



EL PEZ CEBRA UN ALIADO CONTRA LOS EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO

Autor: María Mulero Párraga

Coordinadores: D. Antonio García Zamora y D^a María de Lourdes Barnés Romero

Área: Biología

Centro docente: I.E.S. Francisco Ros Giner

Curso académico: 2019/2020

Nivel: 2ºA Bachillerato

Resumen	2
1.Introducción.....	3
1.1.Envejecimiento.....	7
1.1.1.Definción.....	7
1.1.2. Envejecimiento poblacional.....	7
1.1.3. Capacidades cognitivas deterioradas con el envejecimiento.	10
1.1.3.1. Memoria.....	10
1.1.3.2. Inteligencia.	10
1.1.3.3. Personalidad.	10
1.1.3.4. Afectividad.	11
1.1.4. Factores envejecimiento: Telómeros – Telomerasa.....	11
1.1.4.1.Telómero.	11
1.1.4.2.Estructura de los telómeros.....	13
1.1.5. Senescencia celular	13
1.2. Terapia con senolíticos	15
1.3. Modelos animales: pez cebra.....	15
1.3.1.Características generales.	15
1.3.2.Fisiología.....	15
1.3.3. Ventajas en el laboratorio.....	16
2. Objetivos.....	17
3. Materiales y métodos.....	18
3.1. Animales.	19
3.2. Tratamientos. Contenido parcialmente inhibido autorizado por la Cátedra Poncemar y la Autora del Trabajo.	19
3.3. Estudio de la memoria de reconocimiento, test NOR.	19
3.4. Análisis estadístico.....	23
4. Conclusiones.....	23
4.1. Comparación de la memoria entre peces jóvenes y adultos	23
4.2. Efecto en la memoria tras el tratamiento con compuestos (S)	26
Agradecimientos	30
5. Bibliografía.....	31

Resumen

El envejecimiento es un proceso biológico que produce el deterioro gradual de la capacidad funcional de un organismo a nivel físico y cognitivo. Una de las primeras capacidades cognitivas que se ve afectada es la memoria.

Para estudiar el envejecimiento es necesaria la búsqueda de modelos animales que nos permitan analizar el por qué de este envejecimiento y como podemos revertirlo.

En este proyecto proponemos la utilización del pez cebra como modelo biológico, debido a sus numerosas ventajas y su similitud genética con el ser humano. Para ello, y utilizando el método H+D, hemos estudiado y comprobado los efectos que los compuestos senolíticos (sustancia que matan selectivamente células en senescencia) tienen sobre la memoria del pez cebra, al ser la senescencia celular una de las causas del envejecimiento.

Palabras clave: Envejecimiento, pez cebra, senescencia, senolíticos, memoria.

1.Introducción

La población mundial está envejeciendo. Este hecho es una de las transformaciones sociales más significativas del siglo XXI con consecuencias en todos los sectores de nuestra sociedad.

Se espera que el número de personas con 60 años o más se duplique para 2050 y triplique para 2100 (Organización de las Naciones Unidas, 2017). Este aumento de la esperanza de vida supone a su vez un aumento de todas las enfermedades que se asocian al envejecimiento.

Entendemos el envejecimiento como un proceso biológico individual, irreversible que no ocurre de forma repentina si no de manera gradual y progresiva como resultado de la acumulación de una serie de daños moleculares y celulares. El envejecimiento determina la pérdida de la capacidad funcional de un organismo, el aumento del riesgo de padecer enfermedades y finalmente la muerte y con él se asocian problemas físicos, psicológicos y sociales.

En este trabajo nos queremos centrar en la pérdida de las capacidades cognitivas ya que “a medida que nuestra sociedad envejece aumenta el interés por entender los efectos de la edad sobre el funcionamiento y desempeño cognitivo”(Mas, 2008, p.213). Dentro de estas queremos destacar la memoria, que es la capacidad de adquirir, retener y utilizar conocimiento y habilidades.

La memoria es la capacidad cognitiva que sufre el declive más visible a medida que envejecemos. En las personas con una edad avanzada uno de los procesos más deteriorados es el almacenamiento y la recuperación de información inmediata además de la memoria a corto plazo. No obstante, generalmente la memoria a largo plazo suele conservarse bien.

Son numerosos los factores planteados como causas del envejecimiento, entre ellos se encuentra la longitud de los telómeros que regulan y miden el número de divisiones celulares y por tanto regulan la duración de la vida en los eucariotas, desde el ser unicelular a especies más complejas.

Los telómeros son las estructuras protectoras, formadas por la repetición de la secuencia TTAGGG cientos de veces, que se encuentran en los extremos de los cromosomas de células eucariotas. Tras cada división celular el telómero va perdiendo partes de sus secuencias, se va acortando, y al llegar a una longitud crítica la célula inicia un proceso en el que se bloquea permanentemente la capacidad de división de la célula (*senescencia*) y en algunos casos terminar con su muerte (*apoptosis*). La senescencia guarda una relación con el envejecimiento

ya que al perder la capacidad de división de las células también se pierde la capacidad de renovación de los tejidos, por lo que el organismo se va deteriorando progresivamente.

El acortamiento de la longitud telomérica es un marcador universal de envejecimiento y conduce a la senescencia celular. Las células senescentes, aunque no se dividen se comunican con su entorno, mediante la secreción de un conjunto de factores solubles liberados por estas células, que se conoce como el fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP (Kuilman and Peeper, 2009). Las células senescentes se van acumulando e incrementan en número con el tiempo mientras envejecemos y también los SASP. Los SASP pueden extender el fenotipo senescente a células de su entorno afectando a la integridad del tejido y contribuyendo de esta forma a las disfunciones orgánicas asociadas a la vejez.

Para estudiar el envejecimiento es necesario recurrir a modelos animales que nos ayuden a encontrar las claves de por qué envejecemos y cómo revertir este envejecimiento.

Dentro de estos modelos animales aparece el pez cebra o *Danio rerio*, que comparte con el ser humano un 70% de semejanza genética. Además también están conservados los principales procesos biológicos y fisiológicos como el cáncer, hematopoyesis, desarrollo etc .

El pez cebra presentan muchas ventajas como modelo experimental. Sus embriones son transparentes, lo que permite la observación de diversos fenómenos *in vivo*. Además, es un modelo ideal para investigar procesos regenerativos ya que tiene la capacidad de regenerar los órganos que le han sido parcialmente amputados o dañados.

Las hembras de este pez proporcionan alrededor de 200 huevos cada semana, su tamaño permite tener muchos en poco espacio, y su mantenimiento es entre 100 y 1000 veces menos costoso que el de los ratones de laboratorio.

Además el pez cebra tiene una longitud telomérica parecida a la del humano. Los modelos de pez cebra que carecen de los genes de la telomerasa, sufren envejecimiento prematuro por acortamiento telomérico y recapitula los síntomas que se observan en los pacientes de disqueratosis congénita (Anchelin et al 2011; Anchelin et al 2013), enfermedad generada por carecer de la enzima telomerasa.

Teniendo en cuenta que el pez cebra es un buen modelo para el estudio del envejecimiento (natural o inducido por causas genéticas) y sus consecuencias, nos propusimos investigar si es posible revertir la consecuencias del envejecimiento atacando a la senescencia. Para ello nos vamos a centrar en la memoria, uno de los primeros procesos que se ve afectado durante el envejecimiento.

Este trabajo está enfocado en el área de la biología ya que vamos a estudiar la relación de los telómeros y la senescencia con el envejecimiento y las enfermedades que implican la pérdida de nuestras habilidades cognitivas. A pesar de esto la finalidad práctica estaría enfocada en el ámbito de la medicina o biomedicina ya que pretendemos proponer un sujeto que favorezca el estudio de enfermedades como el Parkinson, Alzheimer, demencia senil....

El interés social de esta investigación se centra en el ámbito de la ciencia y la medicina, más concretamente en el estudio de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y la pérdida de capacidades cognitivas. El pez cebra podría sustituir al ratón como sujeto de investigación en diversos estudios, además de los relacionados con el envejecimiento, dadas sus muchas ventajas y similitudes con el ser humano. Además este trabajo es de nuestro interés personal ya que queremos dar a conocer a un animal extraordinario del que la mayoría de personas nunca ha oído hablar.

Para la mayoría de gente el pez cebra es únicamente una mascota común, presente en los acuarios de muchos hogares. Sin embargo, en muchos laboratorios se ha convertido en un nuevo modelo biológico que complementa al sujeto de experimentación clásico que es el ratón.

Uno de los primeros en incorporar el pez cebra a su laboratorio fue George Streisinger (Universidad de Oregón) cuya investigación duró unos 10 años e invirtió gran parte de ese tiempo en estudiar la morfología y desarrollo embrionario del pez cebra y en elaborar las técnicas genéticas y de mantenimiento necesarias para que pueda ser manipulado. En 1981 y 1983 publicó dos estudios¹, uno en la revista *Nature* y otro en *Genetics*, que hablaban sobre la creación de clones homocigóticos de este pez y la inducción de mutaciones en sus células embrionarias.

En 1995 se divulgó un trabajo de gran importancia titulado "*Stages of Embryonic Development of the zebrafish*"² que explica las diferentes fases por las que pasa un embrión de pez cebra durante su desarrollo. Los embriones, como comentamos al principio, son una de las principales ventajas de este pez ya que gracias a su transparencia se puede observar el resultado en un fenotipo tanto de la acción de medicamentos como de la evolución de las diferentes mutaciones que se les provocan.

¹ El estudio de George Streisinger publicado en 1981 en *Nature* se titula "*Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Brachydanio rerio)*" y el de 1983 en *Genetics*, "*Induction of mutations by y-rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos*".

² Los autores de "*Stages of Embryonic Development of the zebrafish*" son Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F.

A pesar de esto el pez cebra alcanzó verdadera popularidad en 1996 con la publicación en la revista *Development* de varios trabajos sobre el pez cebra y sus mutantes, entre los que destacaban los de Christiane Nüsslein-Volhard (Alemania), ganadora de un premio Nobel, y Wolfgang Driever y Marck Fishman (Estados Unidos). Estas investigaciones supusieron un gran avance ya que la identificación de mutantes es una de las estrategias más importantes en los estudios de muchas áreas de la biología.

Actualmente el pez cebra es utilizado en investigaciones de diversos ámbitos como la regeneración de lesiones medulares, la regeneración de la retina y el nervio óptico, la biotecnología o la toxicología.

Hablando de las investigaciones relacionadas con el tema a tratar en nuestra investigación, el pez cebra ha aparecido como un modelo con potencial para entender los cambios cognitivos y neurobiológicos que se sufren durante el envejecimiento. Esto se debe en parte a que la longitud de sus telómeros es muy similar a la humana.

En 2003 una investigación, "*The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence*"³, presentó al pez cebra como modelo biológico para el estudio del envejecimiento funcional y la senescencia gradual. Un grupo de investigadores del IMIB (Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria) investiga sobre el envejecimiento prematuro utilizando un modelo de pez cebra con insuficiencia en el enzima telomerasa. Se centran en la disqueratosis congénita⁴ intentando idear un fármaco capaz de revertir los síntomas de esta enfermedad que según ellos se podría utilizar también contra el cáncer. Una clínica de Barcelona, Ze-Clinics, también utiliza este modelo para reproducir en el pez cebra el cáncer de diversos pacientes y observar en él su desarrollo.

En 2018 la revista *Nature* ha publicado "*Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neuro specific drug discovery*", en el que se aprecia el alto grado de semejanza neurológica y en el comportamiento entre el pez cebra y el ser humano.

Respecto a la senescencia celular, el artículo publicado en 2018 por Ignacio Palermo en la SEBBM⁵ establece que en los últimos años se ha vinculado la senescencia a una larga lista

³ El estudio, "*The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence*" fue llevado a cabo por Kishi, S., Uchiyama, J., Baughman, A. M., Goto, T., Lin, M. C., y Tsai, S. B.

⁴ 7- La disqueratosis congénita (presente desde el nacimiento) es una enfermedad rara de la piel que aparece con más frecuencia en varones.

⁵ Sociedad Española de Bioquímica y Biología molecular.

de patologías, la mayoría de ellas asociadas al envejecimiento como consecuencia de la acumulación excesiva de estas células y la disminución de la capacidad de regeneración.

Este artículo también expone que numerosos ensayos realizados con modelos animales, han servido de prueba para observar que la eliminación selectiva de células senescentes puede alargar la longevidad. Esto se debe a que al eliminar estas células, se limitan diversas patologías relacionadas con el envejecimiento.

A raíz de estos resultados muchas investigaciones se están centrando en la búsqueda de fármacos senolíticos, que eliminan selectivamente células senescentes, para tratar enfermedades asociadas al envejecimiento.

1.1.Envejecimiento

1.1.1.Definición.

El envejecimiento es un proceso universal, irreversible, continuo y gradual que provoca el deterioro de la capacidad funcional de un organismo y que a la larga conduce a la muerte del mismo (Pérez y Sierra, 2009).

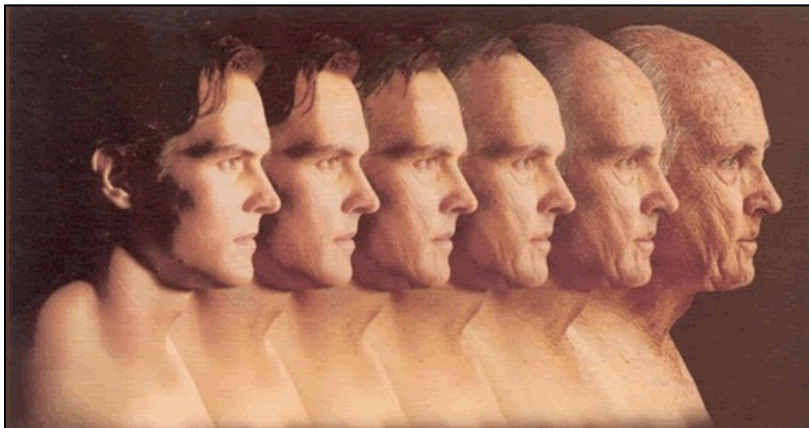


Figura 1: Envejecimiento gradual de un hombre. Fuente: <https://diario7-archivos.blogspot.com/2016/09/alzheimer-y-depresion-las-enfermedades.html> .

El envejecimiento no es una enfermedad. Sin embargo, los organismos de mayor edad tienden a sufrir distintos tipos de enfermedades, que se asocian al envejecimiento, debido a que el deterioro de la capacidad funcional deja al individuo más expuesto.

1.1.2. Envejecimiento poblacional.

Desde hace unos años la esperanza de vida se ha incrementado y, en algunos países, la tasa de natalidad ha sufrido una disminución. Todo esto está dando lugar a un crecimiento

notorio del porcentaje de personas mayores, lo que conlleva un aumento del envejecimiento de la población.

Este aumento en la esperanza de vida de las personas, viene dado por una mejora en su calidad de vida y fundamentalmente a los avances tecnológicos y médicos de nuestra sociedad. Los individuos están alcanzando edades que hace unos años eran impensables, y es que, actualmente la población de personas con 80 años o más ha aumentado significativamente.

En España el fenómeno del envejecimiento está muy acelerado. Esto se observa en la duplicación de la población mayor de 65 años en menos de 30 años.

Los datos recogidos en 2008 por el Instituto Nacional de Estadística muestran que la población anciana con más de 65 años en esa año suponía un 17% de la población, 7 millones de personas de las cuales el 25% eran octogenarias. En 2018 el porcentaje de personas mayores de 65 años era de un 19,1%, es decir, casi 9 millones de personas, y la población octogenaria constituía un 6,1%⁶ del total de la población (Abellán, et all, 2019).

Según las proyecciones realizadas por esta institución, en el año 2050 las personas mayores de 65 años superarán el 30% de la población. Como podemos observar en la siguiente gráfica, en el mismo año la mitad de la población de la Unión Europea tendrá más de 50 años.

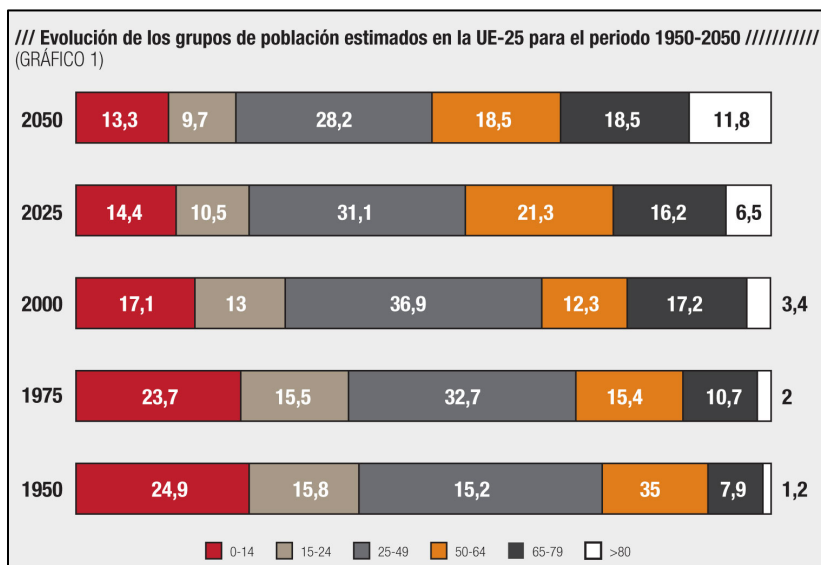


Figura 2: Evolución de los grupos de población estimados en la UE para el periodo 1950-2050. A la izquierda se indica el año de estimación. Los números en las barras indican el porcentaje de cada franja de edad.

Fuente: http://www.fgcsic.es/lychnos/es_es/articulos/envejecimiento_poblacion

⁶ El 6,1% supone un 31,94% de las personas mayores de 65 años.

Las enfermedades crónicas (enfermedades de larga duración y de progresión lenta) afectan al 70% de la población mayor de 65 años, y las más frecuentes son la hipertensión arterial, dolor lumbar y cervical, hipercolesterolemia y pérdida de las capacidades cognitivas.

La atención a los pacientes que las sufren es uno de los retos más importantes del ámbito sanitario español ya que las enfermedades crónicas motivan el 80% de las consultas de atención primaria, el 60% de los ingresos en hospitales y el 85% de los pacientes ingresados en Medicina Interna, suponiendo la primera causa de gasto sanitario en nuestro país (Urtasun, 2018).

De todas las enfermedades neurodegenerativas, cuya incidencia aumenta con la edad, las más comunes son las que conllevan la aparición de demencia que es el deterioro grave de la capacidad mental que interviene con la vida cotidiana. Dentro de las cuales la más común es el Alzheimer.

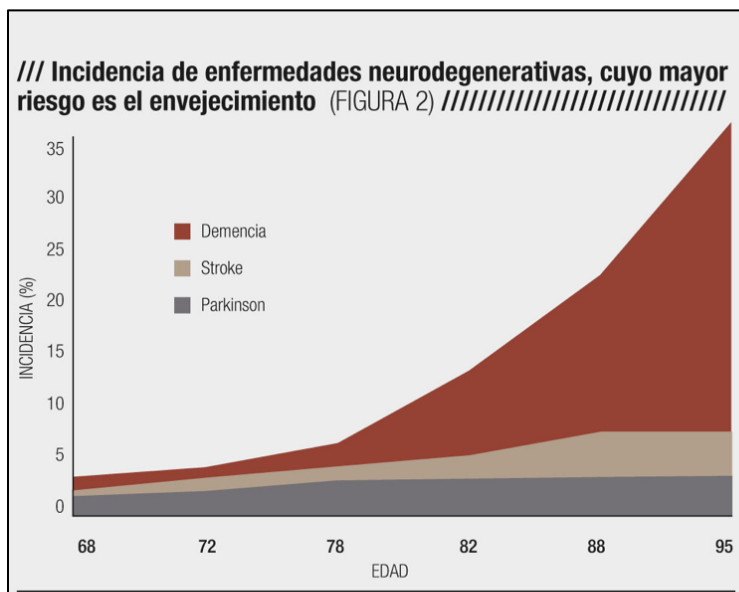


Figura 3: Índice de enfermedades neurodegenerativas, cuyo mayor riesgo es el envejecimiento. En el eje de abscisas se representa la edad y en el de ordenadas el porcentaje de incidencia de las diferentes enfermedades (demencia, stroke (o accidente cerebrovascular ACV) y párkinson).

Fuente: http://www.fgsic.es/lychnos/es_es/articulos/envejecimiento_neurodegeneracion

Dado el aumento en la longevidad de la población humana, en Europa y en todo el mundo se están realizando numerosos esfuerzos para promover las investigaciones sobre envejecimiento, y sobre todo en la prevención de enfermedades neurodegenerativas. Esto se debe a que aun no disponemos de medidas para prevenir o actuar contra los efectos propios del envejecimiento, que desde hace unos años son considerados problemas.

1.1.3. Capacidades cognitivas deterioradas con el envejecimiento.

Envejecer supone un deterioro en el que se acumulan daños a nivel celular, molecular y orgánico, y la longevidad es alargar la duración de la vida. Cuanto mayor es nuestra edad (longevidad mayor), mayor es la probabilidad de sufrir los problemas del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con él como: cardiopatías, demencias seniles, enfermedades músculo-esqueléticas e incluso el cáncer.

Con el envejecimiento también se deterioran las capacidades cognitivas que son todas las actividades mentales que el ser humano realiza para relacionarse con el medio que le rodea.

Algunos cambios cognitivos⁷ que se dan con el envejecimiento son la disminución de la velocidad del procesamiento de la información, dificultad para resolver problemas abstractos y complejos, pérdida de la memoria a corto plazo, etc.

1.1.3.1. Memoria.

La memoria es la capacidad de fijar, organizar, actualizar y reconocer eventos de nuestro pasado. La pérdida de memoria es uno de los signos clave del envejecimiento, normalmente a las personas con una edad avanzada les resulta difícil recordar sucesos recientes y sufren pequeños olvidos. Esto podría estar causado por cambios neurológicos y circulatorios que afectan a la función del cerebro (oxigenación y nutrición de sus células) o otros factores como la pérdida de interés o la motivación. Sin embargo, la memoria a largo plazo suele estar muy bien conservada.

1.1.3.2. Inteligencia.

La inteligencia se puede considerar la capacidad de adaptación al medio o el conjunto de competencias que permiten resolver problemas. La edad no es un factor que modifique el nivel de inteligencia ya que esta suele mantenerse estable en el tiempo. Sin embargo, si que se puede dar una pérdida del interés y más dificultades a la hora de concentrarse.

1.1.3.3. Personalidad.

Los ancianos tienen dificultad para entender a las nuevas generaciones. Sufren un incremento en la tendencia a almacenar cosas y oponen más resistencia al cambio.

Hay personas más adaptadas a la vejez que otras. Los más adaptados son más realistas y están activos mientras que el resto suelen ser más pasivos y presentar descontento general.

⁷ The education club: divulgación dinámica

1.1.3.4. Afectividad.

La afectividad es un aspecto muy importante y sobre todo en la vejez. La pérdida de seres queridos, la soledad o la disminución de contactos influyen en esta cualidad. Por otro lado se establecen nuevos lazos sociales que anteriormente no se habían podido establecer.

1.1.4. Factores envejecimiento: Telómeros – Telomerasa.

Muchos son los factores que se han estudiado como causa del envejecimiento, entre ellos la longitud de los extremos de los cromosomas, los telómeros, ya que se sabe que la longitud telomérica es un reloj biológico que determina nuestra edad.

1.1.4.1. Telómero.

La información genética se encuentra en el ADN, una doble hebra formada por ácidos dexosirribonucleicos. El ADN se duplica durante las fase S de la interfase previa a la división celular, y cuando comienza la división se condensa formando unas estructuras llamadas cromosomas cuya función es facilitar el reparto equitativo del material genético entre las células hijas.

Un cromosomas metafásico está constituido principalmente por dos cromátidas hermanas, idénticas en morfología e información y un centrómero , a cuyo nivel se unen las dos cromátidas. Las partes de las cromátidas que quedan a cada lado del centrómero se denominan brazos y en los extremos de los brazos encontramos los telómeros.

Sabiendo esto podríamos decir que los telómeros son regiones de ADN localizadas en los extremos de los cromosomas de células eucariotas.

La primera vez que se observaron estos elementos estructurales data de 1938 cuando un científico alemán llamado Hermann Müller ⁸

observó que los cromosomas contaban en sus extremos con estructuras esenciales para la estabilidad de los cromosomas (Samper, 2002). Bárbara McClintock ⁹ también lleo a

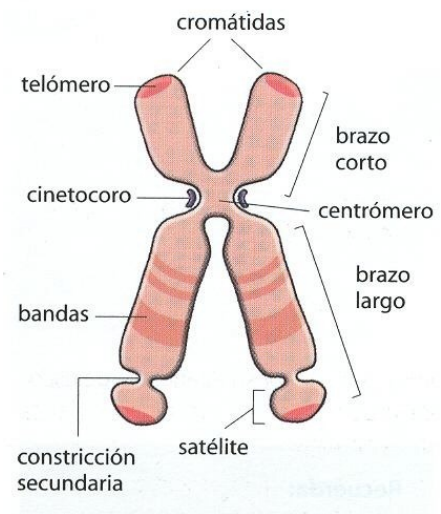


Figura 4: cromosoma metafásico. Fuente: <https://respuestas.tips/como-se-llaman-las-partes-del-cromosoma/>

⁸ Müller sometió a moscas de la especie *Drosophila* a rayos X y observó que los extremos de los cromosomas expuestos a esa radiación no sufrían ninguna alteración, a diferencia del resto del genoma (Chuaire, 2006).

⁹ Investigadora de la Universidad de Missouri, describió como al romperse los cromosomas se producían fusiones de sus extremos y que aquellos cromosomas con los telómeros intactos no presentaban fusiones ni recombinaciones(Chuaire, 2006; Samper, 2002) .

1.1.4.2. Estructura de los telómeros.

Los telómeros están constituidos de ADN y proteínas con unas características especiales que hacen que se diferencien del resto de los cromosomas.

-**ADN telomérico (ADNt).** Consiste en repeticiones en tándem de pequeñas secuencias nucleótidas TTAGGG. La longitud del telómero es variable, cada organismo posee una longitud media característica (Hernández, 1999).

En la zona más extrema de los telómeros tiene un extremo protuberante o monocatenario en 3'¹¹ rico en G's. Esta hebra G es monofibrilar¹² y su longitud varía según la especie .

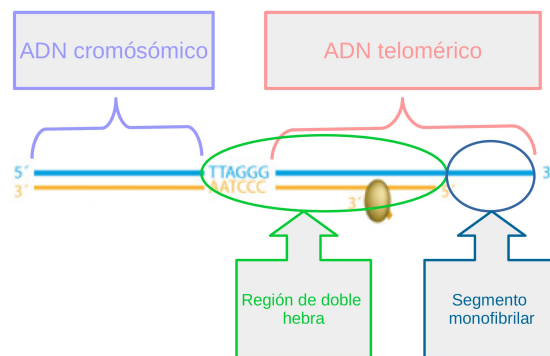


Figura 6: ADN telomérico. Fuente: Elaboración propia.

-**Proteínas teloméricas.** Estas proteínas se pueden unir tanto a la doble hebra como a la zona monofibrilar.

-**Telomerasa.** Esta enzima es una ribonucleoproteína. Como hemos mencionado anteriormente, es la encargada de sintetizar una de las hebras de los telómeros. La telomerasa estabiliza la longitud de los telómeros y los fallos en esta podrían conllevar la aparición de cambios genéticos que favorezcan la aparición de enfermedades como el cáncer (cuando está sobre-expresada) o envejecimiento prematuro (cuando hay deficiencia de la proteína) .

1.1.5. Senescencia celular

La senescencia celular es un proceso irreversible genéticamente programado por el que la célula pierde permanentemente su capacidad proliferativa. Este proceso responde , entre otros factores, al acortamiento telomérico y a daños en el ADN. La pérdida de la capacidad de

¹¹ El extremo 5' de una hebra de ADN supone el inicio de la cadena, y el 3' el final.

¹² Hebra de ADN que carece de una hebra complementaria.

división de las células lleva al deterioro gradual del organismo y como consecuencia a su envejecimiento progresivo.

Las células senescentes están implicadas en el envejecimiento al ser incapaces de autorrenovarse, se pierde la capacidad proliferativa de la célula y como consecuencia también se va perdiendo la capacidad regenerativa del tejido. Estas células van siendo retiradas por el sistema inmune, no obstante, cuando envejecemos dicho proceso pierde eficacia y se van acumulando.

La senescencia es un proceso de control, por el cual las células están programadas para perder la capacidad de multiplicarse tras cierto número de divisiones, esto evita que las células alteradas puedan proliferar sin control y convertirse en células cancerosas. De este modo la contribución de la senescencia en el envejecimiento es el precio a pagar para defendernos contra el cáncer. (Stipp, 2012).

Las células senescentes, aunque no se dividan, secretan activamente un conjunto de moléculas (quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento...) a las que se conoce con el nombre de fenotipo secretor asociado a la senescencia o SASP. Estas moléculas pueden tener efectos beneficiosos o dañinos para las células más cercanas a ellas (Maciel-Barón LA et al., 2017).

Los SASP son el medio por el cual una célula senescente es capaz de comunicar su estado a otras células del mismo tejido, y señalar al sistema inmune que tienen que ser eliminadas. Con el envejecimiento las células inmunes son menos eficaces eliminando células senescentes, lo que hace que se vaya acumulando más cantidad de las mismas.

Mediante el SASP las células senescentes promueven el envejecimiento de las células vecinas. Esto se debe a que a medida que las células senescentes se van acumulando e incrementado su número, también lo hacen los SASP.

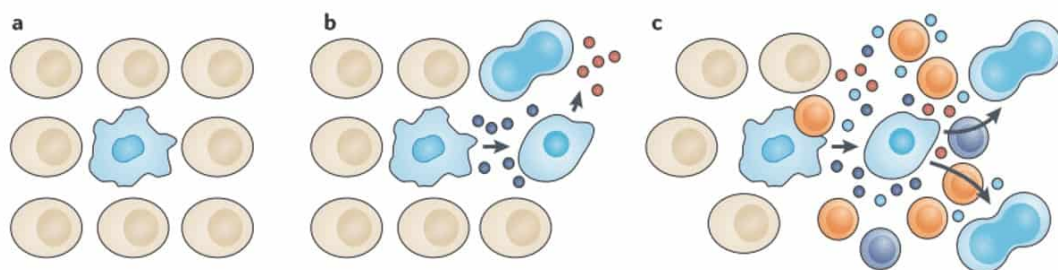


Figura 7: Célula senescente (en azul) liberando los SASP que atraen a las células del sistema inmune (en naranja) y estimulan la división de células vecinas, pueden promover un cáncer o envejecerlas. Fuente: <http://www.besapiens.net/celulas-senescentes/>.

1.2. Terapia con senolíticos

Los senolíticos son fármacos que eliminan selectivamente las células senescentes sin afectar a células normales. Estas sustancias se utilizan actualmente para el tratamiento de linfomas y otros tipos de cáncer. Su función en estos casos es bloquear algunas proteínas que impiden que las células cancerosas mueran. Estas mismas proteínas se cree que son las responsables de una mayor supervivencia de las células senescentes. (Collado, 2007).

En el laboratorio de la Dra Cayuela, disponen de una batería de diferentes senolíticos denominados S1, S2, etc.

1.3. Modelos animales: pez cebra

Para estudiar todas las enfermedades asociadas con el envejecimiento es necesario recurrir a modelos animales que nos ayuden a encontrar las claves de por qué envejecemos y cómo podemos revertirlo. Dentro de estos modelos biológicos aparece el pez cebra.

1.3.1. Características generales.

El pez cebra es un pez tropical llamado así por sus rayas. Su nombre científico es *Danio rerio*, este animal pertenece a la orden cypriniforme (*Cypriniformes*) de la familia de los ciprínidos (*Cyprinidae*) y está emparentado con la carpa y el barbo. Es un pez que forma pequeños grupos y muestra un comportamiento social.

Este pez tiene su origen en ríos de aguas lentas o estancadas y lagunas de la India y Bangladesh, aunque también se puede encontrar en ríos de Nepal, Pakistán y Myanmar. Se trata de un animal omnívoro que se alimenta principalmente de larvas de mosquitos y otras especies de insectos y también de algas microscópicas.

En cuanto a su ciclo vital la época de apareamiento va desde abril a agosto en condiciones normales. Son ovíparos, las hembras depositan los huevos en el agua donde posteriormente el macho los fertiliza. Los huevos eclosionan aproximadamente tres días después de la fertilización y entre 3 y 4 meses ya han alcanzado la madurez reproductiva, su esperanza de vida se encuentra entre los 3 y 4 años, dependiendo de las condiciones ambientales.

1.3.2. Fisiología

En cuanto a su fisiología los peces cebra adultos miden entre 3 y 4 cm, el tamaño máximo es de 6 cm, y sus embriones no miden más de 1mm.

Las hembras son de color plateado con, entre 5 y 9 franjas azules y los machos combinan estas franjas con el color dorado, la presencia de estas rayas ha contribuido a que se conozca popularmente como pez cebra. Tanto los machos como las hembras cuentan con una forma alargada y una aleta dorsal y su zona ventral es de color blanquecino y rosado.



Figura 8: Pez cebra hembra.



Figura 9: Pez cebra macho.

Fuente: Google imágenes

1.3.3. Ventajas en el laboratorio.

Para la mayoría de personas el pez cebra es únicamente una mascota pero para los científicos este animal presenta una gran variedad de posibilidades de ser utilizado como modelo biológico en numerosas investigaciones.

Su tamaño, indicado en el apartado anterior, es una de las principales ventajas del pez ya que se pueden tener más animales en menos espacio y su mantenimiento es entre 100 y 1000 veces menos costoso que el de los ratones (Franco, 2017).

Hay un suministro constante de embriones a un coste relativamente bajo ya que cada hembra da lugar a aproximadamente a 200 embriones por semana. Estos son transparentes y su proceso de formación de órganos ocurre en 24 horas.



Figura 10: Embriones de pez cebra. Fuente: <https://www.youtube.com/watch?v=Js2yndRzVgs> .

Los embriones eclosionan al tercer día y el quinto día (tras la fecundación) ya son larvas, pasados tres o cuatro meses los individuos llegan a la madurez reproductiva. Su esperanza de vida media oscila entre los tres y tres años y medio (Cayuela, Alcaraz y Angelín, 2012).

La transparencia del embrión ha permitido observar el efecto de las mutaciones o de los medicamentos que se les aplican gracias al uso de proteínas fluorescentes o colorantes. La utilización de estas proteínas permite observar cambios funcionales o morfológicos en órganos internos sin la necesidad de tener que diseccionar al pez y aunque la transparencia está presente únicamente durante su estado embrionario actualmente existen modelos mutantes¹³ que alargan esta cualidad durante todo su ciclo de vida (Cayuela et al., 2012).

Además se puede manipular fácilmente su genoma mediante la microinyección de ADN o de herramientas de Edición Genética (“CRISPR/Cas9”)¹⁴ para obtener un fenotipo deseado y así pueda valer de modelo para estudiar una enfermedad concreta. Gracias a su rápida organogénesis es posible ver procesos biológicos, como por ejemplo la hematopoyesis o la formación del corazón, en periodos muy cortos de tiempo

El ser humano y el pez cebra compartimos un 70% del genoma¹⁵ pero el 80% de los genes que producen enfermedades en el ser humano están presentes en el pez. Es decir que en el se pueden reproducir 8 de cada 10 de nuestras enfermedades (Franco, 2017).

Al principio se utilizaba sobre todo para el estudio del desarrollo de órganos en vertebrados pero debido a su semejanza genética y fisiológica con el ser humano ha ido tomando importancia en más áreas durante el paso del tiempo. No obstante, el pez cebra también tiene sus limitaciones como modelo, ya que carece tejido mamario o pulmones por lo que modelar enfermedades relacionadas con estos órganos sería difícil (Cayuela et al., 2012; Franco, 2017).

Cayuela et al. (2012) afirman: “El límite con el pez cebra y sus aplicaciones parece hallarse solo en la imaginación de los científicos”(p.4).

2. Objetivos

Los objetivos de nuestro trabajo serían:

1. Analizar si hay diferencias en el comportamiento de peces jóvenes y adultos frente a un estímulo de memoria (Test NOR).

¹³ Esta línea mutante se denomina Cásper.

¹⁴ *Class 2 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*.

¹⁵ Conjunto de genes contenidos en los cromosomas (información genética que posee un organismo).

2. Comprobar si tras el tratamiento con compuestos senolíticos¹⁶ se produce una mejora o rejuvenecimiento de las capacidades cognitivas (memoria a largo plazo) de los peces adultos.

La hipótesis que planteamos es la siguiente: El pez cebra es un buen modelo para estudiar la pérdida de capacidades cognitivas durante el envejecimiento y por tanto puede ser utilizado para la búsqueda de compuestos que la mejoren, como pueden ser los compuestos senolíticos.

En primer lugar daremos a conocer cuál es la metodología necesaria para llevar a cabo nuestro experimento, un test de memoria al cual vamos a someter peces de distintas edades para así poder comprobar si hay cambios de comportamiento entre los jóvenes y los viejos.

Suministraremos a peces adultos senolíticos y luego volveremos a realizar la prueba de memoria para comprobar si se produce alguna mejora en sus capacidades cognitivas.

3. Materiales y métodos

Para comprobar la veracidad de nuestras hipótesis vamos a hacer uso del método (H-D) Hipotético Deductivo. Este consiste en la observación de un fenómeno del que vamos a deducir una serie de consecuencias, que contrastaremos con nuestra hipótesis para falsarla o verificarla.

También vamos a emplear el método experimental que implica la alteración, bajo nuestro control, de las condiciones naturales y la repetición de estas condiciones modificando las diferentes variables. En nuestro caso, vamos a someter a peces cebra de distinta edad y a peces envejecidos (a los que vamos a exponer a distintos fármacos) a un test de memoria. Tras este método haremos uso del método analítico e inductivo para el análisis de los resultados y el establecimiento de relaciones entre los fenómenos estudiados.

Nuestro trabajo es una investigación explicativa que consiste en, establecer una relación de causa-efecto (la causa es la edad y el efecto la pérdida de memoria) y observar su evolución.

Antes, durante y tras la realización del experimento debemos llevar a cabo una revisión documental con el fin de profundizar y obtener nuevos datos relacionados con el tema a tratar en este proyecto. La parte experimental comprende la determinación de la anterior relación de causa-efecto sometiendo al pez cebra a la ya nombrada prueba de memoria. Todo el experimento constaría de las siguientes partes:

¹⁶ Los senolíticos son fármacos que inducen la muerte de células senescentes, es decir, aquellas que han dejado de dividirse y se acumulan en un cuerpo acelerando el proceso de envejecimiento.

3.1. Animales.

Los peces cebra (*Danio rerio*) se obtuvieron del laboratorio de la Dra. Maria Luisa Cayuela del Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias (IMIB-Arrixaca) Las condiciones ambientales y de manejo están detalladas en protocols.io (DOI: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.mrjc54n) (Widrick *et al.*, 2018). De forma resumida, los peces de entre 5-21 meses se mantienen a una temperatura del agua de 27 °C y un fotoperíodo de 14:10 (luz/oscuridad), y se alimentan una o dos veces al día con artemia viva y GemmaMicro.

Los experimentos realizados cumplen con las directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609 / UE).

Se utilizan 15 peces adultos de especie silvestre o WT (*wild type*), y 15 peces jóvenes para los estudios de memoria sin tratamientos . Para los estudios de memoria con compuestos senolíticos se utilizaron 11 peces.

3.2. Tratamientos

Contenido inhibido autorizado por la Cátedra Poncemar y la Autora del Trabajo.

Los peces jóvenes y viejos que fueron tratados a tiempos cortos o largos, fueron sometidos al test de memoria NOR que se detalla a continuación.

3.3. Estudio de

la memoria de reconocimiento, test NOR.

En este proyecto se lleva a cabo el test NOR (*Novel Object Recognition*) para evaluar la memoria de reconocimiento del pez cebra. Se debe medir el tiempo en el cual los animales exploran el objeto nuevo y el objeto familiar (Antunes & Biala, 2012) .

El test NOR consta de 3 fases: i) la fase de habituación, ii) la fase de familiarización y iii) la fase test. En la *fase de habituación* el animal se encuentra libremente explorando el espacio donde se llevará a cabo el test pero en ausencia de objetos. Después, el animal se individualiza en un lugar diferente. En la *fase de familiarización*, donde se va a hacer el test, se ponen dos objetos iguales (A_1+A_2), durante unos minutos. Para no influir en la decisión del animal, se libera en el centro y él decide de forma libre hacia qué objeto va. Por último, después de un tiempo de descanso, se realiza la *fase test*, en la cual el animal vuelve al sitio del test, donde se encuentra con el objeto anterior (familiar) y un objeto novedoso ($A+B$). Al pasar más

tiempo explorando el objeto novedoso que el familiar, deducimos que el animal recuerda el objeto familiar. Las diferentes fases del test nos permiten evaluar la memoria de reconocimiento a corto y a largo plazo (Antunes & Biala, 2012). El tiempo que dedica el animal a explorar el objeto novedoso con respecto al familiar, se conoce como índice de memoria.

En nuestro proyecto la **fase de habituación** se realiza la tarde de antes de comenzar a grabar, aislando los peces de forma individual en peceras. Los individuos permanecen en estas peceras hasta el final del estudio. Las peceras se colocan una al lado de la otra, para que estén acostumbrados a estar solos y no se estresen a la hora de las grabaciones. Al poner las peceras una al lado de la otra, los peces se ven entre ellos y no se sienten solos .

Durante la fase de habituación, los peces permanecen individualizados en peceras de 1 litro, y no conocen previamente la pecera de la grabación sin objetos (figura 11 y 12).



Figuras 11 Y 12: Peces aislados en peceras individuales antes de realizar la prueba. Fuente: elaboración propia.

Para la **fase de familiarización** se utilizan como objetos dos globos verdes iguales (A_1+A_2) .



Figura 13: fase de familiarización, tiempo 0 de grabación. Fuente: Elaboración propia.

Los peces que no se acercan a los objetos durante la fase de familiarización se eliminan del estudio, ya que no se puede calcular un porcentaje de tiempo control que sea fiable para compararlo con los porcentajes de tiempo que los peces pasan explorando los objetos nuevos.

La fase test consta de 3 pruebas, a las 2 horas, a las 24 horas y a los 8 días, respecto al tiempo 0. Cuando se realizan los vídeos, en la pecera siempre hay dos objetos a la misma altura y recubiertos totalmente de agua. A las 2 horas hay un globo verde y un objeto naranja (A+B), a las 24 horas un globo verde y un objeto gris (A+C), a los 8 días un globo verde y dos bolas pequeñas de distinto color formando un nuevo objeto (A+D)

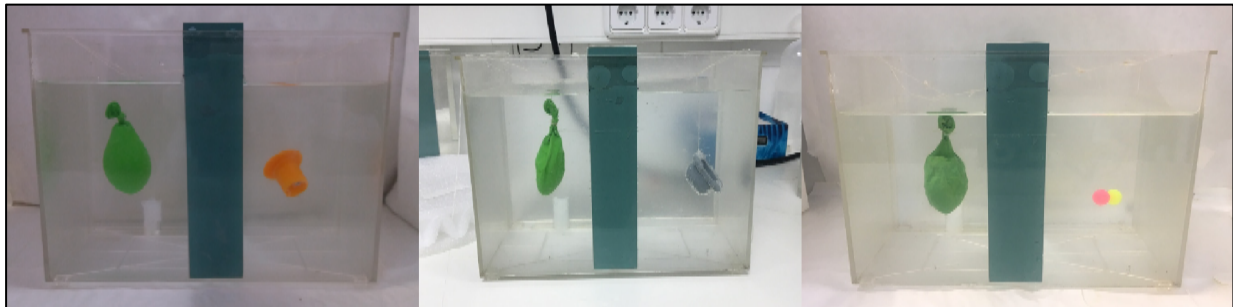


Figura 14,15 y 16: A la izquierda los objetos utilizados a las 2 horas, en el centro los usados a las 24 horas y a la derecha los de los 8 días. Fuente: elaboración propia.

La sala en la que se realiza el test se mantiene a 28 °C para que los peces estén en condiciones normales, ya que hemos comprobado que el agua fría puede alterar el comportamiento de los peces.

En cada grabación, se utiliza una pecera totalmente aislada, donde todo a su alrededor es blanco. Para poder reducir el estrés causado en los peces por el aislamiento social, en el centro de la pecera creamos una “área de refugio” con dos espejos. Estos generan un efecto óptico en el que parece que hay muchos peces para así evitar que el pez cebra se sienta solo.

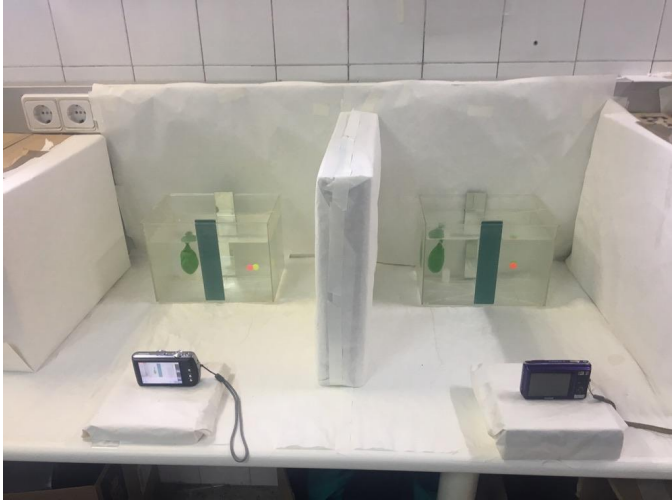


Figura 17: Zona de grabación con dos peceras. Fuente: Elaboración propia.

Se realizan vídeos de 7 minutos, los 2 primeros minutos son para que el pez se adapte al medio con los objetos y los últimos 5 minutos son los que se analizan con el programa *Etho Vision XT* para estudiar el comportamiento del animal. Se obtienen los datos de tiempo en segundos que el pez está en cada uno de los objetos.

El programa *Etho Vision XT* realiza mapas de calor, que son una representación en pseudocolor en la que se indica cuáles son las zonas o puntos donde más se centra el movimiento del pez durante el tiempo de grabación analizado (Figura 20).

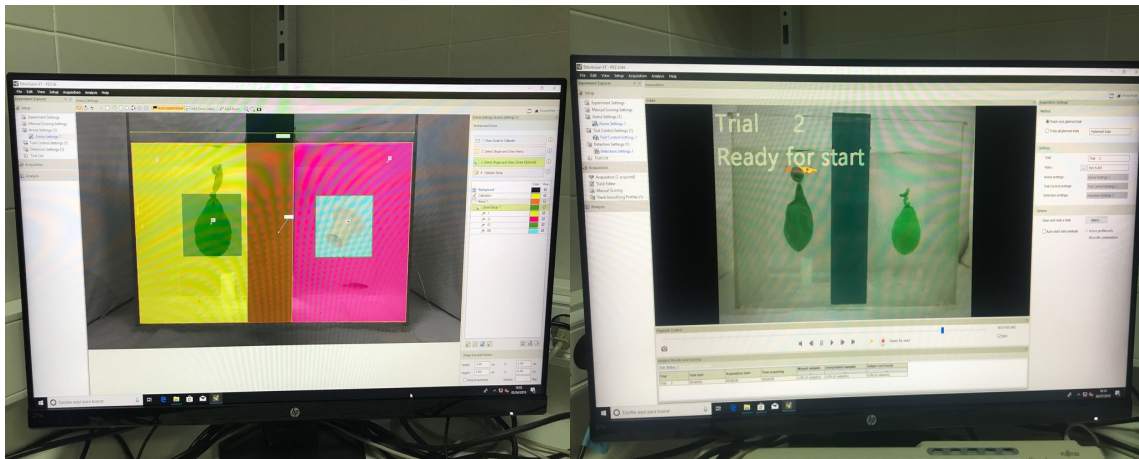


Figura 18 y 19: Análisis con Ethovision XT- 14. Fuente: elaboración propia.

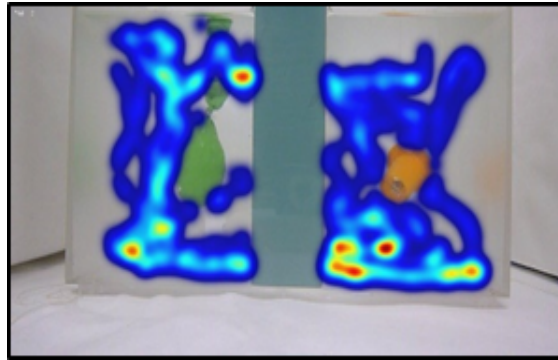


Figura 20: Mapa de calor obtenido con Ethovision XT- 14. Fuente: Elaboración propia.

3.4. Análisis estadístico

Con los datos de tiempo en segundos que el animal está en cada objeto se realiza un índice de preferencia (IP) en porcentaje, y este es el que utilizamos en las gráficas. Este índice calcula el porcentaje de tiempo que el pez ha estado en el objeto nuevo respecto al tiempo que estuvo en el objeto familiar durante la etapa de familiarización.

$$IP = (\% \text{ tiempo en objeto nuevo}) - (\% \text{ tiempo en objeto familiar}) = \\ = \left(\frac{t \text{ Objeto nuevo (s)}}{t (A_1 + \text{Objeto nuevo}) (s)} \times 100 \right) - \left(\frac{t A_2 (s)}{t (A_1 + A_2) (s)} \times 100 \right)$$

Si el índice es positivo significa que el pez pasa más tiempo explorando el nuevo objeto. Sin embargo, si es negativo el pez habrá estado más tiempo en el objeto familiar que en el nuevo. Si este índice es próximo a 0 significa que el pez está el mismo tiempo explorando ambos objetos.

Para poder observar si hay diferencias significativas entre los distintos grupos de edad y de genotipo utilizamos Excel y GraphPad Prism 8 .

4. Conclusiones

4.1. Comparación de la memoria entre peces jóvenes y adultos

Debido a que la eliminación de células senescentes parece ser una terapia rejuvenecedora quisimos probar como afectaba a las capacidades cognitivas en el modelo de pez cebra utilizando el test NOR. Para ello lo primero que debemos hacer es comprobar si hay diferencias cognitivas entre peces jóvenes y adultos.

El test NOR es un ensayo sencillo y eficaz utilizado evaluar la memoria en modelos animales. Como hemos dicho anteriormente, con esta prueba estudiamos la capacidad de

reconocer un objeto nuevo frente a uno conocido y por lo tanto, lo que se evalúa es si recuerda el objeto conocido y evaluamos a la memoria.

Durante la *etapa de familiarización*, a las 0 horas, como se puede observar en los siguientes mapas de calor, obtenidos tras analizar los videos con el programa Etho Vision TX, tanto los peces jóvenes como los adultos pasan más o menos el mismo tiempo en ambos objetos.

FASE DE FAMILIARIZACIÓN (0 HORAS)

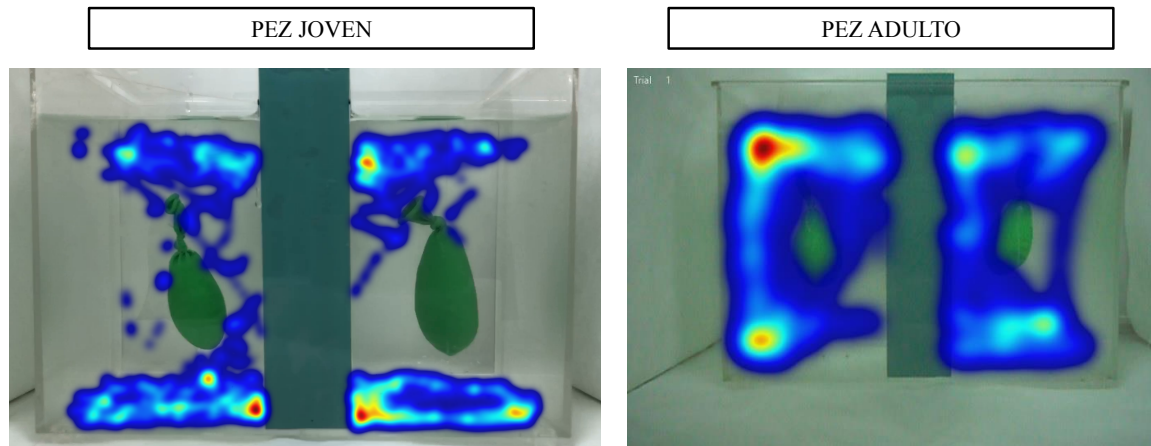


Figura 21 : Mapas de calor obtenidos durante la fase de familiarización del test NOR, cuando los dos objetos son iguales. A la izquierda, el mapa de calor de un pez joven, a la derecha, el de un adulto. Fuente: Elaboración propia.

En la *fase test* a las 2 horas tanto los peces jóvenes como los adultos pasan más tiempo explorando el objeto nuevo (derecha) que el objeto familiar. En las grabaciones realizadas a las 24 horas y a los 8 días podemos apreciar que los jóvenes pasan más tiempo en el objeto nuevo que en el familiar, mientras que los adultos pasan el mismo tiempo en ambos objetos.

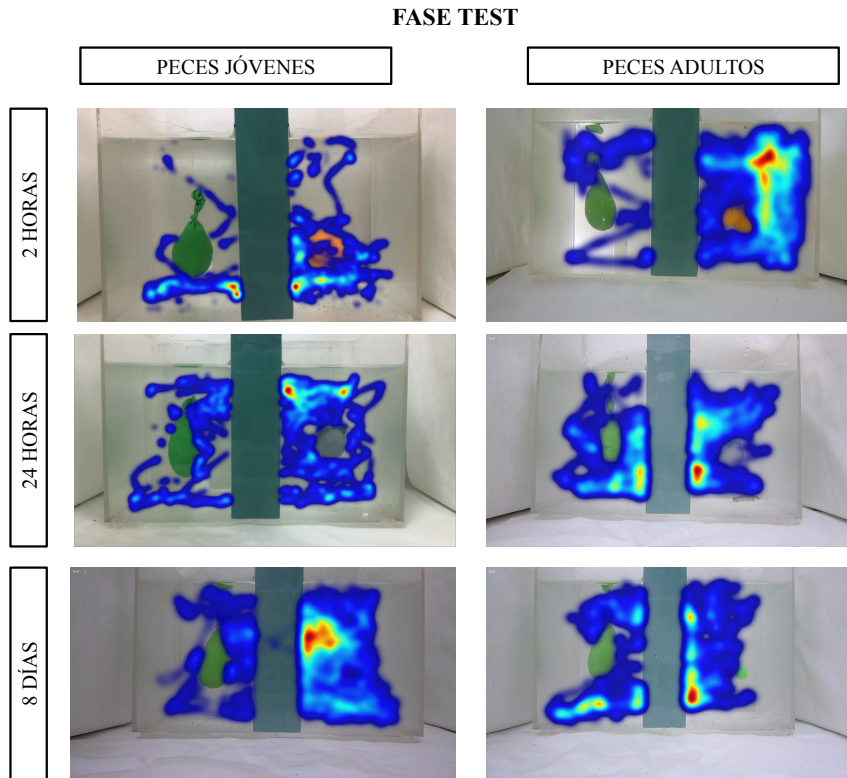
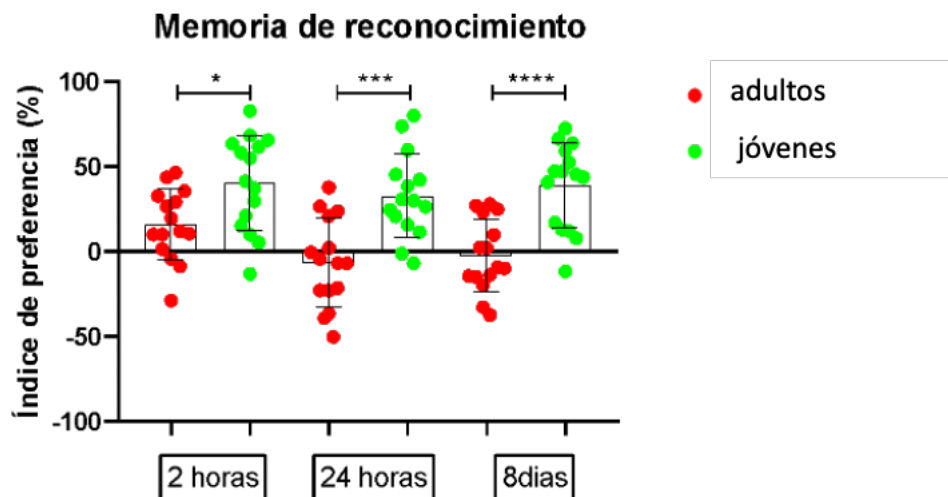


Figura 22: Mapas de calor de la *fase test* del Test NOR. Las imágenes de la izquierda corresponden a peces jóvenes, y las de la derecha a peces adultos. A medida que avanza el Test NOR, los peces jóvenes pasan más tiempo en el objeto nuevo que en el familiar, mientras que los adultos pasan más o menos el mismo tiempo en ambos objetos, al no distinguir el nuevo del familiar. Fuente: Elaboración propia.

Como ya se ha descrito en materiales y métodos hemos utilizado un índice de preferencia (IP) para plasmar la cantidad de tiempo que pasa cada pez en el nuevo objeto.



Grafica 1: La gráfica representa el IP del estudio individual a las 2 horas, 24 horas y 8 días. Cada punto representa un individuo adulto (en rojo) o un individuo joven (en verde). Fuente: Elaboración propia.

La gráfica muestra las distintas pruebas realizadas durante la *fase test*. A las 2 horas los peces jóvenes tienen un IP positivo, esto significa que recuerdan el objeto familiar y por eso pasan más tiempo explorando el nuevo. En la misma fase en los adultos el IP sigue siendo positivo, aunque más bajo significativamente, es decir, pasan menos tiempo explorando el objeto nuevo que los peces jóvenes.

Tanto a las 24 horas como a los 8 días, al igual que a las 2 horas, se observa que los peces jóvenes pasan más tiempo en el objeto nuevo que en el familiar, indicativo de que tienen buena memoria.

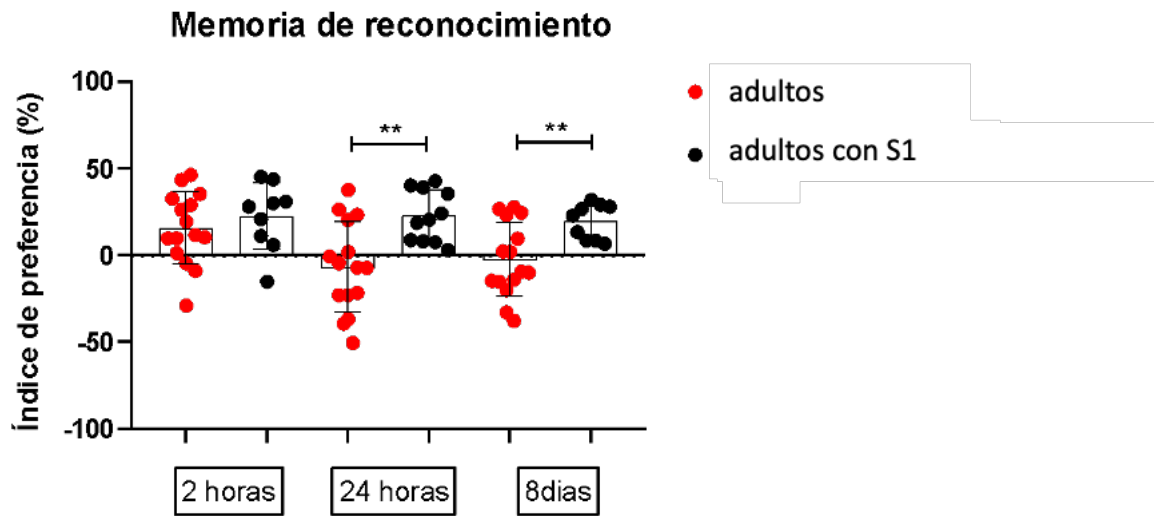
En el caso de los peces adultos a las 24 horas y a los 8 días el IP en más del 50% de los individuos es negativo ya que pasan más o menos el mismo tiempo en ambos objetos. Esto significa que no son capaces de recordar el objeto familiar y lo exploran como si fuera nuevo.

Las diferencias observadas entre el IP de los peces son significativas. observando una pérdida de memoria a largo plazo en los peces adultos. Esto significa que los peces adultos sufren un deterioro en la memoria y capacidad de reconocimiento a largo plazo, a diferencia de los jóvenes que no tienen este problema.

4.2. Efecto en la memoria tras el tratamiento con compuestos (S)

Como ya se ha comentado el acortamiento telomérico produce la entrada en senescencia de las células. El acumulo de estas células está directamente relacionado con el envejecimiento, por lo que eliminar estas células es uno de los objetivos de las terapias de rejuvenecimiento. Se han desarrollado muchos compuestos que las eliminan y reciben el nombre de senolíticos. En este estudio vamos a utilizar uno de ellos al que el laboratorio de la Dra Cayuela llama "S1" .

Puesto que existen diferencias significativas a nivel de la memoria de reconocimiento entre los peces cebra jóvenes y adultos, nos propusimos probar si el tratamiento peces adultos con un senolítico, podría mejorar la respuesta en el Test NOR. Para ello se sometieron a los peces adultos a un tratamiento corto con el senolítico S1 suministrado periódicamente. Tras el tratamiento se le aplicó el Test NOR.



Grafica 2: La gráfica representa el IP del estudio individual a las 2 horas, 24 horas y 8 días. Cada punto representa un individuo adulto (en rojo) o un adulto tras el tratamiento (en negro). Fuente: Elaboración propia.

Lo que se observó tras el tratamiento es que si que hay un aumento de las capacidades cognitivas en la prueba realizada a las 24 horas y a los 8 días.

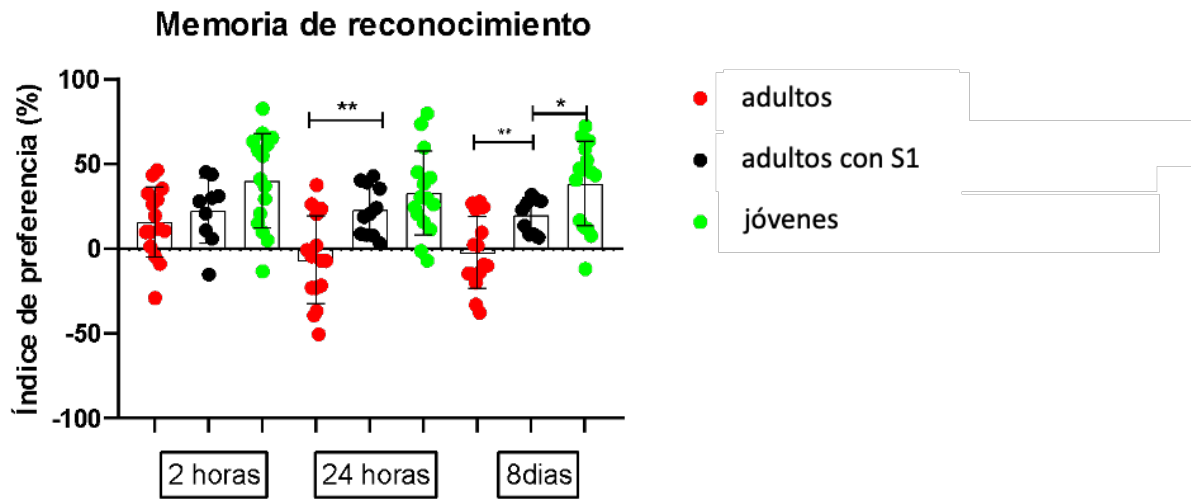
En la primera etapa, a las 2 horas, los peces que han estado expuestos a S1 muestran un IP positivo más alto que el de los peces adultos normales. Aunque esta tendencia a mejorar la memoria de reconocimiento a corto plazo no es significativa.

A las 24 horas y los 8 días, si que podemos apreciar el cambio ya que se observa que el IP de los peces adultos ha pasado de ser negativo a positivo al haber tomado S1. Esto significa que estos peces pasan más tiempo explorando el objeto nuevo que el viejo, es decir recuerdan el viejo y se ha mejorado su memoria.

Según el artículo escrito por Palmero (2018), tras diversos experimentos con modelos animales se había concluido que, la eliminación de células senescentes prolonga la longevidad mediante la limitación de diversos problemas asociados al envejecimiento.

Esto está en consonancia con nuestros resultados, al haber obtenido que utilizando un fármaco senolítico se produce una mejora en la memoria de reconocimiento del pez cebra y por tanto un rejuvenecimiento. De este modo nuestra conclusión también sería que la eliminación de células senescentes permite mejorar una de las consecuencias del envejecimiento de los animales, en este caso, la pérdida de memoria.

Al comprobar que el compuesto S1 produce una mejora de la memoria de reconocimiento en peces adultos, comparamos estos datos con los de los peces jóvenes obtenidos previamente para observar si alcanzan niveles semejantes.



Grafica 3: La gráfica representa el IP del estudio individual a las 2 horas, 24 horas y 8 días. Cada punto representa un individuo adulto (en rojo), un adulto tras el tratamiento (en negro) o un individuo joven (en verde). Fuente: Elaboración propia.

Como podemos observar en este gráfico en ninguna de las últimas etapas el tratamiento con el compuesto S1 es capaz de mejorar la memoria de los peces adultos de manera que se iguale a la de los jóvenes. Por este motivo decidimos seguir prolongando el tratamiento como se expone en el apartado material y métodos, completando así, un tratamiento largo. Tras ese periodo de tiempo volver a realizar el test NOR.

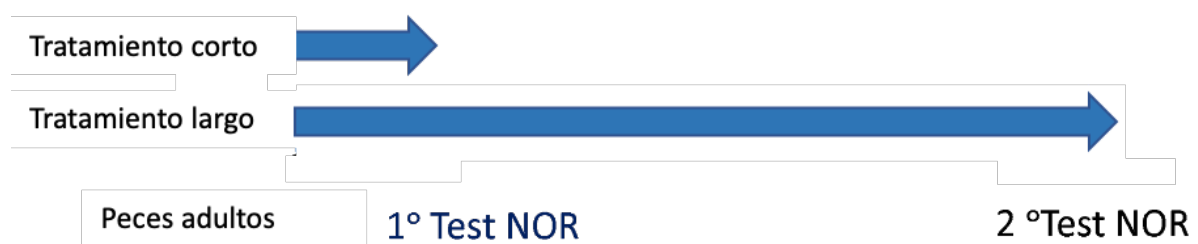
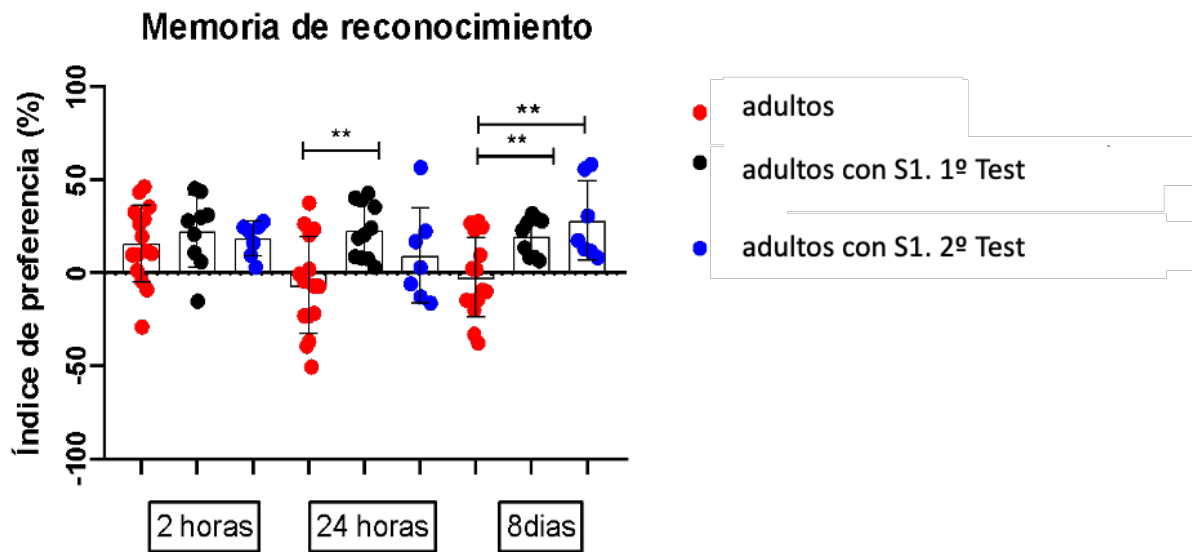


Figura 23: En esta figura se representa el diseño experimental de la duración de los tratamientos con S1 a los que fueron sometidos los peces y el momento en el que se les realizaron el Test NOR. Fuente: Elaboración propia.

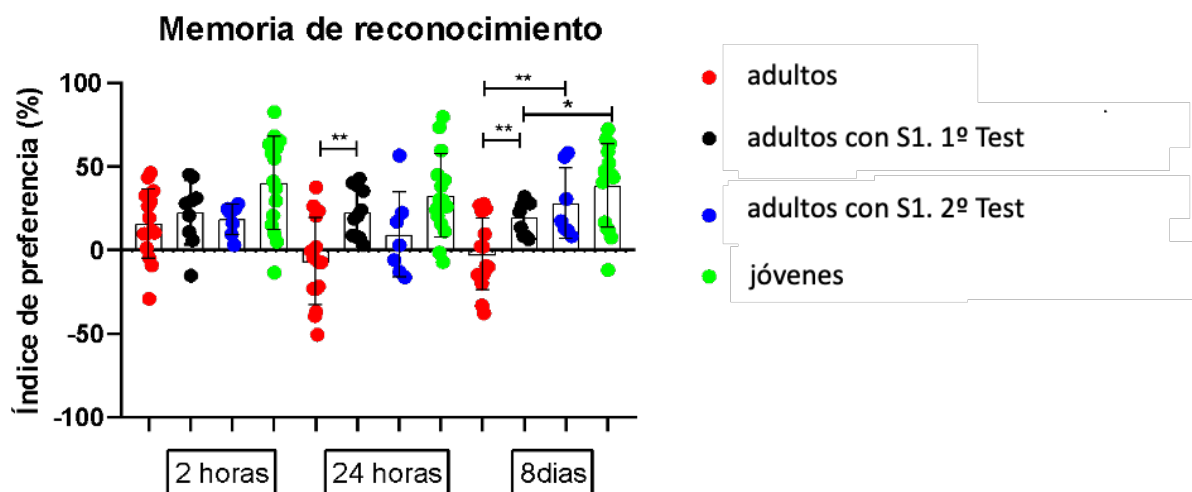
Tras el prolongamiento del tratamiento se observa que sigue habiendo una mejora en las capacidades cognitivas, medido por el IP, pero que no es significativo comparado con los

datos obtenidos con el tratamiento corto. Es decir, que mantener el tratamiento, la memoria no mejora más de lo que ya se había conseguido con el tratamiento corto.



Gráfica 4: En esta gráfica se representa el IP del estudio individual (2 horas, 24 horas y 8 días) durante diferente tiempo de tratamiento con el compuesto S1. Cada punto representa un individuo adulto (en rojo), un adulto con tratamiento corto (en negro), un adulto sometido a tratamiento largo (en azul). Fuente: elaboración propia.

No obstante, quisimos comprobar los nuevos datos del tratamiento más largo con los de los peces jóvenes obtenidos previamente, como hicimos previamente con el primer tratamiento corto de S1.



Gráfica 5: En esta gráfica se representa el IP del estudio individual (2 horas, 24 horas y 8 días) durante diferente tiempo de tratamiento con el compuesto S1. Cada punto representa un individuo adulto (en rojo), un adulto con tratamiento corto (en negro) o un adulto con tratamiento largo (en azul) o un individuo joven (en verde). Fuente: Elaboración propia.

Curiosamente , aunque no había diferencias significativas en la mejora de la memoria por aumentar el tiempo de exposición a S1 cuando comparamos con peces adultos, si se observó que tras el tratamiento más largo no había diferencias significativas con los más jóvenes. Queriendo ello decir que si que hay una mejora al tratar durante más tiempo.

Como hemos podido verificar este compuesto mejora la memoria de reconocimiento o a largo plazo de los peces adultos. Con tratamientos cortos los peces no conseguirían recobrar los mismos niveles de memoria que si fueran jóvenes. Sin embargo, con tratamientos más largos si que parece que los alcanzarían. Aunque se hace preciso aumentar el número de individuos en este tipo de experimentación para poder asegurarlo con mayor fiabilidad.

Por lo tanto, podemos mejorar la memoria en peces adultos. Si trasladamos esto al humano podríamos pensar que con estos tratamiento se fomenta un envejecimiento saludable, mucho más estimulante para las personas que pierden una capacidad tan importante para el día a día como es la memoria.

Aunque este trabajo responde a los objetivos planteados, también abre otros nuevos, como ¿Cuánto tiempo durará este efecto?.

Después de analizar y discutir los resultados, podemos concluir que:

1. La memoria de reconocimiento del pez cebra varía con la edad. Los peces más jóvenes tienen memoria de reconocimiento tanto a corto como a largo plazo. En contraste, los peces adultos sufren un deterioro de la memoria y la capacidad de reconocimiento a largo plazo, aunque si que tienen memoria a corto plazo.

2. Tras exponer a peces adultos al compuesto senolítico S1 hemos podido comprobar que, con tratamientos cortos se mejora la memoria de los peces, aunque no se consigue recobrar los mismos niveles que los jóvenes. No obstante, si la tendencia se mantiene, tras un tratamiento más largo si podría alcanzarlos.

Agradecimientos

Por último, queremos agradecer a los coordinadores del trabajo, D. Antonio García Zamora y D^a María de Lourdes Barnés Romero; y a los compañeros por todo el apoyo y colaboración. También a las profesoras D^a Esther Sánchez Pérez y a D^a María José Aragón Sánchez.

Especialmente a la Dra. María Luisa Cayuela, por toda la ayuda, orientación y su gran interés en el proyecto, además de todos los recursos que ha puesto a nuestra disposición; y a

su ayudante Miriam Roca por la paciencia y toda la ayuda prestada durante la elaboración de este proyecto. Además, gracias a todos los miembros su equipo.

Por último gracias a los más cercanos, mi familia.

5. Bibliografía

- Abellán, A., Aceituno, P., Pérez, J., Ramiro, D., Ayala, A., y Pujol, R. (2019). Un perfil de las personas mayores en España, 2019. Indicadores estadísticos básicos. *Informes Envejecimiento* (22), 1-38. Recuperado de <http://envejecimiento.csic.es/documentos/documentos/enred-indicadoresbasicos2019.pdf> consultado el 25 de junio de 2019.
- Anchelin, M., Alcaraz-Pérez, F., Martínez, C. M., Bernabé-García, M., Mulero, V., & Cayuela, M. L. (2013). Premature aging in telomerase-deficient zebrafish. *Disease models & mechanisms*, 6(5), 1101-1112. Recuperado de <https://dmm.biologists.org/content/6/5/1101.short> consultado el 11 de octubre de 2019.
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z> consultado el 20 de octubre de 2019.
- Alvarado García, A. M., Maya, S., y María, Á. (2014). Análisis del concepto de envejecimiento. *Gerokomos*, 25(2), 57-62. Recuperado de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1134-928X2014000200002 consultado el 14 de mayo de 2019.
- Ávila, J. El envejecimiento y la neurodegeneración. *Lychnos*, (2). Recuperado de http://www.fgcsic.es/lychnos/es_es/articulos/envejecimiento_neurodegeneracion consultado el 3 de enero de 2019.
- Boletín Oficial del Estado (2013). *Disposiciones generales* (34). Recuperado de http://sea.umh.es/files/2010/07/RD-53_2013-Normas-aplicables-para-la-protecci%C3%B3n-de-los-animales-utilizados-en-experimentaci%C3%B3n-y-otros-fines-cient%C3%ADficos1.pdf consultado el 27 de marzo de 2019.
- Chuaire, L. (2006). Telómeros y Telomerasa: Breve recuento de una historia iniciada por Hermann Müller y Bárbara McClintock. *Colombia Médica*. 37(4). Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342006000400014 consultado el 14 de abril de 2019.

- Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 130(2), 223-233. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867407008902> consultado el 25 de octubre de 2019.
- Collado, M. (26 febrero 2016). Naukas.com: “*Senolíticos, la fórmula rejuvenecedora (2)*”. Recuperado de <https://naukas.com/2016/02/29/senoliticos-la-formula-rejuvenecedora-2/> consultado el 5 de agosto de 2019.
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas. *Un pez de acuario y de...¡laboratorio!*. Recuperado de <http://seresmodelicos.csic.es/peix.html> consultado el 19 de marzo 2019.
- Cottliar, A. S., Slavutsky, I. R. (2001). Telómeros y actividad de telomerasa: su participación en el envejecimiento y el desarrollo neoplásico. *Medicina (Buenos Aires)*, 61, 335-42. Recuperado de http://medicinabuenosaires.com/demo/revistas/vol61-01/3/v61_n3_p335_342.pdf consultado del 25 de noviembre de 2018.
- Divulgación dinámica. (2017). *Cambios cognitivos asociados al envejecimiento*. Recuperado de <https://www.divulgaciondinamica.es/blog/cambios-cognitivos-envejecimiento/> consultado el 3 de enero de 2019.
- Fernández, J. L., Parapara, C., Ruíz, M. El envejecimiento de la población. *Lyvhnos*, (2). Recuperado de http://www.fgcsic.es/lychnos/es_es/articulos/envejecimiento_poblacion consultado el 3 de enero de 2019.
- Franco, J. (3 agosto 2017). Infotecnovision.com : “*Pez cebra modelo biológico ideal protagonista de tres investigaciones que busca la regeneración de la retina y del nervio óptico*”. Recuperado de: <https://www.infotecnovision.com/pez-cebra-modelo-biologico-ideal-protagonista-de-tres-investigaciones-que-buscan-la-regeneracion-de-la-retina-y-del-nervio-optico/> consultado el 7 de noviembre de 2018.
- Fuentes, M. L. C., Pérez, F. A., & Flageu, M. A. (2012). El pez cebra, al servicio de la investigación contra el cáncer. *Eubacteria*, (28), 1. Recuperado de: https://www.um.es/eubacteria/pez_cebra.pdf consultado el 3 de diciembre de 2018.
- Hernández Fernández , R. A. (1999). Telómeros y telomerasas. *Rev. Cubana Invest Biomed*, 18(2), 121-9. Recuperado de http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol18_2_99/ibi09299.pdf consultado el 17 de noviembre de 2018.
- Palmero, I. (2018). SEBBM DIVULGACIÓN ACÉRCATE A NUESTROS CIENTÍFICOS. Recuperado de

https://www.sebbm.es/web/images/AAdocumentos/2018/junio2018_ignaciopalmero.pdf consultado el 20 de octubre de 2019.

- Kuilman, T., & Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews cancer*, 9(2), 81. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/nrc2560> consultado el 10 de octubre de 2019.
- Maciel-Barón, L. Á., Pérez, V. I., Torres, C., González-Puertos, V. Y., Konigsberg, M., & López-Diazguerrero, N. E. (2017). La senescencia celular como denominador común de enfermedades asociadas a la edad. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 55(4), 490-497. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=73999> consultado el 17 de octubre de 2019.
- Mas Tous, C. (2008). Mejora de la memoria en personas mayores: variables a tener en cuenta. *Papeles del Psicólogo*, 29(2). Recuperado de <http://www.papelesdelpsicologo.es/pdf/1588.pdf> consultado el 15 de abril de 2019.
- Mesonero Valhondo, A., & Fombona Cadavieco, J. (2013). Envejecimiento y funciones cognitivas: las pérdidas de memoria y los olvidos frecuentes. Recuperado de <https://www.redalyc.org/html/3498/349852173021/> consultado el 31 de marzo de 2019.
- Organización de las Naciones Unidas. (2017). *Envejecimiento*. Recuperado de <https://www.un.org/es/sections/issues-depth/ageing/index.html> consultado el 24 de junio de 2019.
- Organización Mundial de la Salud. (2018). *Envejecimiento y salud*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/envejecimiento-y-salud> consultado el 10 de abril de 2019.
- Pardo Andreu, G., & Delgado Hernández, R. (2003). Senescencia celular y envejecimiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(3), 204-212. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002003000300010&script=sci_arttext&tlng=en consultado el 5 de agosto de 2019.
- Pérez, V., Sierra, F. (2009). Biología del envejecimiento. *Revista médica de Chile*, 137(2), 296-302. Recuperado de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98872009000200017&script=sci_arttext consultado el 30 de marzo de 2019.
- Roca, M (2018/2019). *Las relaciones intergeneracionales y su efecto en las capacidades cognitivas* (Trabajo de fin de grado). Universidad de Murcia, Murcia, España.

- Samper, E. (2002). *Papel de la telomerasa y de proteínas de reparación en la función telomérica: uso de modelos animales* (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. Consultado el 31 de marzo de 2019.
- Stipp, D. (2012). Senescencia celular. *Investigación y ciencia*, (433), 78-83. Consultado el 14 de diciembre de 2018.
- Tutorial, C. (2014). *Comparación del Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia en dos formas distintas de senescencia prematura inducida* (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA). Recuperado de <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI17093.pdf> consultado el 17 de octubre de 2019.
- Urtasun, R. (16 marzo 2018). Geriatricarea.com: “Las enfermedades crónicas afectan al 70% de la población mayor de 65 años”. Recuperado de <https://geriatricarea.com/las-enfermedades-cronicas-afectan-al-70-de-la-poblacion-mayor-de-65-anos/> consultado el 3 de enero de 2019.
- Ventura, R. (2004). Deterioro cognitivo en el envejecimiento normal. *Revista de Psiquiatría y salud Mental*, 2, 17-25. Consultado el 10 de abril de 2019.
- Widrick, J. J., Gibbs, D. E., Sanchez, B., Gupta, V. A., Pakula, A., Lawrence, C., ... & Kunkel, L. M. (2018). An open source microcontroller based flume for evaluating swimming performance of larval, juvenile, and adult zebrafish. *PloS one*, 13(6), e0199712. Recuperado de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0199712> consultado el 25 de octubre de 2019.