



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGIA

Physiology of Ageing in Teleost Fish of the Genus

Nothobranchius

Fisiología del Envejecimiento en Peces Teleósteos

del Género *Nothobranchius*

D. Alejandro Lucas Sánchez

Murcia 2014

Directores:

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

Revisores externos:

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

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada gracias a los contratos asociados a los proyectos “Desarrollo de aplicaciones clínicas de la termografía y actigrafía ambulatorias” por el Centro Médico Virgen de la Caridad, y por la “Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad RETICEF” por el Instituto de Salud Carlos III (RD06/0013/0019 y RD12/0043/0011). Otros proyectos que han financiado los trabajos aquí presentados han sido: “Envejecimiento prematuro y disrupción del sistema circadiano. Papel de la melatonina” por la CICYT (BFU2007-60658), “El ejercicio como factor modulador del envejecimiento. Efecto sobre el estrés oxidativo” por la Fundación Séneca (12005/PI/09), “Prevención de la cronodisrupción en el marcapasos central mediante iluminación saludable. Relevancia en el cáncer y el envejecimiento” por la CICYT (BFU2010-21945-C02-01) y por la Consejería de Agricultura y Agua de la Comunidad Autónoma de Murcia cofinanciado por los fondos FEDER.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

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

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

En Murcia, a 29 de Noviembre de 2013

Mod:T-20



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. PILAR MENDIOLA LÓPEZ, Profesora Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA en el Departamento de FISIOLÓGÍA, AUTORIZA:

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

En Murcia, a 29 de Noviembre de 2013

Pilar Mendiola

Mod:T-20



**UNIVERSITY OF
STIRLING**

SCHOOL OF
NATURAL SCIENCES

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

T: +44 (0) 1796 467878
F: +44 (0) 1796 462133
E: aquaculture@stir.ac.uk

www.stir.ac.uk

2-Diciembre-2013

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

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

En Stirling, a 2 de Diciembre de 2013

16th December 2013

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

Dear Sir/Madame,

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

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

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

Sincerely yours,



Dr Mino Belle

Institute of Toxicology and Genetics

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

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

Prof. Dr. Nicholas S. Foulkes

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

Our reference:
Date: 27 January 2014

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

Don Alejandro Lucas Sanchez. University of Murcia:

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

This thesis project addresses several key issues:

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

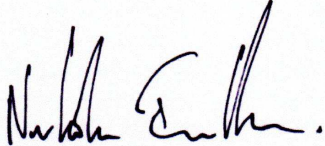
The thesis project takes a closer look at the impact of the rapid aging process on behaviour: specifically a reduction in the amplitude and regularity of diurnal rhythms of locomotor activity, a property associated with aging in other species including humans. Interestingly the characteristic short sleep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

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

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

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

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Nicholas S. Foulkes". The signature is written in a cursive style with a period at the end.

Nicholas S. Foulkes

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



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

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

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

Murcia, a 22 de Enero de 2014

Doctorando: D. Alejandro Lucas Sánchez

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

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

Mod: T-40



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de
Estudios

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

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

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

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

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

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

Concepción Palacios Bernal

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

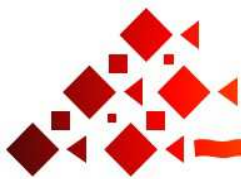
A mis infatigables amigos y compañeros que han aguantado a mi lado y me han aguantado todo este tiempo, en la Universidad (Cristobal y Mila, Antonio, Alberto, Fran, Dani...) y fuera de ella (Cristian, Eloy y Carolina, Antoñico...), y a los buenos amigos de mi paso por Escocia (Sean, Gus, Xristofos, Carina,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

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

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

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

“Respira...”



RESUMEN GENERAL



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

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

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

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

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

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

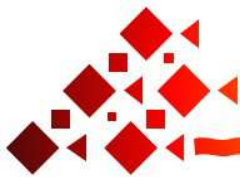
integran, y los cambios en el sistema circadiano con la edad, considerando el ritmo de actividad locomotora como reflejo del estatus del sistema circadiano.

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

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

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

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



SUMMARY



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

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

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

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

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

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

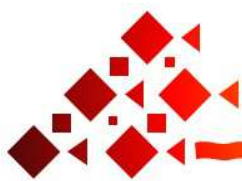
The two *Nothobranchius* species studied showed morphological changes easily recognizable visually, as colour loss, emaciation and spine curvature. At a biochemical level, *Nothobranchius* showed highly unsaturated membranes (plasmatic and mitochondrial), which has been related with an elevated metabolic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

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

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

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

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



ÍNDICE

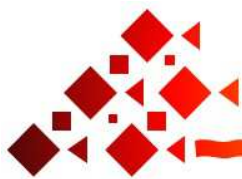


<i>INTRODUCCIÓN.....</i>	<i>1</i>
<i>El envejecimiento. Fundamentos teóricos.....</i>	<i>3</i>
<i>Implicación de los lípidos en el proceso de envejecimiento.....</i>	<i>8</i>
<i>Las membranas lipídicas como determinantes de la esperanza de vida. Teoría de envejecimiento del marcapasos de membrana.....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

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

ABREVIATURAS

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



INTRODUCCIÓN



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

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

El envejecimiento. Fundamentos teóricos.

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

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

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

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

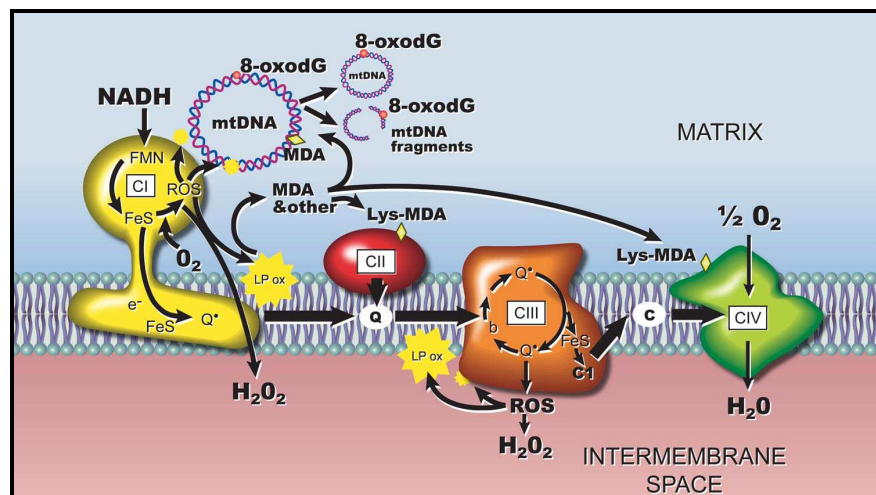


Figura 1. Diagrama de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. El esquema muestra a los complejos I y III como los principales generadores de radicales libres. Los radicales de oxígeno van a afectar a lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN mitocondrial, que se encuentran próximos a su lugar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

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

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

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

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

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

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

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

Implicación de los lípidos en el proceso de envejecimiento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

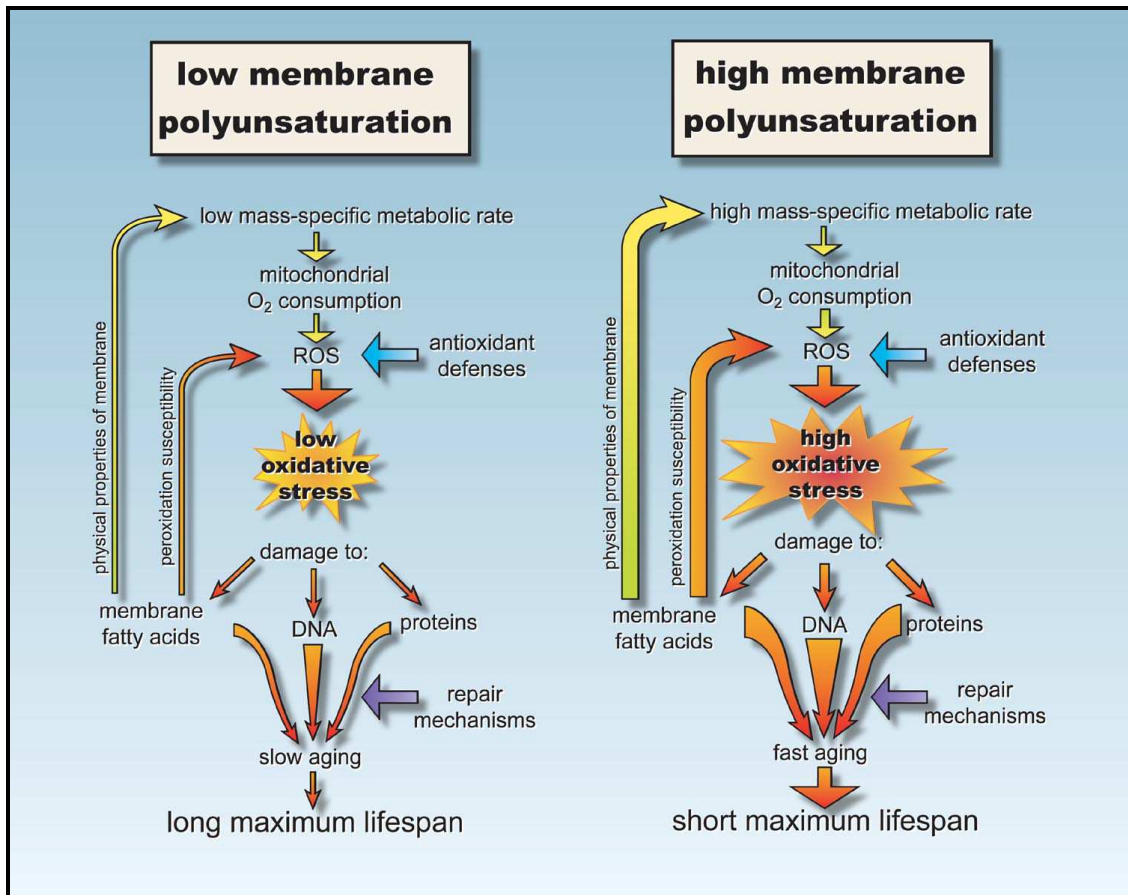


Figura 2. Esquema representando las bases de la teoría de envejecimiento del marcapasos de membrana, haciendo énfasis en la importancia de la composición de ácidos grasos de las membranas en la determinación de la esperanza de vida (tomado de Hulbert *et al.*, 2007b).

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

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

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

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

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

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

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

El sistema circadiano. El reloj de la vida

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

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

Este esquema básico, en principio con un flujo de información unidireccional, puede complicarse un poco más si tenemos en cuenta que la expresión de algunos ritmos puede funcionar como señal para sincronizar otros procesos, y con la presencia de osciladores periféricos que, aunque reciban información del sistema central, o directamente del medio ambiente, tienen la capacidad de funcionar de forma autónoma (Figura 3).

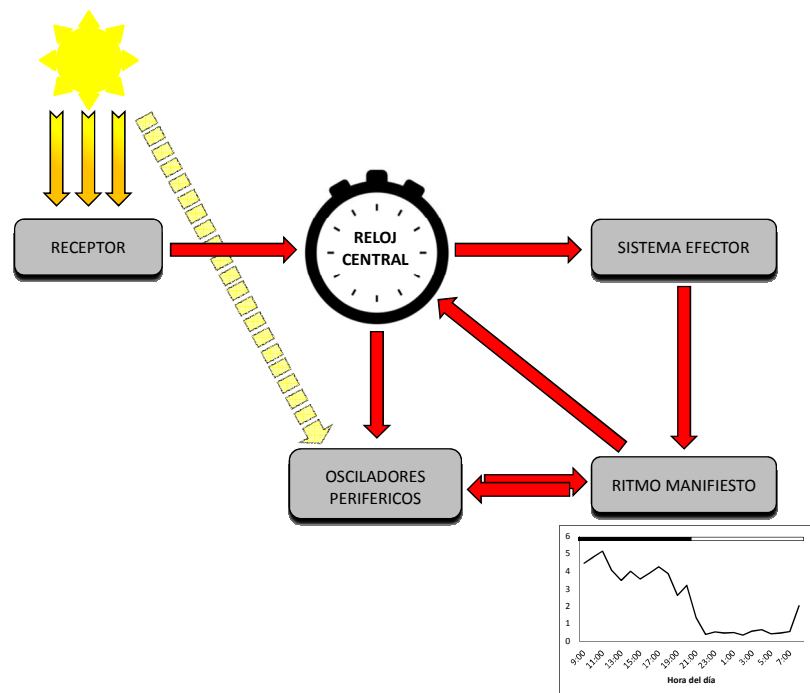


Figura 3. Estructura general del sistema circadiano.

En general, por su situación anatómica, los relojes biológicos son poco accesibles y, en algunos casos, incluso se desconoce su localización. Por ello, su estudio requiere de medidas indirectas. Los ritmos manifiestos pueden ser un reflejo del funcionamiento de cómo el marcapasos recibe e integra la información de los *zeitgebers*. Por tanto, podemos buscar el ritmo manifiesto que más nos interese, caracterizarlo y correlacionar su expresión con la señal ambiental y el funcionamiento del reloj central. Los ritmos a estudiar deben ser robustos y fácilmente medibles, lo que

implica fácil acceso a ellos con técnicas de medición sencillas, preferentemente no invasivas, y que permitan el registro de varios ciclos consecutivos. Históricamente, los ritmos más estudiados han sido los de actividad motora, ciclos de sueño-vigilia, alimentario, hormonales y de expresión génica (Lamont *et al.*, 2007; Pandi-Perumal *et al.*, 2007; Hofstra y de Weerd, 2008).

De todas las señales ambientales capaces de sincronizar los distintos procesos fisiológicos, la que mayor presión evolutiva ha ejercido ha sido el ciclo de 24 horas de luz-oscuridad. La presencia o ausencia de luz es captada por estructuras fotosensibles, como por ejemplo los fotorreceptores de la retina, y llevada al marcapasos central. Por ello, la mayoría de ritmos manifiestos que podemos identificar en un organismo tienen una frecuencia de 24 horas, como el ritmo de sueño-vigilia o diversos ritmos hormonales. Un ritmo circadiano posee diversas propiedades que lo caracterizan y resulta útil conocerlas. Según su periodo (τ), la frecuencia con que se repiten, los ritmos pueden clasificarse como ultradianos (que se repiten con una frecuencia menor de 20 horas), infradianos (que se repiten con una frecuencia superior a 28 horas), y, los más comunes, debido al ciclo luz-oscuridad, los ritmos circadianos, con frecuencia cercana a 24 horas. Los ritmos biológicos pueden ser representados como una curva sinusoidal que se repite con un τ determinado, con un valor medio o mesor y un momento de valor máximo o acrofase (Figura 4). La amplitud del ritmo, resultante de la diferencia entre el valor máximo (o mínimo) y el mesor, es una de sus características más importantes, ya que cuanto mayor contraste existe, más robusto resulta un ritmo. Además, para ser considerados como ritmos biológicos, tienen que cumplir una serie de requisitos. Una de las principales características de los ritmos circadianos es que persisten incluso en ausencia de señales ambientales sincronizadoras. Esto quiere decir que un ritmo circadiano es generado de forma

endógena por un marcapasos interno (Pittendrigh, 1960). Por norma general, un ritmo que oscila de forma autónoma (en curso libre) posee un tau que es ligeramente diferente del periodo de la señal capaz de encarrilarlo, siendo este tau específico para cada especie. Además, este ritmo endógeno puede ser encarrilado por una señal ambiental cíclica o *zeitgeber*, resultando entonces el tau del ritmo y el periodo del *zeitgeber* iguales. Cuando la señal cíclica desaparece, el ritmo manifiesto pasaría a oscilar en curso libre de nuevo (Moore-Ede *et al.*, 1982).

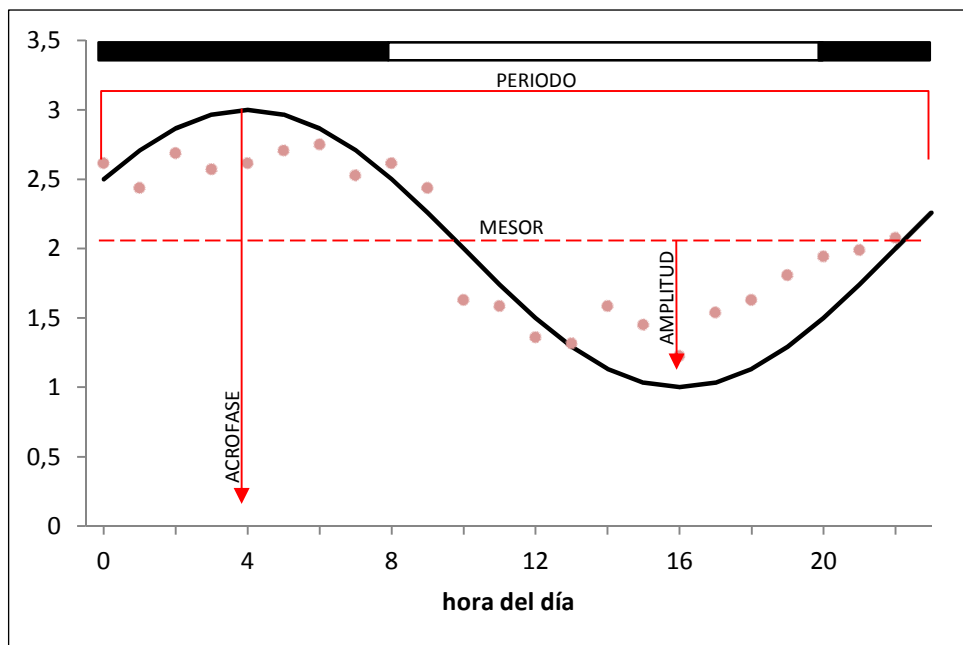


Figura 4. Ajuste de una serie temporal de datos a una función coseno. Gracias a este ajuste, pueden identificarse las propiedades de un ritmo circadiano: periodo, mesor, amplitud y acrofase.

Para que todo el organismo funcione al unísono es necesaria una señal unificadora, y la secreción rítmica de melatonina cumple ese papel, siendo la señal temporal por excelencia del organismo. La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona secretada por la glándula pineal, cuyo nombre hace referencia a la primera función que se le atribuyó: modificación del color de la piel estimulando la contracción de los melanóforos en peces y anfibios (Turner y Bagnara, 1976).

Posteriormente se encontró que la melatonina es también la encargada de regular y sincronizar el CS (Armstrong *et al.*, 1986). En la mayoría de los mamíferos, la melatonina es secretada durante la fase nocturna, alcanzando su pico máximo (acrofase) de concentración en sangre en el centro de la noche, momento en que su concentración comienza a disminuir y llega a desaparecer por completo durante la fase luminosa. Este sistema constituye un indicador químico de la duración de la oscuridad, lo cual permite al organismo “saber”, no sólo si es de noche (melatonina) o de día (no melatonina), sino también si es verano (pico corto de producción de melatonina) o invierno (pico largo de producción de melatonina), útil por ejemplo, para especies migratorias o para el ajuste de la reproducción a épocas favorables (Reiter, 1993).

Existen receptores específicos de melatonina, MT1 y MT2, repartidos por el sistema nervioso central y numerosos tejidos periféricos (Dubocovich, 2007), lo cual apunta al carácter pleiotrópico de esta hormona. Además de su papel como cronobiótico, se han descrito propiedades antitumorales, inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antioxidantes (Hardeland *et al.*, 2011). Respecto a este último punto, la melatonina ha mostrado tener relación con el funcionamiento de la mitocondria, actuando como neutralizador de radicales libres, activador de enzimas antioxidantes y como modulador del flujo de electrones en la ETC (Martín *et al.*, 2002;; León *et al.*, 2005; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007).

Otro ritmo manifiesto presente en todos los organismos es el ritmo de actividad locomotora, o ritmo de reposo-actividad. Este ritmo puede considerarse como consecuencia directa del ciclo ambiental de luz-oscuridad de 24 horas y es uno de los más utilizados como reflejo del estatus del sistema circadiano. En vertebrados, uno de los procesos asociados a este ritmo es el sueño. El sueño es un estado de reposo que

está determinado por la interacción multiplicativa entre la modulación debida al sistema circadiano y la necesidad de una restauración homeostática (Bes *et al.*, 2009). Esta última se manifiesta por el efecto rebote en el sueño que se produce al privar de sueño a un organismo, y el componente circadiano debido a que el ciclo sueño-vigilia tiene una oscilación de 24 horas. Aunque el rol del sueño en el organismo no está del todo claro, es conocido que se asocia con importantes funciones como el aprendizaje, la memoria, la restauración homeostática y la reparación de tejidos (McNamara *et al.*, 2009). Además, aunque se ha descrito el sueño en todos los vertebrados, no se manifiesta del mismo modo en todos ellos. Así, por un lado nos encontramos especies con un periodo de sueño consolidado, ocurriendo durante el día o durante la noche, como el caso del ser humano (diurno) o el ratón (nocturno), mientras que otras especies, como algunos mamíferos carnívoros, presentan un proceso fragmentado con diversos periodos de sueño a lo largo del día (Campbell y Tobler, 1984). Del mismo modo, unas especies se muestran totalmente inermes durante el periodo de sueño, adoptando posturas características, mientras otras especies están en continuo movimiento durante los periodos de sueño. Las manifestaciones del sueño varían y reflejan las diversas adaptaciones al nicho ecológico que las distintas especies ocupan (Campbell y Tobler, 1984; McNamara *et al.*, 2009).

Envejecimiento del sistema circadiano

El CS no se mantiene estático y constante, sino que sufre cambios desde el nacimiento del organismo hasta su muerte (Weinert y Weinert, 1998; Pandi-Perumal *et al.*, 2002; Münch *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2012). En el nacimiento, el CS se muestra inmaduro, cambiando su actividad en poco tiempo para

ser un verdadero marcapasos circadiano, que se mantendrá así hasta que el paso del tiempo comience a deteriorar el conjunto del sistema (Weinert y Schuh, 1988; Weinert, 2005). Las principales manifestaciones de que el CS está sufriendo algún tipo de alteración son: la pérdida de amplitud, el incremento en la fragmentación y cambios de fase de los ritmos manifiestos (Figura 5) (Weinert, 2000).

Es importante comprender que los ritmos generados por el reloj biológico se deben mantener en fase en relación unos con otros, bien diferenciados y sin alteraciones, trabajando en armonía para un correcto funcionamiento del organismo. En definitiva, el orden temporal interno es necesario para el correcto funcionamiento del organismo (Dunlap *et al.*, 2003).

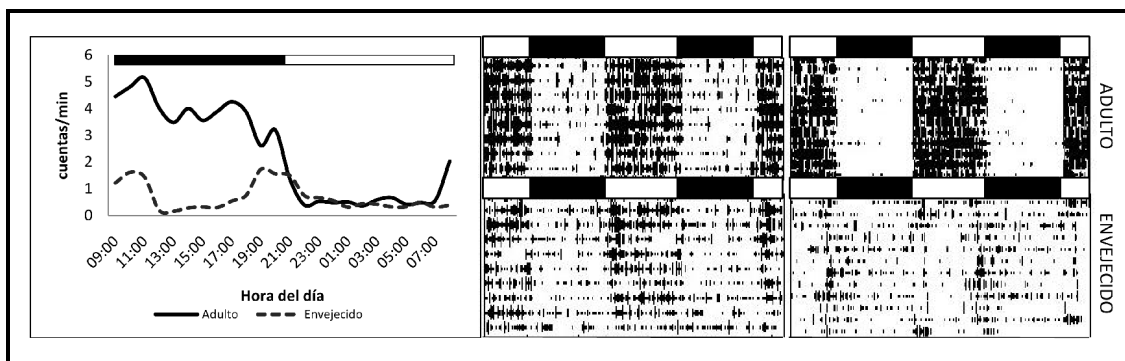


Figura 5. Efectos del envejecimiento sobre el ritmo de actividad locomotora en *Nothobranchius korthausae*. A la izquierda, onda media donde puede apreciarse la reducción en la amplitud del ritmo. A la derecha, actogramas donde puede observarse la fragmentación y la caída en la actividad total (Lucas-Sánchez *et al.*, 2012).

Cuando el orden temporal interno de los diferentes procesos fisiológicos se ve alterado, se habla de cronodisrupción. La cronodisrupción puede producir cambios perjudiciales para el organismo, entre los que se han descrito problemas hormonales, cognitivos, desórdenes del sueño y cáncer (Reiter *et al.*, 2007; Erren y Reiter, 2009). Este desajuste en los ritmos biológicos puede ser debido al deterioro asociado a la

edad del CS. Sin embargo, no solo el envejecimiento va asociado a la aparición de ritmos alterados en el organismo; diversas situaciones como el estrés, el *jet-lag*, el trabajo a turnos o la exposición a la luz durante la noche, también han sido descritos como posibles causantes de cronodisrupción y todos ellos han sido identificados, como aceleradores del envejecimiento (Antoch *et al.*, 2008; Gibson *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2011). De un modo u otro, el envejecimiento va a producir alteraciones a todos los niveles en el CS, ya sea al de las vías de entrada de información, del reloj central y/o de las vías de salida. En cuanto al deterioro de las vías de entrada, el más patente es el que afecta al sistema de visión, alterando la correcta transducción de la información de presencia o ausencia de luz hacia el marcapasos central. Existen numerosas referencias que ponen de manifiesto este hecho, principalmente en humanos (Turner y Mainster, 2008), así como los posibles efectos adversos que ello puede ocasionar sobre el funcionamiento del CS del organismo (Navara y Nelson, 2007).

A nivel del marcapasos central, está ampliamente aceptado que el deterioro asociado al envejecimiento del mismo se debe a la disminución en el número de neuronas y/o a la pérdida de funcionalidad de éstas, lo cual altera el número de sinapsis o la propia sinapsis en sí (Bertini *et al.*, 2010). Sin embargo, la realidad es que en la mayoría de las ocasiones, lo que primero se detecta es un ritmo biológico alterado. Hay que tener en cuenta que el ritmo manifiesto es el último eslabón de una cadena que comienza con la captura de información del medio ambiente, y que cualquier alteración observada en un ritmo generado puede provenir de cualquier punto de esa cadena. Volviendo al símil del reloj antiguo de cuerda, tanto si no le damos cuerda al reloj periódicamente, como si se estropea algún engranaje del

mecanismo central, nosotros observaremos igualmente que las manecillas del reloj indican una hora incorrecta.

Los peces como modelos de estudio del envejecimiento. Género *Nothobranchius*.

El estudio del envejecimiento, como ocurre con cualquier otro campo de investigación, necesita de modelos animales en que poder desarrollar protocolos experimentales que serían imposibles en humanos y, de este modo, arrojar luz sobre los mecanismos implicados. Sin embargo, no todos los animales pueden ocupar el puesto de “modelo” en estos estudios; para ello las especies candidatas deben cumplir una serie de requisitos, previamente establecidos: deben manifestar signos de deterioro relacionados con la edad en el proceso que queramos estudiar, deben ser lo más próximas filogenéticamente a la especie humana y, por último, su ciclo vital debe ser lo más reducido posible. Históricamente, el ratón ha sido el modelo de envejecimiento por excelencia, ya que se conoce bastante bien su biología y está filogenéticamente próximo a los humanos. Sin embargo, la esperanza de vida de estos animales es de, como mínimo, 24 meses, tiempo relativamente elevado y el costo de su mantenimiento en laboratorios por largos periodos de tiempo es considerable. Además, el ratón presenta un comportamiento típicamente nocturno lo cual dificulta su utilización en el laboratorio. En la otra cara de la moneda nos encontramos con *Caenorhabditis elegans*, un nemátodo de 1 mm de longitud, con una esperanza de vida máxima de 2 a 3 semanas por lo que el coste de mantenimiento es muy reducido y necesita de cortos periodos de experimentación para abarcar su ciclo vital completo.

El problema que presenta este pequeño gusano es su gran distancia evolutiva con los mamíferos, lo que dificulta la extrapolación de los datos obtenidos al ser humano.

En una situación intermedia entre estos modelos, en lo que a distancia filogenética se refiere, nos encontramos con el grupo más extenso de vertebrados dentro del reino animal, los peces (Paxton *et al.*, 1998), entre los cuales se incluyen interesantes especies que han sido usadas para el estudio del envejecimiento. Ya en 1978, Woodhead dejó claro que los vertebrados no mamíferos poseen un elevado potencial para erigirse como modelos válidos en estudios de envejecimiento. Los primeros estudios gerontológicos utilizando peces se llevaron a cabo con “Guppy”, *Lebistes reticularis* (Peters, 1859), en el que se observó cómo se podía modular el proceso de envejecimiento mediante la restricción calórica y la manipulación de la temperatura (Comfort, 1960; Comfort, 1961; Comfort, 1969). En la década de los 80 del siglo pasado hubo un gran vacío en la utilización de peces para estudios de envejecimiento, hasta que en los años 90 se comenzó a utilizar el llamado pez cebra, *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822). Estos pequeños ciprínidos de aguas tropicales fueron usados principalmente en biología del desarrollo debido a la transparencia de sus embriones, su rápido desarrollo, su elevada capacidad proliífica (hasta 200 huevos por puesta), su relativo corto ciclo vital, de entre 3 y 4 años, y por el bajo coste de su mantenimiento en el laboratorio (Eisen, 1996). Debido a estas características, numerosos científicos empezaron a mostrar curiosidad por el pez cebra hasta llegar a ser, a día de hoy, uno de los animales mejor caracterizados a nivel genético y muy atractivo para estudios de envejecimiento (Gerhard, 2003; Keller y Murtha, 2004; Kishi, 2004; Yu *et al.*, 2006).

Existe otro grupo de peces muy interesantes, los llamados *killifish* (de “kilde”, palabra de origen danesa que significa pequeño arroyo, charco), que están

adquiriendo un elevado valor gerontológico como modelo de experimentación. En los años 60 se empezaron a usar peces del género *Cynolebias* con el objetivo de determinar la capacidad de la temperatura como modulador del proceso de envejecimiento (Liu y Walford, 1966; Liu y Walford, 1969). Estos peces se siguieron usando en los años 70, documentándose en este género cambios histopatológicos en hígado y riñón con el envejecimiento (Markofsky y Milstoc, 1979a,b). Pero fue hacia el año 2004 cuando se comienza a estudiar verdaderamente la potencialidad de los *killifish* como modelos genéticos de envejecimiento (Herrera y Jagadeeswaran, 2004). Es a partir de entonces cuando este grupo de peces, particularmente los pertenecientes al género *Nothobranchius*, vuelve a ganar importancia en el campo del envejecimiento.

El género *Nothobranchius* está formado por peces anuales de origen africano, que habitan en charcas ocasionadas por las lluvias estacionales. Estos peces se han adaptado a los ciclos de lluvias del ambiente mediante el desarrollo de huevos resistentes a la desecación. Antes de la desaparición de las charcas, los machos estimulan la puesta de las hembras y los huevos quedan enterrados en el sustrato. Una vez que la charca se seca, los huevos entran en un estado de diapausa, ralentizando su desarrollo, hasta la llegada de la nueva estación lluviosa en que se formarán nuevos estanques. Los embriones eclosionan entonces y, de este modo, se da comienzo a un nuevo ciclo (Figura 6) (Jubb, 1982). Además de poseer un marcado dimorfismo sexual (Figura 7), los peces del género *Nothobranchius* poseen un reducido ciclo vital, obviamente determinado por el ambiente extremo en el que viven. Según la especie, se han descrito esperanzas de vida máximas que abarcan desde 3 meses (*N. furzeri*) a 28 meses (*N. guentheri*) (Markofsky y Perlmutter, 1972;

Valdesalici y Cellerino, 2003). Esta peculiar característica es la que los hace especialmente atractivos para realizar estudios de envejecimiento puesto que se trata

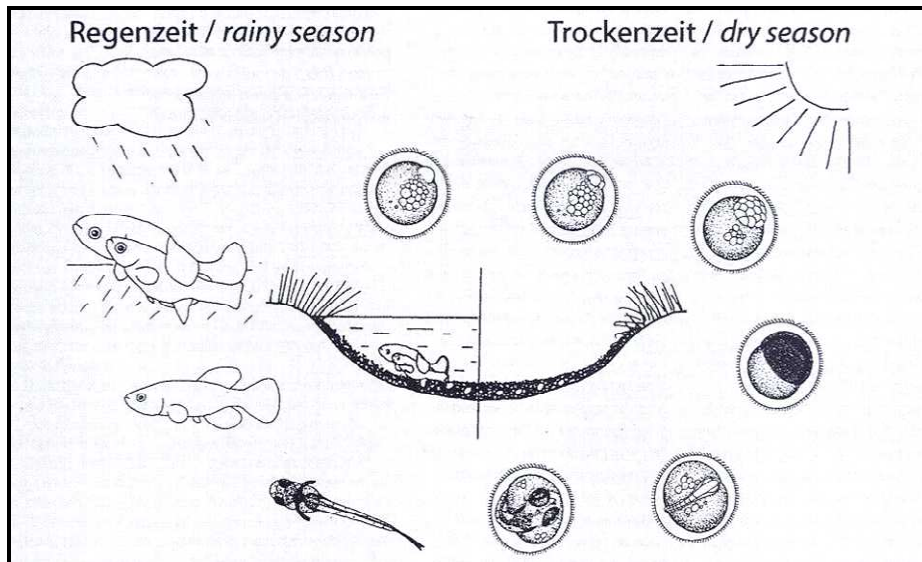


Figura 6. Ciclo de vida de peces anuales del género *Nothobranchius*. En la estación lluviosa la hembra entierra los huevos fecundados en el fango antes de que se seque la charca donde habitan. Durante la estación seca, el embrión se desarrolla hasta que vuelve la estación de lluvias. Poco después de que se forme otra vez la charca, los alevines eclosionan y continúan su ciclo vital (tomado de Seegers, 1997).

de vertebrados y, por lo tanto, su distancia filogenética con mamíferos es mucho menor que la de otros modelos usados como *Caenorhabditis*. Además, son de reducido tamaño y no requieren de ningún tipo especial de equipamiento para el laboratorio. Son resistentes a aguas de baja calidad por lo que toleran un amplio rango de parámetros en el agua, incluyendo la temperatura.

Desde hace unos años, la información disponible en diversos aspectos de la biología del género *Nothobranchius* se ha visto incrementada considerablemente. En la Tabla 1 se recopila toda la información a la que se ha tenido acceso sobre el género *Nothobranchius*. En ella se presenta la longevidad y los hallazgos más relevantes relacionados con el envejecimiento descritos por diferentes autores. En 2003 aparece

la primera referencia a *Nothobranchius furzeri*, especie con una esperanza de vida máxima de 12 semanas, constituyendo el ciclo vital más corto descrito en un vertebrado, lo que lo convirtió en un modelo potencial para el estudio del envejecimiento (Valdesalici y Cellerino, 2003). A partir de ese momento, diversos laboratorios se lanzaron al estudio del envejecimiento del género *Nothobranchius* usando también otras especies (*N. rachovii* y *N. guentheri*), aunque *N. furzeri* ha resultado ser la más utilizada. Desde su primera aparición en 2003, los diversos



Figura 7. Ejemplares de las especies utilizadas en esta tesis doctoral. Arriba, ejemplares macho de *Nothobranchius rachovii* (izquierda) y *N. korthausae* (derecha). Abajo a la izquierda, ejemplar hembra de *N. korthausae*. Queda patente el gran dimorfismo sexual presente en este género. Abajo a la derecha, detalle de un huevo en estado final de desarrollo.

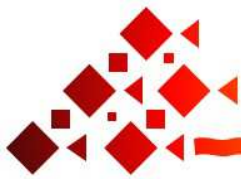
trabajos en *N. furzeri* se han centrado en distintos aspectos de la biología del envejecimiento, como en la modulación de la esperanza de vida mediante la administración de resveratrol (Valenzano *et al.*, 2006b) o mediante la temperatura

(Valenzano *et al.*, 2006a), la descripción de procesos comunes con los mamíferos como el desarrollo de tumores (Di Cicco *et al.*, 2011; Baumgart *et al.*, 2012) o la disminución de la neurogénesis con el envejecimiento (Terzibasi-Tozzini *et al.*, 2012). En la actualidad, una de las líneas de investigación más prometedoras con esta especie tiene como objetivo la producción de individuos transgénicos (Hartmann y Englert, 2012), lo cual supondría un argumento definitivo para considerar al género *Nothobranchius* como un modelo válido para el estudio del proceso de envejecimiento.

Tabla 1. Recopilación de trabajos realizados en *Nothobranchius* relacionados con el envejecimiento hasta la fecha.

Especie – Variedad	Esperanza de vida media/máxima	Observaciones	Referencia
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GNR	9 semanas/12 semanas	Caracterización del ciclo vital	Valdesalici & Cellerino, 2003
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GNR	9 semanas/12 semanas	Prolongación de la esperanza de vida mediante la administración de resveratrol	Valenzano <i>et al.</i> , 2006a
<i>Nothobranchius furzeri</i>	9 semanas/12 semanas	Modulación de la esperanza de vida mediante la modificación de la temperatura y deterioro cognitivo	Valenzano <i>et al.</i> , 2006b
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GRZ <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/03 <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/06 <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/10 <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/10pL		Grandes diferencias en el fenotipo de envejecimiento entre diferentes cepas	Terzibasi-Tozzini <i>et al.</i> , 2008
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GRZ <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/10P <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/03	9 semanas/13 semanas 20 semanas/ 26 semanas 24 semanas/32 semanas	La restricción calórica prolonga la edad máxima en las cepas crecidas en laboratorio y salvajes, pero aumenta la mortandad en las últimas, y aumenta la capacidad de aprendizaje	Terzibasi-Tozzini <i>et al.</i> , 2009
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GRZ <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM-0403	10 semanas/16 semanas 26 semanas/34 semanas	Acortamiento de telómeros e incremento en la actividad telomerasa con el envejecimiento	Hartmann <i>et al.</i> , 2009
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GRZ		Caracterización genómica	Reichwald <i>et al.</i> , 2009
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GRZ <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM0403		Determinación génica de la coloración de la aleta caudal y del sexo	Valenzano <i>et al.</i> , 2009
<i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM-04/10	28 semanas/40 semanas (machos) 30 semanas/41 semanas (hembras)	Aumento del crecimiento mediante el aislamiento de machos y hembras	Graf <i>et al.</i> , 2010
<i>Nothobranchius furzeri</i>		Localización de la proteína S100, importante para el mantenimiento del SNC	D'angelo <i>et al.</i> , 2011
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GNR <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/03 <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/10	9 semanas/No especificado 16 semanas/ No especificado 18 semanas/ No especificado	Muestra un proceso de envejecimiento típico de peces óseos, pero acompañado del desarrollo de neoplasias	Di Cicco <i>et al.</i> , 2011
<i>Nothobranchius furzeri</i>		El número de copias de ADN mitocondrial (mtDNA) y su funcionalidad decrecen con la edad. Secuenciación del mtDNA	Hartmann <i>et al.</i> , 2011
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GRZ <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM0403		Generación de individuos transgénicos	Valenzano <i>et al.</i> , 2011
<i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/10		Reducción en la neurogénesis con el envejecimiento	Terzibasi-Tozzini <i>et al.</i> , 2012
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GRZ <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/10	5 semanas/No especificado 27 semanas/No especificado	Identificación de mRNA responsables del envejecimiento altamente conservados evolutivamente	Baumgart <i>et al.</i> , 2012
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GRZ <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM0403		Secuenciación del genoma y determinación génica de la esperanza de vida	Kirschner <i>et al.</i> , 2012
<i>Nothobranchius furzeri</i> – MZCS-08/122		Protocolo para la generación de individuos transgénicos	Hartmann & Englert, 2012
<i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM04/10		Atlas del SNC	D'angelo, 2013
<i>Nothobranchius furzeri</i>		Generación de individuos transgénicos de expresión inducible	Allard <i>et al.</i> , 2013

<i>Nothobranchius furzeri</i> – GRZ <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM0403		Catálogo de todos los transcritos secuenciados hasta la fecha	Petzold <i>et al.</i> , 2013
<i>Nothobranchius furzeri</i> – GRZ <i>Nothobranchius furzeri</i> – MZM		Células mantenidas en cultivo no expresan marcadores de envejecimiento	Graf <i>et al.</i> , 2013
<i>Nothobranchius guentheri</i>	64 semanas/112 semanas	Relación entre la madurez sexual y la longevidad	Markofsky & Perlmutter, 1972
<i>Nothobranchius guentheri</i>		Diferencias de crecimiento entre individuos de una misma población	Markofsky & Perlmutter, 1973
<i>Nothobranchius guentheri</i>		Vacuolización de hepatocitos y degeneración nodular con la edad	Markofsky & Perlmutter, 1979a
<i>Nothobranchius guentheri</i>		Observación de dilatación tubular, engrosamiento de la cápsula de Bowman, lipocromos, tumores malignos y tejido tiroideo ectópico en el riñón con la edad	Markofsky & Perlmutter, 1979b
<i>Nothobranchius guentheri</i>		Descenso del contenido energético corporal con la edad	Barlmer, 1982
<i>Nothobranchius guentheri</i>		Desarrollo de tumores a nivel general y degeneración del timo con el envejecimiento	Cooper <i>et al.</i> , 1983
<i>Nothobranchius guentheri</i> – TZ97-2	43 semanas/64 semanas	Resveratrol ralentiza el deterioro cognitivo, incrementa la esperanza de vida y retrasa la aparición de marcadores histológicos de envejecimiento	Yu & Li, 2012
<i>Nothobranchius guentheri</i>		Determinación de diferentes biomarcadores de envejecimiento a diferentes edades	Liu <i>et al.</i> , 2012
<i>Nothobranchius guentheri</i>		Efecto protector del resveratrol sobre la glía neuronal e incremento en la esperanza de vida. No produce ningún efecto sobre las neuronas	Genade & Lang, 2013
<i>Nothobranchius rachovii</i>	24 semanas/37 semanas	Acumulación de pigmentos, incremento en la peroxidación lipídica y daño proteínico, reducción de la expresión de enzimas antioxidantes y acortamientos de telómeros con el envejecimiento	Hsu <i>et al.</i> , 2008
<i>Nothobranchius rachovii</i>	34 semanas/37 semanas	Caracterización de la curva de supervivencia y aislamiento de marcadores de cDNA	Herrera & Jagadeeswaran, 2004
<i>Nothobranchius rachovii</i>		La baja temperatura (20°C) prolonga la supervivencia y reduce los valores de los marcadores de envejecimiento	Hsu & Chiu, 2009
<i>Nothobranchius korthausae</i>		Hiperplasia adenohipofisiaria y tiroidea en individuos viejos	Ruijter <i>et al.</i> , 1987



OBJETIVOS



OBJETIVO GENERAL

Estudio de la fisiología del envejecimiento en peces teleósteos del género *Nothobranchius* mediante la caracterización de su ciclo vital: Determinaciones anatómicas, fisiológicas, estudio de la composición de lípidos de membrana, particularmente mitocondriales, y caracterización del sistema circadiano, con el fin de determinar su idoneidad como modelo para estudios de envejecimiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artículo 1

- Caracterizar el ciclo vital completo de *Nothobranchius korthausae* con el establecimiento de su curva de supervivencia.
- Identificar los parámetros morfofisiológicos que sufren cambios con el envejecimiento para su utilización como posibles marcadores de dicho proceso.
- Describir el perfil de ácidos grasos de tejido completo de *Nothobranchius korthausae* a lo largo de su ciclo vital.
- Analizar el ritmo de actividad locomotora a lo largo de su ciclo vital como una expresión del funcionamiento del sistema circadiano.

Artículo 2

- Analizar los cambios en el sistema circadiano de *Nothobranchius korthausae* durante el proceso de envejecimiento.
- Diseñar un método sencillo para la identificación y descripción de periodos de sueño, mediante el registro de la actividad locomotora.

- Caracterizar el sueño en *Nothobranchius korthausae* así como sus posibles alteraciones con el envejecimiento.
- Determinar los efectos del tratamiento con melatonina exógena sobre el ritmo de actividad locomotora y su posible papel como promotor de sueño.

Artículo 3

- Describir los cambios en la composición lipídica, fosfolípidos y sus ácidos grasos constituyentes, de las membranas mitocondriales de *Nothobranchius rachovii* a lo largo del ciclo vital.
- Relacionar dichos cambios con el envejecimiento.

OTROS OBJETIVOS

Anexo I

- Caracterizar las alteraciones que ocurren en el sistema circadiano, determinado a partir del ritmo de actividad locomotora, en los días previos a la muerte de *Nothobranchius rachovii*.
- Determinar qué parámetros del ritmo reposo-actividad son más relevantes como indicadores de cronodisrupción.
- Construir un modelo predictor de la esperanza de vida en la especie.

Anexo II

- Revisión de la situación actual del género *Nothobranchius* como modelo para estudios de envejecimiento.

The graphic consists of a cluster of red diamonds of various sizes on the left, followed by a horizontal wavy line that transitions from yellow to red. The text "TRABAJO EXPERIMENTAL" is positioned to the right of the diamond cluster and above the wavy line.

TRABAJO EXPERIMENTAL

AGE-RELATED CHANGES IN FATTY ACID PROFILE AND LOCOMOTOR ACTIVITY RHYTHMS IN *Nothobranchius korthausae*

A. Lucas-Sánchez, P.F. Almada-Pagán, J.A. Madrid, J. de Costa, P. Mendiola

Publicado en *Experimental Gerontology* 46, 970-978 (2011)

URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2011.08.009>

ABSTRACT

The life cycle of *Nothobranchius korthausae*, a Cyprinodontiformes fish, was studied in our laboratory to characterise the ageing process. Some morphological changes, such as spine curvature, skin colour, and fin and eye appearance are described. Growth and survival curves reflected a fast life cycle with rapid initial growth until 4 weeks of age, after which the fish grew more slowly before reaching their final size in week 40. Senescence onset was established at week 48 with a decrease in spawn size and viability and a general decline in the animal's appearance (weight and colouration losses, caudal fin degradation, and cataractogenesis). The fatty acid composition changed with age, with high unsaturation in the adult stage as reflected by a high peroxidation index, a condition that is associated with high susceptibility to oxidative damage if elevated reactive oxygen species (ROS) production occurs. Senescent fish had an increase in monounsaturated fatty acid proportions and a lower peroxidation index (226.5 ± 19.7 in adults versus 120.2 ± 19.1 in senescent fish, $P < 0.05$). The circadian system, as reflected by locomotor activity rhythms, showed noticeable changes with age. Twenty-four-week-old fish (adults) had a robust diurnal rhythm that showed a decrease in total activity, an increase in rhythm fragmentation, and a fall in amplitude and regularity with age. Changes were clearly reflected in the Circadian

Function Index variations (0.56, 0.47 and 0.25 at 24, 48 and 72 weeks of age, respectively). In conclusion, *N. korthausae* appears to be a species with appropriate characteristics for ageing studies because it manifests clear signs of progressive ageing. Comparing species of *Nothobranchius* genus with different lifespans may be useful for increasing our understanding of the ageing process.

REST-ACTIVITY CIRCADIAN RHYTHMS IN AGED *Nothobranchius korthausae*. THE EFFECTS OF MELATONIN

A. Lucas-Sánchez, P.F. Almada-Pagán, A. Martínez-Nicolas, J.A. Madrid, P. Mendiola, J. de Costa

Publicado en *Experimental Gerontology* 48, 507-516 (2013)

URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2013.02.026>

ABSTRACT

Adult (48-week-old) and senescent (72-week-old) individually-kept Nothobranchius korthausae were used as experimental subjects to characterise circadian system (CS) function and age-related changes in senescent fish. This species was specifically chosen because it has already shown potential for use as a model system in gerontological studies. The rest-activity rhythm (RAR) in fish can be easily monitored and used to characterise the state of the CS, and it has also been proposed as a reliable model to study sleep-like periods in fish. As they aged, N. korthausae experienced a significant decrease in total daily activity and a progressive impairment of the RAR, accompanied by changes in the regularity, fragmentation and amplitude of the rhythm. The ability of the CS to oscillate autonomously when the two main synchronizers, photoperiod and feeding time, were absent (continuous darkness and random feeding), was also impaired with age, as the capacity to re-synchronise to the light–dark (LD) cycle declined. Melatonin treatment improved the regularity, fragmentation and amplitude of the RAR in senescent fish, and it also improved sleep efficiency. In conclusion, N. korthausae represents a viable model for studying the

aging of the circadian system and the restorative effect of chronobiotic substances, such as melatonin.

**AGE-RELATED CHANGES IN MITOCHONDRIAL MEMBRANE
COMPOSITION OF *Nothobranchius rachovii***

A. Lucas-Sánchez, P.F. Almada-Pagán, D.R. Tocher, P. Mendiola, J. de Costa

Publicado en *Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES*.

DOI: 10.1096/gerona/glt066

Decision Letter (JGBS-2012-184.R2)

From: Editor.JGBS@gmail.com

To: alucas@um.es

CC:

Subject: Journal of Gerontology: Biological Sciences - Decision on Manuscript ID JGBS-2012-184.R2

Body: 09-Apr-2013

Dear Mr. Lucas-Sanchez,

It is a pleasure to accept your revised manuscript entitled "Age-related changes in mitochondrial membrane composition of *Nothobranchius rachovii*" in its current form for publication in the Journal of Gerontology: Biological Sciences. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Please visit http://www.oxfordjournals.org/our_journals/gerona/for_authors/licence.pdf to complete the copyright form needed for publication.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of Gerontology: Biological Sciences, we look forward to your continued contributions to the Journal.

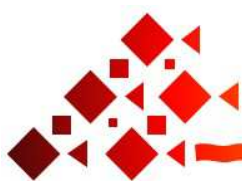
Yours sincerely,
Dr. Rafael de Cabo
Editor, Journal of Gerontology: Biological Sciences
Editor.JGBS@gmail.com

Associate Editor
Comments to the Author:
(There are no comments.)

Date Sent: 09-Apr-2013

ABSTRACT

Mitochondrial membrane composition may be a critical factor in the mechanisms of the aging process by influencing the propagation of reactions involved in mitochondrial function during periods of high stress. Changes affecting either lipid class or fatty acid compositions could affect phospholipid properties and alter mitochondrial function and cell viability. In the present study, mitochondrial membrane phospholipid compositions were analyzed throughout the life cycle of *Nothobranchius rachovii*. Mitochondrial phospholipids showed several changes with age. Proportions of cardiolipin decreased and those of sphingomyelin increased between 11- and 14-month-old fish. Fatty acid compositions of individual phospholipids in mitochondria were also significantly affected with age. These data suggest increasing damage to mitochondrial lipids during the life cycle of *N. rachovii* that could be one of the main factors related with and contributing to degraded mitochondrial function associated with the aging process.



DISCUSIÓN GENERAL



En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el proceso de envejecimiento en dos especies del género *Nothobranchius* utilizando distintas metodologías. De acuerdo con los resultados obtenidos, se confirma la idoneidad del uso de especies de peces del género *Nothobranchius* para el estudio del envejecimiento, surgiendo a la vez nuevas posibilidades para el estudio de este complejo proceso. En primer lugar, la caracterización de los cambios morfológicos que tienen lugar a lo largo del ciclo vital de los animales; segundo, la identificación de los cambios con la edad en la composición lipídica de las membranas plasmáticas y mitocondriales del animal completo; y por último, la caracterización del funcionamiento del sistema circadiano (CS) de los peces a lo largo de su ciclo vital, haciendo especial énfasis en la fase de senescencia de los animales. Todas estas determinaciones han sido consideradas en la presente Tesis Doctoral como posibles marcadores del envejecimiento que, unidos a los sugeridos por otros grupos de investigación en distintas especies de *Nothobranchius*, proporcionan en conjunto una mejor caracterización de este interesante género de peces, que podría ser de gran utilidad para realizar estudios de envejecimiento.

1. Esperanza de vida del género *Nothobranchius*

Las dos especies del género *Nothobranchius* utilizadas en esta Tesis Doctoral, *N. korthausae* y *N. rachovii*, fueron elegidas considerando sus esperanzas de vida (12 y 8 meses de vida media, respectivamente) (Herrera & Jagadeeswaran, 2004). En el presente trabajo, ambas especies mostraron un ciclo de vida acelerado, con un crecimiento explosivo durante la primera mitad de su vida para alcanzar la madurez sexual a las 4 semanas. Uno de los interrogantes que se plantean en el estudio de

este género son las diferencias en la longevidad que muestra cada especie. Este hecho ha sido correlacionado con el hábitat de la especie, principalmente con la disponibilidad de agua. En la Tabla 3 del Artículo 1 se recogen datos referentes a la esperanza de vida media y máxima, precipitaciones totales anuales (en mm) y tipo de hábitat de las diferentes especies de *Nothobranchius* que, hasta el momento, han sido usadas en estudios de envejecimiento por diferentes laboratorios. La duración de la charca en el medio natural determina la ventana de tiempo en la que los alevines deben crecer, llegar a adultos y reproducirse para asegurar la descendencia para el siguiente ciclo de lluvias. A su vez, el tiempo de permanencia de la charca depende fundamentalmente de la duración de la estación lluviosa. Algunas especies de *Nothobranchius* se desarrollan en zonas muy áridas, en las que existe tan sólo una estación lluviosa de no más de unas pocas semanas de duración. En estos ambientes las charcas prevalecen por muy poco tiempo y los peces que en ellas viven, presentan ciclos vitales muy reducidos. Éste es el caso de *N. furzeri*, originario de Zimbabue, que presenta una esperanza de vida media de 9 semanas y una vida máxima de 12 semanas. Estos peces crecen de forma extremadamente rápida y alcanzan la madurez sexual en unas pocas semanas (Valdesalici y Cellerino, 2003). En el otro extremo, están las especies de *Nothobranchius* que crecen en climas moderadamente húmedos, en los que llueve regularmente durante todo el año. En estos hábitats, la presencia de agua no es tan limitante y nos encontramos con peces que, si bien presentan una tasa de crecimiento acelerado, muestran esperanzas de vida más largas (caso de *N. rachovii*, *N. guenterei* y *N. korthausae*, originarios de Mozambique, Zanzíbar e Isla de Mafia, respectivamente; que viven 34 semanas de media y 37 semanas de máxima en el primer caso, 64/112 en el segundo, y 57/81 en el último) (Markofsky y Perlmutter, 1972; Herrera y Jagadeeswaran, 2004).

La utilización de especies con distintas longevidades supone una ventaja para caracterizar el proceso de envejecimiento. La elección de las dos especies de *Nothobranchius* para esta Tesis va en este sentido. Por un lado usamos una especie de ciclo vital más prolongado, como *N. korthausae*, que es adecuada para desarrollar protocolos más largos y que requieran periodos de adaptación o de registro de ventanas de tiempo. De este modo, se pretende realizar un estudio más detallado de todo el proceso de envejecimiento. Por otro lado, usamos *N. rachovii*, una especie de ciclo vital más reducido, en la que se pueden llevar a cabo protocolos experimentales más cortos, facilitando de esta manera el abarcar todo el ciclo vital de la especie. De este modo, la caracterización del envejecimiento a distintos niveles y entre especies muy próximas filogenéticamente puede contribuir a incrementar el conocimiento del proceso de envejecimiento en el género *Nothobranchius*.

2. Cambios morfológicos con el envejecimiento en *Nothobranchius*

A lo largo del ciclo vital de *Nothobranchius* se identifican fácilmente diversos síntomas morfológicos de envejecimiento. La principal manifestación morfológica asociada al envejecimiento en *Nothobranchius* es la curvatura de la espina dorsal (lordosis), en forma de S (Artículo 1, Figura 1). Este proceso también ha sido descrito en *N. furzeri* (Terzibasi-Tozzini *et al.*, 2008), en otras especies de peces teleósteos como medaka (Hatakeyama *et al.*, 2008) y pez cebra (Gerhard *et al.*, 2002) y en diversas especies de vertebrados, incluidos los seres humanos (Arking, 2006). La principal consecuencia de la aparición de lordosis en *Nothobranchius* es que existe una mayor dificultad en el movimiento, ocasionando diferentes tipos de problemas, como por ejemplo en la captura de alimento.

Otros factores indicativos de peces envejecidos son: la pérdida de masa corporal, la pérdida de color y brillo de la piel y el deterioro de las aletas, muy patente en la aleta caudal. Estas observaciones son más evidentes en machos, debido a su mayor vistosidad (Artículo 1). Una observación muy interesante es el deterioro del sistema visual por la aparición de cataratas, proceso ampliamente descrito en diferentes especies de vertebrados (Waagbø *et al.*, 2003; Toivonen *et al.*, 2004; Kondratov *et al.*, 2006; Ferrari, 2007).

3. Composición lipídica. Modificaciones en las membranas con el envejecimiento.

A lo largo de los ensayos realizados en esta Tesis Doctoral, se ha constatado que, lejos de ser estática, la composición en ácidos grasos corporales totales (Artículo 1) y la composición de las membranas mitocondriales (Artículo 3), sufren variaciones con el tiempo. En primer lugar, se han descrito cambios con el envejecimiento en los lípidos totales en cuerpo entero de *N. korthausae* (Artículo 1). En las 3 etapas del ciclo vital analizadas (individuos juveniles, adultos y senescentes) se detectan cantidades significativamente diferentes de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), ácido docosapentaenoico (C22:5n-3) y ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA). La suma de ambos ácidos grasos representa más del 20% del total de ácidos grasos en individuos juveniles y adultos mientras que en animales senescentes apenas supera el 9%. Estos resultados ilustran el alto nivel de insaturación de los lípidos de *N. korthausae*, lo cual podría tener un papel determinante en su reducida esperanza de vida (Sanz *et al.*, 2006b; Hulbert *et al.*, 2007a). Los cambios que se observan al pasar de la etapa adulta a la senescente muestran una reducción notable en el nivel de

insaturaciones en el perfil lipídico de las membranas, incrementándose la proporción de ácidos grasos más saturados como el ácido palmítico (C16:0), debido posiblemente a una acumulación de daños en las membranas producidos por las ROS durante la etapa de crecimiento. La composición de ácidos grasos de un organismo, permite estimar la susceptibilidad al daño oxidativo de sus lípidos mediante el cálculo del Índice de Peroxidación (PIn) (Witting y Horwitt, 1964a). El PIn se mantiene elevado en la etapa de crecimiento, y desciende significativamente en la etapa senescente. Esto puede ser debido a un deterioro general en los lípidos, registrándose caídas significativas en la proporción de HUFA, especialmente de DHA, e incrementos en las proporciones de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Aunque existe una muy reducida información acerca de los cambios en los perfiles lipídicos de los animales a lo largo del ciclo vital, algunos trabajos realizados en corazón de rata (Castelluccio *et al.*, 1994) y en *Daphnia* (Barata *et al.*, 2005) por otros autores, muestran un descenso en el nivel de DHA y HUFA en general, similar a lo encontrado en *N. korthausae*.

A raíz de estos hallazgos, se profundizó más en la caracterización de los perfiles lipídicos de *Nothobranchius*, trabajando a nivel de las membranas mitocondriales, las cuales podrían ser claves por su papel de marcapasos en el proceso del envejecimiento. La generación de energía por parte de la mitocondria depende en buena medida de la composición lipídica de su membrana interna, donde quedan alojadas las subunidades de la cadena transportadora de electrones (ETC). El contenido lipídico de las membranas mitocondriales así como la estructura y composición de sus fosfolípidos constituyentes, han sido asociados con la función de esta organela y se ha comprobado que se ven alterados en múltiples tejidos afectados por numerosas condiciones fisiopatológicas y el envejecimiento (Paradies *et al.*, 2002). En este sentido, la mitocondria posee un fosfolípido exclusivo, la cardiolipina (CL), que

tiene un papel esencial en el funcionamiento de la mitocondria en general y de la fosforilación oxidativa en particular (Paradies *et al.*, 2002). La CL presenta un alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácido linoleico (LA, C18:2n-6), y bajos niveles de ácidos grasos saturados (Schlame *et al.*, 2000). Este hecho junto con su proximidad a los complejos I y III de la ETC, donde se liberan mayoritariamente los ROS, la hacen especialmente susceptible al daño oxidativo. Los niveles de CL aumentan de forma gradual durante la etapa de crecimiento de *Nothobranchius rachovii*, en la que los animales doblan su peso corporal (Artículo 3). Estas etapas de crecimiento rápido se relacionan con elevadas tasas metabólicas y por tanto, una elevada actividad mitocondrial (Inness y Metcalfe, 2008). Las etapas de crecimiento acelerado han sido asociadas con una reducida esperanza de vida (Rollo, 2002; Alonso-Álvarez *et al.*, 2007), debido al elevado estrés oxidativo asociado. En un trabajo realizado en *N. rachovii* por Hsu *et al.* (2009), se observó un incremento de la peroxidación lipídica y del daño a proteínas y un descenso de la capacidad antioxidante con el envejecimiento. Este estrés oxidativo, como ya se ha señalado con anterioridad, afecta a lípidos de la membrana interna mitocondrial (MIM) y al mtDNA fundamentalmente, comprometiendo la función mitocondrial y la viabilidad de la célula (Almroth *et al.*, 2010). Todos estos procesos podrían explicarse teniendo en cuenta el papel que la CL juega en la organela. La alteración del contenido de CL en la MIM o de su composición de ácidos grasos, podría afectar a la eficiencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Paradies *et al.*, 2011).

El contenido de CL en la mitocondria desciende entre animales de 11 y 14 meses de edad (adultos y senescentes, respectivamente) (Artículo 3), probablemente debido a la oxidación de la molécula en una situación de estrés oxidativo. La peroxidación de la CL se ha relacionado también con la apoptosis celular asociada a la

disfunción mitocondrial. Durante el proceso de apoptosis, se han descrito descensos en los niveles de CL y fosfatidilcolina (PC) en mitocondrias de hígado de ratón (Crimi y Esposti, 2011). Estos cambios parecen reflejar problemas en la síntesis de PC, lo cual repercutiría directamente en el remodelado de CL dañadas, ya que la PC actúa como donante de grupos acilo. El descenso significativo observado en PC con el envejecimiento en mitocondrias de *N. rachovii* podría afectar por tanto a la remodelación de CL, todo ello desencadenando los procesos descritos que llevarían a la apoptosis. En esta situación, la CL tiende a asociarse al citocromo c, formando una molécula prooxidante (Basova *et al.*, 2007; Kagan *et al.*, 2009). Este complejo se convierte en la diana de una peroxidasa catalítica, que rompe la molécula y libera el citocromo c al citosol, lo cual ha sido descrito como una de las principales señales para que la célula comience el proceso de apoptosis (Kagan *et al.*, 2005).

En esta Tesis Doctoral se ha observado también un aumento significativo en el contenido de esfingomielina (SM) mitocondrial en animales senescentes. Debido a su composición, con dos cadenas hidrocarbonadas con bajo nivel de insaturaciones, la SM se ha relacionado con un papel protector de las membranas lipídicas. Las membranas con un alto contenido en SM son membranas más rígidas, donde se ralentizaría la propagación de radicales libres o de peróxidos generados por estos radicales libres (Subbaiah *et al.*, 1999a). Un incremento en el nivel de SM con el envejecimiento podría asociarse con un mecanismo de protección frente al daño oxidativo. Por otro lado, la SM es un importante precursor de moléculas señalizadoras asociadas con el proceso de apoptosis (Hannun y Obeid, 1997). Este efecto está asociado a la formación de ceramidas, moléculas que pueden promover la formación de ROS, alterar la homeostasis del calcio y producir cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa al citocromo c y otras proteínas de reducido tamaño

que pueden ser relevantes durante el proceso apoptótico (Cutler y Mattson, 2001; Siskind, 2005; Siskind *et al.*, 2006).

Las membranas mitocondriales de *N. rachovii* muestran patrones similares de cambios en las proporciones de ácidos grasos (Artículo 3) a los encontrados en los ácidos grasos en cuerpo entero de *N. korthausae* (Artículo 1): una elevada proporción en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) inicial que con el paso del tiempo disminuye. Los PUFA de la serie omega-3 descienden en PC, fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS), mientras que los de la serie omega-6 disminuyen en todas las clases de fosfolípidos excepto en PS. Al mismo tiempo, aumentan las proporciones de ácidos grasos monoinsaturados, sobre todo en PC, PE y PS.

Aunque los datos del Artículo 1 y del Artículo 3 procedan de diferentes especies que muestran esperanzas de vida relativamente distintas (*N. korthausae*: 81 semanas máximo, *N. rachovii*: 60 semanas máximo), ambos grupos apuntan en la misma dirección: el nivel de insaturación de la membrana marca los diferentes estadios del ciclo vital. Las dos especies de *Nothobranchius* muestran una elevada tasa de crecimiento. Se trata de animales con membranas lipídicas muy insaturadas, lo que implica una mayor fluidez de las mismas. Este hecho está asociado con una mayor tasa metabólica. Esta gran disponibilidad de energía podría deberse a una mayor presencia de complejos de la ETC, anclados a la MIM mediante la CL. La mayor proporción de CL descrita en *N. rachovii* en los estadios de máximo crecimiento puede respaldar esta hipótesis. Estas elevadas tasas metabólicas se han relacionado con un elevado estrés oxidativo y una reducción del ciclo vital (Inness y Metcalfe, 2008). Una situación de elevado estrés oxidativo va asociada con una mayor tasa de daño a las moléculas celulares, especialmente a los lípidos de membrana adyacentes a los lugares de producción de radicales libres, tal y como se ha descrito en la

introducción. Los ácidos grasos más susceptibles a la oxidación son aquellos con un alto número de insaturaciones (HUFA), por lo que el daño oxidativo estaría asociado con una disminución en la proporción de estos ácidos grasos (Girón-Calle *et al.*, 1997). Un mecanismo de defensa ante esta oxidación, sería el incremento observado en SM, con propiedades rigidificantes de la membrana. Este mecanismo ha sido observado anteriormente en diversos tejidos de mamíferos con el envejecimiento (Giusto *et al.*, 1992; Lightle *et al.*, 2000) y en mitocondrias de cerebro de trucha arco iris (Almáida-Pagán *et al.*, 2012). En cualquier caso, cualquier cambio en la composición de los lípidos de las membranas celulares, especialmente de las membranas mitocondriales, conlleva una alteración de las funciones bioenergéticas de la célula así como de las rutas de señalización en que las distintas moléculas fosfolípídicas operan. Como ya se ha indicado, estos cambios pueden explicar por sí mismos la disfunción mitocondrial y el deterioro tisular asociado al envejecimiento (Ledesma *et al.*, 2012). La necesidad imperiosa de *Nothobranchius* de alcanzar una talla que le permita reproducirse con éxito lo antes posible acaba generando una deuda a pagar que no es otra que la de un ciclo vital reducido.

4. Cambios en el sistema circadiano de *Nothobranchius* con el envejecimiento

Como se ha comentado anteriormente, la disfunción mitocondrial podría explicar el deterioro progresivo, acumulativo e irreversible que se produce en los tejidos de todo organismo con la edad. Aunque los elementos externos que reflejan envejecimiento puedan resultar buenos indicativos del mismo, es necesario conocer cómo se ve afectado el funcionamiento interno de un modo más integral. El estudio del

sistema circadiano (CS) puede ofrecernos ese conocimiento. El CS en peces sigue el mismo esquema general anteriormente descrito, aunque con algunas peculiaridades. Se ha descrito que la glándula pineal cumple la función de reloj central (Zhdanova y Reeb, 2006). Debido a su posición anatómica, la glándula pineal recibe información luminosa directamente del ambiente, además de la información que le llega desde las vías de entrada ópticas generales. La melatonina, secretada por la glándula pineal, es la encargada de poner en hora al animal, esto es, de sincronizar sus funciones internas con los cambios cíclicos del ambiente. Se ha demostrado la existencia de osciladores periféricos que son encarrilados por la luz *in vitro* (Whitmore *et al.*, 1998; 2000; Peirson *et al.*, 2009). Debido a esto, y a la posible dualidad de la entrada de información al sistema (ojos y luz directa), el CS en peces está formado por una compleja red de conexiones entre el reloj central y los relojes periféricos que debe de estar bien coordinada para mantener la integridad fisiológica.

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el ritmo de actividad locomotora como reflejo e indicador del estado del CS, al igual que ha sido usado en otras especies (Edgar y Dement, 1991; Mailloux *et al.*, 1999; Kalsbeek *et al.*, 2011). *Nothobranchius* presenta un comportamiento diurno. En peces de 24 meses (*N. korthausae*), los parámetros medidos indican que se trata de un ritmo estable, regular y robusto. Además, la alimentación tiene un importante efecto sincronizador, tal y como queda reflejado con las actividades máximas (acrofases) del ritmo de actividad locomotora, las cuales se concentran en torno a la hora de la alimentación, así como por la identificación de fuertes incrementos en la actividad locomotora en las horas previas a la alimentación (comportamiento anticipatorio a la alimentación). Este comportamiento refleja la eficiencia del CS para prever eventos cíclicos y, de este modo, responder de forma óptima a dicho evento. En este caso, si la alimentación es administrada

regularmente a la misma hora todos los días, el organismo intentará acomodarse a este evento que se repite, sacando el máximo provecho de ese hecho. Una forma de acrecentar la eficacia es la búsqueda activa del alimento en momentos próximos a su administración, mediante un incremento en la actividad motora, aumentando las probabilidades de éxito de conseguirlo. Esta sincronización con la hora de la alimentación también produce cambios en la fisiología interna, como los descritos en carpín dorado, donde se modifica la secreción de enzimas digestivas en momentos previos y posteriores a la alimentación cuando ésta se producía todos los días a la misma hora (Vera *et al.*, 2007). Por el contrario, en los peces en condiciones aleatorias de alimentación no se observa esa modificación ante la incapacidad de anticipar cuándo les iba a ser suministrado el alimento. Además, la concentración plasmática de cortisol, hormona marcadora de estrés, es más elevada en peces con alimentación aleatoria (Vera *et al.*, 2007). La exposición a claves temporales arrítmicas puede suponer una situación de estrés para el organismo y puede afectar al normal funcionamiento del mismo. Es lógico pensar que existe un mecanismo endógeno de sincronización al alimento (Feeding Entrainment Oscillator, FEO), ya que tanto en carpín dorado, como en mamíferos persiste la secreción de enzimas digestivas al exponer a estos animales a ayuno o a condiciones de curso libre (Saito *et al.*, 1976; Scheving *et al.*, 1983), y que no responde a un mecanismo directo y pasivo en respuesta a la toma de alimento.

Queda patente que *Nothobranchius* presenta un fuerte comportamiento diurno: elevadas tasas de actividad durante el día cuando busca alimento y defiende activamente su territorio; y poco o nada de actividad durante la noche, lo cual equivaldría al período de descanso de *Nothobranchius*. En vertebrados, el periodo de descanso se caracteriza por llevar asociado un comportamiento muy específico, el

sueño. El sueño es un fenómeno comportamental y fisiológico universal que comparte todas las funciones básicas y mecanismos en vertebrados y que deriva del comportamiento de descanso de invertebrados. Numerosas teorías han intentado explicar el porqué de esta universalidad y de los beneficios que aporta el sueño al organismo (McNamara *et al.*, 2009). Los diferentes estudios realizados hasta la fecha no han podido desvelar de forma concluyente el papel de este fenómeno, si bien se conocen muy bien las consecuencias que su privación tiene sobre un organismo (Van Cauter *et al.*, 2008; Walker, 2008). La caracterización del sueño en diferentes especies de vertebrados refleja que este proceso presenta variaciones. Nos encontramos desde periodos de sueño consolidados en algún momento determinado del día, como ocurre en el ser humano, a periodos de sueño fragmentados en los que el animal duerme un breve periodo de tiempo cada vez a lo largo del día. Del mismo modo, algunos organismos permanecen inmóviles durante el sueño, con posturas características, mientras que otros se mantienen en movimiento. Este último es el caso de muchos animales que viven en medios acuáticos y que necesitan un flujo de agua activo por las branquias para conseguir oxígeno (Campbell y Tobler, 1984; McNamara *et al.*, 2009).

Uno de los propósitos de esta tesis ha sido caracterizar el proceso de sueño en *Nothobranchius* y determinar los cambios que ocurren durante el envejecimiento. Para ello, se ha desarrollado un nuevo método basado en la utilización de parámetros derivados del ritmo de actividad locomotora, propuesto como alternativa al *video-tracking* utilizado en otros trabajos y que resulta más tedioso. En el Artículo 2 de la presente Tesis Doctoral se puede apreciar que *Nothobranchius* muestra un comportamiento asociado al sueño durante la fase nocturna, entrando rápidamente en este estado al desaparecer la luz. Se identifican visualmente los periodos de sueño

como periodos sin ningún tipo de movimiento, flotando con la cabeza ligeramente elevada respecto al resto del cuerpo en la superficie del tanque y sin movimientos de las aletas pectorales. Esta descripción para *Nothobranchius* se corresponde con los criterios comportamentales para identificar periodos de sueño previamente descritos (Campbell y Tobler, 1984) y son similares a los observados en el pez cebra (Zhdanova, 2011). Con respecto a su ritmo de actividad motora, los *Nothobranchius* adultos presentan una fase tipo-sueño que ocupa casi la totalidad de la noche, con entre 6 y 9 periodos de reposo e interrupciones de una duración más o menos constante de 15 minutos.

El funcionamiento del CS de *Nothobranchius* se ve alterado con la edad. Como se apuntó anteriormente, el envejecimiento está asociado con disfunción mitocondrial y apoptosis celular que desencadena daño tisular afectando a todos los tejidos del organismo, especialmente a aquellos altamente diferenciados. Este daño afectaría también al CS, lo cual quedará reflejado en los ritmos biológicos del animal. La principal característica de un ritmo envejecido es la pérdida de amplitud, documentado ampliamente en la literatura científica (Weinert, 2000). Otro síntoma descrito en ritmos afectados por el envejecimiento es el incremento en la fragmentación, lo cual resulta en ritmos inestables, situación que afectará a la capacidad del animal para adaptarse a su entorno. En *Nothobranchius* se ha constatado que, con el paso del tiempo, la amplitud del ritmo de actividad locomotora va disminuyendo progresivamente desde la etapa adulta hasta el final de su ciclo vital, al tiempo que la fragmentación se ve incrementada. Otros marcadores que se pueden extraer del análisis del ritmo de actividad locomotora, como la cantidad total de ésta, su estabilidad y la regularidad de la acrofase, también sufren cambios, todos apuntando en la misma dirección: el

deterioro general del ritmo de actividad locomotora y del funcionamiento general del CS con la edad.

La utilización de índices que integren algunas de las variables más importantes de un ritmo circadiano, nos ayuda en tanto que, con un sólo vistazo a un valor, nos da una visión aproximada del conjunto del sistema. En este aspecto, el Índice de Funcionamiento Circadiano (CFI, (Ortiz-Tudela *et al.*, 2010)) ha mostrado ser válido no solo para humanos, sino también para animales. Las 3 variables que la integran: estabilidad interdiaria (IS), variabilidad intradiaria (IV) y amplitud relativa (RA) (Van Someren *et al.*, 1999) dan una importante información adicional cuando se analizan por separado. IS está relacionada con la capacidad del individuo para sincronizar con los diferentes *zeitgebers*, principalmente el ciclo luz-oscuridad. El descenso en IS con el envejecimiento observado en *Nothobranchius* puede ser debido a un deterioro de las vías de entrada, como el sistema visual, o del reloj central. Se ha descrito que ciertas alteraciones visuales tienen este efecto (Drouyer *et al.*, 2008; Lax *et al.*, 2011) a la vez que pueden influir también en el incremento de la fragmentación (IV) del ritmo, tal y como se ha encontrado en *Nothobranchius*. La cataractogénesis observada en individuos senescentes de *Nothobranchius* podría ser una posible razón de pérdida parcial de sincronización y/o incremento de la fragmentación. El deterioro general del organismo con el envejecimiento puede alcanzar también a la glándula pineal, considerada en peces como el marcapasos central del CS (Zhdanova y Reebbs, 2006), lo cual afectará en primer lugar al ritmo de secreción de melatonina. La melatonina, además de ser la señal química de oscuridad para el organismo, también es considerada una molécula antioxidante, inmunoestimulante, antitumoral e hipnótica (Allegra *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2004; Sánchez-Barceló *et al.*, 2010; Escames *et al.*, 2012). Con el envejecimiento, la producción y liberación de esta hormona se ve

alterada, disminuyendo la amplitud del ritmo de secreción y reduciéndose el contraste en la concentración de melatonina circulante durante el día y la noche (Karasek, 2004), lo cual también ha sido descrito en pez cebra (Zhdanova *et al.*, 2008). Ya que la melatonina puede considerarse como el reloj que circula por el organismo, un aplanamiento de su ritmo de secreción podría favorecer la aparición en otros ritmos de síntomas como los ya mencionados, esto es, reducción de la amplitud e incremento de la fragmentación. Esto sugiere que la administración de melatonina exógena en momentos determinados del día podría ser una terapia potencial antienvjecimiento. Los síntomas de envejecimiento mostrados en el ritmo de actividad locomotora en *Nothobranchius senescentes* son temporalmente restaurados por un tratamiento de melatonina exógena, administrada en el alimento antes de iniciar la fase oscura (Artículo 2). Los efectos beneficiosos se observan inmediatamente después de iniciar el tratamiento, aumentando la estabilidad y la amplitud y disminuyendo la fragmentación y el total de actividad durante la fase nocturna. Este efecto se mantiene durante la duración del tratamiento con melatonina exógena y perdura hasta 10 días después de finalizar el tratamiento, momento en el que la mayoría de variables vuelven a sus valores originales. Además, el tratamiento con melatonina tiene un efecto reagrupante sobre la acrofase, reduciendo la dispersión de los datos, efecto que se observa al menos 10 días después de finalizar el tratamiento. Estos datos corroboran los de otros trabajos realizados en animales y humanos, donde la melatonina exógena funciona como sincronizador de diferentes ritmos endógenos (Lockley *et al.*, 2000; Schuhler *et al.*, 2002; Hack *et al.*, 2003; Vivanco *et al.*, 2007).

La melatonina también interviene en la regulación del sueño. En estudios realizados en mamíferos y peces, se ha descrito que la melatonina exógena presenta un efecto potenciador del sueño (Zhdanova *et al.*, 2001). La mayoría de trabajos en los

que se ha estudiado la relación entre sueño y melatonina en peces, han sido realizados en pez cebra y han mostrado el potencial de esta hormona para el tratamiento de alteraciones del sueño (Zhdanova *et al.*, 2008; Appelbaum *et al.*, 2009). El tratamiento con melatonina también mejora la eficacia de sueño en *Nothobranchius*, con una reducción patente del tiempo en que el animal tiene el primer periodo de sueño desde el apagado de luces (latencia). Esto, junto a un ligero descenso de la actividad locomotora total durante el tratamiento sugiere un efecto de somnolencia sobre el individuo. La melatonina ejerce su efecto a través de receptores de membrana MT1 y MT2, ampliamente distribuidos por el organismo (Falcón *et al.*, 2010). Mientras que el efecto de la activación de MT1 parece estar relacionado con la amplitud de los ritmos y es promotor del sueño, la activación de MT2 parece mostrar avance de fase (Dubocovich, 2007). El tratamiento de melatonina exógena en *Nothobranchius* produce un incremento de amplitud en el ritmo de actividad reposo (RAR), reagrupación de fase y una ligera mejora en el sueño, volviendo a valores iniciales al cesar el tratamiento. Esto sugiere que la respuesta a la melatonina por parte de los receptores no está alterada por el envejecimiento, pudiendo ser más un problema de vías de entrada y/o producción/liberación de melatonina. El deterioro de la glándula pineal (Reiter, 1995) junto con el deterioro de la fotorrecepción con el envejecimiento debido a, entre otros, la generación de cataratas, irían en este sentido (Zhang *et al.*, 1998; Turner y Mainster, 2008).

Si bien el CS sufre deterioro con el envejecimiento, no resulta fácil establecer un patrón de descomposición de los diferentes factores que lo integran, ya que es común que animales con la misma base genética y mantenidos bajo las mismas condiciones, muestren diferentes tasas de envejecimiento y esperanzas de vida (Finkel *et al.*, 1995; Herndon *et al.*, 2002). Por tanto, la edad cronológica puede no

corresponderse con la edad biológica de los organismos. Ésta puede ser la causa de la aparición de datos contradictorios entre diferentes estudios, como los encontrados respecto a los cambios de fase de los ritmos con el envejecimiento (Pittendrigh y Daan, 1974; Witting *et al.*, 1994; Davis y Viswanathan, 1998).

Las modificaciones que se producen en el CS en organismos próximos a la muerte no han sido estudiadas en profundidad, siendo una posible razón de ello la baja relación productividad/coste que pueda tener mantener animales hasta su muerte natural en las instalaciones. Sin embargo, puede ser un tipo de experimento válido y útil para encontrar mecanismos comunes en la desorganización del CS en organismos en esa situación y, de este modo, construir un modelo que nos permita predecir el efecto de diferentes condiciones experimentales sobre el CS del animal.

En el Anexo I de esta Tesis Doctoral se han analizado los cambios en el ritmo de actividad locomotora de *Nothobranchius* (reflejando el estado general del CS) durante el último mes de vida de los animales. El sistema muestra un deterioro progresivo, aunque no todos los índices cambian al mismo tiempo. Los indicadores de la robustez y estabilidad del ritmo de actividad locomotora, como el IS, la acrofase, la actividad máxima y el %V del periodograma comienzan a alterarse entre 18 y 16 días antes de la muerte del animal y se produce también un incremento en la fragmentación. A partir del día 14 antes de morir, el valor del periodo del ritmo de actividad locomotora comienza a dispersarse, obteniéndose valores por encima y por debajo de 24 horas. Hasta ese momento, tanto la actividad total, como la amplitud, el CFI y la calidad del sueño se mantienen inalterados, comenzando a mostrar signos de deterioro a partir del día 12 antes de la muerte del animal. Los últimos cambios observados se producen alrededor del día 8 antes de la muerte, momento en que la estabilidad y el %V del periodograma vuelven a sufrir otra caída y se produce una

pérdida de regularidad de la acrofase. A partir de aquí, el deterioro de todos los valores se hace más rápido y progresivo, el animal se vuelve arrítmico y va perdiendo prácticamente toda actividad hasta el momento de su muerte.

Debido a que ese deterioro del CS parece mostrar un patrón más o menos definido, se ha elaborado un modelo para correlacionar el estado de las variables con la esperanza de vida de los animales. Las variables: % de actividad diurna, entropía aproximada (ApEn), IV, actividad máxima y actividad total son las que presentan un mayor grado de correlación para el modelo. Estas variables son fáciles de calcular y algunas de ellas han sido usadas como marcadores de alteraciones circadianas (Turek *et al.*, 1995; Van Someren *et al.*, 1999).

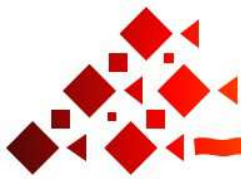
Como se ha visto, se puede extraer mucha información de las diferentes variables que pueden ser medidas en una serie temporal. Está claro que el sistema circadiano produce señales rítmicas complejas y altamente elaboradas como consecuencia de la integración de las numerosas señales que recibe el reloj central, y una variable que puede resultar útil para medir ese grado de acoplamiento puede ser la entropía aproximada (ApEn). Debido al alto nivel de complejidad del sistema, un primer vistazo a los datos puede dar una falsa apariencia de aleatoriedad (“ruido”), que no es otra cosa que un ritmo regular en el que su expresión requiere de la interacción de numerosos factores. El envejecimiento causa una pérdida en la capacidad de integración de las diferentes señales que recibe el CS, lo cual simplifica las señales de salida, reduciendo ese “ruido” (y por tanto la complejidad), dando una apariencia de mayor regularidad a la serie temporal (Lipsitz & Goldberger, 1992). Por este motivo, la cuantificación de la complejidad de la señal de salida de un sistema biológico puede darnos información acerca de su correcto funcionamiento. Así, la medida de la ApEn ha sido utilizada para el diagnóstico clínico (Varela *et al.*, 2006), con buenos

resultados. Básicamente, cuando la ApEn disminuye, la información necesaria para describir una serie temporal es menor y, por tanto, es menos compleja (Pincus y Goldberger, 1994). Hasta donde se ha podido tener acceso, ésta es la primera vez que se aplica este tipo de índice en animales. El descenso progresivo de ApEn descrito en *N. rachovii* podría significar un menor nivel de acoplamiento entre las diferentes señales que integran el ritmo de actividad locomotora, viéndose reducida la complejidad de dicho ritmo con el envejecimiento.

La construcción de un árbol de decisiones como el que se aporta en el Anexo I puede ser una manera sencilla de identificar individuos alterados por el envejecimiento y la posibilidad de aplicar tratamientos capaces de prevenir o retrasar el deterioro de la función circadiana mediante la estabilización de los ritmos circadianos, la reducción de la fragilidad y/o la mejora del bienestar del individuo. De cualquier modo, son necesarios más trabajos para completar estas teorías y comprender mejor el proceso de envejecimiento.

En definitiva, los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral, junto con otros ya existentes en el género (Anexo II), ponen de manifiesto el gran potencial de las distintas especies de *Nothobranchius* como modelos en los que estudiar el envejecimiento. El género incluye especies de ciclo de vida corto, fáciles de manejar y manipular en el laboratorio y, como queda demostrado por los trabajos presentados en la presente memoria, sufren un proceso de envejecimiento progresivo fácil de caracterizar. Por un lado, se observan cambios en la composición de las membranas celulares y mitocondriales a lo largo del ciclo vital de *N. korthausae* y *N. rachovii*, los cuales se relacionan con una disfunción en la producción de energía por parte de la célula y con apoptosis celular mediada por disfunción mitocondrial. Este deterioro podría afectar a la funcionalidad del CS, el cual entraría en un estado de

cronodisrupción que podría acelerar el proceso de envejecimiento en sí. Además, *Nothobranchius* se muestra sensible a cronobióticos como la melatonina, abriendo un nuevo abanico de posibilidades para su estudio. Todo en conjunto no hace más que remarcar la idoneidad de la utilización de especies del género *Nothobranchius* como modelos para estudios de envejecimiento, y apuntan a un prometedor futuro de las mismas como tales.



CONCLUSIONES

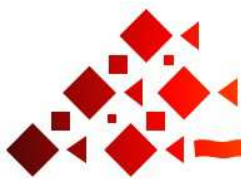


1. Los peces del género *Nothobranchius* muestran un ciclo vital acelerado, marcado por un crecimiento explosivo. Este crecimiento se mantiene constante hasta la aparición de manifestaciones morfofisiológicas de envejecimiento, como daños en la aleta caudal, emaciación, encorvamiento dorsal, pérdida de color, cataratas y reducción en la fertilidad, que son fácilmente identificables.
2. El perfil de ácidos grasos general de *Nothobranchius* sufre cambios relacionados con la edad. Existe una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados en las primeras etapas del ciclo vital, sobre todo de ácido docosahexaenoico (DHA), lo cual está asociado con periodos de elevada tasa metabólica como el crecimiento acelerado característico de las especies del género. Esta situación implica un mayor estrés oxidativo, siendo esto determinante de la esperanza de vida, de acuerdo con la teoría de envejecimiento del marcapasos de membrana.
3. La composición de las membranas mitocondriales de *Nothobranchius* se ve alterada con la edad. Estos cambios ocurren por un lado, a nivel de los fosfolípidos integrantes de dichas membranas, como es el caso de la cardiolipina, cuya concentración disminuye de forma significativa con la edad, y la esfingomielina, cuya proporción aumenta, teniendo ambos un importante papel en la función mitocondrial y en el proceso de apoptosis. Por otro lado, la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana también se ve alterada, se vuelven más saturados, lo cual también influye en las características de la membrana y en las funciones señalizadoras de los fosfolípidos.

4. El sistema circadiano en *Nothobranchius* está sujeto a un deterioro progresivo identificable mediante el estudio del ritmo de actividad locomotora. Este ritmo presenta un fuerte componente diurno y una acrofase asociada a la hora de la alimentación. Los principales cambios que ocurren con el envejecimiento son una reducción de la amplitud del ritmo, un descenso en la regularidad y un aumento de la fragmentación, previamente descritos como buenos marcadores de ritmos circadianos envejecidos.
5. *Nothobranchius* muestra cortos periodos de sueño durante la fase nocturna, identificables por posturas y comportamientos específicos. Aunque se observa un ligero deterioro con el paso del tiempo, no existen grandes diferencias entre peces adultos y senescentes.
6. El tratamiento con melatonina exógena, incluida en el alimento, previo a la fase oscura en *Nothobranchius* senescentes con el ritmo de actividad locomotora claramente deteriorado, produce una potenciación temporal de este ritmo, perceptible como un incremento de la amplitud y una disminución de la fragmentación, además de una reagrupación de fase. La reducción observada en la actividad total sugiere un efecto de somnolencia. El efecto reparador de la melatonina desaparece tras 10 días del cese del tratamiento.
7. Existe un patrón de descomposición del sistema circadiano en *Nothobranchius* próximos a la muerte. El deterioro es rápido y progresivo, y no se manifiesta hasta unos 18 días antes de morir. Se proponen métodos para la estimación de días restantes de vida, con la finalidad de encontrar individuos claramente afectados y aplicarles posibles terapias de recuperación.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los datos aportados en la presente memoria refuerzan la idea de que las especies del género *Nothobranchius* constituyen un buen modelo para el estudio de los procesos de envejecimiento en sus distintos aspectos. En concreto, las especies estudiadas, *N. korthausae* y *N. rachovii*, con un ciclo vital de duración moderadamente corta, son adecuadas tanto para estudios que requieran una intervención experimental de varios días, como son los de actividad locomotora aquí presentados, como para la obtención de muestras puntuales a lo largo del ciclo vital con rapidez. Esta esperanza de vida reducida puede relacionarse con la composición de las membranas lipídicas, altamente insaturadas durante el periodo de crecimiento, de acuerdo con la Teoría de envejecimiento del marcapasos de membrana. Debido a la alteración de estas con el paso del tiempo, el resto de estructuras, como el sistema circadiano, muestran síntomas de envejecimiento, que pueden ser temporalmente revertidos mediante la administración de melatonina exógena, lo cual actúa como un potente cronobiótico.



CONCLUSIONS

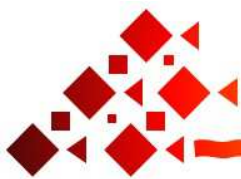
CONCLUSIONS

1. Fish of the genus *Nothobranchius* show an accelerated life-cycle with an explosive growth. This growth is maintained until the apparition of age-related morphophysiological manifestations, as caudal fin damage, emaciation, spine curvature, colour loss, cataractogenesis and diminished fertility, it is easily recognizable.
2. *Nothobranchius* fatty acid profile suffers age-related changes. Higher polyunsaturated fatty acid proportions exist during the early life-cycle, mainly docosahexaenoic acid (DHA), which is associated with high metabolic rate periods as the accelerated growth typical of the species of this genus. This situation, which is related to an increased oxidative stress, is decisive for the lifespan, according to the membrane pacemaker theory of ageing.
3. Mitochondrial membrane composition also suffers changes with time. These changes occur, firstly, to the phospholipids that form the membranes, as cardiolipin, whose concentration is reduced by age, and sphingomyelin, whose proportion is increased. Cardiolipin is an essential phospholipid for the normal functioning of the electron transport chain and changes in its proportion have been associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis. Meanwhile, sphingomyelin has membrane rigidifying properties, blocking the oxidative damage propagation and is also an apoptotic mediator. Secondly, membrane phospholipid fatty acid composition is also altered, becoming more saturated, influencing in the membrane characteristics and in the phospholipid signaling functions.

4. *Nothobranchius* circadian system suffers a progressive impairment reflected by the study of locomotor activity rhythm. This rhythm shows a strong diurnal component and an acrophase associated with feeding time. The main age-related changes are a reduced rhythm amplitude, a regularity loss and a fragmentation increase, previously described as good markers of aged circadian rhythms.
5. *Nothobranchius* shows short sleep periods during the nocturnal phase, recognizable by both specific behaviour and postures. Although a slight impairment is observed with age, there are no remarkable differences between adult and senescent fish.
6. Exogenous melatonin treatment, using food as a vehicle, previous to dark phase, applied to aged *Nothobranchius* with impaired locomotor activity rhythm, produce a temporal rhythm enhancement, noticeable by an increased amplitude and fragmentation loss, besides a phase re-grouping. The reduction observed in the total activity suggests a somnolence effect. Ten days after the treatment ends, the benefits of melatonin disappear.
7. A circadian system breakdown pattern exists in *Nothobranchius* close to death. The impairment is rapid and progressive, and do not appear until 18 days before death. Methods are proposed to estimate how many days are left to death, with the purpose of identifying altered individuals and to apply potential recovery therapies to them.

GENERAL CONCLUSION

All data presented in this Doctoral Thesis reinforce the idea of *Nothobranchius* species are good models for the study of the ageing process. Specifically, *N. korthausae* and *N. rachovii* show a moderated short lifespan, which is appropriate to experimental protocols that required a number of days to make confident measures, as locomotor activity rhythm characterization. Also it is appropriate to obtain punctual samples during a life cycle more quickly than other model species. This reduced lifespan could be related to the lipid membrane composition, highly unsaturated during the growth period, according to the membrane pacemaker theory of ageing. Due to the functional alteration of membranes during ageing, remaining structures as circadian system will show age-related symptoms, which can be temporarily reverted by exogenous melatonin, acting as a strong chronobiotic.



REFERENCIAS



- Acuña-Castroviejo,D., Escames,G., Rodríguez,M.I. y López,L.C. 2007. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front. Biosci.* 12:947-963.
- Allard,J.B., Kamei,H. y Duan,C. 2013. Inducible transgenic expression in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Journal of Fish Biology.* 82:1733-1738.
- Allegra,M., Reiter,R.J., Tan,D.-X., Gentile,C., Tesoriere,L. y Livrea,M.A. 2003. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal Res.* 34:1-10.
- Almáida-Pagán,P.F., de Costa Ruiz,J., Mendiola López,P. y Tocher,D.R. 2012. Age-related changes in mitochondrial membrane composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart and brain. *Comp. Biochem. Physiol.* 163:129-137.
- Almroth,B.C., Johansson,A., Förlin,L. y Sturve,J. 2010. Early-age changes in oxidative stress in brown trout, *Salmo trutta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 155B:442-448.
- Alonso-Álvarez,C., Bertrand,S., Faivre,B. y Sorci,G. 2007. Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches. *Functional Ecology.* 21:873-879.
- Antoch,M.P., Gorbacheva,V.Y., Vykhovanets,O.V., Toshkov,I.A., Kondratov,R.V., Kondratova,A.A., Lee,C. y Nikitin,A.Y. 2008. Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis. *Cell Cycle.* 7:1197-1204.
- Appelbaum,L., Wang,G.X., Maro,G.S., Mori,R., Tovin,A., Marina,W., Yokogawa,T., Kawakami,K., Smith,S.J., Gothilf,Y., Mignot,E. y Mourrain,P. 2009. Sleep-wake

- regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:21942-21947.
- Arking,R. 2006. *Biology of aging: observations and principles*. 3ª ed. 624 págs. Oxford University Press, Oxford. ISBN: 0195167392.
- Armstrong,S.M., Cassone,V.M., Chesworth,M.J., Redman,J.R. y Short,R.V. 1986. Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J. Neural Transm. Suppl.* 21:375-394.
- Balmer,R.T. 1982. The effect of age on body energy content of the annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. *Exp. Gerontol.* 17:139-143.
- Barata,C., Navarro,J.C., Varo,I., Riva,M.C., Arun,S. y Porte,C. 2005. Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. *Comp. Biochem. Physiol.* 140B:81-90.
- Basova,L.V., Kurnikov,I.V., Wang,L., Ritov,V.B., Belikova,N.A., Vlasova,I.I., Pacheco,A.A., Winnica,D.E., Peterson,J., Bayir,H., Waldeck,D.H. y Kagan,V.E. 2007. Cardiolipin switch in mitochondria: Shutting off the reduction of Cytochrome c and turning on the peroxidase activity. *Biochemistry.* 46:3423-3434.
- Baumgart,M., Groth,M., Priebe,S., Appelt,J., Guthke,R., Platzer,M. y Cellerino,A. 2012. Age-dependent regulation of tumor-related microRNAs in the brain of the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Mech. Ageing Dev.* 133:226-233.

- Bertini,G., Colavito,V., Tognoli,C., Seke Etet,P.F. y Bentivoglio,M. 2010. The aging brain, neuroinflammatory signaling and sleep-wake regulation. *Ital. J. Anat. Embryol.* 115:31-38.
- Bes,F., Jobert,M. y Schulz,H. 2009. Modeling napping, post-lunch dip, and other variations in human sleep propensity. *Sleep.* 32:392-398.
- Brown,S.A., Schmitt,K. y Eckert,A. 2011. Aging and circadian disruption: Causes and effects. *Aging.* 3:813-817.
- Campbell,S.S. y Tobler,I. 1984. Animal sleep: A review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8:269-300.
- Castelluccio,C., Baracca,A., Fato,R., Pallotti,F., Maranesi,M., Barzanti,V., Gorini,A., Villa,R.F., Parenti Castelli,G., Marchetti,M. y Lenaz,G. 1994. Mitochondrial activities of rat heart during ageing. *Mech. Ageing Dev.* 76:73-88.
- Chaudhary,K.R., El Sikhry,H. y Seubert,J.M. 2011. Mitochondria and the aging heart. *Journal of Geriatric Cardiology.* 8:159-167.
- Chicco,A.J. y Sparagna,G.C. 2007. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am. J. Physiol.* 292:C33-C44.
- Comfort,A. 1960. The effect of age on growth-resumption in fish (*Lebistes*) checked by food restriction. *Gerontologia.* 4:177-186.
- Comfort,A. 1961. Age and reproduction in female *Lebistes*. *Gerontologia.* 5:146-149.
- Comfort,A. 1969. Effect of temperature on tail regeneration in *Lebistes*. *Gerontologia.* 15:248-251.

- Cooper,E.L., Zapata,A., García Barrutia,M. y Ramírez,J.A. 1983. Aging changes in lymphopoietic and myelopoietic organs of the annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. *Exp. Gerontol.* 18:29-38.
- Crimi,M. y Esposti,M.D. 2011. Apoptosis-induced changes in mitochondrial lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1813:551-557.
- Cutler,R.G. y Mattson,M.P. 2001. Sphingomyelin and ceramide as regulators of development and lifespan. *Mech. Ageing Dev.* 122:895-908.
- D'Angelo,L. 2013. Brain atlas of an emerging teleostean model: *Nothobranchius furzeri*. *Anat. Rec.* 296:681-691.
- D'Angelo,L., De Girolamo,P., Cellerino,A., Terzibasi Tozzini,E., Varricchio,E., Castaldo,L. y Lucini,C. 2011. Immunolocalization of S100-like protein in the brain of an emerging model organism: *Nothobranchius furzeri*. *Microscopy Research and Technique.* (En prensa).
- Davis,F.C. y Viswanathan,N. 1998. Stability of circadian timing with age in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol.* 275:R960-R968.
- Di Cicco,E., Terzibasi Tozzini,E., Rossi,G. y Cellerino,A. 2011. The short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri* shows a typical teleost aging processes reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. *Exp. Gerontol.* 46:249-256.
- Drouyer,E., Dkhissi-Benyahya,O., Chiquet,C., WoldeMussie,E., Ruiz,G., Wheeler,L.A., Denis,P. y Cooper,H.M. 2008. Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS One.* 3:e3931.

- Dubocovich, M.L. 2007. Melatonin receptors: Role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep Med.* 8:34-42.
- Dunlap, J.C., Loros, J.J. y DeCoursey, P.J. 2003. *Chronobiology: Biological timekeeping*. 406 págs. Sinauer Associates Inc., U.S., Sunderland, MA. ISBN: 087893149X.
- Eisen, J.S. 1996. Zebrafish make a big splash. *Cell.* 87:969-977.
- Erren, T.C. y Reiter, R.J. 2009. Defining chronodisruption. *J. Pineal Res.* 46:245-247.
- Escames, G., Ozturk, G., Baño Otálora, B., Pozo, M.J., Madrid Pérez, J.A., Reiter, R.J., Serrano, E., Concepción, M. y Acuña-Castroviejo, D. 2012. Exercise and melatonin in humans: Reciprocal benefits. *J. Pineal Res.* 52:1-11.
- Falcón, J., Migaud, H., Muñoz-Cueto, J.A. y Carrillo Estévez, M.A. 2010. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165:469-482.
- Ferrari, C.K.B. 2007. Functional foods and physical activities in health promotion of aging people. *Maturitas.* 58:327-339.
- Finkel, D., Whitfield, K. y McGue, M. 1995. Genetic and environmental influences on functional age: A twin study. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences.* 50B:104-113.
- Genade, T. y Lang, D.M. 2013. Resveratrol extends lifespan and preserves glia but not neurons of the *Nothobranchius guentheri* optic tectum. *Exp. Gerontol.* 48:202-212.

- 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. y Cheng,K.C. 2002. Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Gerontol.* 37:1055-1068.
- Gerschman,R., Gilbert,D.L., Nye,S.W., Dwyer,P. y Fenn,W.O. 1954. Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science.* 119:623-626.
- Gibson,E.M., Williams III,W.P. y Kriegsfeld,L.J. 2009. Aging in the circadian system: Considerations for health, disease prevention and longevity. *Exp. Gerontol.* 44:51-56.
- Girón-Calle,J., Schmid,P. y Schmid,H.H.O. 1997. Effects of oxidative stress on glycerolipid acyl turnover in rat hepatocytes. *Lipids.* 32:917-923.
- Giusto,N.M., Roque,M.E. y Ilincheta de Boschero,M.G. 1992. Effects of aging on the content, composition and synthesis of sphingomyelin in the central nervous system. *Lipids.* 27:835-839.
- Graf,M., Cellerino,A. y Englert,C. 2010. Gender separation increases somatic growth in females but does not affect lifespan in *Nothobranchius furzeri*. *PLoS One.* 5:e11958.
- Graf,M., Hartmann,N., Reichwald,K. y Englert,C. 2013. Absence of replicative senescence in cultured cells from the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*. *Exp. Gerontol.* 48:17-28.

- Hack,L.M., Lockley,S.W., Arendt,J. y Skene,D.J. 2003. The effects of low-dose 0.5-mg melatonin on the free-running circadian rhythms of blind subjects. *J. Biol. Rhythms*. 18:420-429.
- Halliwell,B. y Gutteridge,J.M.C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4ª ed. (XXXVI, 851 s vols.) 704 págs. Oxford University Press, Oxford. ISBN: 978-0-19-856869-8.
- Hannun,Y.A. y Obeid,L.M. 1997. Ceramide and the eukaryotic stress response. *Biochem. Soc. Trans.* 25:1171-1175.
- Hannun,Y.A. y Obeid,L.M. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:139-150.
- Hardeland,R., Cardinali,D.P., Srinivasan,V., Spence,D.W., Brown,G.M. y Pandi-Perumal,S.R. 2011. Melatonin- A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog. Neurobiol.* 93:350-384.
- Harman,D. 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11:298-300.
- Harman,D. 1972. The biological clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 20:145-147.
- Hartmann,N. y Englert,C. 2012. A microinjection protocol for the generation of transgenic killifish (Species: *Nothobranchius furzeri*). *Dev. Dyn.* 241:1133-1141.
- Hartmann,N., Reichwald,K., Lechel,A., Graf,M., Kirschner,J., Dorn,A., Terzibasi Tozzini,E., Wellner,J., Platzer,M., Rudolph,K.L., Cellerino,A. y Englert,C. 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., Terzibasi Tozzini,E., Cellerino,A., Ristow,M., Brandt,U., Platzer,M. y Englert,C. 2011. Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell.* 10:824-831.
- Hatakeyama,H., Nakamura,K.I., Izumiyama-Shimomura,N., Ishii,A., Tsuchida,S., Takubo,K. y Ishikawa,N. 2008. The teleost *Oryzias latipes* shows telomere shortening with age despite considerable telomerase activity throughout life. *Mech. Ageing Dev.* 129:550-557.
- Heidler,T., Hartwig,K., Daniel,H. y Wenzel,U. 2010. *Caenorhabditis elegans* lifespan extension caused by treatment with an orally active ROS-generator is dependent on DAF-16 and SIR-2.1. *Biogerontology.* 11:183-195.
- Herndon,L.A., Schmeissner,P.J., Dudaronek,J.M., Brown,P.A., Listner,K.M., Sakano,Y., Paupard,M.C., Hall,D.H. y Driscoll,M. 2002. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature.* 419:808-814.
- Herrera,M. y Jagadeeswaran,P. 2004. Annual fish as a genetic model for aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59:B101-B107.
- Hoch,F.L. 1992. Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1113:71-133.

- Hofstra,W.A. y de Weerd,A.W. 2008. How to assess circadian rhythm in humans: A review of literature. *Epilepsy & Behavior*. 13:438-444.
- Holman,R.T. 1954. Autoxidation of fats and related substances. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. 2:51-98.
- Hsu,C.Y. y Chiu,Y.C. 2009. Ambient temperature influences aging in an annual fish (*Nothobranchius rachovii*). *Aging Cell*. 8:726-737.
- Hsu,C.Y., Chiu,Y.C., Hsu,W.L. y 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.
- Hulbert,A.J. 2005. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* 234:277-288.
- Hulbert,A.J. 2008. Explaining longevity of different animals: is membrane fatty acid composition the missing link? *Age*. 30:89-97.
- Hulbert,A.J., Pamplona,R., Buffenstein,R. y Buttemer,W.A. 2007a. Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.* 87:1175-1213.
- Hulbert,A.J., Pamplona,R., Buffenstein,R. y Buttemer,W.A. 2007b. Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.* 87:1175-1213.
- Inness,C.L.W. y Metcalfe,N.B. 2008. The impact of dietary restriction, intermittent feeding and compensatory growth on reproductive investment and lifespan in a short-lived fish. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 275:1703-1708.

- Johnson, M.L., Bengtson, V.L., Coleman, P.G. y Kirkwood, T.B.L. 2005. *The Cambridge handbook of age and ageing*. 772 págs. Cambridge University Press, Cambridge. ISBN: 9780521533706.
- Jubb, R.A. 1982. *Nothobranchius*. TFH Publications, Neptune City, New Jersey. ISBN: 0876665342.
- Kagan, V.E., Bayir, H., Belikova, N.A., Kapralov, O., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Jiang, J., Stoyanovsky, D.A., Wipf, P., Kochanek, P.M., Greenberger, J.S., Pitt, B., Shvedova, A.A. y Borisenko, G. 2009. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic. Biol. Med.* 46:1439-1453.
- Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., Kini, V., Vlasova, I.I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D.A. *et al.* 2005. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol.* 1:223-232.
- Kalsbeek, A., Yi, C.-X., Cailotto, C., la Fleur, S.E., Fliers, E. y Buijs, R.M. 2011. Mammalian clock output mechanisms. *Essays Biochem.* 49:137-151.
- Karasek, M. 2004. Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp. Gerontol.* 39:1723-1729.
- Keller, E.T. y Murtha, J.M. 2004. The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comp. Biochem. Physiol.* 138C:335-341.
- Kirschner, J., Weber, D., Neuschl, C., Franke, A., Böttger, M., Zielke, L., Powalsky, E., Groth, M., Shagin, D., Petzold, A., Hartmann, N., Englert, C., Brockmann, G.A.,

- Platzer,M., Cellerino,A. *et al.* 2012. Mapping of quantitative trait loci controlling lifespan in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*- a new vertebrate model for age research. *Aging Cell.* 11:252-261.
- Kishi,S. 2004. Functional aging and gradual senescence in Zebrafish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019:521-526.
- Kondratov,R.V., Kondratova,A.A., Gorbacheva,V.Y., Vykhovanets,O.V. y Antoch,M.P. 2006. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev.* 20:1868-1873.
- Lamont,E.W., James,F.O., Boivin,D.B. y Cermakian,N. 2007. From circadian clock gene expression to pathologies. *Sleep Med.* 8:547-556.
- Lax,P., Baño Otálora,B., Esquivá,G., Rol de Lama,M.Á., Madrid Pérez,J.A. y Cuenca,N. 2011. Circadian dysfunction in P23H rhodopsin transgenic rats: Effects of exogenous melatonin. *J. Pineal Res.* 50:183-191.
- Ledesma,M.D., Martín,M.G. y Dotti,C.G. 2012. Lipid changes in the aged brain: Effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog. Lipid Res.* 51:23-35.
- León,J., Acuña-Castroviejo,D., Escames,G., Tan,D.x. y Reiter,R.J. 2005. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res.* 38:1-9.
- Lightle,S.A., Oakley,J.I. y Nikolova-Karakashian,M.N. 2000. Activation of sphingolipid turnover and chronic generation of ceramide and sphingosine in liver during aging. *Mech. Ageing Dev.* 120:111-125.
- Lipsitz,L.A. y Goldberger,A.L. 1992. Loss of 'complexity' and aging: Potential applications of fractals and chaos theory to senescence. *JAMA.* 267:1806-1809.

- Liu,C., Wang,X., Feng,W., Li,G., Su,F. y Zhang,S. 2012. Differential expression of aging biomarkers at different life stages of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Biogerontology*. 13:501-510.
- Liu,R.K. y Walford,R.L. 1966. Increased growth and life-span with lowered ambient temperature in the annual fish, *Cynolebias adloffii*. *Nature*. 212:1277-1278.
- Liu,R.K. y Walford,R.L. 1969. Laboratory studies on life-span, growth, aging, and pathology of the annual fish, *Cynolebias bellottii* Stendachner. *Zool. NY Zool. Soc.* 54:1-19.
- Lockley,S.W., Skene,D.J., James,K., Thapan,K., Wright,J. y Arendt,J. 2000. Melatonin administration can entrain the free-running circadian system of blind subjects. *J. Endocrinol.* 164:R1-R6.
- Lucas-Sánchez,A., Martínez-Nicolás,A.B., Escames,G. y de Costa Ruiz,J. 2012. Envejecimiento del sistema circadiano. *Rev. Esp. Ger. Gerontol.* 47:76-80.
- Madrid Pérez,J.A. y Rol de Lama,M.Á. 2006. *Cronología básica y clínica*. 864 págs. Editec Red, S.L., Madrid. ISBN: 84-934510-3-7.
- Mailloux,A., Benstaali,C., Bogdan,A., Auzéby,A. y Touitou,Y. 1999. Body temperature and locomotor activity as marker rhythms of aging of the circadian system in rodents. *Exp. Gerontol.* 34:733-740.
- Markofsky,J. y Milstoc,M. 1979a. Aging changes in the liver of the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. *Exp. Gerontol.* 14:11-20, IN1.

- Markofsky,J. y Milstoc,M. 1979b. Histopathological observations of the kidney during aging of the male annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Exp. Gerontol.* 14:149-155.
- Markofsky,J. y 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.
- Markofsky,J. y Perlmutter,A. 1973. Growth differences in subgroups of varying longevities in a laboratory population of the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri* (Peters). *Exp. Gerontol.* 8:65-73.
- Martín,M., Macías,M., León,J., Escames,G., Khaldy,H. y Acuña-Castroviejo,D. 2002. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34:348-357.
- Masoro,E.J. y Austad,S.N. 2010. *Handbooks of Aging. Handbook of the biology of aging*. 7ª ed. 520 págs. Academic Press, New York. ISBN: 012378638X.
- McCord,J.M. y Fridovich,I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.
- McNamara,P., Barton,R.A. y Nunn,C.L. 2009. *Evolution of sleep: phylogenetic and functional perspectives*. 288 págs. Cambridge University Press, Cambridge. ISBN: 9780521894975.
- Miquel,J., Economos,A.C., Fleming,J. y Johnson,J. 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* 15:575-591.

- Monteiro,J.P., Oliveira,P.J. y Jurado,A.S. 2013. Mitochondrial membrane lipid remodeling in pathophysiology: A new target for diet and therapeutic interventions. *Prog. Lipid Res.* (En prensa).
- Moore-Ede,M.C., Sulzman,F.M. y Fuller,C.A. 1982. *The clocks that time us: physiology of the circadian timing system.* 448 págs. Harvard University Press, H. ISBN: 9780674135802.
- Moreau,R., Nguyen,B.T., Doneanu,C.E. y Hagen,T.M. 2005. Reversal by aminoguanidine of the age-related increase in glycoxidation and lipoxidation in the cardiovascular system of Fischer 344 rats. *Biochemical Pharmacology.* 69:29-40.
- Mozzi,R., Buratta,S. y Goracci,G. 2003. Metabolism and functions of phosphatidylserine in mammalian brain. *Neurochem. Res.* 28:195-214.
- Murphy,M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417:1-13.
- Münch,M., Cajochen,C. y Wirz-Justice,A. 2005. Sleep and circadian rhythms in ageing. *Z. Gerontol. Geriat.* 38:21-23.
- Navara,K.J. y Nelson,R.J. 2007. The dark side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences. *J. Pineal Res.* 43:215-224.
- Ortiz-Tudela,E., Martínez-Nicolás,A.B., Campos,M., Rol de Lama,M.Á. y Madrid Pérez,J.A. 2010. A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Comput. Biol.* 6:e1000996.

- Pak, J.W., Herbst, A., Bua, E., Gokey, N., McKenzie, D. y Aiken, J.M. 2003. Mitochondrial DNA mutations as a fundamental mechanism in physiological declines associated with aging. *Aging Cell*. 2:1-7.
- Pandi-Perumal, S.R., Seils, L.K., Kayumov, L., Ralph, M.R., Lowe, A., Moller, H. y Swaab, D.F. 2002. Senescence, sleep, and circadian rhythms. *Ageing Res. Revs.* 1:559-604.
- Pandi-Perumal, S.R., Smits, M., Spence, W., Srinivasan, V., Cardinali, D.P., Lowe, A.D. y Kayumov, L. 2007. Dim light melatonin onset (DLMO): A tool for the analysis of circadian phase in human sleep and chronobiological disorders. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psych.* 31:1-11.
- Pangborn, M.C. 1942. Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *J. Biol. Chem.* 143:247-256.
- Panno, J. 2009. *New biology. Aging: Modern theories and therapies*. 246 págs. Facts On File, New York. ISBN: 9780816068463.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V. y Ruggiero, F.M. 2010. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radic. Biol. Med.* 48:1286-1295.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V. y Ruggiero, F.M. 2011. Mitochondrial dysfunction in brain aging: Role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochemistry International*. 58:447-457.

- Paradies,G., Petrosillo,G., Pistolese,M. y Ruggiero,F.M. 2002. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*. 286:135-141.
- Paxton,J.R., Eschmeyer,W.N. y Kirshner,D. 1998. *Encyclopedia of fishes*. Academic Press, New York. ISBN: 9780125476652.
- Peirson,S.N., Halford,S. y Foster,R.G. 2009. The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 364:2849-2865.
- Petzold,A., Reichwald,K., Groth,M., Taudien,S., Hartmann,N., Priebe,S., Shagin,D., Englert,C. y Platzer,M. 2013. The transcript catalogue of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri* provides insights into age-dependent changes of mRNA levels. *BMC Genomics*. 14:1-16.
- Pérez-Campo,R., López-Torres,M., Cadenas,S., Rojas,C. y Barja de Quiroga Losada,G. 1998. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B*. 168:149-158.
- Pérez,V.I., Bokov,A., Remmen,H.V., Mele,J., Ran,Q., Ikeno,Y. y Richardson,A. 2009. Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim. Biophys. Acta*. 1790:1005-1014.
- Pincus,S.M. y Goldberger,A.L. 1994. Physiological time-series analysis: what does regularity quantify? *Am. J. Physiol.* 266:H1643-H1656.
- Pittendrigh,C.S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25:159-184.

- Pittendrigh, C.S. y Daan, S. 1974. Circadian oscillations in rodents: A systematic increase of their frequency with age. *Science*. 186:548-550.
- Refinetti, R. 2005. *Circadian physiology*. 2ª ed. 688 págs. CRC Press, Boca Ratón, Florida. ISBN: 0849322332.
- Reichwald, K., Lauber, C., Nanda, I., Kirschner, J., Hartmann, N., Schories, S., Gausmann, U., Taudien, S., Schilhabel, M., Szafranski, K., Glockner, G., Schmid, M., Cellerino, A., Scharf, M., Englert, C. *et al.* 2009. High tandem repeat content in the genome of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*: a new vertebrate model for aging research. *Genome Biology*. 10:R16.
- Reiter, R.J. 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Cell. Molec. Life Sci.* 49:654-664.
- Reiter, R.J. 1995. The pineal gland and melatonin in relation to aging: A summary of the theories and of the data. *Exp. Gerontol.* 30:199-212.
- Reiter, R.J., Tan, D.x., Korkmaz, A., Erren, T.C., Piekarski, C., Tamura, H. y Manchester, L.C. 2007. Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Crit Rev. Oncog.* 13:303-328.
- Richter, C. 1995. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27:647-653.
- Rodríguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V. y Reiter, R.J. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 36:1-9.

- Rollo,C.D. 2002. Growth negatively impacts the life span of mammals. *Evol. Develop.* 4:55-61.
- Rubner,M. 1908. *Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zu Wachstum und Ernährung.* Oldenbourg, München.
- Ruijter,J.M., Peute,J. y Levels,P.J. 1987. The relation between pituitary gland and thyroid growth during the lifespan of the annual fish *Cynolebias whitei* and *Nothobranchius korthausae*: gonadotropic and thyrotropic cells. *Cell and Tissue Research.* 248:689-697.
- Saito,M., Murakami,E. y Suda,M. 1976. Circadian rhythms in disaccharidases of rat small intestine and its relation to food intake. *Biochim. Biophys. Acta.* 421:177-179.
- Sanz,A., Pamplona,R. y Barja de Quiroga Losada,G. 2006a. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antiox. Redox. Signal.* 8:582-599.
- Sanz,A., Pamplona,R. y Barja de Quiroga Losada,G. 2006b. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antiox. Redox. Signal.* 8:582-599.
- Sánchez-Barceló,E.J., Mediavilla,M.D., Tan,D.-X. y Reiter,R.J. 2010. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Curr. Med. Chem.* 17:2070-2095.
- Scheving,L.E., Tsai,T.H. y Scheving,L.A. 1983. Chronobiology of the intestinal tract of the mouse. *Am. J. Anat.* 168:433-465.
- Schlame,M., Rua,D. y Greenberg,M.L. 2000a. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* 39:257-288.

- Schlame,M., Rua,D. y Greenberg,M.L. 2000b. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* 39:257-288.
- Schmidt,C., Peigneux,P. y Cajochen,C. 2012. Age-related changes in sleep and circadian rhythms: impact on cognitive performance and underlying neuroanatomical networks. *Frontiers in Neurology.* 3:1-11.
- Schuhler,S., Pitrosky,B., Kirsch,R. y Pevet,P. 2002. Entrainment of locomotor activity rhythm in pinealectomized adult Syrian hamsters by daily melatonin infusion. *Behav. Brain Res.* 133:343-350.
- Seegers,L. 1997. *AQUALOG-reference fish of the world. Vol. II: Killifishes of the world: old world Killis II.* 112 págs. Verlag A.C.S. GmbH, Mölfenden Walldorf, Germany. ISBN: 9783931702304.
- Shigenaga,M.K., Hagen,T.M. y Ames,B.N. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:10771-10778.
- Siskind,L.J., Kolesnick,R.N. y Colombini,M. 2006. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion.* 6:118-125.
- Siskind,L. 2005. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J. Bioenerg. Biomemb.* 37:143-153.
- Strehler,B.L. 1977. *Time, cells, and aging.* 2ª ed. 456 págs. Academic Press, New York. ISBN: 0126732604.

- Subbaiah,P.V., Subramanian,V.S. y Wang,K. 1999a. Novel physiological function of sphingomyelin in plasma: Inhibition of lipid peroxidation in low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 274:36409-36414.
- Subbaiah,P.V., Subramanian,V.S. y Wang,K. 1999b. Novel physiological function of sphingomyelin in plasma: Inhibition of lipid peroxidation in low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 274:36409-36414.
- Terzibasi Tozzini,E., Valenzano,D.R., Benedetti,M., Roncaglia,P., Cataneo,A., Domenici,L. y Cellerino,A. 2008. Large differences in aging phenotype between strains of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*. *PLoS One.* 3:e3866-13.
- Terzibasi Tozzini,E., Lefrançois,C., Domenici,P., Hartmann,N., Graf,M. y 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.
- Terzibasi Tozzini,E., Baumgart,M., Battistoni,G. y Cellerino,A. 2012. Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging Cell.* 11:241-251.
- Toivonen,L.V., Nefedova,Z.A., Sidorov,V.S. y Yurovitskii,Y. 2004. Age-related features of cataractogenesis in Salmon fry. III. Age-related dynamics of liver lipid composition during cataractogenesis. *Russian Journal of Developmental Biology.* 35:254-260.
- Turner,C.D. y Bagnara,J.T. 1976. *General endocrinology*. 6ª ed. 596 págs. Saunders, Philadelphia. ISBN: 0-7216-8933-7.

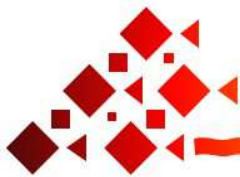
- Turner,P.L. y Mainster,M.A. 2008. Circadian photoreception: ageing and the eye's important role in systemic health. *Br. J. Ophthalmol.* 92:1439-1444.
- Ulmann,L., Mimouni,V., Roux,S., Porsolt,R. y Poisson,J.P. 2001. Brain and hippocampus fatty acid composition in phospholipid classes of aged-relative cognitive deficit rats. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids.* 64:189-195.
- Valdesalici,S. y Cellerino,A. 2003. Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270:S189-S191.
- Valenzano,D.R., Kirschner,J., Kamber,R.A., Zhang,E., Weber,D., Cellerino,A., Englert,C., Platzer,M., Reichwald,K. y Brunet,A. 2009. Mapping loci associated with tail color and sex determination in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Genetics.* 183:1385-1395.
- Valenzano,D.R., Sharp,S. y Brunet,A. 2011. Transposon-mediated transgenesis in the short-lived African killifish *Nothobranchius furzeri*, a vertebrate model for aging. *G3: Genes, Genomes, Genetics and so on.* 1:531-538.
- Valenzano,D.R., Terzibasi Tozzini,E., Cattaneo,A., Domenici,L. y Cellerino,A. 2006a. Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell.* 5:275-278.
- Valenzano,D.R., Terzibasi Tozzini,E., Genade,T., Cattaneo,A., Domenici,L. y Cellerino,A. 2006b. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr. Biol.* 16:296-300.

- Van Cauter,E., Spiegel,K., Tasali,E. y Leproult,R. 2008. Metabolic consequences of sleep and sleep loss. *Sleep Med.* 9:S23-S28.
- Van Raamsdonk,J.M. y Hekimi,S. 2010. Reactive oxygen species and aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or casual relationship? *Antiox. Redox. Signal.* 13:1911-1953.
- Van Raamsdonk,J.M. y Hekimi,S. 2012. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:5785-5790.
- Van Someren,E.J.W., Swaab,D.F., Colenda,C.C., Cohen,W., McCall,W.V. y Rosenquist,P.B. 1999. Bright light therapy: Improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. *Chronobiol. Int.* 16:505-518.
- Varela,M., Churrua,J., González,A., Martín,A., Ode,J. y Galdós,P. 2006. Temperature curve complexity predicts survival in critically ill patients. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 174:290-298.
- Vera,L.M., de Pedro,N., Gómez-Milán,E., Delgado,M.J., Sánchez-Muros,M.J., Madrid Pérez,J.A. y Sánchez-Vázquez,F.J. 2007. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiol. Behav.* 90:518-524.
- Vivanco,P., Ortiz,V., Rol de Lama,M.Á. y Madrid Pérez,J.A. 2007. Looking for the keys to diurnality downstream from the circadian clock: role of melatonin in a dual-phasing rodent, *Octodon degus*. *J. Pineal Res.* 42:280-290.

- Waagbø,R., Hamre,K., Bjerkas,E., Berge,R., Wathne,E., Lie,O. y Torstensen,B.E. 2003. Cataract formation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolt relative to dietary pro- and antioxidants and lipid level. *J. Fish Diseases*. 26:213-229.
- Walker,M.P. 2008. Cognitive consequences of sleep and sleep loss. *Sleep Med*. 9:S29-S34.
- Weinert,D. 2000. Age-dependent changes of the circadian system. *Chronobiol. Int*. 17:261-283.
- Weinert,D. 2005. Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiol. Int*. 22:179-205.
- Weinert,D. y Schuh,J. 1988. Frequency and phase correlations of biorhythms of some metabolic parameters during postnatal ontogeny in mice. *Bull. Exp. Biol. Med*. 106:1764-1767.
- Weinert,H. y Weinert,D. 1998. Circadian activity rhythms of laboratory mice during the last weeks of their life. *Biol. Rhythm Res*. 29:159-178.
- Whitmore,D., Foulkes,N.S. y Sassone-Corsi,P. 2000. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature*. 404:87-91.
- Whitmore,D., Foulkes,N.S., Strahle,U. y Sassone-Corsi,P. 1998. Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat. Neurosci*. 1:701-707.
- Wiseman,H. 1996. Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 7:2-15.

- Witting,L.A. y Horwitt,M.K. 1964a. Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria. *J. Nutr.* 82:19-33.
- Witting,L.A. y Horwitt,M.K. 1964b. Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria. *J. Nutr.* 82:19-33.
- Witting,W., Mirmiran,M., Bos,N.P.A. y Swaab,D.F. 1994. The effect of old age on the free-running period of circadian rhythms in rat. *Chronobiol. Int.* 11:103-112.
- Wolf,N.S. 2009. *Comparative biology of aging*. 388 págs. Springer Verlag, Berlin. ISBN: 978-90-481-3464-9.
- Woodhead,A.D. 1978. Fish in studies of aging. *Exp. Gerontol.* 13:125-140.
- Yamazaki,S., Yoshikawa,T., Biscoe,E.W., Numano,R., Gallaspy,L.M., Soulsby,S., Papadimas,E., Pezuk,P., Doyle,S.E., Tei,H., Sakaki,Y., Block,G.D. y Menaker,M. 2009. Ontogeny of circadian organization in the rat. *J. Biol. Rhythms.* 24:55-63.
- Yang,W. y Hekimi,S. 2010. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 8:e1000556.
- Yu,L., Tucci,V., Kishi,S. y Zhdanova,I.V. 2006. Cognitive aging in zebrafish. *PLoS One.* 1:e14.
- Yu,X. y Li,G. 2012. Effects of resveratrol on longevity, cognitive ability and aging-related histological markers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Exp. Gerontol.* 47:940-949.

- Zhang,Y., Brainard,G.C., Zee,P.C., Pinto,L.H., Takahashi,J.S. y Turek,F.W. 1998. Effects of aging on lens transmittance and retinal input to the suprachiasmatic nucleus in golden hamsters. *Neurosci. Lett.* 258:167-170.
- Zhdanova,I.V. 2011. Sleep and its regulation in zebrafish. *Rev. Neurosci.* 22:27-36.
- Zhdanova,I.V. y Reebbs,S.G. 2006. Circadian rhythms in fish. En: *Fish physiology. Behaviour and physiology of fish*, (Sloman,K.A., Wilson,R.W. y Balshine,S., editores), págs. 197-238. Elsevier Academic Press, Amsterdam; London.
- Zhdanova,I.V., Wang,S.Y., Leclair,O.U. y Danilova,N.P. 2001. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res.* 903:263-268.
- Zhdanova,I.V., Yu,L., López-Patiño,M.A., Shang,E., Kishi,S. y Guelin,E. 2008. Aging of the circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and cognitive performance. *Brain Res. Bull.* 75:433-441.



ANEXOS



ANEXO I**Circadian activity rhythms during the last days of *Nothobranchius rachovii*'s life.****A predictive model of circadian system breakdown**

Lucas-Sánchez, A.¹, Martínez-Nicolás, A.¹, Madrid, J.A.¹, Almada-Pagán, P.F.²,

Mendiola, P.¹, de Costa, J.¹

¹Department of Physiology Faculty of Biology. University of Murcia. 30100 Murcia,
Spain.

²Institute of Aquaculture, School of Natural Sciences, University of Stirling, Stirling
FK9 4LA, UK.

Running title: Circadian disruption at the end of life

Abstract

Several studies have been performed to identify age-related changes in the circadian system (CS) but the impairment of the CS and its chronodisruption at the end of an organism life have not been studied in depth. Aging commonly affects the input pathways into the biological clock or restraints their processing, therefore simplifying the system output, the overt rhythms. The purpose of this work was to do a complete characterization of changes that occurs in the CS in the last stage of a vertebrate organism life and to develop a short-term predictive model of days left to death, through the analysis of an overt rhythm, the rest-activity rhythm (RAR). For that, a fish

species proposed as model for aging studies, *Nothobranchius rachovii*, has been used. A progressive and sequential CS breakdown has been described for the last 22 days of life of *N. rachovii*, a time during which the animal RAR loses phase regularity, complexity, amplitude and the ability to stay synchronized to the LD cycle. Also a predictive equation of days remaining of life has been calculated and proposed as a tool to identify close-to-death individuals which could be subjected to an adequate restoring treatment to enhance the CS function and improve their wellbeing.

Keywords: *Nothobranchius*, circadian system, locomotor activity, death, prediction model, circadian system breakdown.

1. Introduction

The evolutionary pressure of cyclical environmental changes from the beginning of life on Earth has induced the apparition of the circadian system (CS) in all organisms. The CS allows an organism to synchronize its physiological processes with the 24-hour cyclic environmental changes and thus, increase its ability to respond to its habitat. The CS is formed by input pathways which carry the environmental information to the central clock, located in the nervous system. The signal integration by the central clock is transmitted then to the rest of the organism by the output pathways which end in the expression of an overt circadian rhythm.

The CS, like another organism function, is susceptible to be impaired with aging. CS deterioration can be indirectly observed by studying the overt rhythms generated by it, such as sleep-wake and locomotor activity rhythms. Age-related changes in circadian rhythms have been described in some detail in mammals, being

the decrease of amplitude, increased fragmentation and phase shift the main reported features (Weinert, 2000; Weinert, 2005). These changes are related with an age-dependent loss of the complex web of connections that form the CS, simplifying the output signal and giving a false appearance of regular rhythms (Lipsitz and Goldberger, 1992). Both aging and disease alter the dynamics of the organism systems which become less complex, and promote a reduction in its ability to respond to sudden physiologic stresses. This is, the organism becomes less functional and more fragile to the habitat changes. Therefore, the evaluation of the complexity of an organism CS could be used as a clinical diagnostic tool indicating its functioning and age-related impairment (Peng *et al.*, 1995; Varela *et al.*, 2006; Vikman *et al.*, 1999).

The characterization of the CS impairment and its breakdown at the end of life has been scarcely studied (Weinert and Weinert, 1998). A possible reason for that is the cost of animal housing for a long period of time and their low scientific productivity. However, this kind of studies can be useful to find common mechanisms of physiological system disorganization close to animal death, in our case, the CS. This would allow us to predict the moment in which the system impairment is next to being definitive and act accordingly. This would also be interesting to determine the biological age of an organism which does not always correspond to its chronobiological age. Animals with the same genetic background and reared under identical conditions frequently show different rates of aging and lifespan (Finkel *et al.*, 1995; Herndon *et al.*, 2002) this being a source of conflicting results between different studies, such as those showing changes in the rhythm phase with age (Davis and Viswanathan, 1998; Pittendrigh and Daan, 1974; Witting *et al.*, 1994), and make difficult to establish an age-related mechanism for CS breakdown.

Gerontological research as many other areas of knowledge needs of animal models. In the last years, several fish species, such as guppy, zebrafish and killifish, have been shown to be potential models for aging studies (Gerhard, 2007). Fish of the genus *Nothobranchius* (*Cyprinodontidae*, Pisces), the so called killifish, result suitable for aging experiments due to their characteristics: small size, reduced cost to be maintained in laboratory and reduced lifespan (from 3 to 18 months, varying by species). This genus is a promising candidate to fill the absence of short-living vertebrate model organisms and, in recent years, several age-related studies with these teleost fish have been developed (Hsu *et al.*, 2008; Terzibasi Tozzini *et al.*, 2009; Terzibasi Tozzini *et al.*, 2012; Valenzano *et al.*, 2006). Fish of genus *Nothobranchius* have also been shown to be valid to perform chronobiological studies in order to characterize the aging process (Lucas-Sánchez *et al.*, 2011; 2013a) by monitoring the locomotor activity and analyzing the rest-activity rhythm (RAR) and the sleep process as age-related markers of the CS functioning (Mailloux *et al.*, 1999).

The aim of this work was to analyze the evolution of CS complexity in the last days of *Nothobranchius rachovii*'s life through the determination of its RAR and sleep quality. By using a suitable animal model, we intend to establish which parameters are more relevant in the CS breakdown and acquire a tool to determine the biological age of an organism.

2. Material and methods

2.1 Animal housing and data acquisition

Nothobranchius rachovii, Ahl 1926 (*Actinopterygii*, *Cyprinodontiformes*, *Nothobranchiidae*) of the Beira population (Beira 98, Mozambique) belonging to a resident population established in the Fish Chronobiology Laboratory at the University

of Murcia were used. Fish were kept under constant temperature ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$) in 70 L tanks equipped with a recirculating fresh water system (4 L/h flow) and biological and mechanical filtration. The photoperiod was set at 12L:12D (lights on at 08:00 h). Light intensity in the water surface during the photophase was 200 lux. Fish were fed on dried worms (PRODAC, Padova, Italy) which were automatically delivered once a day at 14:00 h.

For the present experiment, sixteen 28-week-old fish were transferred to 12 L tanks (dimensions: 20 × 30 × 20 cm) and kept individually until natural death (this means without any external signs of disease). Each tank was equipped with two photoelectric sensors (model E3S-AD62. Omron Corporation. Kyoto, Japan) in order to record *N. rachovii* locomotor activity. One sensor was positioned 5 cm below the water surface while the other was located 5 cm above the bottom of the tank. When the fish swam in front of the sensors attached to the glass aquariums, the interruption of the infrared light beam was recorded as one count. The number of counts was collected every 10 minutes, using a data acquisition system (Electronic Services of the University of Murcia, Spain). Data obtained from the photoelectric sensors were combined to obtain the rest-activity rhythm (RAR). After data acquisition, a complete analysis of every single fish RAR was performed for its 22 prior-to-death days and different indices calculated (as described below) in order to characterize the changes in the circadian system (CS) in the last stage of *N. rachovii*'s life-cycle.

Fish were treated in accordance with the current Spanish law regarding animal experiments, and the experimental protocol performed for this work was approved by the Bioethics Committee of the University of Murcia.

2.2 General overview of RAR

A specifically designed software for time series analyses (El Temps, A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999) was used to obtain per day: *Total activity* (counts/day); *maximum activity* (counts); percentage of *diurnal activity*; *mesor* (counts/10 min); percentage of variance explained by the cosinor analysis (%*V cosinor*); *acrophase* value; acrophase regularity according to the *Rayleigh test* (r) and the percentage of variance explained by the highest peak in the periodogram as *periodogram %V*, used as an indicator of the robustness of the RAR.

2.3 Non-parametric indices

Non-parametric indices were calculated as proposed by Van Someren *et al.*, 1999 and they included: a) *Interdaily Stability (IS)*, which quantifies rhythm stability over different days and is more dependent on external factors; b) *Intradaily Variability (IV)*, which oscillates between 0 and 2 and depends on the endogenous character of the circadian rhythms and illustrates any fragmentation of the rhythm and c) *Relative Amplitude (RA)*, which results from internal and external influences. IS and RA oscillate between 0 and 1. Information provided by the above IS, IV and RA was integrated in a single value, the *Circadian Function Index (CFI)* (Ortiz-Tudela *et al.*, 2010), as an average of these three parameters (for that, IV values were inverted and normalized between 0 and 1). This index conveys information on the general functioning of the CS and oscillates between 0 (absence of circadian rhythmicity) and 1 (a robust circadian rhythm). Also, the average in 10 min intervals for the 8 h with the maximum activity (*8h maximum activity*, M8), and the average in 10 min intervals for the 8 h with the minimum activity (*8h minimum activity*, L8) were obtained. These two indices indicate the means of activity and rest phases (M8 and L8, respectively) without considering the

light:dark transition times, in order to avoid the masking effect of on and off light on fish activity.

2.4 Sleep quality

N. rachovii show sleep-like states (hereinafter, sleep) according to behavioural criteria previously described in the literature (Campbell and Tobler, 1984), that can be defined as short periods of inactivity during the nocturnal phase in which, fish float with the head slightly upward generally at the surface of the tank, and show no pectoral fin movements. Sleep was considered to occur when locomotor activity (measured with photoelectric sensors) dropped below the 33rd percentile of total nocturnal activity (Lucas-Sánchez *et al.*, 2013a). The following indices were calculated to characterise sleep quality: a) number of *Sleep interruptions* during the rest period; b) *Interruption duration*; c) *Sleep latency*, as the time spent between lights off and the first period of inactivity (considering inactivity as 50 min below the 33rd percentile of total nocturnal activity); d) *Sleep offset*, as the time in anticipation of lights on, which was considered as the awakening time (5 consecutive increases in locomotor activity); e) *Rest time*, as the time elapsed between the first period of inactivity (defined by sleep latency) and the first period of activity in the next light period (defined by sleep offset); and f) *Sleep efficiency*, calculated as $(Rest\ time - Rest\ interruptions \times Interruption\ duration)/night\ duration$.

2.5 Complexity analysis

Due to the high complexity of the CS, with many and intricate ways to gather information from outside and inside the animal, the system output information can appear as very complex and apparently random. In these cases, the information coming out from the analysis of the CS activity is considered as a 'noisy' regular

rhythm. With age, this 'noise' disappears, reducing the rhythm complexity. The complexity of a time series denotes the amount of information needed to describe the series. Then, in a high complexity series, which can reflect a false appearance of noise, the information needed to describe it will be higher than in a low complexity series. In this work we use the Approximated Entropy value (ApEn) as a measure of complexity, internal structure and predictability.

Basically, if we consider a time series of 'N' data points, ApEn measures to what extent knowledge of a given number 'm' of successive data points along the curve, will allow the next data point to be predicted with an error range 'r'. In our work, N=144, m=2 and r=0.2. Therefore the measure calculated was $ApEn_{2,0.2SD,144}$ (Pincus and Goldberger, 1994). An entropy decrease indicates that less information is needed to describe the time series, and therefore that it is less complex.

2.6 *N. rachovii*'s lifespan prediction: Correlation and classification.

With the purpose of obtaining a short-term prediction of *N. rachovii*'s lifespan and considering the CS functional organization as an aging marker that reflects the health status of the animal, a stepwise multiple regression analysis with all variables previously described was performed. Afterwards, a classification analysis for each day was made with WEKA software, version 3.6.7 (University of Waikato, New Zealand, (Hall *et al.*, 2009) to establish the day from which the fish CS suffers a breakdown and how long it takes before the animal death. Then, a classification was performed with a J.4.8 tree decision, which uses the C 4.5 algorithm (Kotsiantis, 2007) for decision making. Parameters for the classification were confidence factor = 0.25, minimum number of instances per leaf = 2, amount of data used for reduced-error pruning = 3. In

this way, it is possible to establish which components of the whole system are more affected with age and could be key in the CS breakdown.

2.7 Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM. Comparisons between values from different days were made using a one-way ANOVA and a Tukey-b post hoc test for multiple comparisons. *P* values below 0.05 were considered to be statistically different. All data were processed using SPSS software v. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

Locomotor activity records began with sixteen 28-week-old fish, but three animals died during the first week of data recording and had to be discarded. Of the remaining 13 fish, the first death was recorded in week 38th while the last one took place in week 50th, giving a mean lifespan of 44 weeks for this experimental group (Fig.1). During this period, fish showed phenotypical age-related changes as spine curvature, body coloration loss and progressive deterioration of the fins, especially caudal fin.

The analysis of the fish rest-activity rhythm (RAR) was focused on the 22 days before death (bd) of each individual. At the beginning of the recordings fish showed a diurnal locomotor activity rhythm (Fig. 2, Table 1) which a regular acrophase (Rayleigh test) located around the middle of photophase (Fig. 3, Table 1), and a stable 24 hours period (%V periodogram, Fig. 4, Fig. 5 and Table 1). However, fish RAR also showed some impairment signals at this time, as a low stability (IS), elevated fragmentation (IV) and low sleep quality (Table 1).

Nothobranchius rachovii's RAR was gradually deteriorated through the last 22 days of life, as reflected by the calculated indices. Nevertheless the observed changes did not all happen simultaneously. Stability (IS), fragmentation (IV), maximum activity time (acrophase) and %V periodogram (indicating rhythm robustness) show impairment symptoms at days 18 and 16 bd (Table 1, Figs. 3 and 4). Approximated entropy (ApEn) decreased gradually to stabilize at day 16 bd (Table 1) and period values began to disperse at day 14 bd (Fig. 5). Total activity, rhythm amplitude, the amount of activity during the photophase (% of diurnal activity), CFI and sleep quality, which had remained constant, showed their impairment from day 12 bd (Fig. 2, Table 1). The last changes were observed around day 8 bd, when stability and %V periodogram values suffered another drop, and the acrophase regularity (r) decreased (Fig. 4, Table 1). From day 8 bd, a fast and progressive impairment of all values was registered and animals were losing locomotor activity and rhythmicity until the end of their life.

The variables described above were used to perform a stepwise lineal regression, with the purpose to predict the remaining approximated lifetime of *N. rachovii*, using chronobiological variables, and to establish which variables are more relevant in the prediction. The following predictive equation was obtained:

$$\begin{aligned} \text{Life expectancy (days)} = & (\% \text{ Diurnal Activity} \times 0.0912) + (\text{ApEn} \times 9.437) - (\text{IV} \times 2.551) \\ & + (\text{Maximum Activity} \times 0.0149) + (\text{Total Activity} \times 5.113) \end{aligned}$$

Variables are ordered as the variance prediction model in the equation. The equation was applied and fish real lifespan was compared with the prediction (Fig. 6). In the correlation analysis between real lifespan and predicted lifespan, a r value of 0.679 ($P < 0.0001$) was obtained.

Then, a regression tree model by cross-validation was obtained to identify fish near to death in normal conditions (Fig. 7). The classification accuracy was calculated for each of the 22 days analyzed, and the highest value was obtained for day 14 bd. The selected variables by the model were ApEn, total activity, sleep quality, CFI, period value, %V periodogram, Rayleigh value, 8h maximum activity (M8), IS and % diurnal activity. At the end of the leafs, 'A' represents fish with a life expectancy higher than 14 days, and 'B' indicates fish with a lifespan prospect of 14 days or less. The classification accuracy for A and B was 84.61%, and 81.31%, respectively. The combined accuracy for the classification model was 82.51%.

4. Discussion

Nothobranchius rachovii specimens used in the present experiment had a mean lifespan of 44 weeks (11 months) and a maximum lifespan of 50 weeks (12.5 months). These data fall within the range reported by other authors, showing a mean lifespan for this species of 34 weeks (8.5 months) (Herrera and Jagadeeswaran, 2004) and 24-37 weeks (Hsu *et al.*, 2008), and previous results from our laboratory, showing a average lifespan of 54 weeks (Lucas-Sánchez *et al.*, 2013b). The divergence observed between these reports could be attributed to a disparity in the husbandry conditions such as temperature, feeding ration or diet composition which can affect the animal metabolic rate, oxidative stress, disease and aging (Hulbert, 2005; Hulbert, 2007). The isolation suffered by aged fish in the present experiment in order to obtain an individual rest-activity rhythm (RAR) record could have also contributed to shorten their lifespan respect the colony from our laboratory, since these animals have an important social behavior. Age-related phenotypes such as spine curvature, loss of coloration and fin deterioration were also observed during the experiment, similar to those described in other species of the same genus (Genade *et al.*, 2005; Terzibasi-Tozzini *et al.*, 2008;

Lucas-Sánchez *et al.*, 2011) and in other aging models such as zebrafish (Gerhard *et al.*, 2002) and medaka (Hatakeyama *et al.*, 2008).

The circadian system (CS) of *Nothobranchius rachovii* showed several changes with age and, particularly, during the 22 days prior to the animal death, as it is reflected by the observed changes in the fish RAR. Although *N. rachovii* still show a diurnal activity pattern in the day 22 before death (bd), fish RAR shows some characteristics, such as an elevated fragmentation and a reduced amplitude, that have been related with senescence in other fish species (Zhdanova and Reeb, 2006), and in mammals including humans (Weinert, 2000; Weinert, 2005). Moreover, some characteristics observed in the day 22 bd such as, regularity, percentage of diurnal activity, fragmentation, stability (IS), amplitude and Circadian Function Index (CFI) have been described in previous works performed with a species of the same genus with aging (Lucas-Sánchez *et al.*, 2011; Lucas-Sánchez *et al.*, 2013a). Our results point to the fact that *N. rachovii*'s CS suffers an age-related progressive impairment similar to that described in other species.

In addition to reduced amplitude and high fragmentation, other rhythmic parameters of *N. rachovii* exhibited age-related changes during the last 22 days of life analyzed. Circadian period and %V periodogram, that indicate the period and the robustness of rhythms, respectively, are also good indicators of the well-functioning of CS synchronizing mechanisms. In this work, period values of 24h at the beginning of the experiment were obtained while these values suffered a progressive dispersion in the last days before the animal death. There is disparity in the bibliography respecting the age-related changes on the circadian rhythm tau; it has been described either a period shortening (Pittendrigh and Daan, 1974), elongation (Gutman *et al.*, 2011) or no changes (Davis and Viswanathan, 1998). In our case, a high dispersion of tau values

was observed, reflecting a high disorganization of CS with high inter-individual variability. This could be due to damage in various structures at different levels of the CS. It is noteworthy that the %V periodogram appears to be a good index or marker to indicate the robustness of a rhythm and its synchronization at the end of life.

The CS has many and complex ways to gather information from outside and inside the organism. This complexity generates elaborated output information and apparently in a random way. Aging produces the dissolution of this complex web of connections, simplifying the output signal and giving a false appearance of regular noise-free rhythms (Lipsitz and Goldberger, 1992). Approximated Entropy (ApEn) gives information about the temporal series complexity. Basically, a decrease in ApEn indicates that less information is needed to describe the time series, and therefore the series is less complex (Pincus and Goldberger, 1994). This analysis has been used and correlated with health status in various diseases constituting a potential prediction measure (Peng *et al.*, 1995; Varela *et al.*, 2006; Vikman *et al.*, 1999). As far as we know, this is the first time that ApEn has been calculated for a time series in a healthy animal up to the end of its life. ApEn has resulted useful to identify and classify fish at the end of their life and fish with more than 14 days of life expectancy. The progressive ApEn decrease observed till the day 14 bd, from which ApEn stabilizes at a low level, can be interpreted as a decrease in the rhythm complexity. This means a decoupling of the different mechanisms involved in the RAR generation. The 14th day bd could be the most critical time for mechanisms and systems that maintain the physiological organism integrity.

One of the challenges in aging studies is to identify physiological parameters (biomarkers) that could reflect the health status of an organism. These parameters must serve as biological age predictors, since chronological age is not entirely reliable

to determine the healthy status (Comfort, 1969; Finkel *et al.*, 1995; Furukawa *et al.*, 1975; Murray, 1951). The aging model *Caenorhabditis elegans* has been used to build predictive models using locomotor activity records (Hsu *et al.*, 2009) or metabolic rate (Suda *et al.*, 2011). The rate of motor activity decay inversely correlates with lifespan. But *C. elegans* has the problem of being phylogenetically far from human species. Genus *Nothobranchius* is formed by small vertebrates with very interesting characteristics such as, short lifespan, phylogenetic proximity to humans and low cost to be bred and maintained in the lab. Moreover, this genus has been shown to suffer age-related changes in the CS (Lucas-Sánchez *et al.*, 2011; Lucas-Sánchez *et al.*, 2013a). Considering chronobiological variables as predictor indices of lifespan, we obtained that % of diurnal activity, ApEn, Intradaily Variability (IV), maximum activity and total activity are the most significant contributing in the decay of the CS function. Their relative relevance is showed by the prediction model. These variables are easy to calculate and some of them have been described as markers of circadian alterations (Turek *et al.*, 1995; Van Someren *et al.*, 1999) or as indicators of disease (Varela *et al.*, 2006). The classification performed through decision tree for the 22 last days of fish life showed that the day 14 bd could be the inflexion point from which the animal systems suffer a definitive breakdown. This model could provide an easy way to identify altered individuals and the subsequent chance to make treatments to reduce fragility and/or stabilize circadian rhythms to improve animal performance and wellbeing.

Our data suggest a sequential breakdown of the CS before the total desynchronization when the death of *N. rachovii* is close. This process could be divided into 4 stages. First, between days 18-16 bd, there was a slight circadian time disruption, as reflected by a decrease in IS (related with external factor synchronizing effects) and %V periodogram (indicating the rhythm robustness) both related to CS

input pathways. The second stage, around day 14 bd, it was observed an increase in period dispersion and a reduction in ApEn which suggests a greater decoupling of the mechanisms implicated in the RAR regulation and the desynchronization with the light-dark cycle. This loss in synchronization ability and decoupling could be due to impairment in CS input pathways and/or a deterioration of the central clock. The third stage, around 12 days bd, was characterized by an important motor activity loss (total daily activity) and, as a consequence of the second stage (LD cycle synchronize loss), a reduction in amplitude (individuals became less diurnal) and an alteration in the sleep-like state. This third stage is not necessarily directly-related to the CS, as both total activity and amplitude reduction seem to be a motor regulation problem due to normal aging. At the end, in fourth stage, at day 8 bd, a strong chronodisruption (again there were changes in IS and %V periodogram) occurs leading to an environmental light-dark disconnection. From this day, a general desynchronization and arrhythmicity occur that ends with the individual death in few days.

This work shows that CS function can be used as a good aging biomarker in *N. rachovii*. This species CS experiences a progressive deterioration with age that can be described using different parameters. Variables as ApEn, that generally has been used in human clinical observations as a possible predictor of aging and disease (Varela *et al.*, 2006), can also be used to determine the loss of complexity of the CS in this species. The proposed model allows examining which parameters of the animal CS have a higher predictive strength and can be used to detect organisms in high fragility situations, regardless of their chronological age, and design appropriated action protocols to enhance their circadian rhythmicity.

Acknowledgments

This project was funded by the Seneca Foundation (12005/PI/09), Instituto de Salud Carlos III (RETICEF, RD12/0043/0011) and the Spanish Ministry of Science and Education (BFU2010-21945-C02-01), including FEDER co-funding. P.F. A.-P. was funded by a Marie Curie Intra-European Fellowship within the 7th Community Framework Programme (PIEF-GA-2011-297964, OLDMITO). All authors have contributed equally.

References

- Campbell,S.S. and Tobler,I. 1984. Animal sleep: A review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8:269-300.
- Comfort,A. 1969. Effect of temperature on tail regeneration in *Lebistes*. *Gerontologia.* 15:248-251.
- Davis,F.C. and Viswanathan,N. 1998. Stability of circadian timing with age in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol.* 275:R960-R968.
- Finkel,D., Whitfield,K. and McGue,M. 1995. Genetic and environmental influences on functional age: A twin study. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences.* 50B:104-113.
- Furukawa,T., Inoue,M., Kajiya,F., Inada,H., Takasugi,S., Fukui,S., Takeda,H. and Abe,H. 1975. Assessment of biological age by multiple regression analysis. *J. Gerontol.* 30:422-434.

- Genade,T., Benedetti,M., Terzibasi Tozzini,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. 2007. Small laboratory fish as models for aging research. *Ageing Res. Revs.* 6:64-72.
- 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.
- Gutman,R., Genzer,Y., Chapnik,N., Miskin,R. and Froy,O. 2011. Long-lived mice exhibit 24 h locomotor circadian rhythms at young and old age. *Exp. Gerontol.* 46:606-609.
- Hall,M., Frank,E., Holmes,G., Pfahringer,B., Reutemann,P. and Witten,I.H. 2009. The WEKA data mining software: an update. *ACM SIGKDD Explorations Newsletter.* 11:10-18.
- Hatakeyama,H., Nakamura,K.I., Izumiyama-Shimomura,N., Ishii,A., Tsuchida,S., Takubo,K. and Ishikawa,N. 2008. The teleost *Oryzias latipes* shows telomere shortening with age despite considerable telomerase activity throughout life. *Mech. Ageing Dev.* 129:550-557.
- Herndon,L.A., Schmeissner,P.J., Dudaronek,J.M., Brown,P.A., Listner,K.M., Sakano,Y., Paupard,M.C., Hall,D.H. and Driscoll,M. 2002. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature.* 419:808-814.

- Herrera,M. and Jagadeeswaran,P. 2004. Annual fish as a genetic model for aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59:B101-B107.
- Hsu,A.-L., Feng,Z., Hsieh,M.-Y. and Xu,X.Z.S. 2009. Identification by machine vision of the rate of motor activity decline as a lifespan predictor in *C. elegans*. *Neurobiol. Aging.* 30:1498-1503.
- 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.
- Hulbert,A.J. 2005. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* 234:277-288.
- Hulbert,A.J. 2007. Membrane fatty acids as pacemakers of animal metabolism. *Lipids.* 42:811-819.
- Kotsiantis,S.B. 2007. Supervised machine learning: A review of classification techniques. *Informatica.* 31:249-268.
- Lipsitz,L.A. and Goldberger,A.L. 1992. Loss of 'complexity' and aging: Potential applications of fractals and chaos theory to senescence. *JAMA.* 267:1806-1809.
- Lucas-Sánchez,A., Almaila-Pagán,P.F., Madrid Pérez,J.A., de Costa Ruiz,J. and Mendiola López,P. 2011. Age-related markers in *Nothobranchius korthausae*: fatty acid profile and locomotor activity rhythms. *Exp. Gerontol.* 46:970-978.
- Lucas-Sánchez,A., Almaila-Pagán,P.F., Martínez-Nicolás,A.B., Madrid Pérez,J.A., Mendiola López,P. and de Costa Ruiz,J. 2013a. Rest-activity circadian rhythms

- in aged *Nothobranchius korthausae*. The effects of melatonin. *Exp. Gerontol.* 48:507-516.
- Lucas-Sánchez,A., Almaida-Pagán,P.F., Tocher,D.R., Mendiola López,P. and de Costa Ruiz,J. 2013b. Age-related changes in mitochondrial membrane composition of *Nothobranchius rachovii*. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* (En prensa).
- Mailloux,A., Benstaali,C., Bogdan,A., Auzéby,A. and Touitou,Y. 1999. Body temperature and locomotor activity as marker rhythms of aging of the circadian system in rodents. *Exp. Gerontol.* 34:733-740.
- Murray,I.M. 1951. Assessment of physiologic age by combination of several criteria - vision, hearing, blood pressure, and muscle force. *J. Gerontol.* 6:120-126.
- Ortiz-Tudela,E., Martínez-Nicolás,A.B., Campos,M., Rol de Lama,M.Á. and Madrid Pérez,J.A. 2010. A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Comput. Biol.* 6:e1000996.
- Peng,C.K., Havlin,S., Hausdorff,J.M., Mietus,J.E., Stanley,H.E. and Goldberger,A.L. 1995. Fractal mechanisms and heart rate dynamics: Long-range correlations and their breakdown with disease. *Journal of Electrocardiology.* 28:59-65.
- Pincus,S.M. and Goldberger,A.L. 1994. Physiological time-series analysis: what does regularity quantify? *Am. J. Physiol.* 266:H1643-H1656.
- Pittendrigh,C.S. and Daan,S. 1974. Circadian oscillations in rodents: A systematic increase of their frequency with age. *Science.* 186:548-550.

- Suda,H., Sato,K. and Shimizu,Y. 2011. A further test of the equation of lifespan by *C. elegans*: Effective activation energy for aging and lifespan. *Exp. Gerontol.* 46:569-578.
- Terzibasi Tozzini,E., Baumgart,M., Battistoni,G. and Cellerino,A. 2012. Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging Cell.* 11:241-251.
- Terzibasi Tozzini,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.
- Turek,F.W., Penev,P., Zhang,Y., van Reeth,O. and Zee,P.C. 1995. Effects of age on the circadian system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19:53-58.
- Valenzano,D.R., Terzibasi Tozzini,E., Cattaneo,A., Domenici,L. and Cellerino,A. 2006. Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell.* 5:275-278.
- Van Someren,E.J.W., Swaab,D.F., Colenda,C.C., Cohen,W., McCall,W.V. and Rosenquist,P.B. 1999. Bright light therapy: Improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. *Chronobiol. Int.* 16:505-518.
- Varela,M., Churruca,J., González,A., Martín,A., Ode,J. and Galdós,P. 2006. Temperature curve complexity predicts survival in critically ill patients. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 174:290-298.

- Vikman,S., Makikallio,T.H., Yli-Mayry,S., Pikkujamsa,S., Koivisto,A.M., Reinikainen,P., Airaksinen,K.E.J. and Huikuri,H.V. 1999. Altered complexity and correlation properties of R-R interval dynamics before the spontaneous onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 100:2079-2084.
- Weinert,D. 2000. Age-dependent changes of the circadian system. *Chronobiol. Int.* 17:261-283.
- Weinert,D. 2005. Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiol. Int.* 22:179-205.
- Weinert,H. and Weinert,D. 1998. Circadian activity rhythms of laboratory mice during the last weeks of their life. *Biol. Rhythm Res.* 29:159-178.
- Witting,W., Mirmiran,M., Bos,N.P.A. and Swaab,D.F. 1994. The effect of old age on the free-running period of circadian rhythms in rat. *Chronobiol. Int.* 11:103-112.
- Zhdanova,I.V. and Reeb,S.G. 2006. Circadian rhythms in fish. En: *Fish physiology. Behaviour and physiology of fish*, (Sloman,K.A., Wilson,R.W. and Balshine,S., editores), págs. 197-238. Elsevier Academic Press, Amsterdam; London.

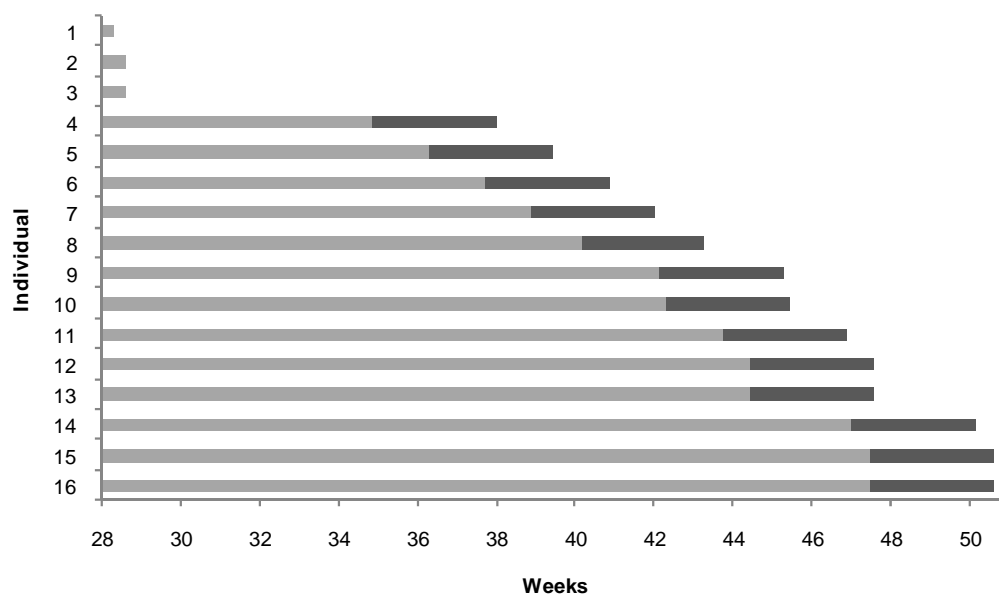


Fig. 1. Lifespan of each individual of *Nothobranchius rachovii* used. The darkest color of each individual bar indicates the time period analyzed (22 days before death).

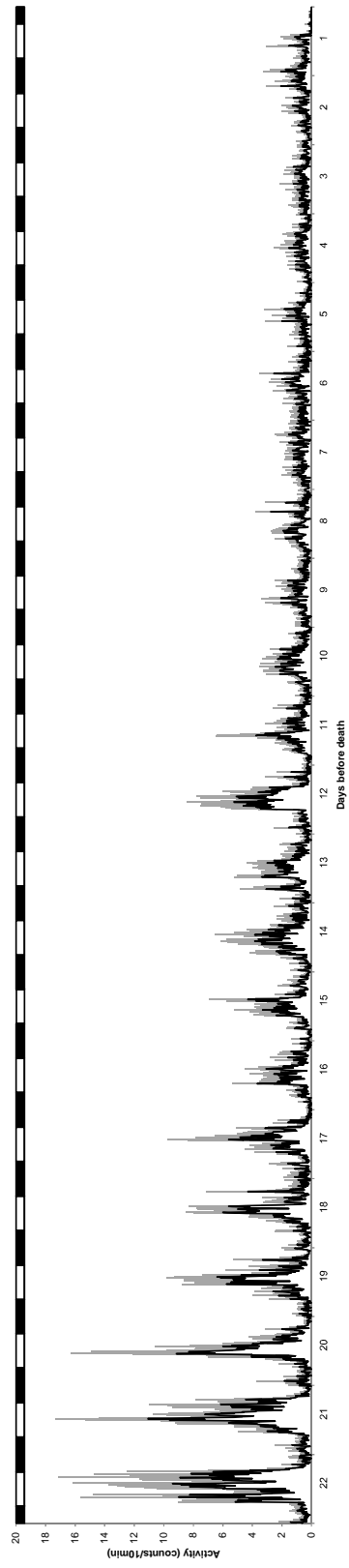


Fig. 2. Locomotor activity mean waveform of *Nothobranchius rachovii* during their last 22 days of life. Data are presented as mean \pm SEM (n=13).

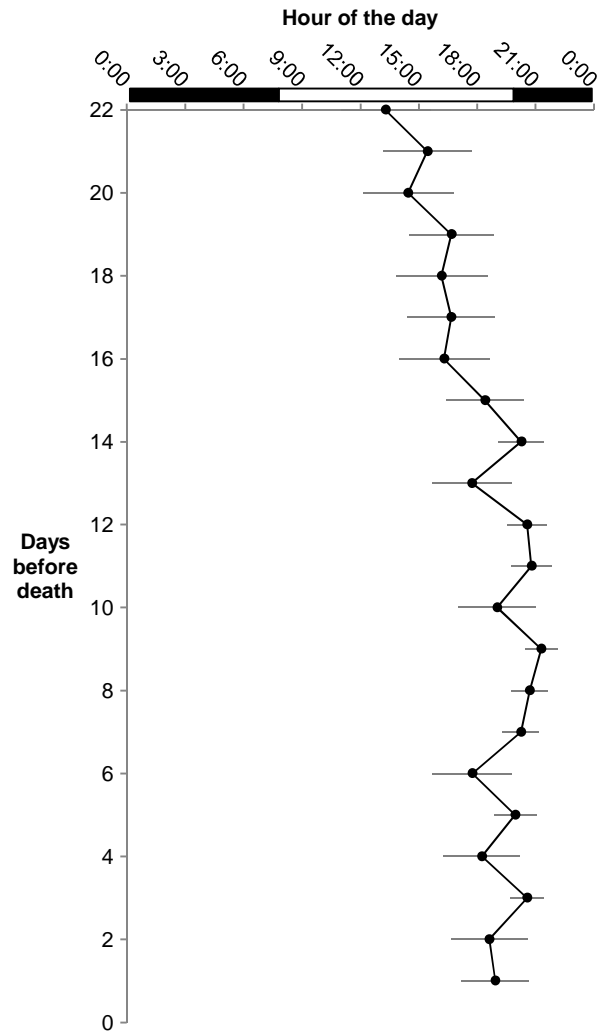


Fig. 3. Daily acrophase values for locomotor activity of *Nothobranchius rachovii* during their last 22 days of life. Data are presented as mean \pm SEM (n=13).

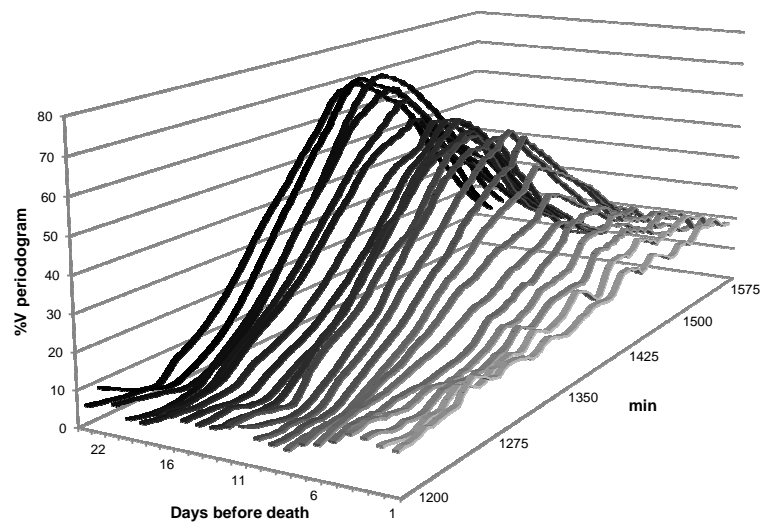


Fig. 4. Changes in the periodogram %V values analysis for the locomotor activity rhythm of *Nothobranchius rachovii* during their last 22 days of life. Each curve represents the mean of the analysis for each day (n=13).

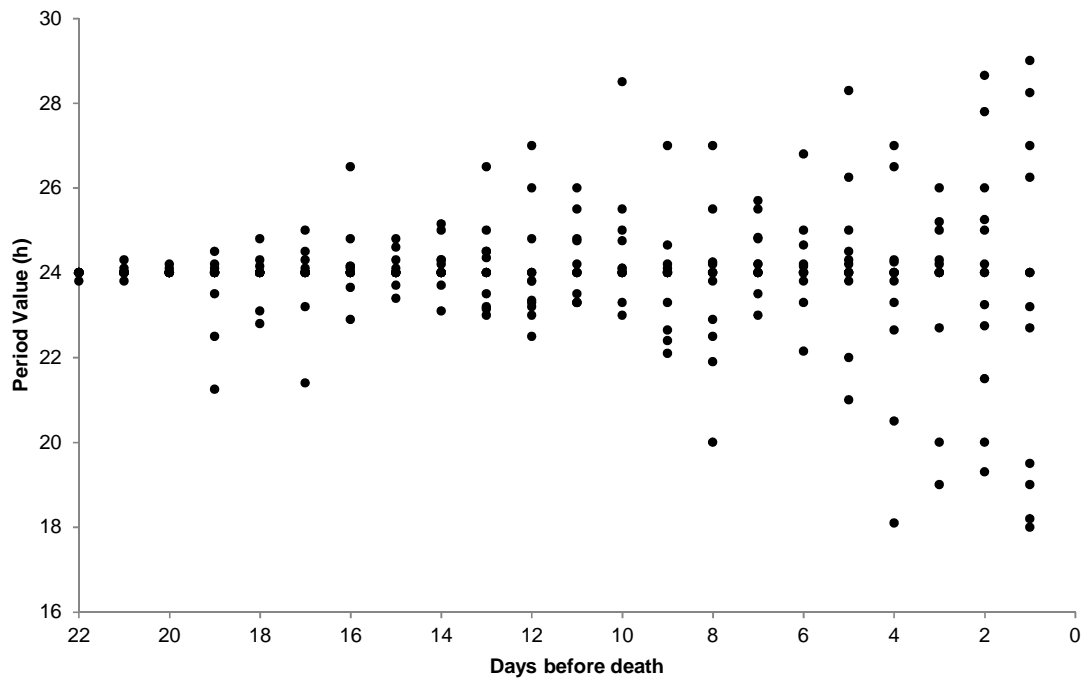


Fig. 5. Changes in the rhythm period values for each day of *Nothobranchius rachovii*.

Each point represents an individual fish for each day (n=13).

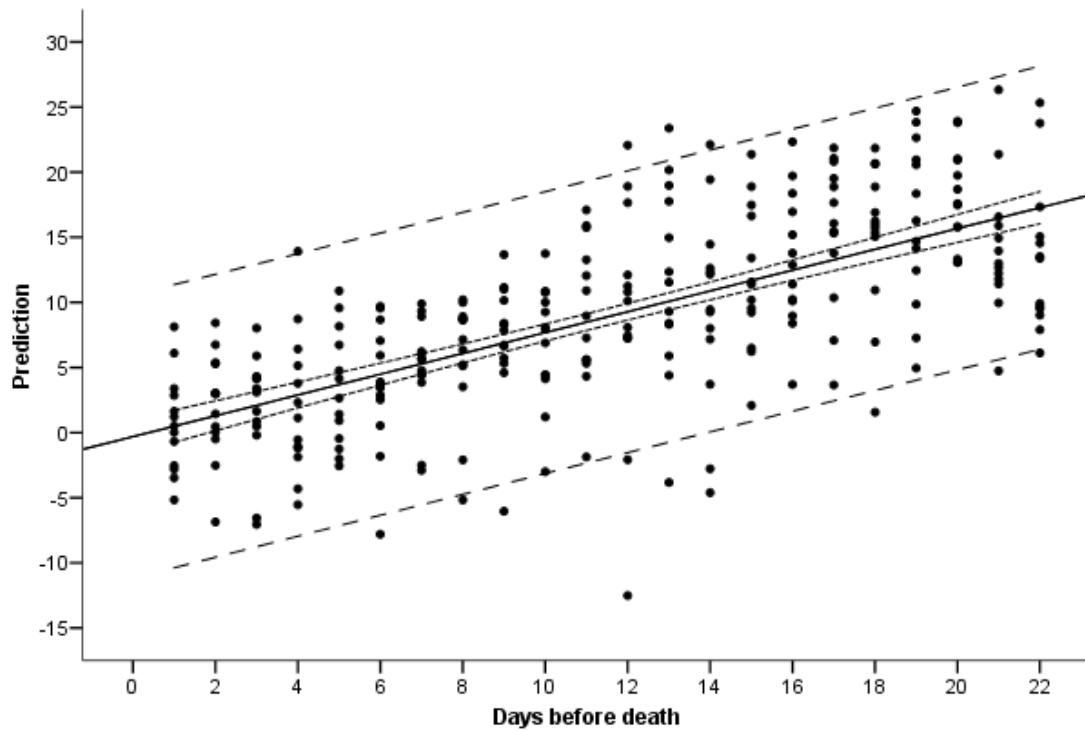


Fig. 6. Correlation between real days of life left to die and days to death as predicted by our model. Each point indicates the prediction value at each day for individual fish. Solid line indicates the mean value of all points in one day ($n=13$). External broken lines represent the 95% confidence interval and internal broken lines indicate the mean confidence interval.

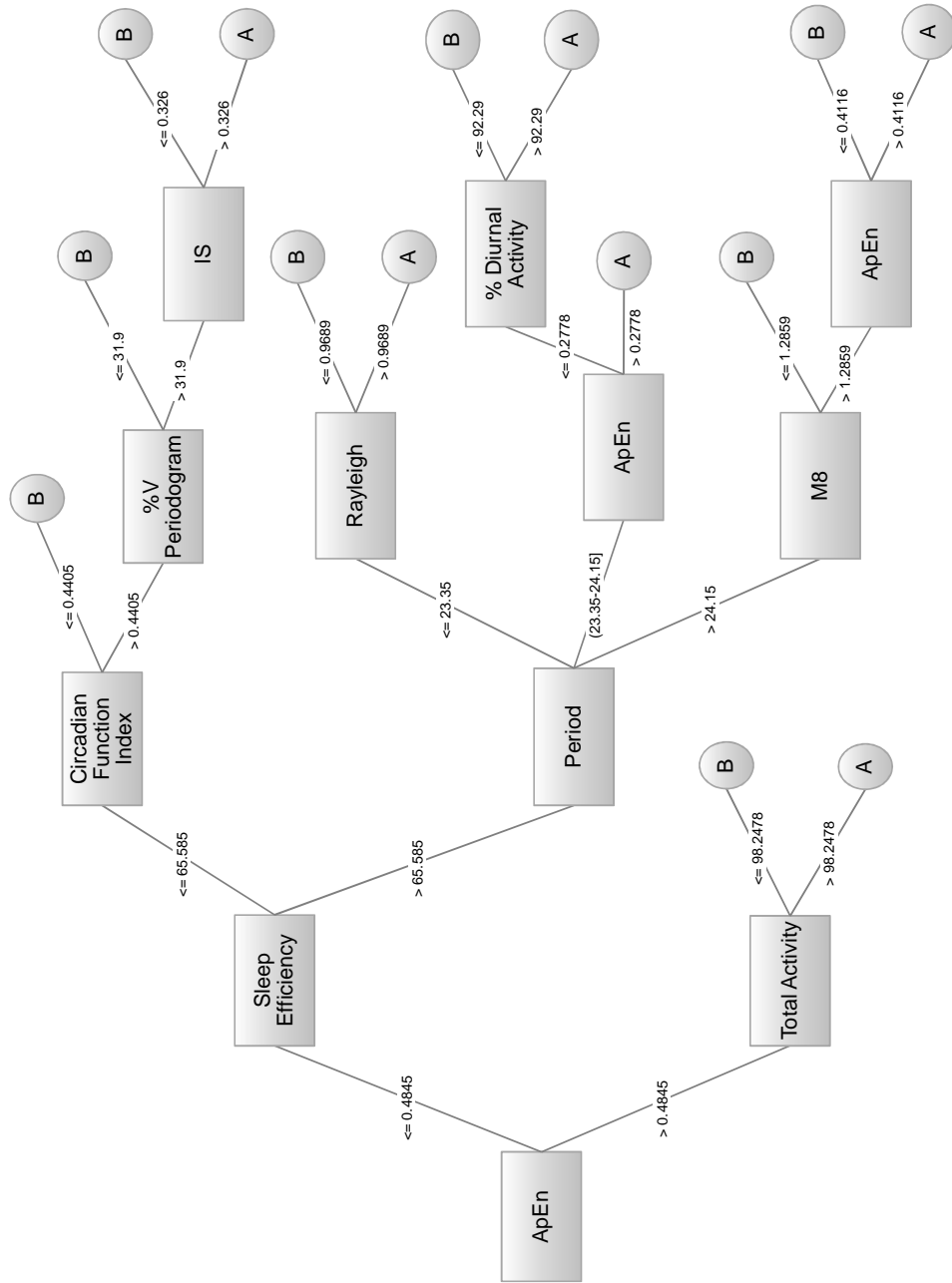


Fig. 7. Decision tree obtained from the analysis of locomotor activity data. At the end of each leaf, 'A' corresponds to fish with more than 14 days to die while 'B' refers to fish with 14 days to die or less. ApEn = approximated entropy. IS = interdaily stability. M8 = average in 10 min intervals for the 8 h with the maximum activity.

Table 1. Rest-activity rhythm analysis for the last 22 days of life of *Nothobranchius rachovii*.

	Days before death							
	22	18	16	14	12	8	4	1
RAR general overview								
Total activity	337.769 ± 208.11	176.538 ± 54.99	110.615 ± 37.38	172.846 ± 60.34	192.692 ± 83.13	89.154 ± 28.06	67.846 ± 17.54	52.692 ± 10.38
Maximum activity (counts)	20.538 ± 2.70 ^{ab}	22.231 ± 2.72 ^b	25.692 ± 2.99 ^b	20.769 ± 3.25 ^{ab}	18.923 ± 3.03 ^{ab}	15.230 ± 3.06 ^{ab}	10.416 ± 3.33 ^a	10.69 ± 3.49 ^a
Diurnal activity (%)	69.209 ± 5.67 ^{bc}	83.312 ± 5.44 ^c	76.866 ± 4.96 ^{bc}	67.876 ± 5.62 ^{bc}	69.511 ± 5.93 ^{bc}	63.310 ± 5.31 ^{bc}	52.125 ± 5.37 ^{ab}	37.294 ± 5.25 ^a
Mesor (counts/10 min)	1.727 ± 0.37 ^c	1.530 ± 0.34 ^{bc}	1.568 ± 0.41 ^{bc}	1.448 ± 0.33 ^b	1.207 ± 0.29 ^b	0.965 ± 0.20 ^{ab}	0.578 ± 0.10 ^a	0.526 ± 0.08 ^a
%V cosinor	15.504 ± 3.83 ^a	13.415 ± 4.00 ^a	12.298 ± 4.02 ^{ab}	9.505 ± 4.06 ^{ab}	8.812 ± 4.06 ^{ab}	8.791 ± 4.04 ^{ab}	7.367 ± 4.03 ^{ab}	3.007 ± 4.55 ^a
Acrophase (h:mm)	13:17 ± 2:18	16:09 ± 2:20	16:17 ± 2:19	20:15 ± 1:59	20:33 ± 1:00	20:41 ± 0:56	18:13 ± 1:59	18:55 ± 1:44
Rayleigh test (r)	0.891 ± 0.02 ^b	0.885 ± 0.03 ^b	0.903 ± 0.03 ^b	0.900 ± 0.03 ^b	0.896 ± 0.03 ^b	0.880 ± 0.03 ^b	0.815 ± 0.03 ^{ab}	0.736 ± 0.03 ^a
Periodogram %V	68.280 ± 1.24 ^c	64.451 ± 2.15 ^c	55.087 ± 1.81 ^b	58.427 ± 3.25 ^b	57.085 ± 2.47 ^b	45.707 ± 1.98 ^{ab}	28.929 ± 1.55 ^a	22.085 ± 2.06 ^a
Non-parametric indices								
Interdaily Stability (IS)	0.334 ± 0.03 ^b	0.339 ± 0.04 ^b	0.302 ± 0.03 ^b	0.274 ± 0.04 ^{ab}	0.253 ± 0.04 ^{ab}	0.265 ± 0.03 ^{ab}	0.221 ± 0.03 ^{ab}	0.167 ± 0.03 ^a
Intradaily Variability (IV)	1.059 ± 0.13 ^{abc}	0.827 ± 0.13 ^a	0.866 ± 0.13 ^{ab}	1.093 ± 0.14 ^{abc}	1.109 ± 0.13 ^{abc}	1.247 ± 0.13 ^{abc}	1.328 ± 0.12 ^c	1.278 ± 0.11 ^{bc}
Relative Amplitude (RA)	0.697 ± 0.06 ^{ab}	0.766 ± 0.05 ^{ab}	0.815 ± 0.06 ^b	0.767 ± 0.06 ^{ab}	0.783 ± 0.05 ^{ab}	0.664 ± 0.04 ^{ab}	0.589 ± 0.05 ^a	0.630 ± 0.05 ^{ab}
8h maximum activity (M8)	3.610 ± 0.92	3.436 ± 0.91	3.091 ± 0.92	2.836 ± 1.03	2.560 ± 0.81	1.675 ± 0.77	1.117 ± 0.74	0.832 ± 0.71
8h minimum activity (L8)	0.317 ± 0.06	0.289 ± 0.07	0.294 ± 0.07	0.250 ± 0.07	0.249 ± 0.07	0.291 ± 0.06	0.280 ± 0.07	0.251 ± 0.07
Circadian Function Index (CFI)	0.493 ± 0.05 ^{ab}	0.567 ± 0.05 ^b	0.581 ± 0.05 ^b	0.489 ± 0.05 ^{ab}	0.501 ± 0.05 ^{ab}	0.428 ± 0.05 ^{ab}	0.382 ± 0.04 ^a	0.387 ± 0.04 ^a
Sleep quality								
Sleep Interruptions	13.548 ± 1.33	8.954 ± 1.16	9.584 ± 1.01	12.548 ± 1.62	9.954 ± 1.21	16.654 ± 1.53	17.654 ± 1.58	15.548 ± 1.45
Interruption duration (min)	23.654 ± 3.24	16.548 ± 2.46	16.978 ± 1.98	17.548 ± 2.67	16.017 ± 3.49	18.129 ± 2.67	24.654 ± 1.43	27.544 ± 3.00
Sleep latency (min)	8.181 ± 3.23	3.433 ± 2.98	5.000 ± 2.50	3.254 ± 2.46	1.667 ± 1.07	3.248 ± 1.36	2.057 ± 2.25	8.128 ± 2.45
Sleep offset (min)	10.000 ± 5.11	4.167 ± 1.85	1.215 ± 0.80	10.833 ± 8.80	5.833 ± 3.43	8.485 ± 4.85	7.501 ± 5.56	8.348 ± 5.52
Rest time (min)	381.337 ± 15.58	564.322 ± 24.54	551.05 ± 19.54	485.62 ± 27.58	553.05 ± 21.78	406.39 ± 18.98	277.223 ± 35.85	275.257 ± 37.54
Sleep efficiency (%)	48.507 ± 4.38 ^{ab}	70.702 ± 4.64 ^d	69.120 ± 4.31 ^{cd}	59.447 ± 4.45 ^{bcd}	64.259 ± 4.62 ^{bcd}	46.884 ± 4.24 ^{ab}	47.262 ± 4.11 ^{abc}	32.644 ± 4.27 ^a
Complexity analysis								
Approximated Entropy	0.552 ± 0.04 ^b	0.453 ± 0.03 ^{ab}	0.378 ± 0.04 ^a	0.360 ± 0.04 ^a	0.320 ± 0.04 ^a	0.356 ± 0.04 ^a	0.316 ± 0.03 ^a	0.361 ± 0.03 ^a

All values are presented as mean ± SEM (n=13). Values on the same line with different superscripts are significantly different (ANOVA, P<0.05) and were obtained by means of a

Tukey-b post hoc for multiple comparisons test. r, IS, RA and CFI range values are between 0 and 1. IV between 0 and 2. CFI = (IS + (2-IV)/2 + RA)/3. Sleep efficiency = (Rest time

- Sleep interruptions x Interruption duration)/night duration. Approximated Entropy: ApEn2.0, 2SD, 144

ANEXO II***Nothobranchius* as a model for aging studies. A review.**

Lucas-Sánchez, Alejandro^{a,*}, Almada-Pagán, Pedro Francisco^b, Mendiola, Pilar^a,
de Costa, Jorge^a

^a Department of Physiology. Faculty of Biology. University of Murcia. 30100 Murcia,
Spain.

^b Institute of Aquaculture, School of Natural Sciences, University of Stirling, Stirling
FK9 4LA, UK.

Running title: Genus *Nothobranchius* for aging studies

Abstract

In recent decades, the increase in human longevity has made it increasingly important to expand our knowledge on aging. To accomplish this, the use of animal models is essential, with the most common being mouse (phylogenetically similar to humans, and a model with a long life expectancy) and *Caenorhabditis elegans* (an invertebrate with a short life span, but quite removed from us in evolutionary terms). However, some sort of model is needed to bridge the differences between those mentioned above, achieving a balance between phylogenetic distance and life span. Fish of the genus *Nothobranchius* were suggested 10 years ago as a possible alternative for the study of

the aging process. In the meantime, numerous studies have been conducted at different levels: behavioral (including the study of the rest-activity rhythm), populational, histochemical, biochemical and genetic, among others, with very positive results. This review compiles what we know about *Nothobranchius* to date, and examines its future prospects as a true alternative to the classic models for studies on aging.

Key words: Aging, Fish, killifish, *Nothobranchius*.

Introduction

Aging is a multifactorial process that involves numerous mechanisms that operate during the normal life cycle of an organism, triggering a progressive, irreversible deterioration that ultimately leads to its death. Because of the sheer complexity of the aging process, it remains one of our great scientific challenges even today. The work invested in studying aging (a search for “aging” on Web of KnowledgeSM returns more than 3 million results after 2003) has made it possible to identify some of the processes that take place with aging, but we are still far from being able to offer a theory that links them all together in a solid chain of cause-effect relationships. Some of these studies have been carried out on humans, but this type of research is very limited for both ethical and technical reasons, which makes it necessary (as in many other fields of science) to resort to models in which experimental designs can be used that would be impossible to apply to human beings, and which permit us to adequately study aging.

To be considered a model for aging, an animal must have a number of features. Firstly, the candidate must show signs of age-related deterioration that can be used as

biomarkers. Secondly, the phylogenetic distance between the model and the human race must be as short as possible, in order to facilitate the extrapolation of the study results. Finally, the animal's life expectancy must be as short as possible, to minimize the time needed to conduct the experiments and make observations. Historically, the mouse has been the aging model par excellence, since its biology is well known and it is phylogenetically close to humans. Nevertheless, the life expectancy of these animals is at least 24 months, which is a considerable amount of time if we consider the high cost of maintaining them in laboratories over long periods of time. In addition, mice typically exhibit a nocturnal behavior pattern, which complicates their use during their activity phase in a laboratory setting. Mammals in general also give birth to relatively few offspring at a time, which increases the genetic variability of the subjects in a particular study.

Another commonly used model in aging studies is *Caenorhabditis elegans*, a nematode measuring 1 mm in length, with a maximum life expectancy of 2 to 3 weeks. The cost of maintenance is very low and its entire life cycle can be covered by short experimental periods. The problem associated with this small worm is its great evolutionary distance from mammals, which complicates the extrapolation of the data obtained to humans. In terms of life expectancy and phylogenetic distance from humans, halfway between the mouse and *C. elegans* we find a group of vertebrates with the potential to be used as models in aging studies: fish.

What do fish have to offer?

Fish constitute the largest group of vertebrates [1], representing approximately one-half of all species. Within this vast group, we find a wide variety of species that

differ greatly in terms of their longevity and versatility as experimental models [2]. As early as 1978 [3], work with guppies demonstrated that fish have great potential for use as valid models in aging studies, due to certain characteristics that have proven very interesting. The main advantage of fish is their great power of adaptation to a wide range of environmental conditions. Fish are particularly sensitive to variations in environmental temperature, which makes it relatively easy to manipulate their rate of aging. Other external factors, such as diet, space available in the environment and reproductive opportunities are also determining factors. One property of fish to consider is the generally large number of eggs laid at a time. In most cases, an experiment can be conducted with eggs laid altogether at the same time, which enables us to know with certainty the origin of the animals, all of which have the same genetic background, facilitating the monitoring of the animals throughout their entire life cycle. Finally, maintenance and rearing costs for large numbers of fish throughout their life cycle are lower than for mammals.

Fish as models for aging studies

It was in the 1960s when the scientific community began to consider fish from a gerontological perspective. The first systematic gerontological studies were carried out with a type of guppy, *Lebistes reticularis* (Peters, 1859), and described how the aging process could be modulated through calorie restriction and temperature manipulation [4-6]. Observations were also made with regard to how the guppy's reproductive capacity was affected over time [6, 7]. This work continued in the 1980s, when Woodhead *et al.* characterized the aging of guppies at the histological level [8, 9]. The guppy was later used for aging studies conducted on natural populations. Guppy

populations have demonstrated different mortality rates depending on factors such as geographic location and co-existence with predators, with sexual maturity being a key factor in determining their life expectancy [10].

However, it is another species, the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), the one that has undergone exponential growth in terms of its use as an experimental model in recent decades. These small tropical water cyprinids were used mainly in developmental biology because of the transparency of their embryos, their rapid development, their high proliferation capacity (laying as many as 200 eggs at a time) and low maintenance cost in a laboratory setting [11]. These characteristics and its tremendous versatility have gradually led to the use of the zebrafish as an experimental model in many fields of research, to the extent that it is currently one of the best characterized animals at the genetic level [12-15]. In spite of its undeniable potential as a model, the use of the zebrafish in aging studies has been somewhat less than satisfactory. The main reason is its life expectancy, which is at least 2 years [16]. It is true that this life expectancy is no greater than that of mice, and that a very high-resolution map of its genetic material has been developed, making it possible to generate mutant zebrafish with shorter life cycles or expressing aging markers earlier than normal [17]. Nevertheless, they would still be genetically manipulated individuals, and the data obtained from this type of experiments must be interpreted with caution.

The genus *Nothobranchius*. Characteristics that make it unique.

There is another very interesting group of fish in the order Cyprinodontiformes, the so-called *killifish* (from the Danish word “kilde”, meaning small stream or puddle), which are quite valuable as gerontological models for experimentation. In the 1960s

scientists began to use fish from the genus *Cynolebias* to determine the capacity of temperature as a modulator of the aging process [18, 19]. In the 1970s, histopathological changes were documented in the liver and kidney with age in the genus *Nothobranchius* [20, 21]. But it was around 2004 when the work by Herrera and Jagadeeswaran [22] pointed to killifish, primarily those belonging to the genus *Nothobranchius*, as potential aging models.

The genus *Nothobranchius* is formed by annual fish from Africa that live in puddles produced by seasonal rains. These fish have adapted to environmental rain cycles by developing eggs that are resistant to desiccation. Before the puddles disappear, the males stimulate the females to lay eggs, and the fertilized eggs are then buried in the substrate. Once the puddle dries up, the eggs enter into a state of diapause, and their development slows down until the new rainy season arrives and ponds are formed once again. The juvenile fish then hatch and a new cycle begins [23]. Fish from the genus *Nothobranchius* have a short life cycle, which is obviously conditioned by the extreme environment in which they live. Depending on the species, maximum life expectancies have been reported that range from 3 (*N. furzeri*) to 28 months (*N. guentheri*) [24, 25]. This peculiar characteristic is what makes them especially attractive for aging studies, combined with the fact that they are small vertebrates, thus requiring no large laboratory equipment. They are also tolerant in terms of water quality. It is simple to establish a colony in a laboratory setting, since egg laying can be naturally induced in the laboratory. Furthermore, the eggs can be easily collected by placing a container with coconut fibre or fine sand in the bottom of the aquarium. This substrate must be allowed to air dry until it is only slightly damp before being stored in small containers; this reduces the required space and facilitates the maintenance of a continuous stock.

What do we know about the *Nothobranchius*?

The first studies with *Nothobranchius* of which we have record were carried out on *N. guentheri* by Markofsky *et al.* [24, 26], characterizing the growth of isolated groups of males and describing the first aging markers in this genus: deterioration of the liver with age [21], the appearance of small malignant tumors on the kidneys [20] and the deterioration of the immune system, accompanied by generalized tumor development [27]. Balmer, in turn, related the aging process in *N. guentheri* to a drop in the energy content in the animal as a whole [28]. In the following years, researchers began to use other species from the genus *Nothobranchius*, such as *N. korthausae*, in which hyperplasia of the thyroid gland and the anterior pituitary gland were described in association with age [29], indicating the potential of the genus for use as a model for the study of tumors.

In 2003, an exceptionally short life cycle was described for another species in this genus: *Nothobranchius furzeri*, with a maximum life expectancy of 12 weeks, the average being 9 weeks, which is the shortest so far described for a vertebrate [25]. This work, along with that by Herrera and Jagadeeswaran in 2004 [22], which suggested the genus *Nothobranchius* as a potential genetic model for studying development and aging, represented the true start of the push to establish the genus *Nothobranchius* as a model for gerontological studies. From that moment on, different research groups began efforts to study aging in *Nothobranchius*. Even though today *N. furzeri* continues to be the most commonly used species, new species continue to be characterized, such as *N. rachovii* [30], each of which having distinctive properties that make them ideal for certain methodologies. This enables researchers to approach the study of aging from different angles, thereby enriching the information that we have about this process in the genus *Nothobranchius*.

1. Growth, reproduction and longevity

The different studies carried out with species from the genus *Nothobranchius* describe the existence of explosive growth in all of them. This growth is noticeable to the naked eye and can be observed from one day to the next. In this case, the growth is constant from the time the eggs hatch until the animals reach adulthood, with a body length of around 5 cm. Sexual maturity is reached 3-4 weeks after the eggs hatch. At this time, the growth rate of males exceeds that of females and the typical coloring of each species begins to become evident [25, 31]. Sexual dimorphism in *Nothobranchius* is very noticeable; males are larger than females and have bright colors that make them very attractive for hobby aquarists [22, 30-33]. It is interesting to note that the elimination of males from a population results in larger female fish that produce fewer eggs [34]. It would seem that the disappearance of sexual stimuli reduces the number of eggs the females lay, which then use this energy to grow. This seems to reflect the disposable soma theory of Kirkwood [35], which considers aging to be the result of competition for an organism's available energy between maintaining the soma and reproduction.

Once they have reached adulthood, the animals begin to display courting behaviors and, from that point on, they will lay eggs on a regular basis for the rest of their lives. However, it has been observed that the number of eggs laid each time and their viability decrease once the fish stops growing [31]. This would be supported by the work of Di Cicco *et al.* [36], who found that the gonads of *Nothobranchius furzeri* show changes associated with age, and by numerous observations made by amateur breeders of the genus *Nothobranchius* [37] and another genus of killifish, *Austrofundulus limnaeus* [38]. The reproductive senescence observed in

Nothobranchius differs from that observed in fish species with longer life cycles, whose reproductive capacity remains intact with age [39].

One interesting aspect is the difference in life expectancy observed between different species of the genus *Nothobranchius*, although intraspecies disparity also exists. The longest life expectancy described for the genus corresponds to *N. guentheri*, with an average life span of 64 weeks and a maximum of 112 weeks [24]. However, a more recent study recorded an average life span of 43 weeks and a maximum of 64 weeks [33]. Something similar occurs with *N. rachovii*: an average life expectancy of 34 weeks and a maximum of 37 weeks were reported [22], but a later publication described a greater life expectancy, with an average of 58 weeks and a maximum of 64 weeks [40]. These differences could be attributed to intraspecies variations (between different varieties) or differences in rearing and maintenance conditions, such as the amount of food supplied or the dietary composition, parameters that are involved in the metabolic rate, oxidative stress, disease and aging [41, 42]. For this reason, it would be important to standardize the protocols for maintaining colonies of *Nothobranchius*, taking into account aspects such as temperature, the type and frequency of feeding, photoperiod, population density, sex ratio and reproduction. This would prevent the emergence of apparently contradictory data and would go a long way to promoting the expansion of the model. Another species studied is *N. korthausae*, with an average life expectancy of 57 weeks and a maximum of 81 weeks [31]. Finally, there is the odd case of *N. furzeri*, for which different varieties are known (captured at different geographic locations), each with a specific life expectancy, ranging from the lowest average of 9 weeks and a maximum of 12-13 weeks (GRZ variety) to the longest average life expectancy of 24 weeks and a maximum of 32 weeks (MZM04/03 variety) [25, 32, 43].

The most plausible explanation for these interspecies (or intervariety) differences in life expectancy for the genus *Nothobranchius* lies in the characteristics of the habitat where each species originates, primarily the rainfall pattern in the area, a determining factor in how long puddles exist before drying up [31, 37, 43]. The habitat of *N. guentheri* (Zanzibar) is characterized by the presence of two rain cycles, and it is possible that the puddles where the fish live never dry up at any time during the year (www.worldweather.org). Something similar occurs with the habitat of *N. korthausae* (Mafia Island, Tanzania), where the climate can be considered tropical. However, the habitat of *N. furzeri* (plains of Zimbabwe) is much drier, and the puddles remain only for short periods of time. The potential correlation between the ratio of precipitation/evaporation where the fish lives and the life expectancy of each variety has been studied in the case of *N. furzeri*, observing a greater life expectancy as the ratio increases, i.e. where the precipitation is greater and/or less evaporation occurs [43]. Evolutionary pressure favoring a very short life cycle would be much greater in a habitat that literally evaporates in a short period of time. Some authors have administered treatments intended to increase the life expectancy of different species of *Nothobranchius*, such as calorie restriction [32], lowering the water temperature [44, 45] or using exogenous substances such as resveratrol [33, 46, 47], which have been suggested as possible treatments against aging [48].

2. Morphological and histopathological changes

The different species of *Nothobranchius* studied have shown numerous morphological changes associated with age, making it relatively easy to identify individuals with a senescent phenotype. The most evident morphological change is the

loss of color that is observed in fish with age, which is much more noticeable in males, due to the characteristic coloring they have throughout adulthood. Both males and females also suffer a noticeable loss of body mass, which is reflected by a decrease in weight, in addition to the curvature of the dorsal spine [37] and deterioration of the fins, especially the caudal fin [31]. These changes have also been described in other genera of fish, such as the zebrafish [16] and the Japanese rice fish, or medaka (*Oryzias latipes*) [49]. In addition, in *Nothobranchius korthausae* the development of cataracts has been described in some of the individuals studied [31].

Age-related changes have also been described at a microscopic level that may be used as markers of aging. Accordingly, progressive increases in granules of lipofuscin, α -galactosidase and fluoro-Jade B in tissues in organs such as the liver [32], different areas of the brain [32, 37, 43], skin [30, 44] and gills [30, 45], which is related to the cellular and tissue deterioration associated with aging. Furthermore, it has been observed that the time for the onset of these markers increases with the application of the aforementioned treatments, such as a decrease in water temperature, calorie restriction or the use of anti-aging molecules like resveratrol [32, 33, 44-47].

Another interesting observation in *Nothobranchius* is the high incidence of tumors that develop with aging. The post-mortem analysis of *N. guentheri* suffering spontaneous deaths frequently revealed neoplasms in the liver, and to a lesser extent, in the kidneys [20, 21]. Cooper *et al.* [27] also described the development of widespread tumors with age in *Nothobranchius guentheri* and *Cynolebias (Austrolebias) adloffii*, associated with a weakening of the animal's immune system. Besides tumors, a higher frequency of the onset of degenerative disorders has also been described in the liver, particularly steatosis, and the kidneys of *Nothobranchius*,

something which has also been described in other fish species, such as *Poecilia reticulata* and *Austrolebias adloffi* [9, 50]. Other symptoms were found in the heart (fibrosis and aggregations of lymphocytes around myocardial fibres) and the gonads (atrophy and fibrosis). It is interesting to note that the severity of the disorders is normally greater in males than in females [36]. In this regard, *Nothobranchius* has been suggested as an accurate model to study tumorigenesis.

3. Cognitive and behavioral changes. The circadian system.

Like what has been described in humans and other animal models, the species belonging to the genus *Nothobranchius* suffer cognitive degeneration as they age. This deterioration has been quantified by different conditioned learning tests, which analyze, for example, the animal's capacity to avoid a certain type of stressor (for example, a weak electrical shock) within a certain time frame. This test is referred to as an Active avoidance task [43, 44], and it is a modification of the so-called shuttlebox originally designed for goldfish and zebrafish [51, 52]. This test showed an increase in the response time of *Nothobranchius* to the conditioning stimulus with age, accompanied by significantly fewer correct responses [43]. Calorie restriction [32], the decrease in temperature [44] and the administration of resveratrol [33, 46] produced a delay in cognitive decline.

One line of research that has shown great potential in the study of an animal's overall functional state and its deterioration with age is that of biological rhythms and, among them, the rest-activity rhythm, which is determined by the circadian system. The circadian system (CS), present at all levels in living beings, is the biological response to an environment that is constantly, yet cyclically changing. Most physiological processes

in an organism are perfectly coordinated or synchronized with changes in the environment in which it lives; this is thanks to the existence of a biological clock capable of receiving changing signals from the environment, integrating them and issuing synchronized, cyclical responses (what we call biological rhythms) [53]. The quintessential environmental signal synchronizing the biological clock is the 24-hour light-dark cycle caused by the Earth's rotation. Most of the biological rhythms described have a period that lasts approximately 24 hours, in other words, that is circadian (from the Latin word *circa*, meaning near or close and *die*, meaning day).

The biological clock consists of a central pacemaker located in the central nervous system, equipped with informational input channels or afferent pathways (e.g. photoreceptors in the retina) and output channels or efferent pathways, which would drive the overt rhythms. Although not as much is known about the CS in fish as in mammals, it is believed that the function of the central pacemaker is performed by the pineal gland, which receives light information directly and through photoreceptors in the retina, and produces melatonin, a hormone secreted during the night, and which serves as a chemical signal of darkness for the organism. The presence of melatonin signals to the organism that it is in the nocturnal phase, while the higher or lower peak amplitude of this hormone release will indicate the duration of the phase, which depends on the season of the year [54]. The animal's capacity to synchronize with its environment is also affected by aging [55]. This process can be characterized by analyzing the animal's overt rhythms, and used as a marker of senescence. One of the best studied rhythms is the locomotor activity rhythm, which indicates periods of rest and activity in a species [56]. Accordingly, it has been observed that *Nothobranchius* species are diurnal, with stable, regular locomotor rhythms during adulthood that suffer a clear deterioration with age, losing a good share of their regularity, becoming

fragmented and decreasing in amplitude [31]. By analyzing an animal's locomotor activity, it is possible to characterize a species' sleep-wake cycle. *Nothobranchius* evidence periods of sleep-like states [57], described as nocturnal periods of inactivity, during which time the animals float on the water with their heads pointing slightly upwards, normally near the surface, with no movement of the pectoral fins [58]. In *Nothobranchius*, these periods of sleep-like states suffer an age-related deterioration, characterized by an increase in sleep interruptions during the night [58]. In mammals, this deterioration has been associated with an imbalance in the production of melatonin by the pineal gland [59]. In *N. korthausae*, temporary exogenous administration of melatonin to aged animals produces a significant improvement in the animal's locomotor activity rhythm, with increased regularity and decreased rhythm fragmentation. This treatment also improves the quality of the sleep period, in particular due to the effect of sleepiness that occurs, as has also been described for mammals and zebrafish [60, 61], and reduces the number of night-time sleep interruptions and their duration. This effect is lost as soon as the treatment ends [58]. The benefits of administering melatonin have been widely reported in both humans and animals [62-65]. For this reason, *Nothobranchius* might be an excellent model for studies on the aging of the circadian system.

4. Biochemical changes

Many studies carried out with cell cultures and animal models support the fact that reactive oxygen species (ROS), particularly those produced by the mitochondria, play a key role in the aging process [66-68]. ROS are continuously produced as the result of the normal functioning of the electron transport chain (ETC) and oxidative

phosphorylation, and they cause a cumulative and irreversible damage to the tissues, leading to cellular dysfunction with age [69, 70]. It would appear that the mitochondria are not only the main source of ROS, they are also the first target of the oxidative attack. According to the mitochondrial theory of aging, the ROS produced by the mitochondrial ETC under normal physiological conditions cause damage to proteins, lipids and mitochondrial DNA (mtDNA) [71-73]. Some authors believe that the first target of oxidative damage in the mitochondria is the mtDNA and that as more and more mutations accumulate in critical DNA regions, the complexes that make up the ETC become less efficient or are rendered inactive, leading to mitochondrial dysfunction [74]. In recent years, many diseases associated with senescence in mammals and humans have been related to the accumulation of mutations in the mtDNA [75, 76]. This process has also been described in fish, specifically in species of the genus *Nothobranchius*. In a study conducted on *N. furzeri*, a decrease in the number of copies of mtDNA was observed in different tissues with age, as well as a reduction in the expression of peptides encoded by the mtDNA, all of which are components of the complexes that make up the ETC [77]. The explanation of the high rate of mutations observed in the mtDNA (much higher than for nuclear DNA) may have something to do with the fact that the mtDNA is greatly exposed to ROS: 1) it is located very near the internal mitochondrial membrane where ROS are produced, 2) it is not overly condensed or protected by histones and 3) it has limited repair activity [73]. However, even though all mitochondria molecules are attacked by ROS, it should be pointed out that lipid peroxidation is the most important oxidative process, primarily due to the extreme sensitivity to oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA), the constituent molecules of cell membrane phospholipids [78]. Lipid peroxidation also gives way to a whole series of highly reactive derivatives that propagate the oxidation reaction throughout the mitochondrial membrane and to other molecules [68]. One

recent theory on aging, that of the membrane pacemaker, suggests that the membrane lipids are the first target of ROS, and damage to these molecules causes an alteration in the membrane fluidity, resulting in a mismatch between the ETC and the oxidative phosphorylation, which in turn increases the rate at which ROS are produced [41]. Finally, the cell's repair and defense mechanisms would be overwhelmed and the oxidative damage would spread, particularly to the mtDNA. In cross-sectional studies on different animal species, including mammals, birds and reptiles, it has been observed that species with lipid membranes that are highly unsaturated, and therefore more fluid, have a high level of metabolic activity, due to the greater mobility of the membrane proteins, which are responsible for a large part of the cell's metabolism. A higher metabolic rate is associated with greater oxidative stress, which according to this theory, would primarily affect the PUFA in the membrane in a vicious circle, which would lead to a high rate of aging and a low life expectancy. There is evidence of oxidative damage associated with aging in the species of the genus *Nothobranchius*. Hsu *et al.* [30] identified an increase in oxidative stress in several tissues of *N. rachovii* with age. The authors observed an increase in lipid peroxidation and oxidative damage to proteins, along with a drop in antioxidant activity with age. Considering that mitochondrial membranes have a distinctive composition of lipid types, phospholipids, glycolipids and cholesterol related to the role of this organelle in energy metabolism and oxygen consumption [79, 80], it is easy to understand that any change, either in terms of the membrane content of the different lipid types or the fatty acid composition of the phospholipids, would affect their functions and, ultimately, the functionality of the mitochondria.

Our group has found lipid composition changes throughout the life cycle of *N. korthausae* [31], as well as in the composition of mitochondrial membranes in *N.*

rachovii as a whole [40]. In the first case, a high level of unsaturation was observed in adult *N. korthausae*, which subsequently decreased in senescence. In *N. rachovii*, mitochondrial membranes are highly unsaturated, which, as in the case of *N. korthausae*, would be related to its fast metabolism, explosive growth and short life expectancy. Over the passage of time, the composition of the mitochondrial membrane undergoes significant changes. On one hand, the proportion of the different phospholipids changes. There is a decrease in the amount of cardiolipin, a phospholipid specific to the mitochondria, as well as an increase in the proportion of sphingomyelin with age [40]. This is important since cardiolipin is a key molecule for mitochondrial function, and its oxidation can lead to cellular apoptosis associated to mitochondrial dysfunction [73, 81]. Sphingomyelin, in turn, has saturated fatty acids in its molecule, for which it is credited with having stiffening properties. Membranes with a high sphingomyelin content are more rigid than the rest, and the propagation of free radicals slows down within them [82]. Sphingomyelin is also the precursor of signaling molecules associated with the process of apoptosis [83]. An alteration in the content of these phospholipids alone could explain the mitochondrial dysfunction associated with age.

Furthermore, the fatty acid composition of the phospholipids present in mitochondrial membranes is affected with age. Most of the phospholipids became more saturated with age [40]. A significant reduction in PUFA content occurred, especially in the docosahexaenoic acid (22:6n3, DHA), the fatty acid that is most susceptible to peroxidation. Taking into account that most of the changes observed in *N. rachovii* occurred after growth was completed, this may be the result of, or be related to, the effects of explosive growth and the speed with which adult size is reached by this

species, which has been associated with numerous negative effects, among them a reduction in life expectancy [84].

Species belonging to the genus *Nothobranchius* thus constitute a good model for studying the role mitochondria play in the aging process. Although we know some of the mechanisms that take place in the organelle with age, a solid cause-effect chain still remains to be determined that would connect them all and enable us to identify the origin of each.

5. Genetics

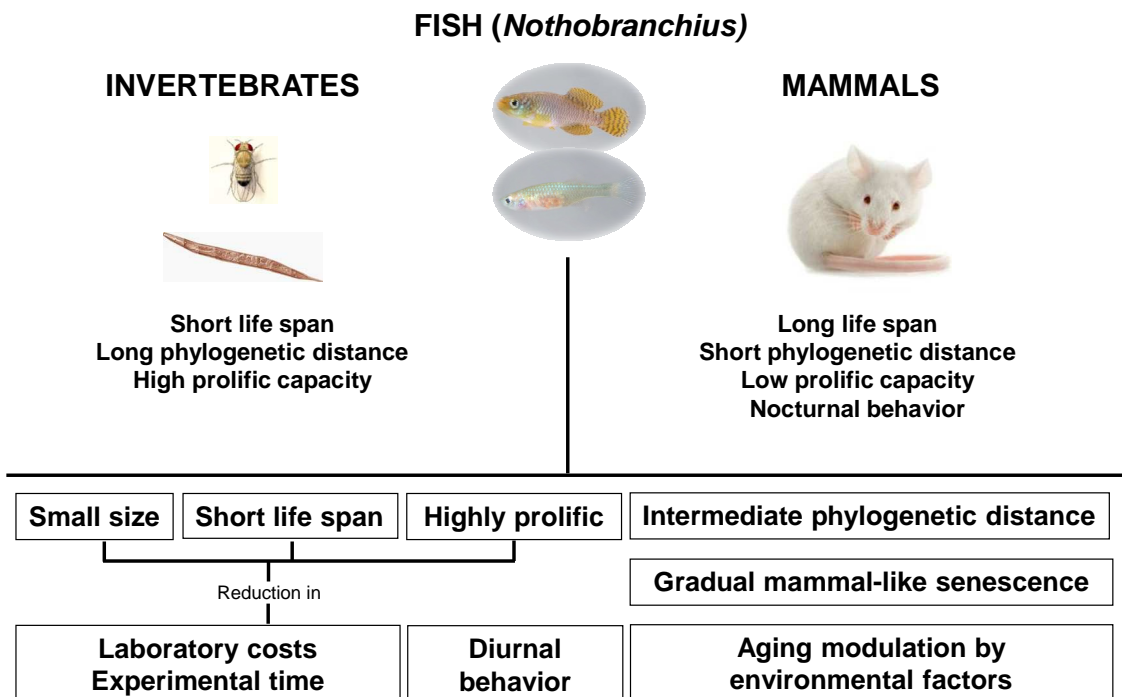
The genomic characterization of *Nothobranchius* constitutes an essential step forward towards understanding the mechanisms that determine life expectancy in this genus. Studies conducted to date have been carried out on *N. furzeri*. In 2009, two published works [85] laid the groundwork to begin to analyze the species at a genomic and genetic level[86]. From this moment on, knowledge about the genome of *N. furzeri* has increased considerably. We already know the complete mitochondrial genome sequence [77] and the nuclear genome of *N. furzeri* [87], as well as the genes that determine the differences in life expectancy among the different varieties. Furthermore, all *N. furzeri* transcripts sequenced to date have been collected into databases to facilitate the search and use of age-related genes [88]. The use of genome databases for the different species will help group and identify the genes involved in the aging process.

Even so, a great deal of work remains. Work is currently underway on the creation of stable lines of transgenic fish of the genus *Nothobranchius* [89, 90] as well

as inducible expression genes [91], which will undoubtedly become a valuable tool for gerontological studies.

CONCLUSIONS

While greater efforts are needed to standardize the maintenance protocols of this genus species in order to prevent disparities in the results obtained by different work groups, the genus *Nothobranchius* has proved to be a competitive option for studies conducted at very different levels, including populational, behavioral, histopathological and biochemical studies, and in particular, those examining circadian rhythms and genetics, thanks to the interesting characteristics described above (Fig. 1). This makes it a viable alternative for all types of age-related studies.



ACKNOWLEDGEMENTS

This project was funded by the Fundacion Seneca (12005/PI/09), Instituto de Salud Carlos III (RETICEF, RD12/0043/0011), and the Ministry of Science and Education (BFU2010-21945-C02-01), as well as FEDER co-funding. P.F.A.-P. was funded by an Intra-European Fellowship under the auspices of the 7th Community Framework Programme (PIEF-GA-2011-297964, OLDMITO).

REFERENCES

- [1] Paxton JR, Eschmeyer WN, Kirshner D, editors. Encyclopedia of fishes. New York: Academic Press; 1998.
- [2] Finch CE, editor. Longevity, senescence, and the genome. Chicago: University of Chicago Press; 1994.
- [3] Woodhead AD (1978). Fish in studies of aging. *Exp Gerontol*, 13:125-140.
- [4] Comfort A (1960). The effect of age on growth-resumption in fish (*Lebistes*) checked by food restriction. *Gerontologia*, 4:177-186.
- [5] Comfort A (1961). The longevity and mortality of a fish (*Lebistes reticulatus* Peters) in captivity. *Gerontologia*, 5:209-222.
- [6] Comfort A (1969). Effect of temperature on tail regeneration in *Lebistes*. *Gerontologia*, 15:248-251.
- [7] Comfort A (1961). Age and reproduction in female *Lebistes*. *Gerontologia*, 5:146-149.

- [8] Woodhead AD, Pond V (1984). Aging changes in the optic tectum of the guppy *Poecilia (lebistes) reticulatus*. *Exp Gerontol*, 19:305-311.
- [9] Woodhead AD, Pond V, Dailey K (1983). Aging changes in the kidneys of two poeciliid fishes, the guppy *Poecilia reticulatus* and the Amazon molly *P. formosa*. *Exp Gerontol*, 18:211-221.
- [10] Reznick DN, Buckwalter G, Groff J, Elder D (2001). The evolution of senescence in natural populations of guppies (*Poecilia reticulata*): a comparative approach. *Exp Gerontol*, 36:791-812.
- [11] Eisen JS (1996). Zebrafish make a big splash. *Cell*, 87:969-977.
- [12] Gerhard GS (2003). Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Exp Gerontol*, 38:1333-1341.
- [13] Keller ET, Murtha JM (2004). The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comp Biochem Physiol*, 138C:335-341.
- [14] Kishi S (2004). Functional aging and gradual senescence in Zebrafish. *Ann N Y Acad Sci*, 1019:521-526.
- [15] Yu L, Tucci V, Kishi S, Zhdanova IV (2006). Cognitive aging in zebrafish. *PLoS One*, 1:e14.
- [16] Gerhard GS, Kauffman EJ, Wang X, Stewart R, Moore JL, Kasales CJ, Demidenko E, Cheng KC (2002). Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp Gerontol*, 37:1055-1068.

- [17] Talbot WS, Hopkins N (2000). Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome. *Genes Dev*, 14:755-762.
- [18] Liu RK, Walford RL (1966). Increased growth and life-span with lowered ambient temperature in the annual fish, *Cynolebias adloffii*. *Nature*, 212:1277-1278.
- [19] Liu RK, Walford RL (1969). Laboratory studies on life-span, growth, aging, and pathology of the annual fish, *Cynolebias bellottii* Stendachner. *Zool NY Zool Soc*, 54:1-19.
- [20] Markofsky J, Milstoc M (1979). Histopathological observations of the kidney during aging of the male annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Exp Gerontol*, 14:149-155.
- [21] Markofsky J, Milstoc M (1979). Aging changes in the liver of the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. *Exp Gerontol*, 14:11-20, IN1.
- [22] Herrera M, Jagadeeswaran P (2004). Annual fish as a genetic model for aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 59:B101-B107.
- [23] Jubb RA, editor. *Nothobranchius*. Neptune City, New Jersey: TFH Publications; 1982.
- [24] Markofsky J, 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.
- [25] Valdesalici S, Cellerino A (2003). Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 270:S189-S191.

- [26] Markofsky J, Perlmutter A (1973). Growth differences in subgroups of varying longevities in a laboratory population of the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri* (Peters). *Exp Gerontol*, 8:65-73.
- [27] Cooper EL, Zapata A, García Barrutia M, Ramírez JA (1983). Aging changes in lymphopoietic and myelopoietic organs of the annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. *Exp Gerontol*, 18:29-38.
- [28] Balmer RT (1982). The effect of age on body energy content of the annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. *Exp Gerontol*, 17:139-143.
- [29] Ruijter JM, Peute J, Levels PJ (1987). The relation between pituitary gland and thyroid growth during the lifespan of the annual fish *Cynolebias whitei* and *Nothobranchius korthausae*: gonadotropic and thyrotropic cells. *Cell Tissue Res*, 248:689-697.
- [30] Hsu CY, Chiu YC, Hsu WL, Chan YP (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.
- [31] Lucas-Sánchez A, Almada-Pagán PF, Madrid Pérez JA, de Costa Ruiz J, Mendiola López P (2011). Age-related markers in *Nothobranchius korthausae*: fatty acid profile and locomotor activity rhythms. *Exp Gerontol*, 46:970-978.
- [32] Terzibasi Tozzini E, Lefrançois C, Domenici P, Hartmann N, Graf M, 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.

- [33] Yu X, Li G (2012). Effects of resveratrol on longevity, cognitive ability and aging-related histological markers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Exp Gerontol*, 47:940-949.
- [34] Graf M, Cellerino A, Englert C (2010). Gender separation increases somatic growth in females but does not affect lifespan in *Nothobranchius furzeri*. *PLoS One*, 5:e11958.
- [35] Kirkwood JK (1983). A limit to metabolisable energy intake in mammals and birds. *Comp Biochem Physiol*, 75A(1):1-3.
- [36] Di Cicco E, Terzibasi Tozzini E, Rossi G, Cellerino A (2011). The short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri* shows a typical teleost aging processes reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. *Exp Gerontol*, 46:249-256.
- [37] Genade T, Benedetti M, Terzibasi Tozzini E, Roncaglia P, Valenzano DR, Cattaneo A, Cellerino A (2005). Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell*, 4:223-233.
- [38] Podrabsky JE (1999). Husbandry of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* with special emphasis on the collection and rearing of embryos. *Environ Biol Fishes*, 54:421-431.
- [39] Reznick DN, Ghalambor CK, Nunney L (2002). The evolution of senescence in fish. *Mech Ageing Dev*, 123:773-789.
- [40] Lucas-Sánchez, Alejandro, Almaida-Pagán, Pedro Francisco, Tocher, Douglas R., Mendiola López, Pilar, and de Costa Ruiz, Jorge (2013). Age-related

- changes in mitochondrial membrane composition of *Nothobranchius rachovii*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. (in press).
- [41] Hulbert AJ (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol*, 234:277-288.
- [42] Hulbert AJ (2007). Membrane fatty acids as pacemakers of animal metabolism. *Lipids*, 42:811-819.
- [43] Terzibasi Tozzini E, Valenzano DR, Benedetti M, Roncaglia P, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A (2008). Large differences in aging phenotype between strains of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*. *PLoS One*, 3:e3866-13.
- [44] Valenzano DR, Terzibasi Tozzini E, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A (2006). Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell*, 5:275-278.
- [45] Hsu CY, Chiu YC (2009). Ambient temperature influences aging in an annual fish (*Nothobranchius rachovii*). *Aging Cell*, 8:726-737.
- [46] Valenzano DR, Terzibasi Tozzini E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol*, 16:296-300.
- [47] Genade T, Lang DM (2013). Resveratrol extends lifespan and preserves glia but not neurons of the *Nothobranchius guentheri* optic tectum. *Exp Gerontol*, 48:202-212.

- [48] Baur JA, Sinclair DA (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 5:493-506.
- [49] Hatakeyama H, Nakamura KI, Izumiyama-Shimomura N, Ishii A, Tsuchida S, Takubo K, Ishikawa N (2008). The teleost *Oryzias latipes* shows telomere shortening with age despite considerable telomerase activity throughout life. *Mech Ageing Dev*, 129:550-557.
- [50] Walford RL, Liu RK (1965). Husbandry, life span, and growth rate of the annual fish, *Cynolebias adloffii* E. Ahl. *Exp Gerontol*, 1:161-168.
- [51] Laudien H, Freyer J, Erb R, Denzer D (1986). Influence of isolation stress and inhibited protein biosynthesis on learning and memory in goldfish. *Physiol Behav*, 38:621-628.
- [52] Pradel G, Schachner M, Schmidt R (1999). Inhibition of memory consolidation by antibodies against cell adhesion molecules after active avoidance conditioning in zebrafish. *J Neurobiol*, 39:197-206.
- [53] Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ, editors. *Chronobiology: Biological timekeeping*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc., U.S.; 2003.
- [54] Reiter RJ (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Cell Molec Life Sci*, 49:654-664.
- [55] Weinert D (2000). Age-dependent changes of the circadian system. *Chronobiol Int*, 17:261-283.

- [56] Mailloux A, Benstaali C, Bogdan A, Auzéby A, Touitou Y (1999). Body temperature and locomotor activity as marker rhythms of aging of the circadian system in rodents. *Exp Gerontol*, 34:733-740.
- [57] Campbell SS, Tobler I (1984). Animal sleep: A review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci Biobehav Rev*, 8:269-300.
- [58] Lucas-Sánchez A, Almailda-Pagán PF, Martínez-Nicolás AB, Madrid Pérez JA, Mendiola López P, de Costa Ruiz J (2013). Rest-activity circadian rhythms in aged *Nothobranchius korthausae*. The effects of melatonin. *Exp Gerontol*, 48:507-516.
- [59] Reiter RJ (1995). The pineal gland and melatonin in relation to aging: A summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol*, 30:199-212.
- [60] Zhdanova IV, Geiger DA, Schwagerl AL, Leclair OU, Killiany R, Taylor JA, Rosene DL, Moss MB, Madras BK (2002). Melatonin promotes sleep in three species of diurnal nonhuman primates. *Physiol Behav*, 75:523-529.
- [61] Zhdanova IV (2011). Sleep and its regulation in zebrafish. *Rev Neurosci*, 22:27-36.
- [62] Allegra M, Reiter RJ, Tan D-X, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res*, 34:1-10.
- [63] Escames G, Ozturk G, Baño Otálora B, Pozo MJ, Madrid Pérez JA, Reiter RJ, Serrano E, Concepción M, Acuña-Castroviejo D (2012). Exercise and melatonin in humans: Reciprocal benefits. *J Pineal Res*, 52:1-11.

- [64] Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 36:1-9.
- [65] Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Tan D-X, Reiter RJ (2010). Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Curr Med Chem*, 17:2070-2095.
- [66] Barja de Quiroga Losada G (2004). Free radicals and aging. *Trends Neurosci*, 27:595-600.
- [67] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120:483-495.
- [68] Sanz A, Pamplona R, Barja de Quiroga Losada G (2006). Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antiox Redox Signal*, 8:582-599.
- [69] Harman D (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11:298-300.
- [70] Harman D (2006). Free radical theory of aging: An update. Increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci*, 1067:10-21.
- [71] Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson J (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*, 15:575-591.
- [72] Pak JW, Herbst A, Bua E, Gokey N, McKenzie D, Aiken JM (2003). Mitochondrial DNA mutations as a fundamental mechanism in physiological declines associated with aging. *Aging Cell*, 2:1-7.

- [73] Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM (2011). Mitochondrial dysfunction in brain aging: Role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochem Int*, 58:447-457.
- [74] Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*, 286:135-141.
- [75] Wei YH, Lee HC (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med*, 227:671-682.
- [76] Larsson NG (2010). Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem*, 79:683-706.
- [77] Hartmann N, Reichwald K, Wittig I, Dröse S, Schmeisser S, Lück C, Hahn C, Graf M, Gausmann U, Terzibasi Tozzini E, Cellerino A, Ristow M, Brandt U, Platzer M, Englert C (2011). Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell*, 10:824-831.
- [78] Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 258:4759-4761.
- [79] Hoch FL (1992). Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim Biophys Acta*, 1113:71-133.
- [80] Wiseman H (1996). Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. *J Nutr Biochem*, 7:2-15.

- [81] Crimi M, Esposti MD (2011). Apoptosis-induced changes in mitochondrial lipids. *Biochim Biophys Acta*, 1813:551-557.
- [82] Subbaiah PV, Subramanian VS, Wang K (1999). Novel physiological function of sphingomyelin in plasma: Inhibition of lipid peroxidation in low density lipoproteins. *J Biol Chem*, 274:36409-36414.
- [83] Hannun YA, Obeid LM (1997). Ceramide and the eukaryotic stress response. *Biochem Soc Trans*, 25:1171-1175.
- [84] Inness CLW, Metcalfe NB (2008). The impact of dietary restriction, intermittent feeding and compensatory growth on reproductive investment and lifespan in a short-lived fish. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 275:1703-1708.
- [85] Reichwald K, Lauber C, Nanda I, Kirschner J, Hartmann N, Schories S, Gausmann U, Taudien S, Schilhabel M, Szafranski K, Glockner G, Schmid M, Cellerino A, Scharl M, Englert C, Platzer M (2009). High tandem repeat content in the genome of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*: a new vertebrate model for aging research. *Genome Biol*, 10:R16.
- [86] Valenzano DR, Kirschner J, Kamber RA, Zhang E, Weber D, Cellerino A, Englert C, Platzer M, Reichwald K, Brunet A (2009). Mapping loci associated with tail color and sex determination in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Genetics*, 183:1385-1395.
- [87] Kirschner J, Weber D, Neuschl C, Franke A, Böttger M, Zielke L, Powalsky E, Groth M, Shagin D, Petzold A, Hartmann N, Englert C, Brockmann GA, Platzer M, Cellerino A, Reichwald K (2012). Mapping of quantitative trait loci controlling

- lifespan in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*- a new vertebrate model for age research. *Aging Cell*, 11:252-261.
- [88] Petzold A, Reichwald K, Groth M, Taudien S, Hartmann N, Priebe S, Shagin D, Englert C, Platzer M (2013). The transcript catalogue of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri* provides insights into age-dependent changes of mRNA levels. *BMC Genomics*, 14:1-16.
- [89] Valenzano DR, Sharp S, Brunet A (2011). Transposon-mediated transgenesis in the short-lived African killifish *Nothobranchius furzeri*, a vertebrate model for aging. *G3*, 1:531-538.
- [90] Hartmann N, Englert C (2012). A microinjection protocol for the generation of transgenic killifish (Species: *Nothobranchius furzeri*). *Dev Dyn*, 241:1133-1141.
- [91] Allard JB, Kamei H, Duan C (2013). Inducible transgenic expression in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *J Fish Biol*, 82:1733-1738.

ANEXO III

Producción científica y actividades desarrolladas durante el periodo de realización de la presente Tesis Doctoral:

1. Publicaciones:

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Characterization of *Nothobranchius korthausae* as a model for studying aging physiology. *Acta Physiologica* 195 – 667, pp. 84-85. 2009.

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Effect of photoperiod on incubation time, survival and growth of *Nothobranchius korthausae*. *Acta Physiologica* 195 – 667, p. 85. 2009.

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P. Age-related changes in fatty acid profile and locomotor activity rhythms in *Nothobranchius korthausae*. *Experimental Gerontology*. 46 - 12, pp. 970 – 978. 2011.

Lucas-Sánchez, A., Martinez-Nicolas, A., Escames, G., de Costa, J. Envejecimiento del Sistema circadiano. *Revista Española de Geriátría y Gerontología*. 47, pp. 76-80. 2012.

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Martinez-Nicolas, A., Madrid, J.A., Mendiola, P., de Costa, J. Rest-activity circadian rhythms in aged *Nothobranchius korthausae*. The effects of melatonin. *Experimental Gerontology*. 48 – 5, pp. 507-516. 2013.

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Tocher, D.R., Mendiola, P., de Costa, J. Age-related changes in mitochondrial membrane composition of *Nothobranchius*

rachovii. Journal of Gerontology: Biological Sciences. In press. DOI: 10.1093/Gerona/glt066.

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. *Nothobranchius*: an established fish genus for aging studies. Aceptado para publicación en *Aging and Disease*.

Lucas-Sánchez, A., Martínez-Nicolas, A., Madrid, J.A., Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Circadian activity rhythms during the last days of life of *Nothobranchius rachovii*. A predictive model of circadian system breakdown. Listo para ser enviado.

2. Capítulos de libros

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Characterization of *Nothobranchius korthausae* as a model for studying aging physiology. Abstracts XXXV Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences. Pp. 85-86. 2009. Deposito Legal: V-253-2009.

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Effect of photoperiod on incubation time, survival and growth of *Nothobranchius korthausae*. Abstracts XXXV Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences. Pp. 86. 2009. Deposito Legal: V-253-2009.

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Composición de ácidos grasos de dos especies de peces de distinta longevidad. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Con la acuicultura alimentamos tu salud. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Pp. 172-173. 2009. ISBN: 978-84-937611-0-3.

Lucas-Sánchez, A., Mendiola, P., Madrid, J.A., de Costa, J. Locomotor activity rhythms in *Nothobranchius korthausae*, a model for aging studies. Libro de

resúmenes del 26th Conference of the International Society for Chronobiology. Vigo (España). Pp. 43-44. 2010. ISBN: 978-84-614-1696-7.

Mendiola, P., de Costa, J., Ortiz-Tudela, E., Martínez-Nicolas, A., Bonmatí-Carrión, M.A., **Lucas-Sánchez, A.**, Baño-Otalora, B., Madrid, J.A., Rol, M.A. Teaching biological rhythms in endocrinology: cortisol and wrist temperature. Congreso Internacional de Innovación Docente. Cartagena (España). Pp. 425. 2011. ISBN: 978-84-694-5332-2.

Fernández-Zapata, J., **Lucas-Sánchez, A.**, Almáida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Efecto del ejercicio periódico sobre varios indicadores del estrés oxidativo en el pez cebra (*Danio rerio*). XIII Congreso Nacional de Acuicultura. En equilibrio con el medio ambiente. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Pp. 187-188. 2011. ISBN: 978-84-937611-9-6.

Cánovas-Hernández, V., **Lucas-Sánchez, A.**, Almáida-Pagán, P.F., Fontanillas, R., Hernández, A., Hernández, M.D., de Costa, J., Mendiola, P. Efecto de la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta de la dorada (*Sparus aurata*) sobre marcadores del estrés oxidativo. XIII Congreso Nacional de Acuicultura. En equilibrio con el medio ambiente. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Pp. 181-182. 2011. ISBN: 978-84-937611-9-6.

Lucas-Sánchez, A., Almáida-Pagán, P.F., Martínez-Nicolas, A., de Costa, J., Mendiola, P. Composición de ácidos grasos de dos especies de peces teleosteos y su relación con la longevidad. I Jornadas de Inicio a la Investigación de Estudiantes de la Facultad de Biología. Pp 63. 2011. DIGITUM. URI: <http://hdl.handle.net/10201/20411>.

Martínez-Nicolas, A., Ortiz-Tudela, E., **Lucas-Sánchez, A.**, Madrid, J.A., Rol, M.A. Intercomunicación entre la exposición a la luz y el reloj biológico en humanos. I

Jornadas de Inicio a la Investigación de Estudiantes de la Facultad de Biología.
Pp 53. 2011. DIGITUM URI: <http://hdl.handle.net/10201/20411>.

3. Comunicaciones a Congresos Nacionales e Internaciones

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Characterization of *Nothobranchius korthausae* as a model for studying aging physiology. XXXV Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences. Valencia (España). 2009. Póster.

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Effect of photoperiod on incubation time, survival and growth of *Nothobranchius korthausae*. XXXV Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences. Valencia (España). 2009. Póster.

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Composición de ácidos grasos de dos especies de distinta longevidad. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid (España). 2009. Póster.

Lucas-Sánchez, A. *Nothobranchius*: un nuevo modelo para estudios en fisiología del envejecimiento. II Workshop Hispano-Brasileño de Acuicultura. Murcia (España). 2009. Ponencia oral.

Lucas-Sánchez, A., Mendiola, P., Madrid, J.A., de Costa, J. Locomotor activity rhythms in *Nothobranchius korthausae*, a model for aging studies. 26th Conference of the International Society for Chronobiology. Vigo (España). 2010. Póster.

Lucas-Sánchez, A., Almaida-Pagán, P.F., Martínez-Nicolas, A., de Costa, J., Mendiola, P. Composición de ácidos grasos de dos especies de peces teleósteos y su relación con la longevidad. I Jornadas de Inicio a la Investigación

de Estudiantes de la Facultad de Biología. Murcia (España). 2011. Ponencia oral.

Martinez-Nicolas, A., Ortiz-Tudela, E., **Lucas-Sánchez, A.**, Madrid, J.A., Rol, M.A. Intercomunicación entre la exposición a la luz y el reloj biológico en humanos. I Jornadas de Inicio a la Investigación de Estudiantes de la Facultad de Biología. Murcia (España). 2011. Ponencia oral.

Mendiola, P., de Costa, J., Ortiz-Tudela, E., Martinez-Nicolas, A., Bonmatí-Carrión, M.A., **Lucas-Sánchez, A.**, Baño-Otalora, B., Madrid, J.A., Rol, M.A. Teaching biological rhythms in endocrinology: cortisol and wrist temperature. Congreso Internacional de Innovación Docente. Cartagena (España). 2011. Póster.

Lucas-Sánchez, A., Martinez-Nicolas, A., Almaida-Pagán, P.F., Madrid, J.A., Mendiola, P., de Costa, J. Rest-activity rhythms in aged *Nothobranchius korthausae*: Effect of melatonin. XII Congress of the European Biological Rhythms Society in association with the Japanese Society for Chronobiology. Oxford (Reino Unido). 2011. Póster.

Lucas-Sánchez, A., Martinez-Nicolas, A., Madrid, J.A., Mendiola, P., de Costa, J. Rest-activity rhythms before death in aged *Nothobranchius rachovii*. XII Congress of the European Biological Rhythms Society in association with the Japanese Society for Chronobiology. Oxford (Reino Unido). 2011. Póster.

Fernandez-Zapata, J., **Lucas-Sánchez, A.**, Almaida-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J. Efecto del ejercicio periódico sobre varios indicadores del estrés oxidativo en el pez cebra (*Danio rerio*). XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Castelldefels (España). 2011. Póster.

Cánovas-Hernandez, V., **Lucas-Sánchez, A.**, Almaida-Pagán, P.F., Fontanillas, R., Hernandez, A., Hernandez, M.D., de Costa, J., Mendiola, P. Efecto de la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta de la dorada

(*Sparus aurata*) sobre marcadores del estrés oxidativo. XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Castelldefels (España). 2011. Póster.

Lucas-Sánchez, A. Age-related changes in the circadian system of *Nothobranchius*. I *Nothobranchius* Symposium. From bush to bench: 10 years of *Nothobranchius furzeri* as a model system in Biology. Pisa (Italia). 2014. Ponencia oral invitada.

4. Participación en tareas docentes

Participación en tareas docentes haciendo uso de la *venia docendi* del programa de doctorado de la Universidad de Murcia. 2010-2012.

Participación en el programa PATyO-Bio como tutor de alumnos de primer curso. 2011-2012.

5. Contratos de investigación que han financiado esta Tesis Doctoral

Contrato de trabajo de duración determinada de la Universidad de Murcia para la Colaboración en el Proyecto de Investigación “Red temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad. RETICEF”. Duración: 2 meses.

Contrato de trabajo de duración determinada de Universidad de Murcia para la Colaboración en el Proyecto de Investigación “Desarrollo de aplicaciones de la termografía y actigrafía ambulatorias”. Duración: 1 año y 8 meses.

6. Estancias breves

Estancia breve en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling, Escocia, con el fin de trabajar en técnicas de aislamiento y determinación de lípidos de mitocondrias a partir de muestras biológicas, bajo la supervisión del Catedrático Douglas R. Tocher. Septiembre-Noviembre 2012.

7. Proyectos de investigación que han financiado los experimentos realizados

Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad RETICEF.

Instituto de Salud Carlos III (RD06/0013/0019 y RD12/0043/0011). 2007-2013.

El ejercicio como factor modulador del envejecimiento. Efecto sobre el estrés oxidativo.

Fundación Séneca (12005/PI/09). 2010-2013.

Desarrollo de aplicaciones clínicas de la termografía y actigrafía ambulatorias. Centro

Médico Virgen de la Caridad. 2010-2011.

Prevención de la cronodisrupción en el marcapasos central mediante iluminación

saludable. Relevancia en el cáncer y el envejecimiento. CICYT (BFU2010-

21945-C02-01) cofinanciado con Fondos FEDER. 2011-2013.

ANEXO IV

Índice de impacto de las revistas donde han sido publicados los artículos que componen esta Tesis Doctoral.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data ⁱ⁾						Eigenfactor [®] Metrics ^{j)}	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	NEUROBIOL AGING	0197-4580	15479	6.166	6.098	1.583	537	6.1	0.03535	1.837
<input type="checkbox"/>	2	AGEING RES REV	1568-1637	1965	5.953	6.549	1.439	41	4.0	0.00623	1.938
<input type="checkbox"/>	3	AGING CELL	1474-9718	4134	5.705	6.415	1.485	130	4.5	0.01748	2.333
<input type="checkbox"/>	4	J AM MED DIR ASSOC	1525-8610	2480	5.302	3.912	1.343	178	3.3	0.00514	0.666
<input type="checkbox"/>	5	FRONT AGING NEUROSCI	1663-4365	392	5.224	5.169	0.727	33	2.4	0.00198	1.597
<input checked="" type="checkbox"/>	6	J GERONTOL A-BIOL	1079-5006	10520	4.314	4.604	0.975	162	7.6	0.02125	1.459
<input type="checkbox"/>	7	AM J GERIAT PSYCHIAT	1064-7481	4663	4.131	4.295	1.131	107	5.6	0.01377	1.425
<input type="checkbox"/>	8	AGE	0161-9152	1120	4.084	4.321	0.910	122	3.5	0.00447	1.610
<input type="checkbox"/>	9	J AM GERIATR SOC	0002-8614	21435	3.978	4.625	0.696	293	8.5	0.04055	1.582
<input checked="" type="checkbox"/>	10	EXP GERONTOL	0531-5565	6075	3.911	3.705	0.706	136	7.2	0.01192	1.055
<input type="checkbox"/>	11	AGE AGEING	0002-0729	6487	3.816	4.115	0.470	149	7.7	0.01246	1.260
<input type="checkbox"/>	12	J GERIATR PSYCH NEUR	0891-9887	1190	3.525	3.114	0.062	32	7.7	0.00274	1.054
<input type="checkbox"/>	13	MECH AGEING DEV	0047-6374	5030	3.264	3.812	0.584	77	8.1	0.00888	1.196
<input type="checkbox"/>	14	BIOGERONTOLOGY	1389-5729	1413	3.190	3.047	0.708	48	5.1	0.00336	0.746
<input type="checkbox"/>	15	CLIN GERIATR MED	0749-0690	1298	3.144	2.429	0.463	41	7.5	0.00322	0.792
<input type="checkbox"/>	16	J GERONTOL B-PSYCHOL	1079-5014	5637	3.006	3.520	1.026	77	8.9	0.01294	1.566
<input type="checkbox"/>	17	INT J GERIATR PSYCH	0885-6230	6417	2.977	2.967	0.824	148	7.2	0.01373	0.928
<input type="checkbox"/>	18	REJUV RES	1549-1684	1134	2.919	2.573	0.425	73	3.5	0.00393	0.623
<input type="checkbox"/>	19	MATURITAS	0378-5122	4185	2.844	2.667	0.491	173	5.8	0.00945	0.701
<input type="checkbox"/>	20	DEMENT GERIATR COGN	1420-8008	4074	2.787	3.121	0.354	99	5.7	0.01024	0.864

Autorización de los coautores que han participado en los trabajos publicados.UNIVERSIDAD DE
MURCIAFacultad de
Biología

Los coautores del artículo "Age-related changes in fatty acid profile and locomotor activity rhythms in *Nothobranchius korthausae*", publicado en *Experimental Gerontology* 46, 970-978 (2011), declaran:

- Su conformidad con la presentación del presente artículo por parte del doctorando Alejandro Lucas Sánchez con el propósito de presentar su tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra tesis doctoral.
- Reconocen la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados han sido plasmados en el presente artículo.

Dr. Pedro Francisco Almaila Pagán

Dr. Juan Antonio Madrid Pérez

Dra. Pilar Mendiola López

Dr. Jorge de Costa Ruiz

UNIVERSIDAD DE
MURCIAFacultad de
Biología

Los coautores del artículo "Rest-activity rhythms in aged *Nothobranchius korthausae*. The effects of melatonin", publicado en *Experimental Gerontology* 48, 507-516 (2013), declaran:

- Su conformidad con la presentación del presente artículo por parte del doctorando Alejandro Lucas Sánchez con el propósito de presentar su tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra tesis doctoral.
- Reconocen la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados han sido plasmados en el presente artículo.

Dr. Pedro Francisco Almaila Pagán

D. Antonio Martínez Nicolás

Dr. Juan Antonio Madrid Pérez

Dra. Pilar Mendiola López

Dr. Jorge de Costa Ruiz

Departamento de Fisiología. Unidad Docente de Fisiología Animal
Campus de Espinardo. 30100 Murcia
Tel. 868 884 931 - Fax 868 883 963

UNIVERSIDAD DE
MURCIAFacultad de
Biología

Los coautores del artículo "Age-related changes in mitochondrial membrane composition of *Nothobranchius rachovii*", aceptado para publicación en *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, declaran:

- Su conformidad con la presentación del presente artículo por parte del doctorando Alejandro Lucas Sánchez con el propósito de presentar su tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra tesis doctoral.
- Reconocen la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados han sido plasmados en el presente artículo.

Dr. Pedro Francisco Almadia Pagán

Dr. Douglas Redford Tocher

Dra. Pilar Mendiola López

Dr. Jorge de Costa Ruiz

Departamento de Fisiología. Unidad Docente de Fisiología Animal
Campus de Espinardo. 30100 Murcia
Tel. 868 884 931 - Fax 868 883 963



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Facultad de
Biología

Los coautores del artículo "Circadian activity rhythms during the last days of *Nothobranchius rachovii*'s life. A predictive model of circadian system breakdown", pendiente de ser considerado para publicación, declaran:

- Su conformidad con la presentación del presente artículo por parte del doctorando Alejandro Lucas Sánchez con el propósito de presentar su tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra tesis doctoral.
- Reconocen la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados han sido plasmados en el presente artículo.

Dr. Pedro Francisco Almáida Pagán

D. Antonio Martínez Nicolás

Dr. Juan Antonio Madrid Pérez

Dra. Pilar Mendiola López

Dr. Jorge de Costa Ruiz

Departamento de Fisiología. Unidad Docente de Fisiología Animal
Campus de Espinardo, 30100 Murcia
Tel. 868 884 931 - Fax 868 883 963

UNIVERSIDAD DE
MURCIAFacultad de
Biología

Los coautores del artículo "*Nothobranchius* as a model for aging studies. A review", aceptado para publicación en *Aging and Disease*, declaran:

- Su conformidad con la presentación del presente artículo por parte del doctorando Alejandro Lucas Sánchez con el propósito de presentar su tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra tesis doctoral.
- Reconocen la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados han sido plasmados en el presente artículo.

Dr. Pedro Francisco Almada Pagán

Dra. Pilar Mendiola López

Dr. Jorge de Costa Ruiz

Departamento de Fisiología. Unidad Docente de Fisiología Animal
Campus de Espinardo. 30100 Murcia
Tel. 868 884 931 - Fax 868 883 963

... y nunca te rindas"