiente lo más homogéneo y constante posible, en ambas especies se observaron sustituciones nucleotídicas no-sinónimas desde etapas tempranas de su ciclo de vida, que podrían estar relacionadas al envejecimiento de la especie o bien ser consecuencia de la heteroplasma presente en el músculo esquelético de estas especies.

### *Divergencia del gen *cox-1* durante el envejecimiento de *Austrolebias* en la naturaleza*

A pesar de ser uno de los genes mitocondriales más conservados, el gen *cox-1* no se ha estudiado, hasta la fecha en especies del género *Austrolebias*. Por esto, en esta Tesis se amplificó por primera vez este gen en dos especies del género *Austrolebias* y se testeó la misma hipótesis planteada para el gen mitocondrial *cyt-b*.

Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias parciales del gen *cox-1* amplificadas en las dos poblaciones naturales de *A. charrua* revelaron la presencia de 2 sitios nucleotídicos altamente variables (105 y 144) (Figura 21a y b). Ambos cambios nucleotídicos fueron detectados en individuos en las 3 etapas del ciclo de vida, son sinónimos y corresponden a una transversión y a una transición respectivamente. Esto concuerda con los análisis de divergencia nucleotídica (Tabla 23) que revelaron que este gen se encuentra bajo selección purificadora ( $Ka/Ks < 1$ ) que sería responsable de eliminar los polimorfismos aminoacídicos que pudieran causar una disminución o eliminación de la proteína involucrada. Si bien no se observó un aumento en el número de sitios variables, el nucleótido “alternativo” está presente en más individuos adultos y seniles, respecto a los juveniles, sugiriendo una acumulación de los mismos durante el envejecimiento en la naturaleza. A pesar de que no existen otros estudios que analicen la evolución de este gen durante la ontogenia de un organismo, estos resultados concuerdan con lo descrito en *Fundulus* donde los autores encontraron que los genes de la *citocromo oxidasa* evolucionan relativamente lento y no detectaron la presencia de sustituciones aminoacídicas en las poblaciones que analizaron (Whitehead 2009).

Una tendencia similar se observó en las secuencias *cox-1* amplificadas en las poblaciones naturales de *A. cheradophilus* (Figuras 22, 23, 24 y 25). Se detectaron muy pocas sustituciones nucleotídicas y todas ellas sinónimas. Si bien algunas sustituciones presentes en los ejemplares más viejos no estaban presentes en los estadios más jóvenes, tampoco se encontraban en todos los seniles. Por lo tanto, se podría sugerir una tendencia al aumento de las mutaciones durante la ontogenia de *A. cheradophilus* en la naturaleza pero los polimorfismos detectados podrían deberse a la heteroplasmia presente en el tejido, como se ha descrito anteriormente.

### *Divergencia del gen *cox-1* durante el envejecimiento de *Austrolebias* en cautiverio*

Siguiendo los mismos criterios descritos anteriormente para el gen *cyt-b*, se evaluó un posible aumento de los sitios variables en el gen *cox-1* durante el envejecimiento de *A. charrua* y *A. cheradophilus* nacidos y mantenidos en cautiverio a lo largo de todo su ciclo de vida.

Sorpresivamente, y a diferencia de los resultados obtenidos en las poblaciones naturales, observamos un incremento del número de sitios variables durante la ontogenia de la progenie de *A.*

*charrua* obtenida en 2012 (Figura 21c). A diferencia de lo esperado y del patrón observado en el gen *cyt-b* amplificado en estos mismos individuos, en las secuencias *cox-1* se encontraron muy pocos cambios en los individuos juveniles y casi el 100% de las sustituciones se localizaban en el genoma de los ejemplares adultos y seniles. Esto podría estar indicando un incremento de los sitios variables en el ADNmt durante el envejecimiento de esta especie en cautiverio. En ambos genes las transiciones fueron inferiores a las transversiones y el 64% de las sustituciones son no-sinónimas. Teniendo en cuenta estos resultados y la relación  $Ka/Ks \sim 1$  obtenida en los individuos adultos y seniles (Tabla 24), podríamos inferir que la selección neutral estaría actuando sobre esta fracción del gen favoreciendo la presencia de aminoácidos polimórficos que podrían afectar la funcionalidad de esta proteína.

Sin embargo el patrón de sustituciones en esta fracción del gen *cox-1* amplificado en hermanos totales de *A. charrua* nacidos en 2013 (Figura 21d), fue sustancialmente diferente. En esta progenie no se detectó la presencia de sitios variables, pero sí nucleótidos comunes entre el genoma mitocondrial de algunos juveniles y el de su progenitor masculino. Al igual que lo planteado para el gen *cyt-b*, teniendo en cuenta que el genoma mitocondrial se hereda por vía materna, la presencia en la progenie de estos nucleótidos comunes al genoma paterno podría sugerir que en esta especie existe herencia paterna, o son sitios altamente variables y el azar favoreció el cambio de nucleótido o bien se deben al polimorfismo presente en el tejido (St John 2014).

El análisis de estas secuencias parciales del gen *cox-1* en las progenies de *A. cheradophilus* obtenidas en cautiverio corroboró el alto grado de conservación de este gen. Las secuencias aisladas en los tres estadios ontogenéticos fueron idénticas entre sí en la generación de 2012 y solamente se detectaron 2 sitios variables en la generación siguiente (Tabla 27).

### *Tasas de mutación de los genes mitocondriales cyt-b y cox-1 en Austrolebias*

Actualmente no existen estimaciones sobre las tasas de mutación de los genes mitocondriales en peces del género *Austrolebias*. En esta Tesis se estimó por primera vez la tasa de mutación por año (o generación) de los genes mitocondriales *cyt-b* (Tabla 28) y *cox-1* (Tabla 29) en *A. charrua* y *A. cheradophilus*. En las poblaciones naturales y progenies de *A. charrua*, el gen *cyt-b* presenta una tasa de mutación en el orden de  $10^{-4}$ , mientras que en *A. cheradophilus* ésta es un poco mayor ya que se encuentra en el orden de  $10^{-3}$ . Por otro lado, la tasa de mutación estimada para el gen *cox-1* amplificado en las poblaciones naturales y progenies de *A. charrua* es del orden de  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  respectivamente. Las tasas de mutación estimadas para este gen en las poblaciones naturales y progenies de laboratorio de *A. cheradophilus* es del orden de  $10^{-4}$ . Las tasas de mutación nulas obtenidas para el gen *cyt-b* de la progenie 2013 de *A. charrua* y el gen *cox-1* de la progenie 2013 de

*A. charrua* y de la progenie 2012 de *A. cheradophilus*, se deben a que esas poblaciones no presentaron sitios variables, como se comentó anteriormente.

Estos resultados son sustancialmente superiores a la tasa de mutación de  $8,6 \pm 0,1 \times 10^{-9}$  sustituciones de pares de bases<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> determinada para el ADNmt en el género *Aphanius* (Cyprinodontiformes) (Hrbek and Meyer, 2003). Esta diferencia puede deberse al método empleado (Henn et al., 2009) ya que en *Austrolebias* se estimó en base al pedigrí y en *Aphanius* en base a una filogenia de especies. En *Drosophila melanogaster* la tasa de mutación del ADNmt estimada es de  $6,2 \times 10^{-8}$  por sitio por generación (Haag-Liautard et al., 2008). Por lo tanto, a pesar de tener una tasa de mutación tan elevada, en *A. charrua* y *A. cheradophilus* los genes mitocondriales *cyt-b* y *cox-1* se encuentran bajo una fuerte selección purificadora (como se ha descrito anteriormente) que impide que las mutaciones se fijen en el genoma. Como se mencionó anteriormente, las elevadas tasas de sustitución nucleotídica estimadas para las dos especies de *Austrolebias*, pueden ser consecuencia de su ciclo de vida anual y de su posible elevada tasa metabólica desde las etapas tempranas de su desarrollo. La relación entre altas tasas metabólicas y la acumulación de sustituciones ha sido previamente postulado por varios autores (Martin and Palumbi, 1993).

### *Contenido de cisteína en las proteínas codificadas en el ADNmt de Austrolebias*

Recientemente se ha postulado que la frecuencia con la que el aminoácido cisteína es codificado por el ADNmt es un marcador específico de la longevidad, ya que especies con un largo ciclo de vida sintetizan complejos de la cadena respiratoria carentes de este aminoácido (Moosmann and Behl 2008). Por esta razón, determinamos el contenido de cisteínas en las secuencias aminoacídicas parciales codificadas por los genes mitocondriales *cyt-b* y *cox-1* amplificadas en los individuos de *A. charrua* y *A. cheradophilus* colectados en la naturaleza y obtenidos en cautiverio. El análisis del gen *cyt-b*, reveló que en ambas especies y en los dos tipos de hábitat, este aminoácido solamente constituye aproximadamente el 1% de todos los aminoácidos codificados. Este resultado se asemeja al obtenido en *N. furzeri* donde se observó que la frecuencia con la que la cisteína era codificada por el ADNmt era del 0.79%, un valor relativamente elevado y esperado para una especie con un ciclo de vida tan corto (Hartmann et al. 2011). Por otro lado, el análisis de las secuencias *cox-1* aisladas en los mismos individuos, reveló que esta fracción del gen no codifica cisteína, lo que estaría indicando la acción de una fuerte selección purificadora en contra de la presencia de este aminoácido en este gen. Este resultado se asemeja más al obtenido en especies con un largo ciclo de vida, más que al observado en peces anuales.

Habría que analizar la frecuencia con la que la cisteína es codificada por el genoma mitocondrial completo a fin de poder concluir si este aminoácido es un indicador molecular de la longevidad en los peces anuales del género *Austrolebias*.

### *Proteínas nucleares vinculadas al envejecimiento animal presentes en A. charrua*

En la fracción del genoma total de *A. charrua* secuenciado mediante NGS, se encontraron secuencias homólogas asociadas a 26 proteínas vinculadas al envejecimiento de *D. rerio* y *M. musculus* (Apéndice 3). De las 26 proteínas, las tres seleccionadas (IGF-1, Adcy5 y p53) están filogenéticamente relacionadas con sus homólogas en otros peces teleósteos (Figura 26) y se han sugerido diferentes funciones de ellas vinculadas al envejecimiento animal. Por ejemplo, en mamíferos y otros organismos, se ha demostrado que mutaciones puntuales que tiendan a disminuir IGF-1 pueden producir un incremento significativo de la longitud de vida (Bartke, 2011). Por otro lado, el gen Adcy5 codifica un miembro de las enzimas adenilato ciclasa de membrana cuya actividad es estimulada por una de las subunidades del receptor acoplado a la proteína G. Su producto, la 3',5'adenosina monofosfato cíclica (AMPC) modula el crecimiento y la diferenciación celular en organismos desde las bacterias hasta los eucariotas superiores (Tresguerres et al., 2011). Por último, P53 actúa como factor de transcripción implicado en el control del ciclo celular, en la reparación del ADN, en la apoptosis y en las respuestas celulares al estrés. Además de inducir la detención del crecimiento celular y la apoptosis, su activación modula la senescencia celular y el envejecimiento del organismo, contribuyendo a la supresión del crecimiento tumoral (Rufini et al., 2013).

Por esto, considerando que las especies de *Austrolebias* presentan un ciclo de vida tan corto y un envejecimiento tan rápido, la amplificación y evaluación de los patrones de sustitución nucleotídica y de selección actuando sobre los genes de las proteínas IGF1, Adcy5 y p53, nos permitirá evaluar si ellas cumplen la misma función determinada en otros vertebrados.

### *Dinámica de los extremos cromosómicos durante la ontogenia de A. charrua*

Nuestros resultados sugieren que la actividad de la telomerasa en el hígado de hembras de *A. charrua*, no disminuye con el envejecimiento de los individuos, tanto en la naturaleza como en cautiverio (Figuras 27 y 28). El mantenimiento de la actividad de esta enzima durante el envejecimiento, también se ha detectado en otros peces teleósteos e incluso también anuales, tales como *N. rachovii* (Hsu et al., 2008), *N. guentheri* (Liu et al., 2012) y *N. furzeri* (Kipling, 2001; Graf

et al., 2013). Observaciones similares se han realizado en *Danio rerio* (Kishi et al., 2003) y en especies del género *Oryzias* (Au et al., 2009). Todos estos análisis mostraron que la actividad de la telomerasa aparentemente no está relacionada con el incremento de los años y por lo tanto no concuerdan con lo observado en humanos (Morin, 1989; Wright et al., 1996).

Por otro lado, nuestros análisis sobre el acortamiento de los extremos cromosómicos en células de músculo esquelético de individuos de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2013, sugieren un posible acortamiento de los telómeros en los machos y en las hembras seniles (Figura 29). El análisis de las hembras obtenidas en cautiverio en 2012 también sugiere un acortamiento de los extremos cromosómicos durante su envejecimiento, no pudiéndose confirmar esta tendencia en las hembras procedentes de la naturaleza (Figura 30). La presencia de secuencias teloméricas de menor tamaño en células musculares de individuos más viejos de *A. charrua* es consistente con los resultados obtenidos en los peces anuales del género *Nothobranchius* (Hsu et al., 2008; Hartmann et al., 2009; Liu et al., 2012; Graf et al., 2013) y concuerda con lo observado en otros organismos, incluso en humano, acerca del acortamiento progresivo de los extremos cromosómicos durante las sucesivas divisiones celulares (Harley et al., 1990; Blackburn, 1991; Kipling, 2001).

Dentro de los peces anuales del género *Nothobranchius*, a la fecha no existen estudios sobre la actividad de la telomerasa y el acortamiento de los extremos teloméricos en diferentes órganos de una misma especie. Estudios realizados en *D. rerio* revelaron que ambos eventos difieren en los diferentes órganos (Lund et al., 2009). Considerando que nuestros análisis sobre la actividad de la telomerasa se realizaron en muestras de hígado y el acortamiento de los extremos cromosómicos se evaluó en el ADN genómico total extraído de muestras de músculo esquelético, se debería analizar ambos procesos en un mismo tejido a fin de determinar su interrelación durante el envejecimiento de *A. charrua*. Este estudio permitirá corroborar si ambos eventos están asociados como en mamíferos y humano o son independientes y la longitud de los telómeros depende de otros mecanismos, tales como de la actividad de elementos transponibles descrito en *D. melanogaster* (Pardue and DeBaryshe, 2008).

## CONCLUSIONES

---

- Por primera vez se realiza un análisis exhaustivo de los cambios nucleotídicos presentes en los genes mitocondriales durante la ontogenia de una especie.
- Los 3 abordajes implementados sobre los genes mitocondriales (secuenciación masiva, análisis de poblaciones naturales y de pedigrí de laboratorio) sugieren la aparición de cambios nucleotídicos en etapas tempranas del ciclo de vida (juveniles), coincidiendo con la hipótesis de que altas tasas metabólicas relacionadas al crecimiento explosivo de estos peces, podrían estar implicadas en el daño mitocondrial.
- Los genes mitocondriales COI, ND3, ND5 y Cyt b presentan cambios nucleotídicos en los individuos juveniles de *A. charrua* (detectados en el diseño de secuenciación masiva del ADNmt entre hermanos totales).
- En las poblaciones naturales y de laboratorio de *A. charrua*, el gen *cyt-b* presenta cambios desde el estadio juvenil (principalmente transversiones) y está sujeto a selección purificadora.
- En *A. cheradophilus*, el gen *cyt-b* presenta cambios nucleotídicos desde el estadio juvenil (principalmente transiciones) a pesar de los diferentes tipos de selección actuando sobre él en los diferentes estadios de la ontogenia de las poblaciones naturales y en cautiverio.
- El gen *cox-I* de las poblaciones naturales y de laboratorio de *A. charrua* también presenta cambios desde estadio juvenil. En contraposición a ser uno de los genes mas conservados, se encontraron varios sitios variables en una progenie de laboratorio.
- Se realiza por primera vez una aproximación a la estimación de la tasa de mutación por año (o generación) de dos genes mitocondriales, tanto en poblaciones naturales como en pedigrís de laboratorio para el género *Austrolebias*. Para ambos genes, las tasas estimadas resultaron considerablemente elevadas.
- Muy baja presencia del aminoácido cisteína en proteínas codificadas por los genes mitocondriales *cyt-b* (1%) y *cox-I* (0%).
- Por primera vez se detectaron en el genoma de *A. charrua* genes nucleares vinculados al envejecimiento animal.
- No disminuye la actividad de la enzima telomerasa en el hígado de *A. charrua* durante su envejecimiento en el campo o en el laboratorio.
- Se observó un posible acortamiento de los extremos teloméricos en las células musculares durante el envejecimiento en la naturaleza y en cautiverio de *A. charrua*.

## PERSPECTIVAS

---

- Analizar el mitogenoma de otras especies de *Austrolebias* a fin de corroborar si las características encontradas en *A. charrua* son especie-específicas o comunes al género.
- Realizar los mismos abordajes (secuenciación masiva, análisis de poblaciones naturales y de pedigrí de laboratorio) en al menos 1 población natural más (colectada en el mismo charco) y otras progenies de laboratorio a fin de corroborar las tendencias observadas en cada especie.
- Aumentar el número de secuencias para cada gen mitocondrial en cada individuo analizado.
- Analizar el porcentaje del aminoácido cisteína codificado por otros genes mitocondriales.
- Amplificar los genes codificantes de las proteínas IGF1, Adcy5 y p53 en el genoma de *Austrolebias* y evaluar los patrones de sustitución nucleotídica y de selección actuando sobre ellos para evaluar si ellas cumplen la misma función determinada en otros vertebrados.
- Evaluar la actividad de la telomerasa y el acortamiento de los telómeros en un mismo tejido para confirmar o refutar su interrelación durante el envejecimiento de *A. charrua* y poder confirmar el mecanismo responsable de la estabilidad de los extremos cromosómicos.

## CAPITULO 2

---

*Funcionalidad  
mitocondrial y  
daño oxidativo  
durante el  
envejecimiento  
de Austrolebias  
charrua*

## CAPITULO 2 - Índice

INTRODUCCIÓN .....	117
Efectos del envejecimiento sobre la respiración mitocondrial.....	117
Daño oxidativo y disfunción mitocondrial.....	117
Proteínas carboniladas en el envejecimiento .....	118
HIPÓTESIS.....	120
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	120
MATERIALES y MÉTODOS .....	121
Diseño experimental con ejemplares obtenidos en cautiverio .....	121
Medidas del flujo de O <sub>2</sub> en un oxímetro de alta resolución .....	121
Determinación del acoplamiento mitocondrial en biopsias de hígado .....	123
Determinación de proteínas carboniladas: Oxyblot .....	124
RESULTADOS.....	126
Evaluación de la función mitocondrial en individuos de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio en 2012 .....	126
.....	126
Evaluación de la función mitocondrial en individuos de <i>A. charrua</i> obtenidos en cautiverio en 2013 .....	130
.....	130
Presencia de proteínas carboniladas durante la ontogenia de <i>A. charrua</i> en cautiverio .....	134
DISCUSIÓN .....	135
Funcionalidad mitocondrial en el hígado durante el envejecimiento de <i>A. charrua</i> .....	135
Acumulación de proteínas oxidadas durante el envejecimiento de <i>A. charrua</i> .....	135
CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS.....	138

## INTRODUCCIÓN

---

### *Efectos del envejecimiento sobre la respiración mitocondrial*

Las mitocondrias han cobrado protagonismo en la biología del envejecimiento debido a su rol en la producción de energía para cubrir los requerimientos celulares y al declive de las tasas metabólicas basales y funciones fisiológicas en eventos que requieren ATP. Un deterioro de la función mitocondrial con el envejecimiento involucra una disminución de las tasas de transferencia electrónica (mediante una disminución de la actividad de los complejos I - IV), un posible aumento de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial a los H<sup>+</sup> y una caída de la síntesis de ATP (Navarro et al. 2002; Navarro and Boveris 2007).

### *Daño oxidativo y disfunción mitocondrial*

El estrés oxidativo resulta de un desequilibrio entre la generación y eliminación de las ROS, creando así el daño oxidativo. El contenido mitocondrial de productos de la oxidación de proteínas, tales como nitrotirosina y proteínas carboniladas, se utiliza a menudo como un marcador de estrés oxidativo mitocondrial. Sin embargo, un aumento del contenido de proteínas carboniladas y nitradas no reflejan necesariamente el aumento del estrés oxidativo ya que también pueden ser el resultado del recambio de las proteínas dañadas (Murphy et al., 2011).

La acumulación de daño oxidativo y una disminución de la producción de ATP en los órganos y tejidos, son dos conceptos involucrados en la “Teoría mitocondrial” del envejecimiento. Estudios realizados en cerebro e hígado, revelaron que la cantidad de mitocondrias disminuye así como también la capacidad de fosforilación de la ATP sintasa y la transferencia de electrones en la membrana mitocondrial (Navarro and Boveris, 2007; Yin et al., 2014).

Las mitocondrias disfuncionales se caracterizan por una disminución del estado 3 de la respiración (en presencia de ADP), de la regulación de la respiración y del potencial de membrana, así como por el incremento del estado 4 de la respiración (sin fosforilación de ADP) y del tamaño y fragilidad de la mitocondria asociados al aumento del contenido de los productos oxidados (Navarro and Boveris, 2007). La determinación experimental del aumento de los componentes mitocondriales tales como fosfolípidos, proteínas y ADN, oxidados mediante radicales libres es el principal objetivo en estudios sobre el envejecimiento (Navarro and Boveris, 2007).

El daño oxidativo, determinado por el contenido mitocondrial de proteínas carboniladas y lípidos peroxidados, está negativamente correlacionado con la actividad de los complejos I y IV (Navarro et al., 2002; Navarro and Boveris, 2007).

### *Proteínas carboniladas en el envejecimiento*

En condiciones fisiológicas, constantemente se generan bajas concentraciones de ROS dentro de las células jugando un rol en la regulación redox celular. El daño oxidativo se produce cuando el balance entre los sistemas generadores de ROS y los detoxificantes se ven desbalanceados a favor de los primeros (Dalle-Donne et al., 2006a).

El blanco principal del estrés oxidativo puede variar dependiendo del tipo de célula, del nivel absoluto y de la duración de la producción de oxidantes, de las especies de ROS generadas, su reactividad, su sitio de producción (intra o extracelular) y de la proximidad del oxidante a un sustrato celular específico (Dalle-Donne et al., 2006a).

Debido a que son el componente principal de la mayoría de los sistemas biológicos, las proteínas son los principales blancos de oxidación de las ROS y de sub-productos secundarios del estrés oxidativo. Algunas modificaciones proteicas inducidas por las ROS pueden afectar el plegamiento o alterar la estructura de la proteína, afectando o no su función. Las modificaciones proteicas irreversibles pueden ocasionar la inactivación de diversas proteínas con efectos perjudiciales para la célula (Dalle-Donne et al., 2006a).

La carbonilación es una modificación de las proteínas irreversible y no enzimática. Los grupos carbonilo se introducen en las proteínas mediante diversas vías oxidativas. Las distintas especies de ROS pueden reaccionar directamente con la proteína o con compuestos de menor peso molecular (azúcares y lípidos) y generar productos que luego reaccionan con la proteína. El mecanismo de carbonilación de proteínas más prominente en células es conocido como “metal-catalyzed oxidation, MCO” cuando se forma el radical hidroxilo muy reactivo, por reacción de  $H_2O_2$  con metales reducidos (reacción de Fenton). Es un proceso sitio-específico, donde el ataque puede ser a la cadena lateral siendo los aminoácidos más susceptibles a esta oxidación la arginina (Arg), la lisina (Lys), la prolina (Pro) y la treonina (Thr), o puede provocar la ruptura del esqueleto proteico (Maisonneuve et al., 2009; Møller et al., 2011). La carbonilación de proteínas es un biomarcador ampliamente usado para evaluar el daño oxidativo a las proteínas y refleja el daño celular inducido por múltiples formas de ROS (Dalle-Donne et al., 2003a, 2003b; Grune et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006a, 2006b). Se ha acumulado evidencia experimental que apunta a un aumento en la concentración intracelular de proteínas oxidadas en función de la edad. Aumento en los niveles de proteínas carboniladas ocurre en hepatocitos de rata, en *Drosophila*, cerebro y riñón de ratón y fibroblastos humanos (Sohal et al., 1993, 1994). Es más, en cerebro y músculo humanos, el contenido en proteínas carboniladas aumenta con la edad (Smith et al., 1991; Pansarasa et al., 1999).

El aumento de proteínas carboniladas durante el envejecimiento animal y en respuesta al estrés oxidativo, no es al azar ya que algunas proteínas son más susceptibles que otras. Sin embargo, las proteínas carboniladas difieren en las diferentes especies. Por ejemplo, en el plasma de ratones la carbonilación proteica asociada al envejecimiento sólo se observó en dos proteínas, la albúmina (proteína más abundante del plasma) y la transferrina, mientras que en el plasma de ratas esta modificación se detectó en la albúmina y en la  $\alpha$ 1-macroglobulina (Jana et al., 2002).

Las proteínas carboniladas pueden tener un rol en el control de la calidad de las proteínas. Por ejemplo, se ha observado que las proteínas “mal plegadas” (misfolded) son más susceptibles a la carbonilación que las nativas, sugiriendo que la carbonilación podría estar indicando que una proteína es irreparable y por lo tanto estaría actuando como un sistema de “etiquetado” para la vía de degradación. Esto se ha observado en células de mamífero oxidativamente estresadas, donde la carbonilación conduce a la degradación de la proteína modificada (y generalmente disfuncional) por el sistema proteosómico (Grune et al., 2004; Dalle-Donne et al., 2006b). En procariotas, los mismos estudios han planteado la posibilidad de que algunas proteínas sean más susceptibles a la carbonilación porque están mal plegadas, en lugar de ser disfuncionales porque la carbonilación ha provocado el plegamiento erróneo (Dukan et al., 2000; Ballesteros et al., 2001).

Las proteínas con función reducida o perdida, pueden ser dañinas si se acumulan en las células. Por lo tanto, las proteínas oxidadas son reparadas, eliminadas mediante su degradación proteolítica o acumuladas en forma de proteínas dañadas o mal plegadas. Los principales sistemas proteolíticos intracelulares incluyen proteasas lisosomales (catepsinas), proteasas dependientes del calcio (calpaínas), y proteasas multicatalíticas (proteosoma 20S y proteosoma 26S). Los proteosomas pueden degradar las proteínas mediante dos vías no lisosomales, ubiquitina-dependiente o ubiquitina-independiente. En las células, la mayoría de las proteínas destinadas a la degradación primero son “etiquetadas” por la ubiquitina (en un proceso dependiente de ATP) y luego digeridas a pequeños péptidos por el proteosoma 26S. Sin embargo, las proteínas oxidadas son en su mayoría degradadas por el proteosoma 20S que, a diferencia del 26S, no requiere del marcaje de las proteínas diana por la ubiquitina ni ATP para la actividad (Dukan et al., 2000; Ballesteros et al., 2001).

## HIPÓTESIS

---

La disfunción mitocondrial determina un aumento del stress oxidativo ligado al envejecimiento de *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- a) Evaluar la función mitocondrial en individuos juveniles y seniles de *A. charrua* nacidos en cautiverio.
- b) Estudiar el aumento de stress oxidativo en individuos juveniles, adultos y seniles de *A. charrua* obtenidos en cautiverio.

## MATERIALES y MÉTODOS

---

### *Diseño experimental con ejemplares obtenidos en cautiverio*

Se analizaron ejemplares juveniles y seniles de hermanos totales de *A. charrua* de las progenies obtenidas en cautiverio durante los años 2012 y 2013. Los individuos fueron mantenidos en cautiverio a lo largo de todo su ciclo de vida, en acuarios con agua de clorinada, burbujeo constante, temperatura ambiente de 19°C, fotoperíodo natural y alimentación diaria. Se analizaron algunos individuos colectados en el campo, pero éstos no fueron considerados en análisis posteriores debido a que el estrés ocasionado por la captura, transporte y adaptación a las condiciones de cautiverio podría interferir en los resultados. Ejemplares de *A. cheradophilus* tampoco fueron analizados debido al bajo número de individuos obtenidos en las 2 progenies.

### *Medidas del flujo de O<sub>2</sub> en un oxímetro de alta resolución*

En mitocondrias con la membrana interna intacta, la transferencia de electrones (que se puede medir mediante el consumo de O<sub>2</sub>) en presencia de ADP conduce a la síntesis de ATP por la ATP sintasa. Este fenómeno se conoce como “acoplamiento” y puede determinarse experimentalmente mediante el índice de control respiratorio (RCR, “Respiratory Control Rate”). El consumo de oxígeno en presencia de algún sustrato y ADP (conocido como estado 3 de la respiración) se mide y compara con la tasa de respiración luego de que el ADP fue consumido (estado 4 de la respiración). Por lo tanto, aquellas mitocondrias que no presenten diferencias entre ambos estados estarían “desacopladas” (Rickwood et al., 1987).

En esta tesis, estas mediciones se llevaron a cabo en un equipo de respirometría de alta resolución Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) ubicado en el Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, del CEINBIO, Centro de Investigaciones Biomédicas de la UdelaR. A fin de evaluar la máxima capacidad respiratoria de las células intactas, inicialmente se adicionan sustratos respiratorios de los complejos I y II de la cadena respiratoria. Luego de alcanzar un nivel estacionario, el flujo de oxígeno comienza a disminuir y se agrega ADP (Respiración basal). Esto ocasiona un aumento drástico del consumo de oxígeno por la disipación del gradiente de H<sup>+</sup> que conduce a la síntesis de ATP, lo cual indica el grado de acoplamiento entre el consumo de O<sub>2</sub> y la síntesis de ATP en estas células. Cuando el ADP fue consumido casi completamente, se observa una disminución del flujo de O<sub>2</sub> y se agrega oligomicina, inhibidor de la síntesis de ATP que actúa específicamente bloqueando el canal de H<sup>+</sup> en la fracción F<sub>0</sub> de la ATP sintasa, inhibiendo así la fosforilación oxidativa. Esto produce una disminución constante del flujo de O<sub>2</sub> y antes de que se

consume todo el O<sub>2</sub> presente en el medio, se adiciona un agente desacoplante (por ej. FCCP “Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone”). Este reactivo actúa como un transportador móvil de iones, transportando H<sup>+</sup> a través de la membrana interna e impidiendo así la síntesis de ATP. Esto permite evaluar la velocidad de respiración desacoplada mediante el índice de control desacoplado (UCR, “Uncoupling Control Rate”) que corresponde al inverso del índice de control respiratorio (RCR). Finalmente, se agrega antimicina, un inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria ya que bloquea la transferencia de electrones entre el citocromo b y el c1. El flujo de O<sub>2</sub> obtenido luego de su adición refleja el consumo basal de O<sub>2</sub> por parte de la célula sin considerar la respiración mitocondrial.

El Oxímetro de alta resolución posee un software específico, el DatLab ver.4.3.1.15 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) que permite el análisis en tiempo real del flujo de oxígeno medido en el OROBOROS Oxygraph-2k. El flujo de oxígeno por volumen puede ser instantáneamente normalizado por la masa de la muestra o el número de células. Los resultados son visualizados en una gráfica como la que se muestra en la Figura 31. En la gráfica correspondiente al flujo de O<sub>2</sub> se seleccionan las regiones más estables y los valores medios correspondientes se visualizan en una Tabla (que se puede exportar a Excel, para el análisis de los datos).

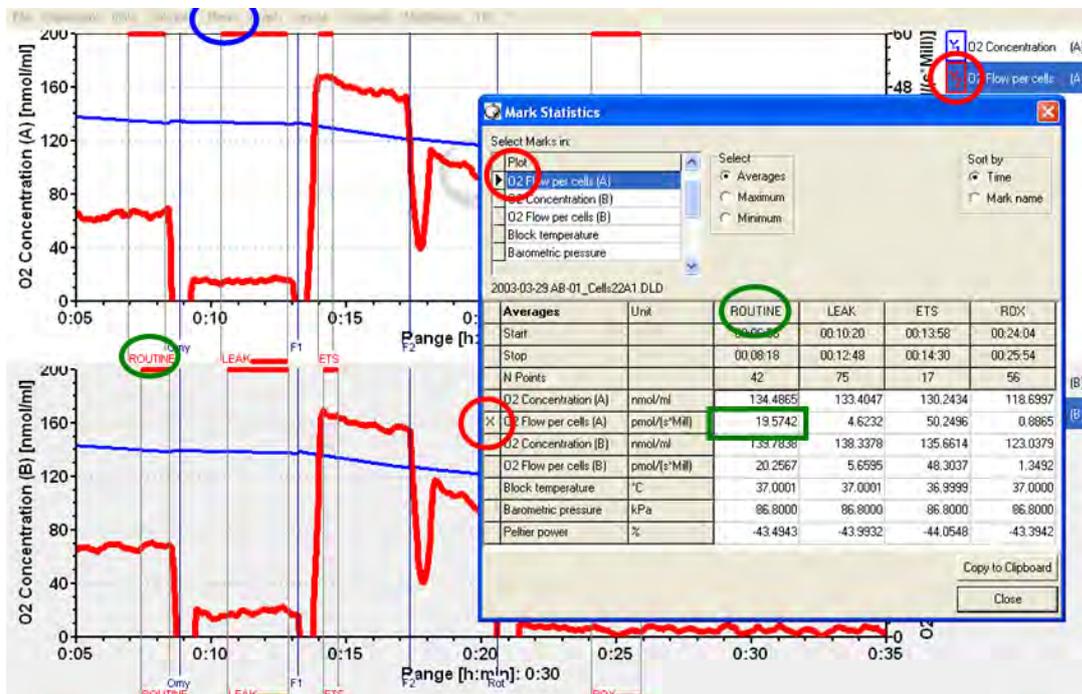


Figura 31. Concentración de O<sub>2</sub> (azul en el eje Y1) y flujo de O<sub>2</sub> (rojo en el eje Y2) en función del tiempo. El registro de datos se inició luego de la adición de una suspensión celular. Los eventos marcan el inicio de una nueva fase del análisis (por ej. luego de la adición de alguno de los reactivos) y se muestran mediante líneas verticales. Las marcas realizadas en las regiones más constantes de cada evento, se muestran mediante barras horizontales entre dos líneas verticales, con el nombre de la marca en la barra inferior. Superpuesta en la figura, se muestra la Tabla con los valores promedio de cada evento. Tomada de [www.bioblast.at/index.php/MiPNet19.01E\\_O2\\_Flux\\_Analysis](http://www.bioblast.at/index.php/MiPNet19.01E_O2_Flux_Analysis).

Como se mencionó anteriormente, el “acoplamiento” de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa se determina mediante el índice de control respiratorio (RCR). En células intactas, este índice se calcula a partir de los valores promedio del flujo de O<sub>2</sub> obtenidos luego de la adición de FCCP y oligomicina según la siguiente ecuación:

$$\text{RCR} = \frac{\text{FCCP} - \text{Antimicina}}{\text{Oligomicina} - \text{Antimicina}}$$

Se resta el valor promedio del flujo de O<sub>2</sub> obtenido luego del agregado de la antimicina, para considerar solamente el consumo de O<sub>2</sub> por parte de la cadena respiratoria mitocondrial. Valores de RCR > 1 indican que existe acoplamiento en las mitocondrias analizadas. Cuando se analizan células intactas, frecuentemente se calcula el UCR (o índice de desacople) mediante la ecuación:

$$\text{UCR} = \frac{\text{FCCP} - \text{Antimicina}}{\text{Respiración basal} - \text{Antimicina}}$$

Este índice refleja la capacidad respiratoria de reserva y puede disminuir por el aumento de la respiración endógena estimulada por ADP (por ejemplo, debido a una mayor demanda de energía) debido a la disociación de las mitocondrias o a una disminución de la capacidad respiratoria.

### *Determinación del acoplamiento mitocondrial en biopsias de hígado*

En esta tesis, se estudió por primera vez la integridad funcional de las mitocondrias presentes en el hígado de una especie de peces anuales de la familia Rivulidae (Cyprinodontiformes). Se midió la respiración mitocondrial en biopsias de hígado de individuos jóvenes y seniles de hermanos totales de *A. charrua* mediante el registro del flujo de O<sub>2</sub> en el tejido.

La técnica se puso a punto para *A. charrua* como modelo animal, realizando mediciones en biopsias de hígado y músculo esquelético y en animales juveniles, adultos y seniles procedentes de la naturaleza y nacidos en cautiverio. Los resultados obtenidos para las biopsias de hígado fueron más satisfactorios que los obtenidos para el músculo esquelético, por lo que el primero fue seleccionado como órgano en los experimentos finales. Asimismo, los resultados obtenidos en los individuos de campo fueron sumamente variables (posiblemente debido al estrés ocasionado por la captura, transporte y adaptación a las condiciones de cautiverio) por lo cual éstos no fueron evaluados en los análisis posteriores. A fin de evaluar la respiración mitocondrial en el tejido lo menos alterado

posible, los hígados analizados fueron obtenidos de individuos sacrificados mediante decapitación en el momento previo a la extracción del órgano.

Por lo tanto, se midió el consumo de O<sub>2</sub> en biopsias de hígados frescos de hembras y machos jóvenes y seniles de las 2 progenies de *A. charrua* nacidas y mantenidas en cautiverio (ver Apéndice 1), tal como se describe en el Apéndice 4.

Finalizado el análisis, los registros de consumo de oxígeno fueron analizados con el programa DatLab ver.4.3.1.15 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) donde se determinaron los índices RCR y UCR descritos anteriormente.

Se graficó el promedio de cada uno de los índices con su error estándar. Las diferencias significativas se determinaron a partir de valores-p ( $p < 0,05$ ) calculados mediante un test t-student con una distribución de 2 colas.

#### *Determinación de proteínas carboniladas: Oxyblot*

Para determinar la presencia de proteínas carboniladas durante la ontogenia de *A. charrua*, se realizó una inmuno detección de los residuos de 2,4-dinitrofenilhidrazona mediante el kit comercial “OxyBlot™ Protein Oxidation Detection System” (Millipore). Se analizaron hígados (conservados a -80°C) de hembras de *A. charrua* obtenidas en los 3 estadios ontogenéticos durante el año 2012 (ver apéndice 1).

#### Cuantificación de proteínas totales en la muestra

Se usó el mismo extracto de proteínas descrito anteriormente en la determinación de la actividad de la enzima telomerasa (Tabla 30) y se cuantificaron proteínas totales por el método de Bradford.

#### Derivatización de las proteínas totales

Los grupos carbonilo de las proteínas totales fueron convertidos a 2,4-dinitrofenilhidrazona mediante su reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) usando el kit comercial “OxyBlot™ Protein Oxidation Detection System” (Millipore). Luego de la puesta a punto de la técnica en *A. charrua*, se trataron 500 µg/ml de proteínas totales, siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante que se detalla en el Apéndice 4.

### Separación de las proteínas carboniladas: SDS-PAGE

Las muestras carboniladas se sometieron a una electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) al 12% en buffer Tris-Glicina 1X (pH 8,3). Se sembraron 20 µl de las muestras derivatizadas en el ítem anterior y 3 µl del marcador de peso molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker, #SM0441, FERMENTAS). La corrida electroforética se realizó a 150V durante aproximadamente 2 horas y a 4°C.

### Separación de las proteínas totales: SDS-PAGE

Como control de carga de las proteínas totales derivatizadas sembradas en el gel, en el mismo se sembraron 5 µl del extracto crudo de proteínas con buffer de corrida 1X. Esta región del gel posteriormente será evaluada con un anticuerpo primario anti-actina.

### Transferencia de las proteínas a la membrana

Finalizada la corrida electroforética, se procedió a la transferencia de todas las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Biorad) como de describe en el Apéndice 4.

La transferencia de las proteínas a la membrana se llevó a cabo a 100V durante aproximadamente 2 horas, a 4°C.

### Inmuno-detección

Finalizada la transferencia, se desmontó “el sándwich” y se procedió como se detalla en el Apéndice 4. La membrana con las proteínas carboniladas se incubó con una dilución 1:50 del anticuerpo primario anti-2,4-dinitrofenilhidrazona y luego con una dilución 1:300 del anticuerpo secundario (vienen con el kit). Por otro lado, la membrana para el control de carga de proteínas sembradas se incubó con una dilución 1:500 del anticuerpo primario anti-actina producido en conejo (#A2066, Sigma-Aldrich) y luego con una dilución 1:10000 del anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo).

## RESULTADOS

### *Evaluación de la función mitocondrial en individuos de A. charrua obtenidos en cautiverio en 2012*

Debido a que se midió la respiración mitocondrial en biopsias de tejidos, se pesó cada uno de los hígados analizados (Tabla 31), inmediatamente después de extraído del individuo.

Tabla 31. Peso de los hígados de los ejemplares de *A. charrua* obtenidos en cautiverio analizados en 2012.

Número de individuo	Sexo	Ontogenia	Edad	Peso Total (mg)
1	Hembra	Juvenil	2 meses	66,40
2	Hembra	Juvenil	2 meses	66,10
3	Hembra	Juvenil	2,5 meses	83,00
4	Hembra	Juvenil	3 meses	67,00
5	Hembra	Juvenil	3 meses	18,20
6	Macho	Juvenil	2,5 meses	19,40
7	Macho	Juvenil	2,5 meses	97,30
8	Macho	Juvenil	2,5 meses	62,90
9	Macho	Juvenil	3 meses	29,40
10	Macho	Juvenil	3 meses	30,00
11	Hembra	Senil	6 meses	20,20
12	Hembra	Senil	6 meses	31,30
13	Hembra	Senil	7 meses	26,40
14	Hembra	Senil	7 meses	52,60
15	Macho	Senil	6 meses	97,00
16	Macho	Senil	6 meses	75,00

Como se observa en la Tabla 31, el tamaño de los hígados analizados fue muy variable incluso dentro de los individuos del mismo sexo y en la misma etapa ontogenética. Algunos hígados muy grandes, fueron fraccionados al medio y se midió la funcionalidad mitocondrial en cada fracción.

Luego de pesado, el hígado fue colocado dentro de una de las cámaras del oxímetro de alta resolución Oxygraph-2k y se inició el registro de los datos que se muestra en la Figura 32.

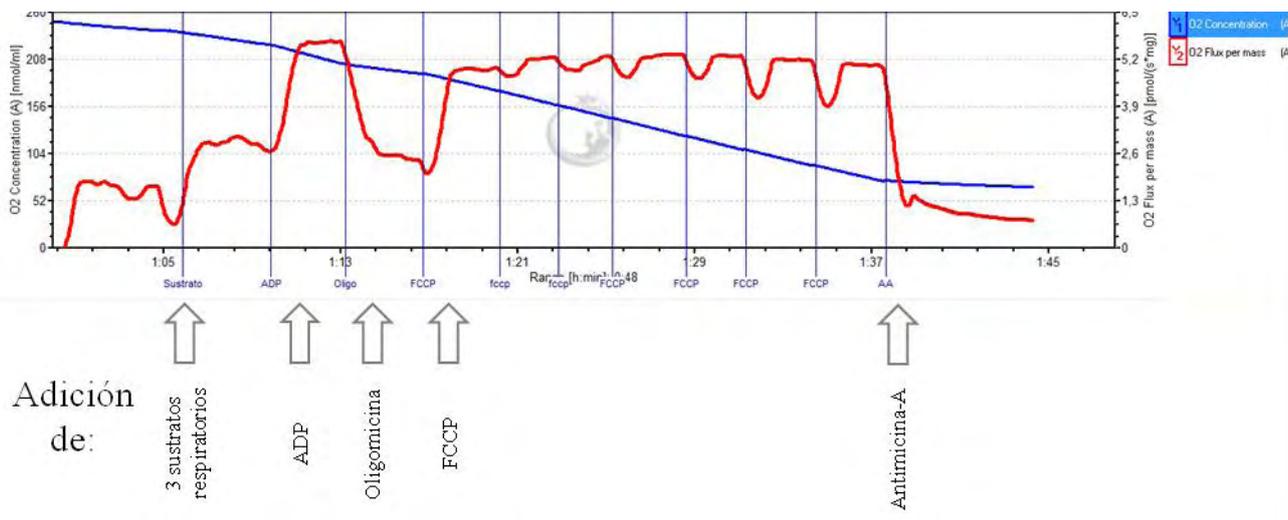


Figura 32. Registro del consumo de oxígeno en el hígado de una hembra joven. La gráfica azul indica la concentración de oxígeno [nmol/ml] y la roja el flujo de oxígeno por masa de tejido [pmol/(s\*mg)] en función del tiempo. El registro de datos se inició después de la adición de la biopsia. Las flechas señalan el momento en que se adicionaron los diferentes reactivos.

El patrón de flujo de  $O_2$  en función del tiempo fue muy similar en todas las muestras analizadas, tanto juveniles como seniles. Luego de la adición de los sustratos respiratorios de los complejos I y II de la cadena respiratoria, se observó un aumento del flujo de  $O_2$  por el tejido, sugiriendo que ambos complejos están activos. Cuando el consumo de  $O_2$  comenzó a disminuir como consecuencia de una disminución de los sustratos en el medio, se agregó ADP y se observó un drástico aumento del flujo de oxígeno, indicando que existe acoplamiento en las mitocondrias de los hígados analizados. Cuando la concentración de ADP comenzó a disminuir, se agregó oligomicina y se observó una drástica disminución del flujo de  $O_2$ . Este resultado es coherente con lo esperado luego de la inactivación de la actividad de la ATP sintasa por parte de la oligomicina, que ya no disipa el gradiente de pH, por lo tanto la mitocondria disminuye el consumo de  $O_2$  al no tener que mantener el gradiente de  $H^+$  a través de su membrana interna. Una vez inactivada la fosforilación oxidativa, y antes de que se consumiera todo el  $O_2$  disuelto en el medio de respiración, se evaluó la máxima capacidad respiratoria de las mitocondrias mediante el agregado del agente desacoplante FCCP, y se observó que el flujo de oxígeno comenzaba a aumentar nuevamente. Cuando el consumo de oxígeno dejó de aumentar, luego de varias adiciones de FCCP, se inhibió el flujo de electrones en el complejo III mediante la adición de antimicina y se observó un drástico colapso del flujo de  $O_2$ , ya que solamente se registra el consumo basal de  $O_2$  por parte de la célula.

En la Tabla 32 se muestran los valores de flujo de oxígeno obtenidos para cada individuo analizado y los índices correspondientes calculados.

Tabla 32. Valores de flujo de O<sub>2</sub> por masa de tejido [pmol/(s\*mg)] luego de la adición de los sustratos, inhibidores y del desacoplante en individuos de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2012. En amarillo se resaltan los valores obtenidos para el RCR y en verde para el UCR.

Número de individuo	Sexo	Peso de la biopsia analizada (mg)	Basal=SUST+ADP	Oligomicina	FCCP	Antimicina	RCR	UCR
1	Hembra	44,20	4,3	2,6	4,6	0,6	2,0	1,1
		22,20	11,6	7,2	10,4	1,8	1,6	0,9
2	Hembra	37,20	3,9	2,5	5,3	0,9	2,8	1,5
		28,90	3,5	3,2	4,1	1,8	1,7	1,3
3	Hembra	83,00	4,1	2,6	3,9	0,5	1,6	0,9
4	Hembra	67,00	4,6	2,6	4,4	0,7	1,9	1,0
5	Hembra	18,20	11,6	7,2	12,6	2,3	2,1	1,1
6	Macho	19,40	10,3	7,6	11,5	2,1	1,7	1,1
7	Macho	97,30	3,4	2,0	2,7	0,7	1,5	0,8
8	Macho	62,90	5,1	4,0	4,4	1,1	1,1	0,8
9	Macho	29,40	6,4	3,9	9,1	1,5	3,2	1,5
10	Macho	30,00	5,4	4,7	6,3	2,4	1,7	1,3
11	Hembra	20,20	7,9	4,6	8,1	3,3	3,5	1,0
12	Hembra	31,30	12,8	4,0	4,3	1,9	1,1	0,2
13	Hembra	13,10	6,6	5,8	8,8	2,7	2,0	1,6
		13,30	6,4	4,9	7,7	2,4	2,1	1,3
14	Hembra	21,60	5,8	4,3	5,9	2,1	1,7	1,0
		31,00	5,9	3,4	5,8	1,3	2,2	1,0
15	Macho	97,00	5,7	3,0	3,1	0,8	1,1	0,5
16	Macho	75,00	5,7	2,9	3,0	1,3	1,0	0,4

Como no se adicionó ningún permeabilizante a las muestras (por ej. Saponina 50 µg/µl), consideramos como respiración basal del tejido el flujo de O<sub>2</sub> luego de la adición de los sustratos y del ADP. Como se observa en la Tabla 32, los valores obtenidos para el índice de control respiratorio (RCR) en los individuos jóvenes, son muy variables dentro de individuos del mismo sexo y entre sexos. Los valores del índice de desacople (UCR) fueron bastante constantes, no detectándose grandes diferencias dentro ni entre los sexos. Por esto, solamente graficamos los valores promedio de RCR para cada sexo y cada estadio ontogenético. En la Figura 33 se muestra la relación entre los RCR de hembras y machos jóvenes de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2012. El valor promedio de RCR obtenido para las hembras (RCR=2,0) resultó casi igual al

obtenido para los machos (RCR=1,9). Como ambos valores promedio de RCR > 1, en este estadio las mitocondrias del hígado están acopladas en ambos sexos. El análisis estadístico de t-student reveló que no existe una diferencia significativa entre ellos ( $p>0,05$ ). La diferencia obtenida entre hembras y machos seniles, tampoco fue significativa ( $p>0,05$ ).

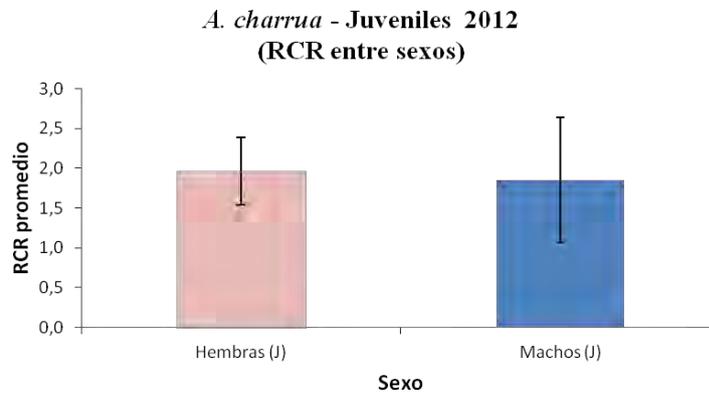


Figura 33. Gráfica de los valores promedio de RCR obtenidos en hígados de hembras (rosado) y machos (azul) juveniles de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2012. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar para cada set de datos.

Al comparar los valores de RCR entre los dos estadios ontogenéticos (juveniles vs. seniles) (Figura 34) tampoco se observó una diferencia significativa entre ellos ( $p>0,05$ ). El valor promedio de RCR obtenido para todos los individuos jóvenes (RCR=1,9) resultó casi igual al obtenido para todos los individuos viejos (RCR=1,8). Como ambos valores promedio de RCR > 1, se puede inferir que el nivel de respiración mitocondrial no se ve disminuido con el envejecimiento de los individuos.

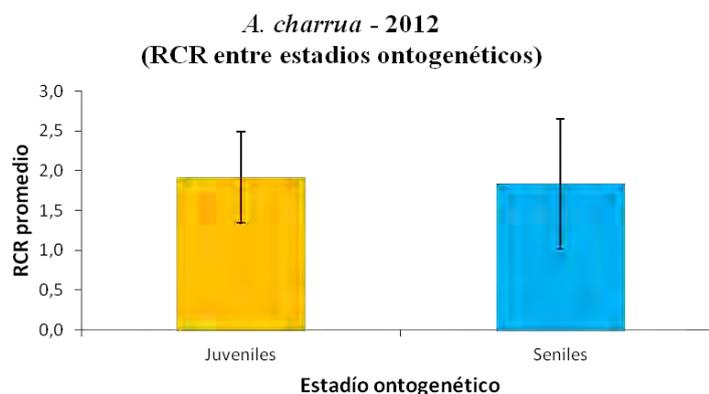


Figura 34. Gráfica de los valores promedio de RCR obtenidos en hígados de individuos jóvenes (naranja) y seniles (celeste) de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2012. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar para cada set de datos.

*Evaluación de la función mitocondrial en individuos de A. charrua obtenidos en cautiverio en 2013*

Al igual que para la progenie anterior, se pesó cada uno de los hígados analizados de la progenie de *A. charrua* nacida y mantenida en cautiverio en 2013 (Tabla 33).

Tabla 33. Peso de los hígados de todos los ejemplares de *A. charrua* obtenidos en cautiverio analizados en el 2013.

Número de individuo	Sexo	Ontogenia	Edad	Peso (mg)
1	Hembra	Juvenil	3 meses	78,50
2	Hembra	Juvenil	3 meses	53,70
3	Hembra	Juvenil	3 meses	34,00
4	Macho	Juvenil	3 meses	69,40
5	Macho	Juvenil	3 meses	3,00
6	Macho	Juvenil	3 meses	39,50
7	Macho	Juvenil	3 meses	37,50
8	Macho	Juvenil	3 meses	25,20
9	Macho	Senil	5 meses	39,60
10	Macho	Senil	5 meses	35,40
11	Macho	Senil	5 meses	31,20
12	Macho	Senil	5 meses	45,80
13	Macho	Senil	7 meses	130,60
14	Macho	Senil	7 meses	10,00
15	Macho	Senil	7 meses	96,30
16	Macho	Senil	7 meses	130,30

Como se observa en la Tabla 33, en esta generación de *A. charrua* en cautiverio, el tamaño de los hígados analizados también fue muy variable no sólo dentro de los individuos del mismo sexo sino también en la misma etapa ontogenética. Al igual que en los análisis de la generación del 2012, algunos hígados muy grandes, fueron fraccionados al medio y se midió la funcionalidad mitocondrial en cada fracción.

Luego de pesado, el hígado fue colocado dentro de una de las cámaras del oxímetro de alta resolución Oxygraph-2k y se inició el registro de los datos que se muestra en la Figura 35.

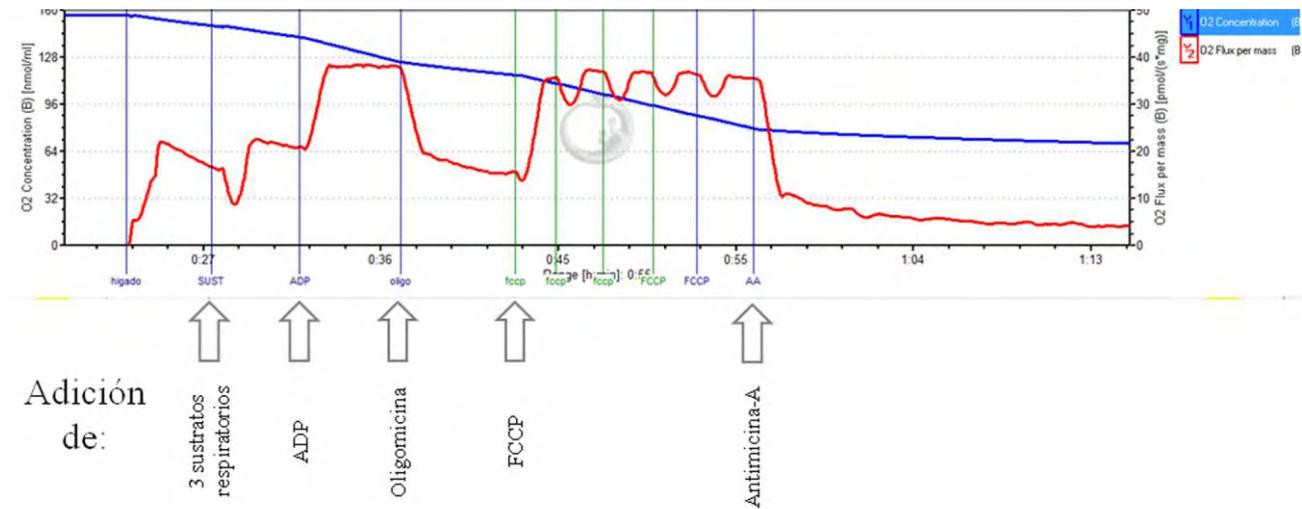


Figura 35. Registro del consumo de oxígeno en el hígado de un macho joven. La gráfica azul indica la concentración de oxígeno [nmol/ml] y la roja el flujo de oxígeno por masa de tejido [pmol/(s\*mg)] en función del tiempo. El registro de datos se inició después de la adición de la biopsia. Las flechas señalan el momento en que se adicionaron los diferentes reactivos.

El patrón de flujo de O<sub>2</sub> en función del tiempo fue muy similar en todas las muestras analizadas, tanto juveniles como seniles, y mostró el mismo comportamiento descrito para la generación anterior.

En la Tabla 34 se muestran los valores de flujo de oxígeno obtenidos para cada individuo analizado y los índices correspondientes calculados.

Tabla 34. Valores de flujo de O<sub>2</sub> por masa de tejido [pmol/(s\*mg)] luego de la adición de los sustratos, inhibidores y del desacoplante en individuos de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2013. En amarillo se resaltan los valores obtenidos para el RCR y en verde para el UCR.

Número de individuo	Sexo	Peso de la biopsia analizada (mg)	Basal= SUST+ADP	Oligomicina	FCCP	Antimicina	RCR	UCR
1	Hembra	78,50	3,0	0,9	3,6	0,3	5,0	1,2
2	Hembra	53,70	3,9	2,2	4,9	0,6	2,7	1,3
3	Hembra	34,00	3,7	2,1	4,5	0,9	2,9	1,3
4	Macho	69,40	3,4	1,5	4,7	0,4	3,9	1,4
5	Macho	3,00	30,2	15,3	37,2	4,1	2,9	1,3
6	Macho	39,50	3,5	1,2	4,6	0,2	4,6	1,3
7	Macho	37,50	2,1	1,6	3,2	0,8	3,1	1,9
8	Macho	25,20	6,0	3,7	7,1	1,1	2,3	1,2
9	Macho	39,60	4,4	3,2	4,1	0,9	1,4	0,9
10	Macho	35,40	4,7	2,7	4,9	0,7	2,1	1,0
11	Macho	31,20	4,8	4,1	4,5	1,7	1,2	0,9
12	Macho	45,80	3,1	2,7	2,8	0,9	1,1	0,9
13	Macho	130,60	7,5	3,2	4,4	0,3	1,4	0,6
14	Macho	10,00	46,4	22,4	61,5	4,4	3,2	1,4
15	Macho	48,40	5,6	3,3	4,8	1,2	1,7	0,8
		47,90	6,1	3,5	5,7	0,9	1,8	0,9
16	Macho	83,20	2,5	2,2	2,3	0,6	1,1	0,9
		47,10	4,2	3,7	3,7	2,2	1,0	0,8

Siguiendo el mismo criterio empleado en el análisis de la generación de 2012, como no se adicionó ningún permeabilizante a las muestras, consideramos como respiración basal del tejido el flujo de O<sub>2</sub> luego de la adición de los sustratos y el ADP. Como se observa en la Tabla 34, los valores obtenidos para el índice de control respiratorio (RCR) en los individuos jóvenes, son muy variables dentro de individuos del mismo sexo y entre sexos, mientras que los valores del UCR son bastante constantes. Por lo tanto, en esta generación también graficamos los valores promedio de RCR para cada sexo y cada estadio ontogenético de esta progenie. En la Figura 36 se muestra la relación entre los RCR de hembras y machos jóvenes de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2013. El valor promedio de RCR obtenido para las hembras (RCR=3,5) resultó casi igual al obtenido para los machos (RCR=3,4). Como ambos valores promedio de RCR > 1, en este estadio las mitocondrias del hígado están acopladas en ambos sexos. El análisis estadístico de t-student reveló que no existe una diferencia significativa entre ellos (p>0,05). Cabe destacar que los valores de RCR obtenidos en

esta generación, fueron sensiblemente mayores que los obtenidos en la generación 2012 (3.5 vs 2.0). En esta generación de hermanos totales no se obtuvieron hembras viejas, por lo que el análisis entre ambos sexos en el estadio senil, no se pudo realizar.

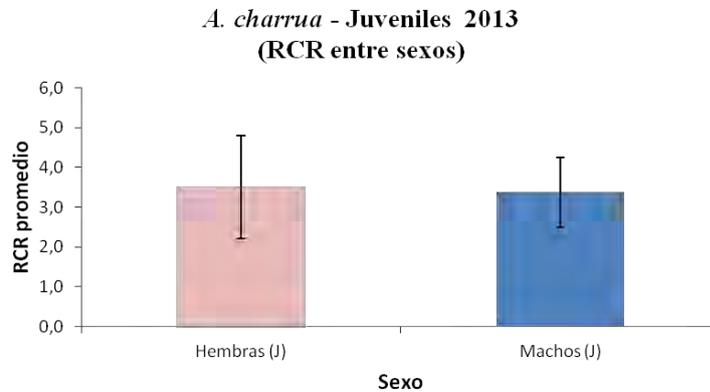


Figura 36. Gráfica de los valores promedio de RCR obtenidos en hígados de hembras (rosado) y machos (azul) juveniles de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2013. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar para cada set de datos.

A diferencia de lo observado en la generación anterior (2012), al comparar los valores de RCR entre los dos estadios ontogenéticos (juveniles vs. seniles) (Figura 37) se observó una diferencia significativa entre ellos ( $p < 0,05$ ). El valor promedio de RCR obtenido para todos los individuos jóvenes (RCR=3,4) resultó mayor al obtenido para todos los individuos viejos (RCR=1,6). Si bien ambos valores de RCR  $> 1$ , y existiría acoplamiento en ambos estadios de la ontogenia, se puede inferir que el nivel de respiración mitocondrial disminuyó significativamente con el envejecimiento de los individuos.

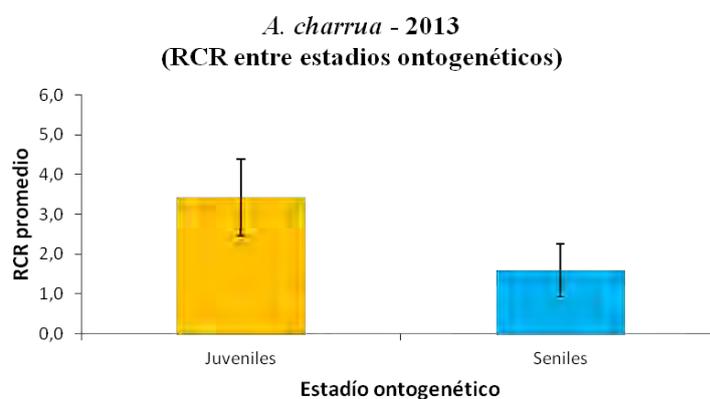


Figura 37. Gráfica de los valores promedio de RCR obtenidos en hígados de individuos jóvenes (naranja) y seniles (celeste) de *A. charrua* obtenidos en cautiverio en 2013. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar para cada set de datos.

### *Presencia de proteínas carboniladas durante la ontogenia de A. charrua en cautiverio*

Se determinó la presencia de proteínas carboniladas en el hígado de 3 hembras jóvenes (3 meses de vida) y 3 adultas (5 meses de vida) de *A. charrua* nacidas y mantenidas en cautiverio en 2012.

#### Concentración de proteínas totales en la muestra

Se analizó el mismo extracto de proteínas utilizado en la determinación de la actividad de la telomerasa (Tabla 30).

#### Detección de proteínas carboniladas mediante inmuno-detección

Una concentración de proteínas totales de 500 µg/ml fue analizada por Western blot con anticuerpo anti-2,4-dinitrofenilhidrazona (Figura 38). Por disponibilidad del número de pocillos, no se incluyeron los controles negativos y positivos en el gel.

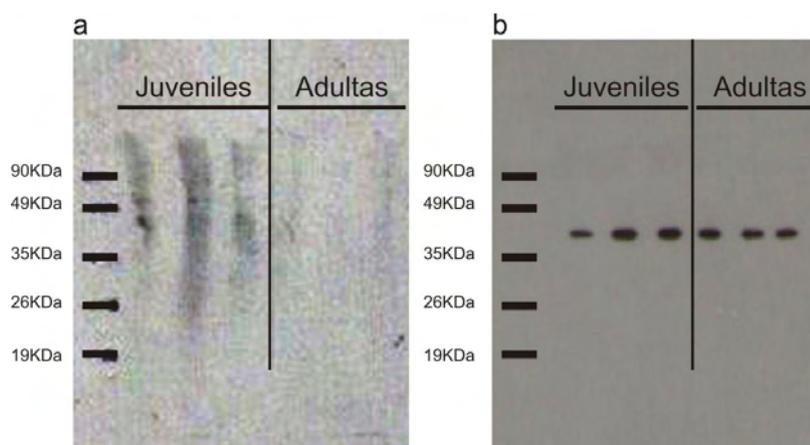


Figura 38. Presencia de proteínas carboniladas en el hígado de hembras de *A. charrua* durante su ontogenia en cautiverio. a) SDS-PAGE (12%) de las proteínas carboniladas detectadas por Western blot usando un anticuerpo anti-DNP, en 3 hembras juveniles y 3 adultas. b) Western blot para la proteína actina (control de carga). Marcador de peso molecular: Prestained Protein Molecular Weight Marker (#SM0441, FERMENTAS).

La comparación de la acumulación de proteínas carboniladas en el hígado de hembras de *A. charrua* de 3 y 5 meses de vida, reveló ya elevados niveles de proteínas oxidadas en el hígado de las hembras más jóvenes. Estos resultados indican que, en individuos de *A. charrua* obtenidos en cautiverio, los niveles de proteínas oxidadas no aumentan significativamente con la edad. Los individuos analizados en esta instancia fueron jóvenes y adultos, en un futuro análisis, habría que incluir individuos de edad más avanzada (aproximadamente 7-8 meses de vida), seniles, a fin de corroborar o refutar esta tendencia.

## DISCUSIÓN

---

### *Funcionalidad mitocondrial en el hígado durante el envejecimiento de A. charrua*

En esta tesis, se evaluó por primera vez la respiración y acoplamiento mitocondrial en una especie de peces anuales del Orden Cyprinodontiformes (Rivulidae). Se analizaron biopsias de hígado de hermanos totales nacidos y mantenidos en cautiverio a lo largo de todo su ciclo de vida, en acuarios con agua de clorinada, burbujeo constante, temperatura ambiente de 19°C, fotoperíodo natural y alimentación diaria. A pesar de esto, se observó una alta diversidad en el peso de los hígados extraídos, tanto en los machos como en las hembras y en las ventanas de la ontogenia (Tablas 31 y 33). Estos datos estarían sugiriendo que el tamaño del hígado no disminuye con el envejecimiento del individuo y principalmente en las hembras, donde se podría esperar este fenómeno ya que las células de este tejido están en constante renovación (tejido mitótico) y éste órgano es el responsable de la producción de la proteína vitelogenina que es incorporada en los ovocitos para comenzar proceso de vitelogénesis (Tyler and Sumpter, 1996; Arezo et al., 2007).

A la fecha no existen estudios que analicen la funcionalidad mitocondrial en hembras y machos por separado. Nuestros resultados sobre el análisis del índice de control respiratorio, revelaron que a los 3 meses de vida ambos sexos presentan una tasa respiratoria similar (Figuras 33 y 36). Tanto en las hembras, como en los machos el RCR > 1. El análisis entre sexos de individuos seniles no se pudo llevar a cabo ya que en la progenie del 2012 solamente se pudieron analizar 2 machos (y 4 hembras) y en la del 2013 solamente se analizaron machos. El análisis comparativo entre juveniles y seniles no fue concordante entre las 2 generaciones estudiadas (Figuras 34 y 37). En la progenie obtenida en 2012, no se detectó una diferencia significativa entre los RCR de los individuos jóvenes y seniles (Figura 34), mientras que en la progenie del 2013 si (Figura 37). Cabe mencionar que los valores de RCR obtenidos en 2012 fueron sorprendentemente bajos. Por otro lado, el resultado de la progenie 2013, coincide con lo observado en mitocondrias aisladas de células musculares del pez anual *N. furzeri* (Hartmann et al., 2011). En este trabajo se reporta una diferencia significativa entre el RCR de individuos de 5 semanas (RCR = 8.0) y de 32 semanas (RCR = 4.0).

### *Acumulación de proteínas oxidadas durante el envejecimiento de A. charrua*

En esta tesis se determinó por primera vez la presencia de proteínas carboniladas en una especie del género *Austrolebias*. Los resultados obtenidos mediante Western blot revelaron la presencia de proteínas carboniladas ya en el hígado de hembras jóvenes con 3 meses de vida, mientras que los niveles detectados en las hembras con 5 meses de vida, fueron sustancialmente inferiores (Figura

38). Esta diferencia no se debe a la concentración de proteínas totales analizadas, ya que el control de carga realizado con la proteína actina constató similar concentración de proteínas para los 6 individuos analizados. El análisis sobre la acumulación de proteínas carboniladas realizado en individuos con 3, 6, 12 y 24 meses de vida de *D. rerio*, reveló un aumento de las mismas con el envejecimiento. En ese trabajo, los ejemplares de 3 meses de vida ya presentan una elevada concentración de proteínas oxidadas (dato que coincide con el resultado de esta tesis), siendo sustancialmente mayor a los 24 meses de vida. Sin embargo, se observa una menor concentración en los individuos de 6 meses respecto a los jóvenes de 3 meses (otra vez en concordancia con nuestras observaciones en *A. charrua*) pero los autores no hacen referencia a esta disminución de la concentración (Kishi et al., 2003). Un aumento de proteínas carboniladas también se observó durante el envejecimiento de los peces anuales *N. rachovii* y *N. guentheri* mediante la detección de DNPH a 366 nm (Hsu et al., 2008; Liu et al., 2012).

A diferencia de lo observado en otros peces (Kishi et al., 2003; Hsu et al., 2008; Liu et al., 2012), en el hígado de *A. charrua* se observó mayor concentración de proteínas carboniladas en los individuos más jóvenes (Figura 38). Un resultado similar observamos al estudiar la acumulación de proteínas carboniladas en el hígado de hembras de *A. charrua* colectadas en la naturaleza (Figura 39). En ese análisis solamente se estudió 1 individuo joven, otro colectado a los 2 meses en el mismo charco temporal y otro colectado 2 meses después, casi al final del ciclo en la naturaleza. Como se observa en la Figura 39, en este caso la concentración de proteínas oxidadas disminuye en el hígado de la hembra adulta y luego vuelve a incrementarse en la hembra senil.

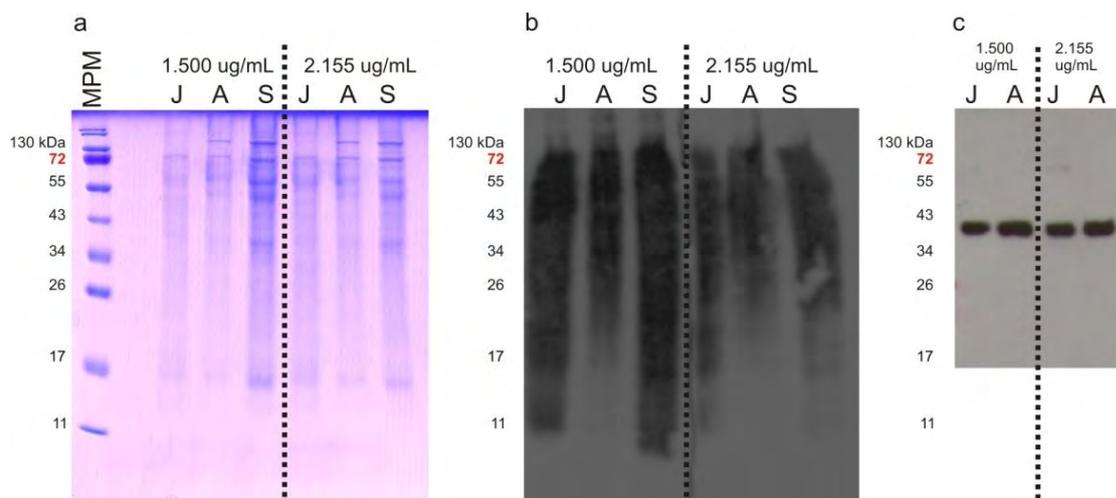


Figura 39. Presencia de proteínas carboniladas en el hígado de hembras de *A. charrua* colectadas en la naturaleza. a) SDS-PAGE al 12% tenido con Coomassie Blue donde se observan las proteínas totales en cada una de las muestras. b) SDS-PAGE al 12% de las proteínas carboniladas detectadas por Western blot usando un anticuerpo anti-DNP, c) Western blot para la proteína actina que fue utilizada como control cuantitativo de cada muestra. En este análisis no se incluyó la hembra senil por disponibilidad de carriles. El marcador de peso molecular (MPM) sembrado fue el PageRuler™ Prestained Protein ladder (#SM0671, FERMENTAS). Como se indica en la figura, se analizaron dos concentraciones diferentes de proteínas totales: 1500 y 2.155  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . J= juveniles, A=adultos, S=seniles.

Considerando que una alta tasa metabólica se asocia con un mayor estrés oxidativo (Lucas-Sánchez et al., 2014) y que se ha demostrado que la tasa metabólica disminuye a lo largo del ciclo de vida de *A. viarius* (Cardozo, 1999), una posible explicación para la presencia de proteínas carboniladas en individuos jóvenes sería debido a su alta tasa metabólica, con requerimientos elevados de ATP, por lo tanto una respiración mitocondrial intensa y fuertemente acoplada a la fosforilación oxidativa (como lo demuestran nuestros resultados de valores de RCR). Por otro lado, la disminución observada en el hígado de las hembras adultas, con una exigencia energética mucho menor, respiración mitocondrial disminuida, por lo tanto menor producción lateral de superóxido, pero a su vez un sistema todavía eficiente de remoción de proteínas disfuncionales como las carboniladas, los niveles de éstas disminuyen. En la mosca doméstica *Musca domestica*, una restricción en el vuelo (menor actividad física y exigencia energética) aumenta el tiempo de vida y se correlaciona con una disminución en las proteínas carboniladas (Yan and Sohal, 2000). Otro dato interesante de la literatura es que la oxidación de proteínas aumenta dramáticamente en el último tercio de vida del individuo (Oliver et al., 1987; Starke-Reed and Oliver, 1989). Es de esperar que en individuos seniles, donde los sistemas de remoción de proteínas disfuncionales sean menos eficientes, se llegue a la acumulación de proteínas oxidadas. Lamentablemente no dispusimos en esta instancia de individuos seniles para su comparación. Nuestra hipótesis es que en los individuos seniles, el sistema de reparación/remoción de proteínas disfuncionales decae y se llega a la acumulación de proteínas carboniladas.

## CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

---

- Los resultados obtenidos sobre la funcionalidad mitocondrial durante el envejecimiento de *A. charrua* muestran que, a los 3 meses de vida la tasa respiratoria es similar entre hembras y machos y que puede haber una disminución significativa de la misma como consecuencia del envejecimiento. Sin embargo, debido a la variabilidad observada entre los individuos, habría que analizar un mayor número de muestras, por lo menos otra generación, a fin de corroborar la disminución detectada en la progenie obtenida en 2013. El nuevo análisis debería comprender individuos en estadios tempranos de su ciclo de vida (3 meses o menos) y otros al final del mismo (7 meses o más) y se debería analizar biopsias de hígado y músculo a fin de poder evaluar la funcionalidad mitocondrial en dos tipos de células (mitóticas y post-mitóticas) ya que se ha demostrado que éstas “envejecen” de manera diferente.
- A fin de investigar más a fondo la actividad de la cadena respiratoria durante el envejecimiento de estos peces anuales, el futuro análisis de otra progenie debería incluir la determinación de la actividad de algunos complejos de la cadena respiratoria, tales como los complejos I y II. En el pez anual *N. furzeri* se ha observado que la actividad de los mismos disminuye con el envejecimiento.
- Otro abordaje a implementar sería la determinación de la actividad de algunas enzimas antioxidantes, tales como la MnSOD (inicialmente propuesto en el proyecto de tesis). El análisis de MnSOD y catalasa, llevado a cabo en los peces anuales *N. rachovii* y *N. guentheri* reveló que la actividad de las mismas disminuye con el envejecimiento. En el marco de esta tesis, se llevaron a cabo análisis preliminares sobre la actividad de la MnSOD, midiendo su actividad en geles nativos de poliacrilamida con el agregado de cianuro de potasio como inhibidor de la isoforma Cu-Zn SOD, no obteniéndose resultados satisfactorios ya que solamente se pudo detectar la enzima Cu-Zn-SOD presente en el citosol. El mismo análisis se podría realizar usando mitocondrias aisladas y no un homogenizado celular como el que fue analizado.
- La evaluación de la acumulación de proteínas oxidadas durante el envejecimiento de *A. charrua* representa el primer análisis realizado en este género de peces anuales, y reveló la presencia de proteínas carboniladas ya en el hígado de los individuos más jóvenes (con las tasas metabólicas más altas), e incluso sorprendentemente mayor respecto a los adultos. Por lo tanto, es necesario el futuro análisis de proteínas oxidadas en estos peces incluyendo individuos en estadios tempranos de su ciclo de vida (3 meses o menos), intermedios (5 meses) y otros al final del mismo (7 meses o más). Además se debería analizar biopsias de hígado y músculo a fin de

poder seguir la acumulación de proteínas carboniladas en dos tipos de células (mitóticas y post-mitóticas).

## CAPITULO 3

---

*Biomarcador  
de senescencia  
celular en  
Austrolebias  
charrua*

## CAPITULO 3 - Índice

INTRODUCCIÓN .....	142
Senescencia celular y envejecimiento del organismo .....	142
La lipofuscina: biomarcador del envejecimiento .....	142
Acumulación de lipofuscina en diferentes órganos de peces teleósteos .....	143
HIPÓTESIS.....	144
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	144
MATERIALES y MÉTODOS .....	145
Fijación del tejido.....	145
Procesamiento del tejido para inclusión en parafina y cortes histológicos .....	145
Preparaciones histológicas para tinción con hematoxilina y eosina .....	145
Preparaciones histológicas y cuantificación de lipofuscina .....	145
RESULTADOS.....	146
Estructura del músculo esquelético de <i>A. charrua</i> .....	146
Detección de lipofuscina durante el envejecimiento de <i>A. charrua</i> en la naturaleza .....	146
Cuantificación de la acumulación de lipofuscina durante el envejecimiento: .....	148
DISCUSIÓN .....	150
Estructura del músculo esquelético de <i>A. charrua</i> .....	150
Acumulación de lipofuscina durante el envejecimiento de <i>A. charrua</i> .....	150
CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS.....	150

## INTRODUCCIÓN

---

### *Senescencia celular y envejecimiento del organismo*

Cuando las células son expuestas a potenciales estímulos oncogénicos, tales como el acortamiento de los telómeros, daños en el ADN o expresión de algunos oncogenes, se inducen mecanismos supresores de tumores y las células dañadas detienen su ciclo celular. En las células de mamíferos, los mecanismos de defensa mejor conocidos son la senescencia celular y la apoptosis (muerte celular programada). Si alguno de estos mecanismos falla, la célula adquiere un fenotipo maligno resultando en la formación de tumores (Takahashi, 2007).

La senescencia celular, fue inicialmente descrita a partir de cultivos celulares de fibroblastos humanos normales que se replicaban un número limitado de veces (senescencia replicativa) (Hayflick and Moorhead, 1961). La proliferación celular generalmente se detiene en la fase G1 pero las células mantienen su actividad metabólica y pueden permanecer esencialmente viables indefinidamente (Matsumura et al., 1979; Pignolo et al., 1998).

En términos generales la senescencia celular se desencadena en respuesta a un daño en el ADN no reparado o al acortamiento de los telómeros. Dos tipos de daños en el ADN inducidos por niveles fisiológicos de ROS pueden tener un impacto significativo sobre la senescencia celular. Por un lado, un corte de simple hebra ineficientemente reparado en el ADN telomérico que ocasiona el acortamiento de los telómeros; por otro lado, daños en el ADNmt interrelacionados con la producción mitocondrial de ROS (Passos et al., 2007).

Teniendo en cuenta que las células senescentes pueden tener efectos deletéreos, incluido el envejecimiento del organismo, es crucial poder diferenciarlas de las células saludables y quiescentes presentes en los tejidos normales. Para ello, se han identificado biomarcadores que permiten diferenciar los fenotipos moleculares de las células senescentes.

### *La lipofuscina: biomarcador del envejecimiento*

Un biomarcador ampliamente empleado en la detección de células senescentes es la lipofuscina o “pigmento del envejecimiento”. Se origina por la auto-fagocitosis de componentes celulares que fueron oxidados dentro o fuera del lisosoma y está constituida por proteínas oxidadas y residuos de la degradación de lípidos. Aunque su composición varía significativamente entre los diferentes tipos celulares, es un pigmento insoluble que no puede ser degradado por las hidrolasas lisosomales ni ser exocitado. Una de sus propiedades más importantes es que es autofluorescente, lo que hace posible su cuantificación (Terman and Brunk, 2004).

Se ha encontrado que su acumulación a lo largo del tiempo en las células post-mitóticas (por ej. neuronas) puede ser perjudicial para las funciones celulares. La proliferación celular es el único mecanismo conocido que permite a las células deshacerse de la “basura” (Brunk and Terman, 2002). Por esta razón, las células proliferativas presentan alteraciones menores con el paso del tiempo mientras que las células post-mitóticas de vida larga envejecen y finalmente sufren una muerte celular programada (apoptosis) (Terman and Brunk, 2004).

### *Acumulación de lipofuscina en diferentes órganos de peces teleósteos*

Debido a su propiedad autofluorescente y por ser uno de los marcadores candidato de la senescencia celular, muchas investigaciones sobre el envejecimiento animal llevadas a cabo en diferentes modelos de peces han determinado la presencia de lipofuscina en diferentes órganos y tipos celulares.

El primer análisis sobre la acumulación de lipofuscina durante el envejecimiento de un pez teleósteo se llevó a cabo en células de músculo esquelético y cardíaco de ejemplares juveniles (5 meses de vida) y seniles (24 meses de vida) de *Danio rerio*. En ambos tejidos, no se pudo detectar la acumulación de este pigmento asociada al envejecimiento (Kishi et al., 2003).

En *Oryzias latipes*, se determinó la acumulación de lipofuscina en el hígado y en el corazón. En ambos tipos celulares, los autores observaron prominentes depósitos de lipofuscina en los hepatocitos de los individuos de 16 y 24 meses y no en los más jóvenes de 6 meses (Ding et al., 2010).

En los últimos 10 años, los peces anuales han adquirido protagonismo como animales modelo para estudiar el envejecimiento. Los primeros estudios realizados en células del hígado de *N. furzeri* revelaron un aumento del pigmento lipofuscina durante el envejecimiento de esta especie (Genade et al., 2005; Terzibasi et al., 2009). Posteriormente, también se observó una acumulación de lipofuscina en células del epitelio de las branquias de *N. rachovii* (Hsu et al., 2008) y en el hígado de *N. guentheri* (Liu et al., 2012).

## HIPÓTESIS

---

Se produce una acumulación del biomarcador lipofuscina como consecuencia del envejecimiento del músculo esquelético en *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- a) Determinar la estructura de las células musculares de *A. charrua*.
- b) Determinar la acumulación del biomarcador lipofuscina en individuos jóvenes, adultos y seniles de *A. charrua* colectados en la naturaleza.

## MATERIALES y MÉTODOS

---

### *Fijación del tejido*

Se analizaron 3 hembras juveniles, 1 hembra y 2 machos adultos y 1 hembra y 2 machos seniles de *A. charrua* colectados en el charco temporal ubicado en "La Coronilla" (Apéndice 1).

Los individuos fueron anestesiados con una sobredosis de una solución al 1% de 2-fenoxietanol (Sigma) según un protocolo previamente aprobado por la CNEA (Comisión Nacional de Experimentación Animal) y posteriormente una muestra de músculo esquelético de aproximadamente 50 mg fue fijada en 1 ml de PFA 4%. A las 24 se repuso con PFA 4% nuevo y luego el tejido se guardó a 4°C en solución de PBS 1X.

### *Procesamiento del tejido para inclusión en parafina y cortes histológicos*

El procedimiento para la inclusión del tejido en parafina se describe en el Apéndice 4.

Se realizaron secciones de 5µm en un micrótopo Reichert-Jung Mod. 1130/Biocut y se adhirieron a portaobjetos de vidrio sin ningún tipo de adhesivo. Se guardaron en oscuridad y a temperatura ambiente.

### *Preparaciones histológicas para tinción con hematoxilina y eosina*

La desparafinización e hidratación se realizaron de acuerdo a procedimientos estándares de histología y se describen en el Apéndice 4.

### *Preparaciones histológicas y cuantificación de lipofuscina*

La desparafinización e hidratación se realizaron de la misma manera que en el paso anterior y se tiñeron los núcleos con una solución de Hoechst (1:8000) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, los tejidos se lavaron 2 veces con PBS 1X, durante 10 minutos cada uno y se guardaron en oscuridad y a temperatura ambiente.

Los preparados fueron visualizados en un microscopio NIKON ECLIPSE 50i. La autofluorescencia de los gránulos de lipofuscina fue observada a una excitación de 488nm. Se tomaron 10 imágenes al azar de cada muestra. El análisis y procesamiento de las imágenes se llevó a cabo utilizando el paquete informático ImageJ (Collins, 2007). Se graficó el promedio de intensidad con su error estándar. Las diferencias significativas se determinaron a partir de valores-p ( $p < 0,05$ ) calculados mediante un test t-student con una distribución de 2 colas.

## RESULTADOS

### *Estructura del músculo esquelético de A. charrua*

La tinción convencional de HyE de músculo esquelético de una hembra joven de *A. charrua* reveló que, al igual que en el resto de los vertebrados, estas células musculares son fusiformes y multinucleadas, con los núcleos localizados en la periferia de la fibra (Figura 40).

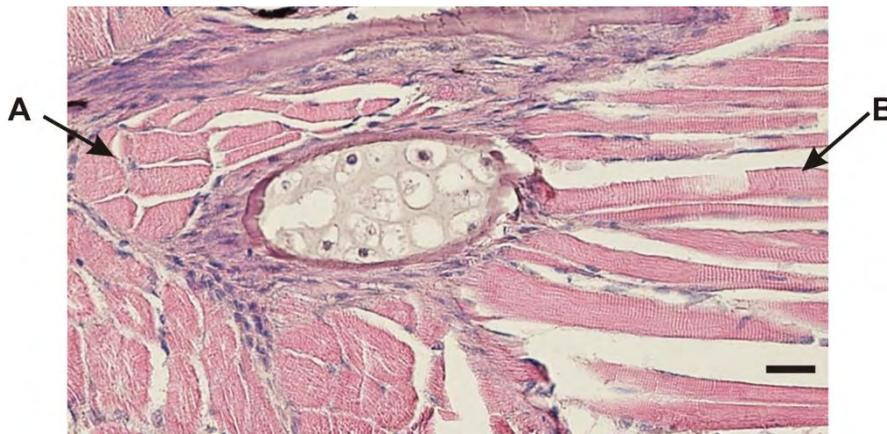


Figura 40. Estructura del músculo estriado de *A. charrua*. Corte histológico teñido con HyE de una hembra de *A. charrua* colectada en la naturaleza al inicio de su ciclo de vida (20X). (A) corte transversal de una fibra muscular donde se distinguen los núcleos (azul/púrpura) localizados en la periferia del sarcoplasma (rosa). (B) corte longitudinal de la fibra muscular con los núcleos localizados a lo largo del sarcoplasma. En estas fibras puede apreciarse la estriación característica de este tipo muscular. Escala=1000µm.

### *Detección de lipofuscina durante el envejecimiento de A. charrua en la naturaleza*

La lipofuscina aparece como puntos verdes fluorescentes en el citoplasma celular. En las fibras musculares, este pigmento se observa como una línea verde fluorescente en la periferia de la célula. El músculo esquelético de los individuos jóvenes presenta muy poca lipofuscina (Figura 41a) mientras que se observa un aumento de este pigmento en los individuos adultos y seniles (Figura 41b y c).

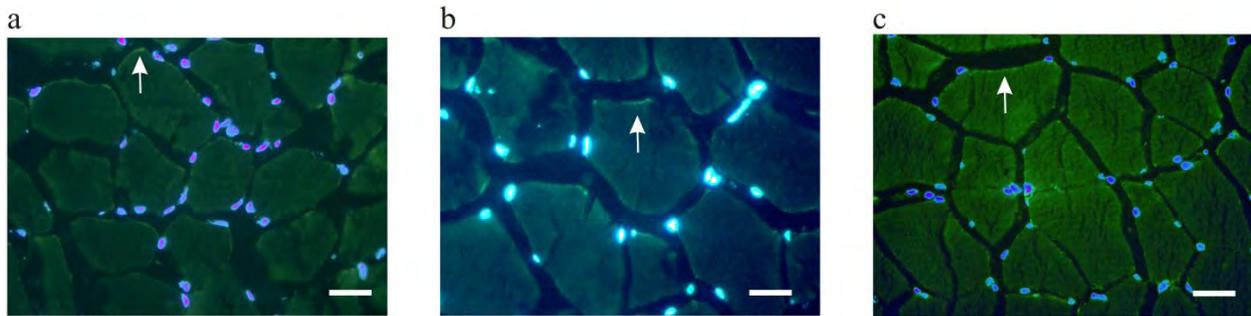


Figura 41. Acumulación de lipofuscina en el músculo esquelético de hembras de *A. charrua* colectadas en la naturaleza. Cortes histológicos transversales de las fibras musculares observados a una excitación de 488nm (40X). a) Hembra joven colectada al inicio del ciclo de vida, b) Hembra adulta colectada 2 meses después y c) Hembra senil colectada al final del ciclo de vida. En azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst (1:8000) y en verde opaco el sarcoplasma. En la periferia de la fibra, se observan regiones verdes fluorescentes que corresponden a la acumulación de lipofuscina (flecha blanca). Escala=1000 $\mu$ m.

Al ampliar una de las células de la Figura 41c, se observan claramente los gránulos de lipofuscina acumulados en la periferia de la fibra muscular (Figura 42).

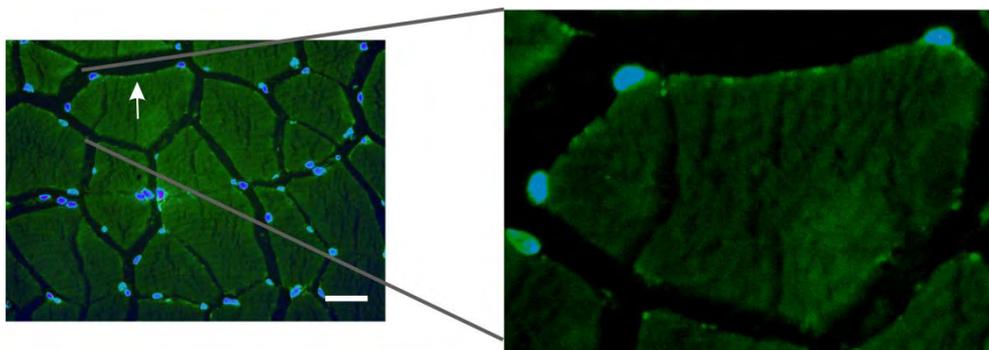


Figura 42. Acumulación de lipofuscina en una de las fibras musculares de la figura 41c. En azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst (1:8000) y en verde opaco el sarcoplasma. En la periferia de la fibra, se observan regiones verdes fluorescentes que corresponden a la acumulación de lipofuscina.

La acumulación de este pigmento autofluorescente también se ha detectado en músculo esquelético de machos de *A. charrua* colectados en el campo (Figura 43).

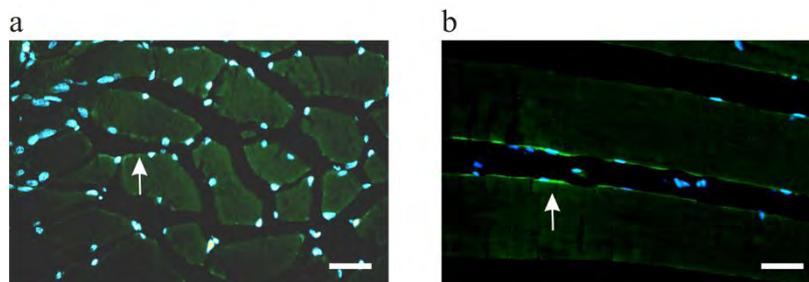


Figura 43. Acumulación de lipofuscina en el músculo esquelético de machos de *A. charrua* colectados en la naturaleza. Cortes histológicos de las fibras musculares observados a una excitación de 488nm (40X). a) Corte transversal del músculo de un macho adulto colectado en la mitad de su ciclo de vida, b) Corte longitudinal del músculo de un macho senil colectado al final del ciclo de vida. En azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst (1:8000) y en verde opaco el sarcoplasma. En la periferia de la fibra, se observan regiones verdes fluorescentes que corresponden a la acumulación de lipofuscina (flecha blanca). Escala=1000 $\mu$ m.

Cuantificación de la acumulación de lipofuscina durante el envejecimiento:

Se utilizó el programa ImageJ para la cuantificación de lipofuscina en 5 imágenes tomadas al azar en cada uno de los individuos analizados. En cada una de ellas se seleccionó la región fluorescente correspondiente a la acumulación del pigmento y se cuantificó mediante el valor CTCF.

En el tejido muscular esquelético de las hembras de *A. charrua*, aumenta en forma significativa la presencia del pigmento autofluorescente lipofuscina con el envejecimiento (Figura 44).

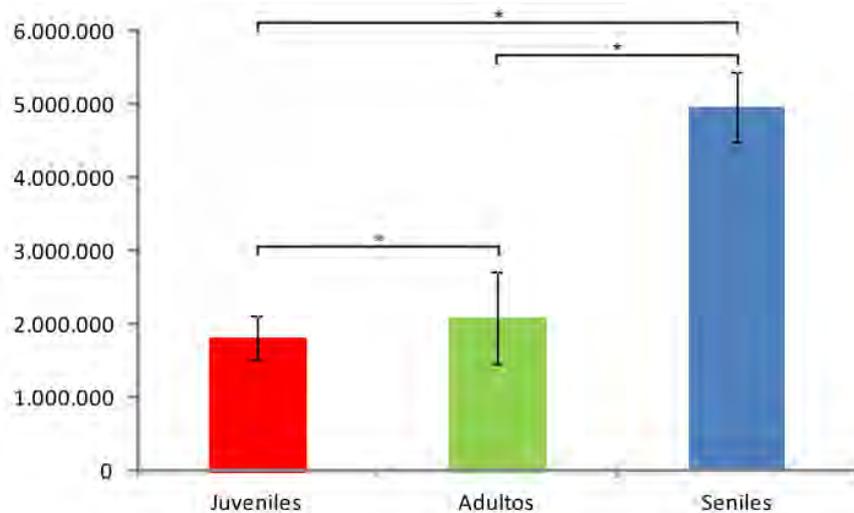


Figura 44. Aumento de la lipofuscina en el músculo esquelético de hembras de *A. charrua* colectadas en la naturaleza. Gráfica del promedio de la intensidad de fluorescencia en cada estadio ontogénico  $\pm$  el desvío estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Se detectó un aumento significativo de este pigmento en las células musculares de hembras de *A. charrua* colectadas en la naturaleza en etapas más avanzadas de su ciclo de vida.

En el tejido muscular esquelético de los machos de *A. charrua* se observó una leve acumulación del pigmento en los individuos más viejos (Figura 45).

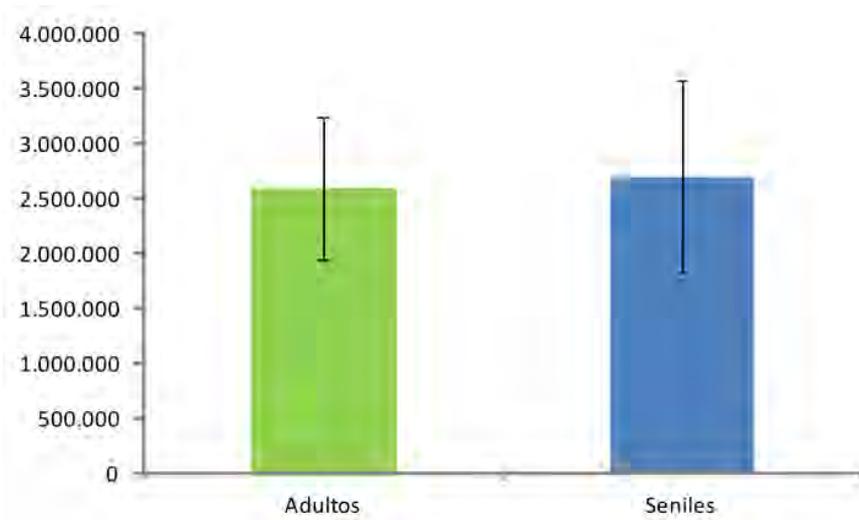


Figura 45. Aumento de la lipofuscina en el músculo esquelético de machos de *A. charrua* colectados en la naturaleza. Gráfica del promedio de la intensidad de fluorescencia en cada estadio ontogenético  $\pm$  el desvío estándar.

En las células musculares de los machos de *A. charrua* colectados en la naturaleza, no se detectó un aumento significativo de lipofuscina durante el envejecimiento.

## DISCUSIÓN

---

### *Estructura del músculo esquelético de A. charrua*

Con el objetivo de contar con imágenes de referencia que permitieran visualizar la localización de la lipofuscina se determinó la estructura del músculo estriado en el pez anual *A. charrua*. Al igual que en el resto de los vertebrados, estas células musculares son fusiformes y multinucleadas, con los núcleos localizados en la periferia de la fibra (Figura 40).

### *Acumulación de lipofuscina durante el envejecimiento de A. charrua*

La lipofuscina es material intracelular rodeado de membrana que se localiza en el interior de los lisosomas. Representa restos del proceso de degradación lisosómica de diversos componentes celulares y se acumula debido a que no puede ser degradado en su totalidad o eliminado por exocitosis (Jung et al., 2007). Este pigmento se acumula progresivamente con la edad de los organismos y es muy utilizado en estudios sobre el envejecimiento celular de muchos tejidos somáticos. Este biomarcador también es muy utilizado en estudios sobre el envejecimiento celular en peces. Por ejemplo, se ha confirmado que la lipofuscina está relacionada al envejecimiento en el hígado y corazón de *Oryzias latipes* (Ding et al., 2010). Dentro de los peces anuales, se ha observado un incremento de este pigmento en el hígado de *N. furzeri* (Genade et al. 2005), en el tejido epitelial de las branquias de *N. rachovii* (Hsu et al. 2008) y en el hígado de *N. guentheri* (Liu et al. 2012). Nuestros resultados sugieren que la acumulación de lipofuscina en el músculo esquelético de hembras (Figuras 41 y 44) de *A. charrua* está asociada al envejecimiento de esta especie y concuerdan con los resultados descritos en otros peces.

## CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

---

El pigmento lipofuscina, constituido por proteínas oxidadas y residuos de la degradación de lípidos, se acumula en los lisosomas de las células musculares durante el envejecimiento de *A. charrua* en el naturaleza. Como las células musculares son post-mitóticas, habría que determinar qué pasa con la acumulación de lipofuscina en células mitóticas, como los hepatocitos, a fin de determinar si este pigmento es un buen biomarcador del envejecimiento de todos los tejidos de *A. charrua*. También habría que determinar si el mismo patrón de acumulación ocurre durante el envejecimiento de los individuos en cautiverio, ya que las condiciones ambientales son diferentes.

## CONCLUSIONES GENERALES

---

- Los diferentes abordajes interdisciplinarios implementados en esta Tesis muestran patrones moleculares de senescencia concordantes, poniendo de manifiesto que éstos pueden ser detectables desde etapas tempranas del ciclo de vida (juveniles). Los individuos juveniles de *A. charrua* presentan características moleculares del envejecimiento (acumulación de mutaciones en el ADNmt, elevada concentración de proteínas carboniladas y acumulación de lipofuscina) que son observadas en etapas más avanzadas de la ontogenia en otros vertebrados que no presentan un ciclo de vida anual.
- A pesar de la detección precoz de los eventos de senescencia en los juveniles, en general nuestros resultados sugieren que las especies de *Austrolebias* presentan patrones típicos del envejecimiento de los vertebrados, tales como: un posible acortamiento de los telómeros, disminución del RCR, aumento de las proteínas carboniladas y acumulación de lipofuscina.
- No se observaron diferencias notorias en la acumulación de cambios en el ADNmt entre las poblaciones naturales y las progenes obtenidas en cautiverio.
- Nuestros resultados sugieren que *Austrolebias charrua* podría ser un buen modelo animal para estudiar los diferentes aspectos moleculares del envejecimiento de vertebrados, tanto en poblaciones naturales como en pedigrí de laboratorio. La abundancia de individuos en poblaciones naturales, así como su viabilidad en condiciones de cautiverio, permiten la realización de abordajes interdisciplinarios en esta temática tan compleja.

## AGRADECIMIENTOS

---

- A Dra. Rebeca Chávez, Dr. Gustavo Folle y Dra. Adriana Cassina por aceptar evaluar esta tesis y los valiosos aportes brindados.
- A Graciela, por orientarme en este nuevo desafío, su invaluable enseñanza y apoyo, tanto académico como personal, a lo largo de tantos años.
- A Nibia y Ana por co-orientarme y aceptar el desafío de incursionar en técnicas nunca antes implementadas en este modelo animal de peces.
- Al PEDECIBA.
- A la ANII por la beca concedida, sin la cual hubiese sido difícil llevar a cabo esta tesis.
- A Néstor, Nico, Ale y Cristhian por su ayuda y colaboración en las colectas de campo y en el cuidado de los peces en el acuario.
- A todos mis compañeros del laboratorio (Lucía, Ileana, Viviana, Cece, Cecilia, Néstor, Nico, Ale, Wilson, y Cristhian) por el apoyo brindado en el día a día.
- A Nico Papa por algunas fotos de *A. charrua* viejos.
- A todos los docentes, pasantes y estudiantes de la Sección Genética Evolutiva, por su colaboración y consejos.
- A Laura Castro y Fiorella Scandroglio (LOBBM) por su ayuda, conocimiento y buena disponibilidad con los experimentos realizados en el OROBOROS.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Físicoquímica Biológica (Mariano, Leonardo y Lía) por su ayuda con los experimentos de WB.
- A todos los integrantes de la Sección Biología Celular (María, Nico y Jimena) por su ayuda y consejos con las preparaciones histológicas.
- A Bettina, Caco y Marcelo por la colaboración con la colecta de junio de 2011.
- A toda la Sección Virología, por los consejos, el apoyo brindado y los almuerzos compartidos.
- A todo el grupo del laboratorio de la Dra. Laura Neiderhofer (Univ. de Pittsburgh, USA).
- A Laura Rodríguez por el proyecto FCE (copépodos).
- A Graciela García por el proyecto FCE (NGS).
- A mis amigos del grupo “peixes” (Julia, Laurita, Silvana, Mareney y Sebastián) que a pesar de la distancia me apoyaron y estimularon a seguir adelante con este proyecto.
- A todas mis amigas/os por su amistad incondicional y el “aguante” a lo largo de todos estos años.
- A toda mi familia por el apoyo emocional y la contención brindada, siempre.
- A mi madre, por su apoyo incondicional durante toda mi vida.

## ***REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- Ansorge, W.J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnol.* 25, 195–203.
- Arenzon, A., Lemos, C., and Bohrer, M. (2002). The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoeilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Braz. J. Biol.* 62, 743–747.
- Arezo, M., Pereiro, L., and Berois, N. (2005). Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *J. Fish Biol.* 66, 1357–1370.
- Arezo, M.J., D'Alessandro, S., Papa, N., de Sá, R., and Berois, N. (2007). Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue Cell* 39, 89–98.
- Ashok, B.T., and Ali, R. (1999). The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp. Gerontol.* 34, 293–303.
- Au, D.W., Mok, H.O., Elmore, L.W., and Holt, S.E. (2009). Japanese medaka: a new vertebrate model for studying telomere and telomerase biology. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 161–167.
- Austad, S.N. (2009). Comparative biology of aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 64, 199–201.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–495.
- Ballard, J.W.O. (2000). Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *J. Mol. Evol.* 51, 48–63.
- Ballesteros, M., Fredriksson, Å., Henriksson, J., and Nyström, T. (2001). Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *EMBO J.* 20, 5280–5289.
- Bartke, A. (2011). Single-gene mutations and healthy ageing in mammals. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 28–34.
- Bazin, E., Glémin, S., and Galtier, N. (2006). Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312, 570–572.
- Bernardi, G., and Powers, D.A. (1995). Phylogenetic relationships among nine species from the genus *Fundulus* (Cyprinodontiformes, Fundulidae) inferred from sequences of the cytochrome b gene. *Copeia* 469–473.
- Berois, N., Arezo, M.J., Papa, N.G., and Clivio, G.A. (2012). Annual fish: developmental adaptations for an extreme environment. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 595–602.
- Blackburn, E.H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569–573.

- Boesch, P., Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Tarasenko, V., Cosset, A., Paulus, F., Lightowers, R.N., and Dietrich, A. (2011). DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* 1813, 186–200.
- Bogenhagen, D., and Clayton, D.A. (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11, 719–727.
- Bogenhagen, D.F., and Clayton, D.A. (2003). The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci.* 28, 357–360.
- Bogenhagen, D.F., Wang, Y., Shen, E.L., and Kobayashi, R. (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol. Cell. Proteomics* 2, 1205–1216.
- Brunk, U.T., and Terman, A. (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 611–619.
- Busuttill, R.A., Garcia, A.M., Reddick, R.L., Dollé, M.E., Calder, R.B., Nelson, J.F., and Vijg, J. (2007). Intra-organ variation in age-related mutation accumulation in the mouse. *PLoS One* 2, e876.
- Cardozo, V. (1999). Tasa metabólica y excreción del nitrógeno en peces anuales *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes). MSc. Dissertation. Thesis. PEDECIBA. Facultad de Ciencias. UdelaR. Uruguay.
- Chang, J.H., and Tong, L. (2012). Mitochondrial poly (A) polymerase and polyadenylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gene Regul. Mech.* 1819, 992–997.
- Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., and Hulihan, M. (2004).  $\alpha$ -Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *The Lancet* 364, 1167–1169.
- Church, G.M. (2006). Genomes for all. *Sci. Am.* 294, 46–54.
- Clayton, D.A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28, 693–705.
- Codes, G. (2011). Sequencher version 4.10. 1 sequence analysis software.
- Collins, T.J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 43, 25–30.
- Cooper, E.L., Zapata, A., Garcia Barrutia, M., and Ramirez, J.A. (1983). Aging changes in lymphopoietic and myelopoietic organs of the annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. *Exp. Gerontol.* 18, 29–38.
- Cortopassi, G., Shibata, D., Soong, N., and Arnheim, N. (1992). A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 7370–7374.
- Costa, W. (1989). Análise filogenética da família Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei). *Rev. Bras. Biol.* 50, 65–82.
- Costa, W.J. (1996). Pearl Killifishes: The Cynolebiatinae: systematics and biogeography of the Neotropical annual fish subfamily (Cyprinodontiformes: Rivulidae) (TFH Publications).
- Costa, W.J. (2006). The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa* 1–162.

- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., and Milzani, A. (2003a). Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* *9*, 169–176.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., and Colombo, R. (2003b). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* *329*, 23–38.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., and Milzani, A. (2006a). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* *10*, 389–406.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., and Milzani, A. (2006b). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* *52*, 601–623.
- De Magalhães, J.P., and Church, G.M. (2007). Analyses of human–chimpanzee orthologous gene pairs to explore evolutionary hypotheses of aging. *Mech. Ageing Dev.* *128*, 355–364.
- De Magalhães, J.P., Finch, C.E., and Janssens, G. (2010). Next-generation sequencing in aging research: emerging applications, problems, pitfalls and possible solutions. *Ageing Res. Rev.* *9*, 315–323.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 9363–9367.
- Ding, L., Kuhne, W.W., Hinton, D.E., Song, J., and Dynan, W.S. (2010). Quantifiable biomarkers of normal aging in the Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *PLoS One* *5*, e13287.
- Dufour, E., Terzioglu, M., Sterky, F.H., Sörensen, L., Galter, D., Olson, L., Wilbertz, J., and Larsson, N.-G. (2008). Age-associated mosaic respiratory chain deficiency causes trans-neuronal degeneration. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1418–1426.
- Dukan, S., Farewell, A., Ballesteros, M., Taddei, F., Radman, M., and Nyström, T. (2000). Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 5746–5749.
- Eisen, J.S. (1996). Zebrafish make a big splash. *Cell* *87*, 969–977.
- Elson, J., Turnbull, D., and Howell, N. (2004). Comparative genomics and the evolution of human mitochondrial DNA: assessing the effects of selection. *Am. J. Hum. Genet.* *74*, 229–238.
- Errea, A., and Danulat, E. (2001). Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. *Environ. Biol. Fishes* *61*, 261–268.
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N.-G., and Gustafsson, C.M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat. Genet.* *31*, 289–294.
- Falkenberg, M., Larsson, N.-G., and Gustafsson, C.M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* *76*, 679–699.
- Funayama, R., and Ishikawa, F. (2007). Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* *116*, 431–440.

- Garcia, A.M., Calder, R.B., Dollé, M.E., Lundell, M., Kapahi, P., and Vijg, J. (2010). Age- and temperature-dependent somatic mutation accumulation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* *6*, e1000950.
- García, G., Wlasiuk, G., and Lessa, E.P. (2000). High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zool. J. Linn. Soc.* *129*, 93–110.
- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Bliek, A.M., and Spelbrink, J.N. (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1583–1596.
- Genade, T., Benedetti, M., Terzibasi, E., Roncaglia, P., Valenzano, D.R., Cattaneo, A., and Cellerino, A. (2005). Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell* *4*, 223–233.
- Gerhard, G.S. (2003). Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Exp. Gerontol.* *38*, 1333–1341.
- Gerhard, G.S., Kauffman, E.J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J.L., Kasales, C.J., Demidenko, E., and Cheng, K.C. (2002). Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Gerontol.* *37*, 1055–1068.
- Graf, M., Hartmann, N., Reichwald, K., and Englert, C. (2013). Absence of replicative senescence in cultured cells from the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*. *Exp. Gerontol.* *48*, 17–28.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., and Davies, K.J. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and “aggresomes” during oxidative stress, aging, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2519–2530.
- Grune, T., Merker, K., Jung, T., Sitte, N., and Davies, K.J.A. (2005). Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. *Free Radic. Biol. Med.* *39*, 1208–1215.
- Guarente, L., and Kenyon, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* *408*, 255–262.
- Gupta, A., Hasan, M., Chander, R., and Kapoor, N. (1991). Age-related elevation of lipid peroxidation products: diminution of superoxide dismutase activity in the central nervous system of rats. *Gerontology* *37*, 305–309.
- Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B., and Keightley, P.D. (2008). Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* *6*, e204.
- Hara, K., Fujita, H., Johnson, T.A., Yamauchi, T., Yasuda, K., Horikoshi, M., Peng, C., Hu, C., Ma, R.C., and Imamura, M. (2014). Genome-wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 239–246.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.
- Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J. Gerontol.* *11*, 298–300.

- Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* *20*, 145–147.
- Hartmann, N., Reichwald, K., Lechel, A., Graf, M., Kirschner, J., Dorn, A., Terzibasi, E., Wellner, J., Platzer, M., Rudolph, K.L., et al. (2009). Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Mech. Ageing Dev.* *130*, 290–296.
- Hartmann, N., Reichwald, K., Wittig, I., Dröse, S., Schmeisser, S., Lück, C., Hahn, C., Graf, M., Gausmann, U., and Terzibasi, E. (2011). Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell* *10*, 824–831.
- Hayflick, L. (1965). The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *37*, 614–636.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *25*, 585–621.
- Henn, B.M., Gignoux, C.R., Feldman, M.W., and Mountain, J.L. (2009). Characterizing the time dependency of human mitochondrial DNA mutation rate estimates. *Mol. Biol. Evol.* *26*, 217–230.
- Herrera, M., and Jagadeeswaran, P. (2004). Annual fish as a genetic model for aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *59*, B101–B107.
- Holt, I.J., and Jacobs, H.T. (2003). Response: The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 355–356.
- Holt, I.J., Lorimer, H.E., and Jacobs, H.T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* *100*, 515–524.
- Hrbek, T., and Larson, A. (1999). The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): a molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution* *1200*–1216.
- Hrbek, T., and Meyer, A. (2003). Closing of the Tethys Sea and the phylogeny of Eurasian killifishes (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). *J. Evol. Biol.* *16*, 17–36.
- Hsu, C.-Y., Chiu, Y.-C., Hsu, W.-L., and Chan, Y.-P. (2008). Age-related markers assayed at different developmental stages of the annual fish *Nothobranchius rachovii*. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *63*, 1267–1276.
- Huang, S., Wang, C., and Li, H. (2014). Natural Selection on Human Mitochondrial DNA. *Biotechnol. Front.* *3*.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D., and Wilson, A.C. (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* *32*, 128–144.
- Itsara, L.S., Kennedy, S.R., Fox, E.J., Yu, S., Hewitt, J.J., Sanchez-Contreras, M., Cardozo-Pelaez, F., and Pallanck, L.J. (2014). Oxidative stress is not a major contributor to somatic mitochondrial DNA mutations. *PLoS Genet.* *10*, e1003974.
- Iwasaki, W., Fukunaga, T., Isagozawa, R., Yamada, K., Maeda, Y., Satoh, T.P., Sado, T., Mabuchi, K., Takeshima, H., and Miya, M. (2013). MitoFish and MitoAnnotator: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Mol. Biol. Evol.* *30*, 2531–2540.

- Jana, C.K., Das, N., and Sohal, R.S. (2002). Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 433–439.
- Jenuth, J.P., Peterson, A.C., and Shoubridge, E.A. (1997). Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat. Genet.* 16, 93–95.
- Jühling, F., Pütz, J., Bernt, M., Donath, A., Middendorf, M., Florentz, C., and Stadler, P.F. (2012). Improved systematic tRNA gene annotation allows new insights into the evolution of mitochondrial tRNA structures and into the mechanisms of mitochondrial genome rearrangements. *Nucleic Acids Res.* 40, 2833–2845.
- Jung, T., Bader, N., and Grune, T. (2007). Lipofuscin: Formation, Distribution, and Metabolic Consequences. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1119, 97–111.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P. d L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011–2015.
- Kipling, D. (2001). Telomeres, replicative senescence and human ageing. *Maturitas* 38, 25–37.
- Kishi, S. (2004). Functional Aging and Gradual Senescence in Zebrafish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 521–526.
- Kishi, S. (2011). The search for evolutionary developmental origins of aging in zebrafish: A novel intersection of developmental and senescence biology in the zebrafish model system. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 93, 229–248.
- Kishi, S., Uchiyama, J., Baughman, A.M., Goto, T., Lin, M.C., and Tsai, S.B. (2003). The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Proc. 2nd Symp. Org. Slow Aging SOSA-2* 38, 777–786.
- Kishido, T., Unno, K., Yoshida, H., Choba, D., Fukutomi, R., Asahina, S., Iguchi, K., Oku, N., and Hoshino, M. (2007). Decline in glutathione peroxidase activity is a reason for brain senescence: consumption of green tea catechin prevents the decline in its activity and protein oxidative damage in ageing mouse brain. *Biogerontology* 8, 423–430.
- Klein, R.J., Zeiss, C., Chew, E.Y., Tsai, J.-Y., Sackler, R.S., Haynes, C., Henning, A.K., SanGiovanni, J.P., Mane, S.M., and Mayne, S.T. (2005). Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308, 385–389.
- Kowald, A. (2001). The mitochondrial theory of aging. *Neurosignals* 10, 162–175.
- Krzywinski, M., Schein, J., Birol, Í., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S.J., and Marra, M.A. (2009). Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 19, 1639–1645.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 113, 3613–3622.
- Lagouge, M., and Larsson, N. (2013). The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J. Intern. Med.* 273, 529–543.

- Larsson, N.-G. (2010). Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 683–706.
- Larsson, N., and Clayton, D.A. (1995). Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu. Rev. Genet.* 29, 151–178.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195.
- Lee, J.-S., Miya, M., Lee, Y.-S., Kim, C.G., Park, E.-H., Aoki, Y., and Nishida, M. (2001). The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) and the first description of duplication of a control region in fish. *Gene* 280, 1–7.
- Librado, P., and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Liu, R.K., and Walford, R.L. (1966). Increased growth and life-span with lowered ambient temperature in the annual fish, *Cynolebias adloffii*.
- Liu, C., Wang, X., Feng, W., Li, G., Su, F., and Zhang, S. (2012). Differential expression of aging biomarkers at different life stages of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Biogerontology* 13, 501–510.
- Liu, R., Leung, B., and Walford, R. (1975). Effect of temperature-transfer on growth of laboratory populations of a South American annual fish *Cynolebias bellottii*. *Growth* 39, 337–343.
- Lubert, S. (1995). *Bioquímica*. Reverté Barc.
- Lucas-Sánchez, A., Almáida-Pagán, P.F., Mendiola, P., and de Costa, J. (2014). *Nothobranchius* as a model for aging studies. A review. *Aging Dis.* 5, 281–291.
- Lund, T.C., Glass, T.J., Tolar, J., and Blazar, B.R. (2009). Expression of telomerase and telomere length are unaffected by either age or limb regeneration in *Danio rerio*. *PLoS One* 4, e7688.
- Maisonneuve, E., Ducret, A., Khoueiry, P., Lignon, S., Longhi, S., Talla, E., and Dukan, S. (2009). Rules governing selective protein carbonylation. *PLoS One* 4, e7269.
- Mardis, E.R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 24, 133–141.
- Markofsky, J., and Perlmutter, A. (1972). Age at sexual maturity and its relationship to longevity in the male annual cyprinodont fish, *nothobranchius guentheri*. *Exp. Gerontol.* 7, 131–135.
- Martin, A.P., and Palumbi, S.R. (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 4087–4091.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Medvedev, Z.A. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev.* 65, 375–398.

- Melov, S., Lithgow, G., Fischer, D., Tedesco, P., and Johnson, T. (1995). Increased frequency of deletions in the mitochondrial genome with age of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* *23*, 1419–1425.
- Miquel, J. (2006). Integración de teorías del envejecimiento (parte I). *Rev. Esp. Geriatria Gerontol.* *41*, 55–63.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., and Johnson Jr., J.E. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* *15*, 575–591.
- Møller, I.M., Rogowska-Wrzęsinska, A., and Rao, R. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J. Proteomics* *74*, 2228–2242.
- Moosmann, B., and Behl, C. (2008). Mitochondrially encoded cysteine predicts animal lifespan. *Aging Cell* *7*, 32–46.
- Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* *59*, 521–529.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., and Wu, J.-R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *85*, 6622–6626.
- Murphy, W.J., and Collier, G.E. (1996). Phylogenetic relationships within the aplocheiloid fish genus *Rivulus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae): implications for Caribbean and Central American biogeography. *Mol. Biol. Evol.* *13*, 642–649.
- Murphy, M.P., Holmgren, A., Larsson, N.-G., Halliwell, B., Chang, C.J., Kalyanaraman, B., Rhee, S.G., Thornalley, P.J., Partridge, L., and Gems, D. (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.* *13*, 361–366.
- Navarro, A., and Boveris, A. (2007). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *292*, C670–C686.
- Navarro, A., Del Pino, M.J.S., Gómez, C., Peralta, J.L., and Boveris, A. (2002). Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *282*, R985–R992.
- Oliver, C.N., Ahn, B.-W., Moerman, E.J., Goldstein, S., and Stadtman, E.R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* *262*, 5488–5491.
- Osawa, S., Jukes, T., Watanabe, K., and Muto, A. (1992). Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.* *56*, 229.
- Ossum, C.G., Hoffmann, E.K., Vijayan, M., Holt, S., and Bols, N. (2004). Characterization of a novel fibroblast-like cell line from rainbow trout and responses to sublethal anoxia. *J. Fish Biol.* *64*, 1103–1116.
- Palumbi, S. (1991). Simple fool's guide to PCR.
- Pansarasa, O., Bertorelli, L., Vecchiet, J., Felzani, G., and Marzatico, F. (1999). Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* *27*, 617–622.

- Pardue, M.-L., and DeBaryshe, P.G. (2008). *Drosophila* telomeres: a variation on the telomerase theme. *Fly Austin 2*.
- Parenti, L.R. (1981). A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the AMNH*; v. 168, article 4.
- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Pöyhönen, M., and Paetau, A. (2014). A novel  $\alpha$ -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol. Aging*.
- Passos, J.F., Saretzki, G., and von Zglinicki, T. (2007). DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 35, 7505–7513.
- Pignolo, R.J., Martin, B.G., Horton, J.H., Kalbach, A.N., and Cristofalo, V.J. (1998). The Pathway of Cell Senescence: WI-38 Cells Arrest in Late G1 and Are Unable to Traverse the Cell Cycle from a True G0 State. *Exp. Gerontol.* 33, 67–80.
- Poulton, J., and Marchington, D.R. (2002). Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications. *Reproduction* 123, 751–755.
- Richardson, A.G., and Schadt, E.E. (2014). The Role of Macromolecular Damage in Aging and Age-related Disease. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 69, S28–S32.
- Rickwood, D., Wilson, M., and Darley-Usmar, V. (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. *Mitochondria Pract. Approach 1*, 1–16.
- Rudolph, K.L., Chang, S., Lee, H.-W., Blasco, M., Gottlieb, G.J., Greider, C., and DePinho, R.A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96, 701–712.
- Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., and Melino, G. (2013). Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* 32, 5129–5143.
- Salipante, S.J., and Horwitz, M.S. (2007). A phylogenetic approach to mapping cell fate. *Curr. Top. Dev. Biol.* 79, 157–184.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., and Takeda, A. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 41, 1303–1307.
- Semsei, I., Rao, G., and Richardson, A. (1991). Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech. Ageing Dev.* 58, 13–19.
- Setiamarga, D.H., Miya, M., Yamanoue, Y., Mabuchi, K., Satoh, T.P., Inoue, J.G., and Nishida, M. (2008). Interrelationships of Atherinomorpha (medakas, flyingfishes, killifishes, silversides, and their relatives): the first evidence based on whole mitogenome sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 598–605.

- Singleton, A., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., and Nussbaum, R. (2003).  $\alpha$ -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841–841.
- Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., and Hadjadj, S. (2007). A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445, 881–885.
- Smith, C., Carney, J.M., Starke-Reed, P., Oliver, C., Stadtman, E., Floyd, R., and Markesbery, W. (1991). Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10540–10543.
- Smits, P., Smeitink, J., and van den Heuvel, L. (2010). Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *J. BioMed Res.* 2010.
- Sohal, R.S., Agarwal, S., Dubey, A., and Orr, W.C. (1993). Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7255–7259.
- Sohal, R.S., Ku, H.-H., Agarwal, S., Forster, M.J., and Lal, H. (1994). Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 74, 121–133.
- Starke-Reed, P.E., and Oliver, C.N. (1989). Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 275, 559–567.
- Stewart, J.B., Freyer, C., Elson, J.L., Wredenberg, A., Cansu, Z., Trifunovic, A., and Larsson, N.-G. (2008). Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS Biol.* 6, e10.
- St John, J. (2014). The control of mtDNA replication during differentiation and development. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* 1840, 1345–1354.
- Strehler, B.L. (1959). Origin and comparison of the effects of time and high-energy radiations on living systems. *Q. Rev. Biol.* 117–142.
- Takahashi, A. (2007). A Novel Mechanism of Irreversible Cell Cycle Arrest in Cellular Senescence. *J. Oral Biosci.* 49, 47–53.
- Takubo, K., Izumiyama-Shimomura, N., Honma, N., Sawabe, M., Arai, T., Kato, M., Oshimura, M., and Nakamura, K.-I. (2002). Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp. Gerontol.* 37, 523–531.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Terman, A., and Brunk, U.T. (2004). Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1400–1404.
- Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E.A., and Brunk, U.T. (2010). Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial–lysosomal axis theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 503–535.
- Terzibasi, E., Valenzano, D.R., Benedetti, M., Roncaglia, P., Cattaneo, A., Domenici, L., and Cellerino, A. (2008). Large differences in aging phenotype between strains of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*. *PLoS One* 3, e3866.

- Terzibasi, E., Lefrançois, C., Domenici, P., Hartmann, N., Graf, M., and Cellerino, A. (2009). Effects of dietary restriction on mortality and age-related phenotypes in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell* 8, 88–99.
- Thyagarajan, B., Padua, R.A., and Campbell, C. (1996). Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J. Biol. Chem.* 271, 27536–27543.
- Tresguerres, M., Levin, L.R., and Buck, J. (2011). Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int.* 79, 1277–1288.
- Tuppen, H.A., Blakely, E.L., Turnbull, D.M., and Taylor, R.W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Bioenerg.* 1797, 113–128.
- Tyler, C., and Sumpter, J. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fish.* 6, 287–318.
- Valdesalici, S., and Cellerino, A. (2003). Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, S189–S191.
- Vaz-Ferreira, R., and Sierra, B. (1972). Los géneros de Cyprinodontidae de aguas temporales sudamericanas. *Bol Soc Zool Urug.* 2, 36–42.
- Vaz-Ferreira, R., and Sierra, B. (1973). Caracteres etológicos genéricos y específicos en los peces del genero *Cynolebias* Steindachner, 1876. *Bol Soc Zool Urug.* 2, 22–35.
- Vermulst, M., Bielas, J.H., Kujoth, G.C., Ladiges, W.C., Rabinovitch, P.S., Prolla, T.A., and Loeb, L.A. (2007). Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice. *Nat Genet* 39, 540–543.
- Volcan, M.V., Fonseca, A.P. da, Figueiredo, M.R.C., Sampaio, L.A., and Robaldo, R.B. (2012). Effect of temperature on growth of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001. *Biota Neotropica* 12, 68–73.
- Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3, 294–299.
- Walford, R.L., and Liu, R.K. (1965). Husbandry, life span, and growth rate of the annual fish, *Cynolebias adloffii* E. Ahl. *Exp. Gerontol.* 1, 161–168.
- Wang, E., Wong, A., and Cortopassi, G. (1997). The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than humans. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 377, 157–166.
- Weber, B.H., Issa, P.C., Pauly, D., Herrmann, P., Grassmann, F., and Holz, F.G. (2014). The role of the complement system in age-related macular degeneration. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 111, 133.
- Whitehead, A. (2009). Comparative mitochondrial genomics within and among species of killifish. *BMC Evol. Biol.* 9, 11.
- Wourms, J. (1964). Comparative observations on the early embryology of *Nothobranchius taeniopygus* (Hilgendorf) and *Aplocheilichthys pumilis* (Boulenger) with special reference to the problem of naturally occurring embryonic diapause in teleost fishes. *Annu. Rep. E Afr Freshwat Fish Res Organ Append. H* 68–73.
- Wourms, J.P. (1967). Annual fishes. *Methods Dev. Biol.* N. Y. Thomas Crowell Co. Pp 123–137.

- Wourms, J.P. (1972). The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zool.* *182*, 389–414.
- Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W., and Shay, J.W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* *18*, 173–179.
- Yan, L.-J., and Sohal, R.S. (2000). Prevention of flight activity prolongs the life span of the housefly, *Musca domestica*, and attenuates the age-associated oxidative damage to specific mitochondrial proteins. *Free Radic. Biol. Med.* *29*, 1143–1150.
- Yap, W.H., Yeoh, E., Brenner, S., and Venkatesh, B. (2005). Cloning and expression of the reverse transcriptase component of pufferfish (*Fugu rubripes*) telomerase. *Gene* *353*, 207–217.
- Yin, F., Boveris, A., and Cadenas, E. (2014). Mitochondrial energy metabolism and redox signaling in brain aging and neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 353–371.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* *7*, 203–214.
- Zhu, Y., Carvey, P.M., and Ling, Z. (2006). Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. *Brain Res.* *1090*, 35–44.

## Individuos analizados de *A. charrua*

### *A. charrua* (colectados en el campo en 2011)

Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de colecta	Tiempo en el acuario		NGS - ADNmt	Genes MITO			NGS - ADN genómico total	Actividad de la TELOMERASA	Acortamiento de los TELOMEROS	Funcionalidad mitocondrial	Determinación de proteínas carboniladas	Acumulación del biomarcador lipofuscina
							D-loop	CYT-b	COX-1						
1	2073	?	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					
2	2074	?	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					
3	2075	?	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					
4	2076	?	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					
5	2077	?	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					
6	2147	?	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1,5 meses	J			✓	✓					
7	2167	?	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1,5 meses	J			✓	✓					
8	2068	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					✓
9	2069	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					✓
10	2070	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					✓
11	2071	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					
12	2138	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1,5 meses	J			✓	✓					
13	2139	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1,5 meses	J			✓	✓					
14	2143	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1,5 meses	J			✓	✓					
15	2166	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1,5 meses	J			✓	✓					
16	2170	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	2,5 meses	J			✓	✓					
17	2125	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					
18	2126	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1 mes	J			✓	✓					
19	2137	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1,5 meses	J			✓	✓					
20	2164	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 16 junio 2011	1,5 meses	J			✓	✓					
21	2179	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	3 días	A			✓	✓					✓
22	2180	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	3 días	A			✓	✓					
23	2181	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	3 días	A			-	✓					
24	2182	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	3 días	A			✓	✓					
25	2183	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	3 días	A			✓	✓					
26	2308	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	1 mes	A			✓	✓					
27	2495	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	1,5 meses	A			✓	✓					
28	2496	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	24 días	A			✓	✓					
29	2497	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	24 días	A			✓	✓					
30	2174	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	3 días	A			✓	✓					✓
31	2175	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	3 días	A			✓	✓					✓
32	2176	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	3 días	A			✓	✓					

## Individuos analizados de *A. charrua*

### *A. charrua* (colectados en el campo en 2011)

Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de colecta	Tiempo en el acuario	NGS - ADNmt	Genes MITO			NGS - ADN genómico total	Actividad de la TELOMERASA	Acortamiento de los TELOMEROS	Funcionalidad mitocondrial	Determinación de proteínas carboniladas	Acumulación del biomarcador lipofuscina
						D-loop	CYT-b	COX-1						
33	2177	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	3 días	A		✓	✓					
34	2178	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	3 días	A		✓	✓					
35	2305	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	1 mes	A		✓	✓					
36	2306	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	1 mes	A		✓	✓					
37	2307	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	1 mes	A		✓	✓					
38	2688	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	1 mes	A		✓	✓					
39	2689	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	1 mes	A		✓	✓					
40	2690	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 30 agosto 2011	1 mes	A		✓	✓					
41	2261	ma	<i>A. charrua</i> (ADULTO)	La Coronilla (prox. al parador del MTOP) - 16 junio 2011 / 21 setiembre 2011	3 meses	A		-						
42	2292	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1 día	S		✓	✓					✓
43	2293	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1 día	S		✓	✓					
44	2294	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1 día	S		✓	✓					
45	2754	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1 mes	S		✓	✓					
46	2755	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1 mes	S		✓	✓					
47	2761	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1,5 meses	S		✓	✓					
48	2762	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1,5 meses	S		✓	✓					
49	2767	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1,5 meses	S		-	✓					
50	2768	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1,5 meses	S		✓	✓					
51	2289	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1 día	S		✓	✓					✓
52	2290	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1 día	S		✓	✓					✓
53	2291	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1 día	S		✓	✓					
54	2334	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	2 días	S		✓	✓			✓		
55	2335	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	9 días	S		✓	✓			✓		
56	2336	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	9 días	S		✓	✓			✓		
57	2337	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	9 días	S		✓	✓			✓		
58	2338	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	9 días	S		-	✓			✓		
59	2711	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1 día	S		✓	✓					
60	2712	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	1 día	S		✓	✓					
61	2738	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	20 días	S		✓	✓					
62	2739	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 4 octubre 2011	20 días	S		✓	✓					
63	2437	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla (prox. al parador del MTOP) - 16 junio 2011 / 31 octubre 2011	4 meses	S		-						
64	2169	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla (prox. al parador del MTOP) - 16 junio 2011 - PAREJA 3	2 meses	A		✓	✓					
65	2280	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla (prox. al parador del MTOP) - 16 junio 2011 - PAREJA 3	3,5 meses	A		✓	✓					

## Individuos analizados de *A. charrua*

### *A. charrua* (progenie 2012)

Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de nacimiento	Tiempo en el acuario	NGS - ADNmt	Genes MITO			NGS - ADN genómico total	Actividad de la TELOMERASA	Acortamiento de los TELOMEROS	Funcionalidad mitocondrial	Determinación de proteínas carboniladas	Acumulación del biomarcador Ipfuscina
						D-loop	CYT-b	COX-1						
66	2782	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	66 días	J		✓	✓			✓		
67	2783	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	66 días	J		✓	✓			✓		
68	2784	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	66 días	J		-				✓		
69	2785	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	72 días	J		✓	✓			✓		
70	2789	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	74 días	J	✓	✓	✓					
71	2790	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	74 días	J		✓	✓		✓		✓	
72	2791	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	74 días	J		✓	✓		✓		✓	
73	2792	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	74 días	J		✓	✓		✓		✓	
74	2793	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	74 días	J		✓	✓					
75	2806	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	93 días	J		✓	✓			✓		
76	2807	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	93 días	J		✓	✓			✓		
77	2786	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	72 días	J		✓	✓			✓		
78	2787	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	72 días	J		✓	✓			✓		
79	2788	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	72 días	J		✓	✓			✓		
80	2794	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	74 días	J		✓	✓					
81	2795	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	74 días	J		✓	✓					
82	2796	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	74 días	J		✓	✓					
83	2797	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	74 días	J		✓	✓					
84	2798	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	74 días	J		✓	✓					
85	2808	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	93 días	J		✓	✓			✓		
86	2809	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	93 días	J		✓	✓			✓		
87	2811	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	141 días	A		✓	✓					
88	2812	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	141 días	A		✓	✓	✓	✓		✓	
89	2813	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	141 días	A	✓	✓	✓	✓	✓		✓	
90	2814	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	141 días	A		✓	✓	✓	✓		✓	
91	2815	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	141 días	A		✓	✓					
92	2816	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	141 días	A		✓	✓					
93	2817	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	141 días	A		✓	✓					
94	2818	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	141 días	A		✓	✓					
95	3256	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	15-jun-12	A		✓	✓					
96	3262	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	24-jul-12	A		✓	✓					
97	3263	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	24-jul-12	A		✓	-					

## Individuos analizados de *A. charrua*

### *A. charrua* (progenie 2012)

Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de nacimiento	Tiempo en el acuario	NGS - ADNmt	Genes MITO			NGS - ADN genómico total	Actividad de la TELOMERASA	Acortamiento de los TELOMEROS	Funcionalidad mitocondrial	Determinación de proteínas carboniladas	Acumulación del biomarcador Ipfuscina
						D-loop	CYT-b	COX-1						
98	2819	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	141 días	A		✓	✓					
99	2820	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	141 días	A		✓	✓					
100	3257	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	15-jun-12	A		✓	✓					
101	3258	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	20-jun-12	A		0	✓					
102	3259	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	23-jun-12	A		✓	✓					
103	3260	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	02-jul-12	A		✓	✓					
104	3261	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	12-jul-12	A		0	✓					
105	2847	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	6 meses	S		✓	✓			✓		
106	2848	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	6 meses	S		✓	✓			✓		
107	3115	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	7 meses	S	AUS11	✓	✓			✓		
108	3116	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	7 meses	S	AUS12	✓	✓		✓	✓		
109	3117	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	7 meses	S	AUS13	✓	✓		✓	✓		
110	3118	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	7 meses	S		✓	✓			✓		
111	3149	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	7 meses	S	AUS14	✓	✓	✓	✓		✓	
112	3265	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	8-ago-12	S		✓	✓					
113	3266	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	15-ago-12	S		✓	✓					
114	3267	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	8-oct-12	S		0	✓					
115	2845	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	6 meses	S		✓	✓			✓		
116	2846	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	6 meses	S		✓	✓			✓		
117	3264	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	8-ago-12	S		✓	✓					
118	3268	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 2169 x 2280 - 06 marzo 2012	9-oct-12	S	AUS15	0	-					

## Individuos analizados de *A. charrua*

*A. charrua* (colectados en el campo en 2011)

Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de colecta	Tiempo en el acuario	NGS - ADNmt	Genes MITO			NGS - ADN genómico total	Actividad de la TELOMERASA	Acortamiento de los TELOMEROS	Funcionalidad mitocondrial	Determinación de proteínas carboniladas	Acumulación del biomarcador lipofuscina
						D-loop	CYT-b	COX-1						
119	2829	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
120	2830	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓		✓	✓		
121	2831	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓		✓	✓		
122	2832	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓		✓	✓		
123	2833	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
124	3183	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
125	3184	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
126	3185	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
127	3186	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
128	3187	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
129	3188	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
130	3189	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
131	2834	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
132	2835	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
133	2836	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
134	2837	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
135	2838	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
136	3190	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
137	3191	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
138	3192	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 04 julio 2012	1 mes	J		✓	✓					
139	2869	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	-					
140	2870	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓	✓	✓	✓		
141	2871	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓		✓	✓		
142	2872	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓		✓	✓		
143	2873	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓					
144	3105	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓					
145	3106	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓					
146	3107	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		-	✓					
147	3108	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓					
148	3109	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓					
149	2874	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓					
150	2875	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓					
151	2876	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓					

## Individuos analizados de *A. charrua*

*A. charrua* (colectados en el campo en 2011)

Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de colecta	Tiempo en el acuario	NGS - ADNmt	Genes MITO			NGS - ADN genómico total	Actividad de la TELOMERASA	Acortamiento de los TELOMEROS	Funcionalidad mitocondrial	Determinación de proteínas carboniladas	Acumulación del biomarcador lipofuscina	
						D-loop	CYT-b	COX-1							
152	2877	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓						
153	2878	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓						
154	3094	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓						
155	3095	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		✓	✓						
156	3096	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		-	✓						
157	3097	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		-	✓						
158	3098	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 07 setiembre 2012	5 días	A		-	✓						
159	3150	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
160	3151	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓	✓	✓				
161	3152	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓	✓	✓				
162	3153	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓	✓	✓				
163	3154	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
164	3269	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
165	3270	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
166	3271	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
167	3272	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
168	3273	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
169	3155	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
170	3156	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
171	3157	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
172	3158	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
173	3159	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		-	✓						
174	3274	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
175	3275	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		-	✓						
176	3276	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
177	3277	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
178	3278	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla - 17 octubre 2012	9 días	S		✓	✓						
179	3730	he	<i>A. charrua</i>	La Coronilla (prox. al parador del MTOP) - 04 JUL 2012 - PAREJA 3	9 días	A		✓	✓						
180	3731	ma	<i>A. charrua</i>	La Coronilla (prox. al parador del MTOP) - 04 JUL 2012 - PAREJA 3	9 días	A		✓	✓						

## Individuos analizados de *A. charrua*

### *A. charrua* (progenie 2013)

Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de nacimiento	Tiempo en el acuario	NGS - ADNmt	Genes MITO			NGS - ADN genómico total	Actividad de la TELOMERASA	Acortamiento de los TELOMEROS	Funcionalidad mitocondrial	Determinación de proteínas carboniladas	Acumulación del biomarcador lípofusina
						D-loop	CYT-b	COX-1						
181	3680	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	14-jun-13	J		✓	✓					
182	3681	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	14-jun-13	J		✓	✓		✓			
183	3682	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	14-jun-13	J		✓	✓					
184	3683	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	14-jun-13	J		✓	✓		✓			
185	3684	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	14-jun-13	J		✓	✓		✓			
186	3685	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	11-jun-13	J		✓	✓		✓	✓		
187	3686	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	11-jun-13	J		✓	✓		✓	✓		
188	3687	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	11-jun-13	J		✓	✓			✓		
189	3666	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	10-jun-13	J						✓		
190	3667	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	10-jun-13	J						✓		
191	3668	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	10-jun-13	J						✓		
192	3669	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	10-jun-13	J						✓		
193	3675	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	14-jun-13	J		✓	✓		✓			
194	3676	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	14-jun-13	J		✓	✓		✓			
195	3677	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	14-jun-13	J		✓	✓					
196	3678	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	14-jun-13	J		✓	✓		✓			
197	3679	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	14-jun-13	J		✓	✓		✓			
198	3688	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	11-jun-13	J		✓	✓			✓		
199	3691	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	20-ago-13	S		✓	✓			✓		
200	3692	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	20-ago-13	S		✓	✓			✓		
201	3693	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	20-ago-13	S		✓	✓		✓	✓		
202	3694	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	20-ago-13	S		✓	✓		✓	✓		
203	3708	he	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	07-oct-13	S		✓	✓		✓			
204	3706	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	07-oct-13	S		✓	✓		✓			
205	3707	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P3: 3730 x 3731 - 07 marzo 2013	07-oct-13	S		✓	✓		✓			
206	3695	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P1: 3742 x 3743 - 04 marzo 2013	02-oct-13	S						✓		
207	3696	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P1: 3742 x 3743 - 04 marzo 2013	02-oct-13	S		✓	✓			✓		
208	3697	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P1: 3742 x 3743 - 04 marzo 2013	02-oct-13	S		✓	✓			✓		
209	3698	ma	<i>A. charrua</i>	F1 de laboratorio. Parentales P1: 3742 x 3743 - 04 marzo 2013	02-oct-13	S		✓	✓			✓		

# Individuos analizados de *A. cheradophilus*

## *A. cheradophilus* (colectados en el campo en 2011)

	Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de colecta	Tiempo en el acuario		Genes MITO	
							COX-1	CYT-b
1	2029	?	<i>A. cheradophilus</i>	Zona de contacto (ZC) <b>Buonomo</b> (10may 2011)	15 días	J	✓	✓
2	2030	?	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta <b>91</b> , CH1009 "ceibal". GPS: 33°00'44"S; 53°52'35"W (10may 2011)	15 días	J	✓	✓
3	2031	?	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta <b>91</b> , CH1009 "ceibal". GPS: 33°00'44"S; 53°52'35"W (10may 2011)	15 días	J	✓	✓
4	2053	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta <b>91</b> , CH1009 "ceibal". GPS: 33°00'44"S; 53°52'35"W (10may 2011)	2 meses	A	✓	✓
5	2054	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta <b>91</b> , CH1009 "ceibal". GPS: 33°00'44"S; 53°52'35"W (10may 2011)	2 meses	A	✓	✓
6	2270	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta <b>91</b> , CH1009 "ceibal". GPS: 33°00'44"S; 53°52'35"W (10may 2011)	4 meses	S	✓	✓
7	2271	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta <b>91</b> , CH1009 "ceibal". GPS: 33°00'44"S; 53°52'35"W (10may 2011)	4 meses	S	✓	✓
8	2281	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta <b>91</b> , CH1009 "ceibal". GPS: 33°00'44"S; 53°52'35"W (10may 2011) <b>PAREJA 2</b>	5 meses	S	✓	✓
9	2341	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta <b>91</b> , CH1009 "ceibal". GPS: 33°00'44"S; 53°52'35"W (10may 2011) <b>PAREJA 2</b>	5 meses	S	✓	✓
10	2097	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Camino Arrozal 33 ( <b>A17</b> ) GPS: 32°59'60"S; 53°50'54"W (15 jun 2011)	2 meses	A	✓	✓
11	2055	he	<i>A. cheradophilus</i>	Camino Arrozal 33 ( <b>A13</b> ) GPS: 33°01'32"S; 53°50'34"W (15 jun 2011)	1 mes	A	✓	✓
12	2327	he	<i>A. cheradophilus</i>	Camino Arrozal 33 ( <b>A13</b> ) GPS: 33°01'32"S; 53°50'34"W (15 jun 2011)	4 meses	S	✓	✓
13	2282	he	<i>A. cheradophilus</i>	Camino Arrozal 33 ( <b>A13</b> ) GPS: 33°01'32"S; 53°50'34"W (15 jun 2011)	4 meses	S	✓	✓
14	2339	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Camino Arrozal 33 ( <b>A13</b> ) GPS: 33°01'32"S; 53°50'34"W (15 jun 2011)	4 meses	S	✓	✓
15	2340	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Camino Arrozal 33 ( <b>A13</b> ) GPS: 33°01'32"S; 53°50'34"W (15 jun 2011)	4 meses	S	✓	-
16	2411	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Camino Arrozal 33 ( <b>A13</b> ) GPS: 33°01'32"S; 53°50'34"W (15 jun 2011)	4 meses	S	✓	✓
17	2380	he	<i>A. cheradophilus</i>	Zona de contacto <b>6</b> , Treinta y Tres. GPS: 33°04'02.3"S; 53°50'35.2"W (15 jun 2011)	4 meses	S	✓	✓
18	2412	he	<i>A. cheradophilus</i>	Zona de contacto <b>6</b> , Treinta y Tres. GPS: 33°04'02.3"S; 53°50'35.2"W (15 jun 2011)	4 meses	S	✓	✓
19	2328	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Zona de contacto <b>24</b> , Treinta y Tres. GPS: 32°57'22,7"S; 53°55,5'57,6"W (26 set 2011)	1 mes	S	✓	✓
20	2413	he	<i>A. cheradophilus</i>	Zona de contacto <b>24</b> , Treinta y Tres. GPS: 32°57'22,7"S; 53°55,5'57,6"W (26 set 2011)	1 mes	S	✓	✓

## Individuos analizados de *A. cheradophilus*

### *A. cheradophilus* (progenie 2012)

	Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de nacimiento	Tiempo en el acuario		Genes MITO	
							COX-1	CYT-b
21	2804	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales P2: 2281 x 2341 - 16 abr 2012	32 días	J	✓	✓
22	2799	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	32 días	J	✓	✓
23	2800	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	32 días	J	✓	✓
24	2801	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	32 días	J	✓	✓
25	2802	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	32 días	J	✓	✓
26	2803	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	32 días	J	✓	✓
27	2824	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	3,5 meses	A	✓	✓
28	2825	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	3,5 meses	A	✓	✓
29	2826	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	3,5 meses	A	✓	✓
30	2827	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	3,5 meses	A	✓	✓
31	2828	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	3,5 meses	A	✓	✓
32	3144	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	6 meses	S	✓	✓
33	3145	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	6 meses	S	✓	✓
34	3146	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	6 meses	S	✓	✓
35	3147	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	6 meses	S	✓	✓
36	3148	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	6 meses	S	✓	✓
37	3141	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	6 meses	S	✓	✓
38	3142	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	6 meses	S	✓	✓
39	3143	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales <b>R91</b> (P2: 2281 x 2341) - 16 abr 2012	6 meses	S	✓	✓

# Individuos analizados de *A. cheradophilus*

## *A. cheradophilus* (colectados en el campo en 2012)

	Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de colecta	Tiempo en el acuario		Genes MITO	
							COX-1	CYT-b
40	2879	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (Entrada a Barra grande) - 24 ago 2012	20 días	J	✓	✓
41	2880	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (Entrada a Barra grande) - 24 ago 2012	20 días	J	✓	✓
42	2881	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (Entrada a Barra grande) - 24 ago 2012	20 días	J	✓	✓
43	2882	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (Entrada a Barra grande) - 24 ago 2012	20 días	J	✓	✓
44	2883	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (Entrada a Barra grande) - 24 ago 2012	20 días	J	✓	✓
45	2884	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (Entrada a Barra grande) - 24 ago 2012	20 días	J	✓	✓
46	2885	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (Entrada a Barra grande) - 24 ago 2012	20 días	J	✓	✓
47	2886	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
48	2887	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
49	2888	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
50	2889	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
51	2890	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
52	2891	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
53	2892	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
54	2893	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
55	2894	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
56	2895	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
57	2896	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	-	-
58	3279	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
59	3280	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
60	3281	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 07 set 2012	5 días	A	✓	✓
61	3744	he	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (Entrada a Barra grande) - 24 ago 2012 <b>PAREJA 1</b>	1 mes	A	✓	✓
62	3745	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (Entrada a Barra grande) - 24 ago 2012 <b>PAREJA 1</b>	1 mes	A	✓	✓
63	3160	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 17 oct 2012	2 días	S	✓	✓
64	3161	ma	<i>A. cheradophilus</i>	Ruta 9, Km 248,500 (enfrente a la entrada a Barra grande) - 17 oct 2012	2 días	S	✓	✓

## Individuos analizados de *A. cheradophilus*

### *A. cheradophilus* (progenie 2013)

	Número de catálogo (GP)	SEXO	Especie	Localidad - Fecha de nacimiento	Tiempo en el acuario		Genes MITO	
							COX-1	CYT-b
65	3746	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	✓	✓
66	3747	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	✓	✓
67	3748	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	-	-
68	3749	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	✓	✓
69	3750	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	✓	✓
70	3751	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	✓	✓
71	3752	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	✓	✓
72	3753	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	✓	✓
73	3754	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	-	✓
74	3755	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	✓	✓
75	3756	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 14 jun 2013	2 meses	J	✓	✓
76	3757	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 09 oct 2013	6 meses	S	✓	✓
77	3758	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 09 oct 2013	6 meses	S	✓	✓
78	3759	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 09 oct 2013	6 meses	S	✓	✓
79	3760	he	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 09 oct 2013	6 meses	S	✓	✓
80	3761	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 09 oct 2013	6 meses	S	✓	✓
81	3762	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 09 oct 2013	6 meses	S	✓	✓
82	3763	ma	<i>A. cheradophilus</i>	F1 de laboratorio. Parentales (pareja 1) - 08 abr 2013 - 09 oct 2013	6 meses	S	✓	✓

*Reads de A. charrua con homología (Mus musculus vs Zebrafish)*

	Gene Name (M. musculus)	Gene Symbol	Locus PROT (M.Musculus)	BLAST con prots Zebrafish	Read de <i>A. charrua</i> con homología	E-value
	adenylate cyclase 5	Adcy5	NP_001012783.3	<a href="#">NP_001165056.1</a>	IJK8IZS08JQ60U length=458 xy=3883_0700 region=8	70 1e-14
	adenylate cyclase 5	Adcy5			IJK8IZS08I6QBL length=226 xy=3650_0303 region=8	90 1e-22
	adenylate cyclase 5	Adcy5			IJK8IZS08JMWKX length=325 xy=3834_1247 region=8	65 1e-13
1	adenylate cyclase 5	Adcy5			IJK8IZS08JDTGL length=160 xy=3730_3283 region=8	73 3e-17
	adenylate cyclase 5	Adcy5			IJK8IZS08JD6YV length=181 xy=3735_0309 region=8	77 1e-18
	adenylate cyclase 5	Adcy5			IJK8IZS08I48UP length=405 xy=3633_0639 region=8	52 3e-16
	adenylate cyclase 5	Adcy5			IJK8IZS08JGV76 length=514 xy=3765_3476 region=8	42 3e-07
2	caveolin, caveolae protein 1	Cav1	NP_001229993.1	<a href="#">NP_001019333.1</a>	IJK8IZS08I7PZN length=456 xy=3661_1473 region=8	218 4e-74
3	caveolin, caveolae protein 1	Cav1	NP_031642.1	<a href="#">NP_997816.1</a>	IJK8IZS08I7PZN length=456 xy=3661_1473 region=8	218 1e-73
4	CDC14 cell division cycle 14B	Cdc14b	NP_001116461.1	<a href="#">NP_001122010.1</a>	IJK8IZS08JT6IH length=379 xy=3917_1427 region=8	96 3e-24
	cyclin-dependent kinase 7	Cdk7	NP_034004.2	<a href="#">NP_998126.2</a>	IJK8IZS08JATIJ length=387 xy=3696_2649 region=8	48 1e-08
	cyclin-dependent kinase 7				IJK8IZS08JDCOZ length=394 xy=3725_2033 region=8	48 1e-08
	cyclin-dependent kinase 7				IJK8IZS08JHTEA length=392 xy=3776_1408 region=8	55 1e-09
	cyclin-dependent kinase 7				IJK8IZS08JV54S length=437 xy=3939_3450 region=8	49 9e-08
5	cyclin-dependent kinase 7				IJK8IZS08JFEXE length=444 xy=3754_3415 region=8	46 2e-06
	cyclin-dependent kinase 7				IJK8IZS08JS2VY length=379 xy=3904_2636 region=8	50 3e-08
	cyclin-dependent kinase 7				IJK8IZS08JE3IA length=377 xy=3745_1520 region=8	48 3e-08
	cyclin-dependent kinase 7				IJK8IZS08JV8HM length=379 xy=3940_2408 region=8	48 2e-07
	cyclin-dependent kinase 7				IJK8IZS08JJK77 length=363 xy=3796_2213 region=8	49 1e-07
	cyclin-dependent kinase 7				IJK8IZS08JAF5 length=308 xy=3695_2771 region=8	48 1e-07
6	diacylglycerol O-acyltransferase 1	Dgat1	NP_034176.1	<a href="#">NP_956024.1</a>	IJK8IZS08JLFOT length=562 xy=3817_2331 region=8	85 2e-19
	Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	Efemp1	NP_666127.2	<a href="#">NP_001008587.1</a>	IJK8IZS08JARUJ length=494 xy=3696_0489 region=8	35 6e-06
7	Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1				IJK8IZS08JWBCE length=503 xy=3941_2016 region=8	37 3e-07
	Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1				IJK8IZS08JTTVN length=493 xy=3913_0753 region=8	37 3e-07
	Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1				IJK8IZS08I9W3T length=293 xy=3686_1607 region=8	49 4e-08
8	Forkhead box M1	Foxm1	NP_032047.4	<a href="#">NP_957391.1</a>	IJK8IZS08JO69G length=422 xy=3860_1906 region=8	60 3e-11
	Growth hormone releasing hormone receptor	Ghrhr	NP_001003685.2	<a href="#">NP_001075951.1</a>	IJK8IZS08JPFUL length=368 xy=3863_0747 region=8	72 1e-15
					IJK8IZS08JR0KM length=436 xy=3892_2132 region=8	72 3e-15

	Gene Name (M. musculus)	Gene Symbol	Locus PROT (M.Musculus)	BLAST con prots Zebrafish	Read de <i>A. charrua</i> con homología	E-value
9					IJK8IZS08JAC8Z length=337 xy=3691_2049 region=8	72 9e-16
					IJK8IZS08I9BVP length=455 xy=3679_2771 region=8	70 1e-14
					IJK8IZS08JPQLJ length=353 xy=3866_2389 region=8	53 4e-09
					IJK8IZS08I8QYY length=406 xy=3673_0248 region=8	72 2e-15
10	Glutathione peroxidase 4	Gpx4	NP_001032830.2	<a href="#">NP_001025241.2</a>	IJK8IZS08JSFOT length=485 xy=3897_1418 region=8	59 3e-11
					IJK8IZS08JMA7I length=510 xy=3827_2220 region=8	55 1e-09
11	glycogen synthase kinase 3 alpha	Gsk3a	NP_001026837.1	<a href="#">NP_001038386.2</a>	IJK8IZS08JPSQE length=404 xy=3867_1060 region=8	45 5e-06
					IJK8IZS08JFEX length=444 xy=3754_3415 region=8	59 1e-10
12	Proliferation associated SNF-2-like gene	Hells	NP_032260.2	<a href="#">NP_001032178.1</a>	IJK8IZS08JIKX6 length=436 xy=3785_0252 region=8	51 4e-08
					IJK8IZS08JUTOK length=413 xy=3924_2530 region=8	51 4e-08
					IJK8IZS08JKPOX length=385 xy=3809_1407 region=8	51 3e-08
	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	Htr1b	NP_034612.1	<a href="#">NP_001122181.1</a>	IJK8IZS08JODUP length=479 xy=3851_0655 region=8	52 2e-10
					IJK8IZS08JKP9O length=427 xy=3809_2154 region=8	46 2e-06
					IJK8IZS08JK5RO length=475 xy=3814_1762 region=8	65 7e-13
13					IJK8IZS08JQQC1 length=335 xy=3877_3683 region=8	65 2e-13
					IJK8IZS08I68VQ length=400 xy=3655_3876 region=8	65 3e-13
					IJK8IZS08JBT9O length=488 xy=3708_1142 region=8	52 4e-08
					IJK8IZS08I1RTQ length=307 xy=3593_2444 region=8	65 1e-13
					IJK8IZS08JIMP4 length=340 xy=3785_2554 region=8	62 3e-12
14	Insulin-like growth factor 1	Igf1	NP_001104744.1	<a href="#">NP_571900.1</a>	IJK8IZS08JXIAA length=498 xy=3955_0320 region=8	96 3e-28
					IJK8IZS08JGSK5 length=467 xy=3764_2855 region=8	96 3e-28
	Insulin-like growth factor 1 receptor	Igf1r	NP_034643.2	<a href="#">NP_694500.1</a>	IJK8IZS08JK20M length=446 xy=3813_2292 region=8	65 6e-13
15					IJK8IZS08JV5S9 length=494 xy=3939_3035 region=8	48 7e-07
					IJK8IZS08I8CBH length=372 xy=3668_1739 region=8	49 2e-07
	Insulin receptor	Insr	NP_034698.2	<a href="#">NP_001136144.1</a>	IJK8IZS08JK20M length=446 xy=3813_2292 region=8	50 1e-07
16					IJK8IZS08JV5S9 length=494 xy=3939_3035 region=8	82 1e-18
					IJK8IZS08JRK5C length=371 xy=3887_2622 region=8	50 5e-08
					IJK8IZS08I8CBH length=372 xy=3668_1739 region=8	46 2e-06
17	lamin A	Lmna	NP_001002011.2	<a href="#">NP_694503.1</a>	IJK8IZS08JFLT length=459 xy=3751_0681 region=8	46 3e-06

	Gene Name ( <i>M. musculus</i> )	Gene Symbol	Locus PROT ( <i>M. Musculus</i> )	BLAST con prots Zebrafish	Read de <i>A. charrua</i> con homología	E-value
18	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	Msh2	NP_032654.1	<a href="#">NP_998689.1</a>	IJK8IZS08JAFNA length=382 xy=3692_1060 region=8	65 2e-13
19	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	Mtor	NP_064393.2	<a href="#">NP_001070679.2</a>	IJK8IZS08JKFDK length=200 xy=3806_0326 region=8	48 4e-08
	Plasminogen activator, urokinase	Plau	NP_032899.1	<a href="#">NP_001165872.1</a>	IJK8IZS08J0FG length=466 xy=3801_1434 region=8	47 9e-07
					IJK8IZS08JQC2R length=318 xy=3873_2849 region=8	47 2e-07
					IJK8IZS08JWWFS length=485 xy=3948_0678 region=8	47 1e-06
					IJK8IZS08JSIDX length=445 xy=3898_0643 region=8	47 1e-07
					IJK8IZS08JSWLF length=456 xy=3902_2673 region=8	47 2e-08
					IJK8IZS08JYA4 length=459 xy=3800_2782 region=8	47 8e-07
					IJK8IZS08JDCVM length=481 xy=3725_2272 region=8	47 1e-07
					IJK8IZS08JDGPD length=490 xy=3726_3135 region=8	47 1e-07
					IJK8IZS08I803D length=467 xy=3676_1079 region=8	47 9e-07
20					IJK8IZS08I5IND length=497 xy=3636_1047 region=8	48 8e-07
					IJK8IZS08I6SGW length=420 xy=3650_3086 region=8	47 6e-07
					IJK8IZS08JGafa length=481 xy=3758_3892 region=8	47 1e-06
					IJK8IZS08I7IEH length=350 xy=3664_3975 region=8	44 7e-06
					IJK8IZS08I5WHS length=464 xy=3640_2606 region=8	47 1e-07
					IJK8IZS08JEKUG length=496 xy=3739_1910 region=8	47 1e-06
					IJK8IZS08JRNSY length=438 xy=3888_1968 region=8	47 7e-07
					IJK8IZS08JM1Q7 length=341 xy=3835_3857 region=8	47 3e-07
					IJK8IZS08I6HH5 length=397 xy=3647_1163 region=8	47 5e-07
					IJK8IZS08I93P4 length=484 xy=3688_1994 region=8	48 7e-07
21	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	Pparg	NP_001120802.1	<a href="#">NP_571542.1</a>	IJK8IZS08I8JVC length=411 xy=3670_3334 region=8	77 4e-17
	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1	Rps6kb1	NP_001107806.1	<a href="#">NP_998241.1</a>	IJK8IZS08JQLMG length=510 xy=3876_1638 region=8	42 1e-09
22					IJK8IZS08JBK1U length=511 xy=3705_1472 region=8	42 1e-09
					IJK8IZS08I6B0W length=514 xy=3645_2254 region=8	64 4e-12
					IJK8IZS08JFXEX length=444 xy=3754_3415 region=8	46 2e-06
23	Solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 1	Slc13a1	NP_062354.2	<a href="#">NP_954975.1</a>	IJK8IZS08JJAD3 length=285 xy=3793_0457 region=8	50 2e-08
	Topoisomerase (DNA) III beta	Top3b	NP_035754.1	<a href="#">XP_003198651.1</a>	IJK8IZS08I7WS5 length=418 xy=3663_2119 region=8	45 3e-06
24					IJK8IZS08JE0QD length=281 xy=3744_2019 region=8	45 8e-07

	Gene Name ( <i>M. musculus</i> )	Gene Symbol	Locus PROT ( <i>M. Musculus</i> )	BLAST con prots Zebrafish	Read de <i>A. charrua</i> con homología	E-value
47					IJK8IZS08JBKMC length=416 xy=3705_0914 region=8	47 1e-06
					IJK8IZS08I7NU5 length=327 xy=3660_2815 region=8	45 1e-06
25	Transformation related protein 63	Trp63	NP_001120731.1	<a href="#">NP_689454.1</a>	IJK8IZS08JMK4E length=281 xy=3808_2172 region=8	43 7e-06
26	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	Ucp2	NP_035801.3	<a href="#">NP_571251.1</a>	IJK8IZS08JWISX length=449 xy=3943_3487 region=8	105 2e-29
	apoptosis-stimulating of p53 protein 1 [Danio rerio]	p53		<a href="#">NP_001038289.2</a>	IJK8IZS08JUJFV length=505 xy=3921_1113 region=8	
27					IJK8IZS08I5OE2 length=460 xy=3638_0332 region=8	
					IJK8IZS08JJ8A8 length=328 xy=3803_3458 region=8	

## Protocolos

---

Todos los buffers y soluciones utilizadas en los siguientes protocolos experimentales se prepararon según Sambrook et al. (1989).

### Aislamiento de mitocondrias

1. Lavar el tejido con 1ml de 1X STE (pH 8,0).
2. Triturar el tejido y agregar 1 ml de solución de homogeneización.
3. Centrifugar 10 minutos a 800 g y a 4°C.
4. Transferir el sobrenadante a otro tubo y centrifugar 10 minutos a 8.200 g y a 4°C.
5. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500 µl de solución de homogeneización.
6. Centrifugar 10 minutos a 8.200 g y a 4°C.
7. Descartar el sobrenadante, resuspender el pellet de mitocondrias en 500 µl de solución de homogeneización y guardarlo a -20°C hasta el momento de usarlo.

### Extracción del ADNmt con fenol-cloroformo

1. Centrifugar 10 minutos a 1000 g y a 4°C para recolectar las mitocondrias.
2. Resuspender el pellet en 600 µl de buffer de lisis (pH 8,0).
3. Agregar 0,2 mg/ml de proteinasa K e incubar 1 hora a 55°C.
4. Agregar 0,1 mg/ml RNasaA e incubar 1 hora a 55°C.
5. Agregar 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar por inversión.
6. Centrifugar 5 minutos a 10.000 g y a 4°C.
7. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, agregar 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar por inversión.
8. Centrifugar 5 minutos a 10.000 g y a 4°C.
9. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, agregar 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y mezclar por inversión.
10. Centrifugar 10 minutos a 13.000 g y a 4°C.
11. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, agregar 1 volumen de isopropanol y mezclar por inversión.
12. Centrifugar 15 minutos a 13.000 g y a 4°C.
13. Descartar el sobrenadante y secar el pellet en estufa a 55°C.

14. Resuspender el pellet en 50 µl de buffer 1X TE (pH 8,0) y guardar el ADNmt a -20°C hasta el momento de usarlo.

#### Extracción de ADN genómico total sin fenol-cloroformo

1. Lavar el tejido 2 veces con 1 mL de buffer 1X STE (frío).
2. Triturar el tejido, agregar 550 µl de buffer de lisis (pH 8,0) y terminar de homogeneizar el tejido.
3. Agregar 0,2 mg/ml de proteinasa K e incubar toda la noche a 55°C.
4. Agregar 0,1 mg/ml RNasaA e incubar 1 hora a 55°C.
5. Centrifugar 10 minutos a 12.000 rpm y a temperatura ambiente.
6. Transferir el sobrenadante a otro tubo y agregarle NaCl (2M).
7. Centrifugar 30 minutos a 12.000 rpm y a temperatura ambiente.
8. Transferir el sobrenadante a otro tubo y agregarle el doble de volumen de EtOH absoluto frío. Agitar lentamente permitiendo que la interfase con el alcohol se vaya mezclando paulatinamente a fin de poder visualizar el ADN genómico total precipitado.
9. Incubar toda la noche a 4°C.
10. Centrifugar 30 minutos a 12.000 rpm y a temperatura ambiente.
11. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet dos veces con 1 mL de EtOH 70%.
12. Entre cada lavado, centrifugar 5 minutos a 6.000 rpm y a temperatura ambiente.
13. Secar el pellet en una estufa a 37°C.
14. Resuspender en 100 µl de buffer 1X TE (pH 8,0).
15. Incubar durante 20 minutos en un baño a 65°C. Hacer un spin y guardar los ADN a -20°C hasta el momento de usarlos.

#### Amplificación *in vitro* de los extremos teloméricos con el kit comercial “TRAPEZE® Telomerase Detection Kit” (Millipore):

El kit comercial “TRAPEZE® Telomerase Detection Kit” (Millipore) permite la amplificación *in vitro* de los extremos teloméricos mediante PCR, en 2 etapas: 1) la telomerasa adiciona repetidos teloméricos (GGTTAG) en el extremo 3' de un sustrato oligonucleotídico TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), que es el cebador “hacia adelante” (o forward); 2) los productos extendidos son amplificados mediante PCR usando los cebadores TS y RP que es el cebador “hacia atrás” (o reverse). La secuencia del cebador RP proporcionado en el kit fue modificada de la

original (CX: 5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') descrita por Kim et al. (1994) para mejorar el rendimiento del método.

Cada mezcla de reacción de este kit contiene un cebador (K1) y un sustrato (TSK1) que amplifican un producto de 36pb que es un control positivo interno. Este control permite una cuantificación más exacta de la actividad de la telomerasa y la detección de falsos negativos que contienen inhibidores de la *Taq* polimerasa.

### Southern blot

#### **Extracción y precipitación del ADN genómico total**

Los ADN genómicos totales previamente extraídos a partir de aproximadamente 50 mg de músculo esquelético conservado a 4°C en EtOH 95%, se precipitaron con 1 volumen de isopropanol (frío) y 1/3 de volumen de acetato de sodio (3M). La mezcla se dejó precipitando toda la noche a 4°C.

#### **Purificación del ADN genómico total**

1. Homogeneizar la solución precipitada.
2. Centrifugar 15 minutos a 12.000 rpm y a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
3. Lavar el pellet con 300 µL de EtOH 70%.
4. Centrifugar 10 minutos a 12.000 rpm y a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
5. Lavar el pellet nuevamente con 200 µL de EtOH 70%.
6. Centrifugar 10 minutos a 12.000 rpm y a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
7. Secar el pellet a 55°C en estufa y resuspender en 20 µL de buffer 1X TE (pH 8,0).
8. Incubar durante 20 minutos en un baño a 65°C. Hacer un spin y guardar los ADN precipitados y purificados a -20°C hasta el momento de usarlos.

#### **Digestión del ADN genómico total**

Los ADN purificados fueron digeridos con las enzimas de restricción Hinf-I (10 U/mL) (Thermo Scientific) y Rsa-I (10 U/mL) (Thermo Scientific) simultáneamente, según las indicaciones del fabricante que se indican a continuación:

Componente	Volumen ( $\mu$ l)
H2O desionizada	-
Buffer TANGO	2,0
ADN genómico	17,0
Mezcla de las enzimas (Hinf-I + Rsa-I)	1,0
Volumen total	20,0

Se realizó la digestión durante 2 horas a 37°C.

Finalizada la incubación, se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa (ICN Biomedicals Inc.) al 0,8% en buffer 1X TAE teñido con bromuro de etidio (0,05  $\mu$ L/mL). Se sembraron 5  $\mu$ L del ADN digerido con 2  $\mu$ l de buffer de corrida. También se sembró marcador de peso molecular (1kb DNA ladder, Invitrogen). Se dejó correr a 80V durante 1 hora.

Una vez corroborada la digestión, se inactivó la reacción con EDTA 0,5 M (pH=8,0), se precipitó y purificó el ADN digerido de la forma descrita anteriormente.

### **Preparación del gel para el Southern blot**

Los ADN genómicos digeridos se sometieron a una electroforesis en un gel grande (200 mL) de agarosa (ICN Biomedicals Inc.) al 0.8% en buffer 0,5X TBE teñido con bromuro de etidio (0,05  $\mu$ l /mL). Se sembraron 20  $\mu$ l de ADN digerido con 10  $\mu$ l de buffer de corrida. También se sembró marcador de peso molecular (1kb DNA ladder, Invitrogen). Inicialmente se corrió a 70V durante 30 minutos y luego se dejó correr a 75V durante 5 horas.

Antes de la transferencia de los ADNs digeridos a la membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Life Science):

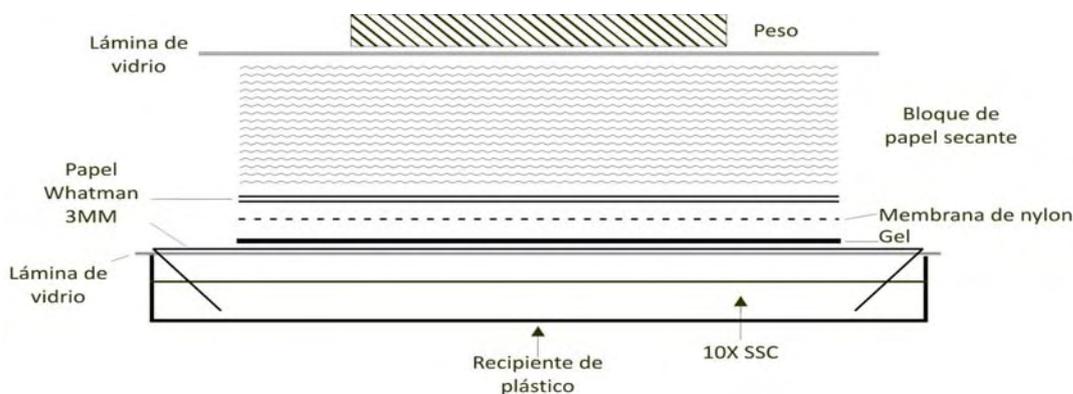
1. Sumergir el gel en 500 mL de solución desnaturalizante e incubar durante 45 minutos con agitación constante. Enjuagar brevemente con H<sub>2</sub>O.
2. Cortar uno de los extremos inferiores del gel para poder identificar la orientación correcta del mismo y recortar todas las áreas no utilizadas.
3. Sumergir el gel en 500 mL de solución neutralizante e incubar durante 30 minutos con agitación constante. Repetir dos veces y mantener el gel en esta solución hasta el momento de la transferencia.

### Acondicionamiento de la membrana

1. Cortar la membrana del mismo tamaño que el gel.
2. Cortar uno de los extremos inferiores (igual que al gel).
3. Colocar la membrana en un recipiente con H<sub>2</sub>Odd y dejarla hasta que se hunda.
4. Colocar la membrana en buffer de transferencia (10X SSC) durante 5 minutos.

### Transferencia del ADN a la membrana

La transferencia del ADN a la membrana de nylon Hybond-N+ se llevó a cabo durante aproximadamente 20 horas según el esquema:



Esquema del montaje realizado para la transferencia del ADN a la membrana de nylon.

Finalizada la transferencia:

1. Sumergir la membrana en SSC 6X durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Sacar la membrana del SSC 6X, colocarla sobre un papel Whatman y dejarla por lo menos 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Colocar la membrana sobre una hoja de papel Whatman humedecida con 6X SSC y fijarla con UV durante 5 minutos.

### Pre-hibridación de la membrana

Para la hibridación de la membrana se utilizó el kit comercial “ECL direct nucleic acid labeling and detection systems” (Amersham Biosciences). Antes de comenzar la prehibridación de la membrana, se prepara el buffer de hibridación según el protocolo suministrado por el fabricante.

**Procedimiento:**

1. A temperatura ambiente, colocar 20 mL de gold hybridization buffer en un vaso de bohemia.
2. Agregarle NaCl a una concentración final de 0,5M.
3. Agregarle agente bloqueante a una concentración final de 5% w/v y mezclar vigorosamente.
4. Mezclar a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora.
5. Calentar durante 1 hora a 42°C en estufa (mezclar ocasionalmente).
6. Humedecer la membrana en SSC 5X, enrollarla cuidadosamente y colocarla dentro del tubo de hibridación. Agregar un poco de SSC 5X al tubo y desenrollar la membrana.
7. Sacar el SSC 5X y agregar 20 mL del buffer de hibridación.
8. Pre-hibridar a 42°C durante 1 hora.

**Marcaje de la sonda e hibridación de la membrana**

La sonda TELO-1 [(AATCCC)<sub>4</sub>] se mandó sintetizar en la empresa MACROGEN (Seúl, Corea) y su marcaje se realizó de acuerdo a las indicaciones del kit “ECL direct nucleic acid labeling and detection systems”:

1. Desnaturalizar 15 µl de la sonda TELO-1 (100pmol/ µl) durante 5 minutos en un baño con H<sub>2</sub>O hirviendo e inmediatamente, colocar el tubo en hielo durante 5 minutos.
2. Agregarle 15 µl de DNA labelling reagent y mezclar vigorosamente. Hacerle un spin.
3. Agregarle 15 µl de la solución de glutaraldehído y mezclar vigorosamente. Hacerle un spin.
4. Incubar durante 20 minutos a 37°C y luego colocar el tubo en hielo de 10 a 15 minutos.

Luego de marcar la sonda, se procedió a la hibridación de la membrana de la siguiente manera:

1. Tomar un poco del buffer de hibridación que está dentro del tubo de hibridación a 42°C y agregarle los 45 µl la sonda marcada.
2. Colocar la mezcla cuidadosamente dentro del tubo de hibridación y dejar hibridando toda la noche a 42°C.

**Lavados de la membrana**

1. Preparar el buffer de lavado 1 (SDS 0.4% + SSC 0.5X) y pre-calentarlo a 42°C en baño.
2. Tomar el tubo de hibridación que contiene la membrana y descartar el buffer de hibridación.
3. Agregarle 100 mL de SSC 5X y colocarlo nuevamente dentro del horno por 5 minutos.
4. Descartar el SSC 5X.
5. Agregar 100mL Buffer de Lavado 1. Incubar 42°C / 20min. Descartar el buffer.
6. Agregar 100mL Buffer de Lavado 1. Incubar 42°C / 10min. Descartar el buffer.

7. Sacar la membrana del tubo de hibridación y colocarla dentro de un recipiente limpio.
8. Agregar 150mL de Buffer de Lavado 2 (SSC 2X). Incubar a temperatura ambiente / 5 min / agitación.
9. Agregar 150mL de Buffer de Lavado 2 (SSC 2X). Incubar a temperatura ambiente / 5 min / agitación.

### **Detección de la señal y revelado**

1. Preparar la solución de detección mezclando volúmenes iguales de los reactivos que vienen con el kit “ECL direct nucleic acid labeling and detection systems” (detection reagent 1 y 2).
2. Sacar la membrana del buffer de lavado 2 y colocarla sobre una hoja de papel film (con el ADN hacia arriba).
3. Agregar la solución de detección directamente sobre la membrana e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Escurrir el exceso de solución de detección.
4. Colocar la membrana envuelta en el papel film en el “casete”.
5. En la oscuridad, colocar una hoja de placa autorradiográfica sobre la membrana.
6. Exponer durante 72 horas.
7. Sacar el film y revelar

### Medidas del flujo de O<sub>2</sub> en un oxímetro de alta resolución

1. Calibrar los electrodos del Oxygraph-2k con medio de respiración Mir05 a 25°C.
2. Decapitar el pez y cuidadosamente extraer el hígado (sin la vesícula biliar).
3. Pesar el tejido y colocarlo en una de las cámaras del respirómetro conteniendo 2 mL de medio de respiración MiR05 saturado de aire.
4. Iniciar el registro.
5. Adicionar los sustratos respiratorios: glutamato (10 mM), malato (2 mM) y succinato (10 mM).
6. Cuando el flujo de oxígeno comienza a disminuir, agregar ADP (0,3 mM).
7. Cuando el flujo de oxígeno comienza a disminuir, adicionar oligomicina (2 µg/mL).
8. Antes que se consuma todo el O<sub>2</sub> presente en el medio, agregar el agente desacoplante FCCP (1 mM). Agregar varias dosis de FCCP hasta observar que no se produce un aumento del flujo de O<sub>2</sub>.
9. Adicionar antimicina-A (2,5 µM) como control de respiración mitocondrial.

### Derivatización de proteínas totales

1. Ajustar la concentración de todas las muestras a una concentración final de 500 µg/ml diluyendo las muestras con buffer de muestra (Tris – HCl pH=7.5).
2. Desnaturalizar 5 µl de muestra mediante la adición de 5 µl de SDS 12%.
3. Derivatizar las proteínas totales presentes en la muestra con 10 µl de 1X DNPH.
4. Incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Agregar 7,5 µl de solución de neutralización.

Las muestras pueden ser conservadas a 4°C (heladera) hasta una semana.

### Transferencia de las proteínas a la membrana

1. Cortar la membrana del mismo tamaño que el gel.
2. Cortar uno de los extremos inferiores (igual que al gel para poder identificar la orientación correcta de la misma).
3. Colocar la membrana en un recipiente con H<sub>2</sub>O y dejarla hasta que se hunda.
4. Colocar la membrana en buffer de transferencia durante 5 minutos.

### Inmuno-detección

Finalizada la transferencia, se desmontó “el sándwich” y se procedió como se detalla a continuación:

1. Para corroborar la transferencia total de las proteínas a la membrana, colocar el gel en solución colorante de Coomassie Brilliant Blue y dejar con agitación aproximadamente 24 horas.
2. Separar las dos regiones de la membrana (proteínas carboniladas y actina) e incubar cada una por separado en solución de bloqueo durante 1 hora.
3. Finalizado el bloqueo proceder a la incubación con el anticuerpo primario:
  - Membrana con las proteínas carboniladas: incubar toda la noche a 4°C en solución de bloqueo con una dilución 1:50 del anticuerpo primario anti-2,4-dinitrofenilhidrazona que viene con el kit.
  - Membrana para el control de carga de proteínas sembradas: incubar toda la noche a 4°C en PBS 1X (con 1% BSA y azida de sodio 15 mM) con una dilución 1:500 del anticuerpo primario anti-actina producido en conejo (#A2066, Sigma-Aldrich).
4. Lavar las membranas 3 veces con 1X PBS-Tween (0,05 %), durante 10 minutos cada uno.
5. Incubación con el anticuerpo secundario:

- Membrana con las proteínas carboniladas: incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en solución de bloqueo con una dilución 1:300 del anticuerpo secundario que viene con el kit.
  - Membrana para el control de carga de proteínas sembradas: incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en solución de bloqueo con una dilución 1:10000 del anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo)
6. Lavar las membranas 3 veces con 1X PBS-Tween (0,05 %), durante 10 minutos cada uno.

#### Detección de la señal y revelado

7. Drenar el exceso de 1X PBS-Tween (0,05 %) de la membrana y colocarla sobre papel film.
8. Preparar la solución de detección mezclando volúmenes iguales de luminol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM).
9. Incubar durante 1 minuto. Drenar el exceso de reactivos de la membrana mediante contacto con papel en una de sus puntas.
10. Colocar la membrana envuelta en el papel film dentro del casete.
11. En la oscuridad, colocar una hoja de placa autorradiográfica sobre la membrana.
12. Exponer durante 10 minutos y luego sacar el film y revelar.

#### Inclusión del tejido en parafina

##### Deshidratación:

- Etanol 70%: 2 lavados de 30 minutos cada uno.
- Etanol 95%: 2 lavados de 30 minutos cada uno.
- Etanol 100%: 1 lavado de 30 minutos.

##### Diafanización:

- Cloroformo I: 1 lavado de 20 minutos.
- Cloroformo II: 1 lavado de 20 minutos.
- Cloroformo III: 1 lavado de 20 minutos.

##### Impregnación:

- Paraplast I: 30 minutos en estufa a 60°C de temperatura
- Paraplast II: 30 minutos a 60°C de temperatura
- Paraplast III: 30 minutos A 60°C de temperatura

Después de los 3 baños, se armó un bloque de parafina con el tejido ubicado en el medio. Se dejó solidificar y finalmente se guardó a temperatura ambiente hasta la realización de los cortes.

Desparafinización e hidratación

## Desparafinización:

- Xilol I: 5 minutos.
- Xilol II: 5 minutos.

## Rehidratación:

Debido a que los tejidos no fueron adheridos a la lámina y con el fin de evitar su desprendimiento, estos pasos se realizaron manteniendo los portaobjetos horizontales dentro de placas de petri de vidrio y manipulándolos con mucho cuidado.

- Etanol 95%: 5 minutos.
- Etanol 70%: 5 minutos.
- H<sub>2</sub>O: 5 minutos.

## Coloración nuclear:

- Hematoxilina de Mayer: 6 a 10 minutos
- H<sub>2</sub>O: 1 enjuague
- Virado en agua de canilla corriente: 10 minutos
- H<sub>2</sub>O: 2 enjuagues

## Coloración citoplásmica:

- Eosina amarillenta alcohólica al 0.5%: 4 minutos

## Deshidratación y montaje:

- Alcohol 95%: 2 lavados de 1 minuto cada uno
- Alcohol 100%: 1 minuto
- Xilol: 2 minutos y luego montar en Entellan (bálsamo sintético) preferentemente en campana de extracción de gases.