Efecto de la luz en la longevidad de *Caenorhabditis elegans*

CAMILA CAMPO

1222703902

FUNDACIÓN UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD - FUCS

FACULTAD DE CITOHISTOLOGÍA

PROYECTO DE GRADO

2020-2

Efecto de la luz en la longevidad de *Caenorhabditis elegans*

CAMILA CAMPO

1222703902

MARCELA GÓMEZ GARZÓN

DOCENTE

FUNDACIÓN UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD - FUCS

FACULTAD DE CITOHISTOLOGÍA

PROYECTO DE GRADO

2021-2

Hace siete meses me vinculé al Semillero SIMIC de Microbiología. Mi tarea inicial fue realizar la búsqueda de información sobre Caenorhabditis elegans y participar en la construcción del proyecto con mis tutoras la Dra Marcela Gómez y la Profesora Jeannette León.

El objetivo de mi trabajo de grado fue escribir el proyecto y someterlo a la Convocatoria de Semilleros del 2020.

Logre cumplir el objetivo, presento a continuación el proyecto sometido, que fue subido por mis tutoras al sitio SIDI con el código 5356 y recibió todos los avales para entrar a la convocatoria el día 16 de octubre.

El proyecto será evaluado externamente por pares y finalmente realizare la presentación ante el Comité de Investigación de la FUCS para su aprobación final próximamente.

I. INFORMACION GENERAL DEL PROYECTO:

Título: Efecto de la luz en la longevidad de *Caenorhabditis elegans*	
Investigador Principal: Jeannette León Enciso	Filiación Institucional: FUCS
Correo electrónico: jleon@fucsalud.edu.co	Teléfono Celular : 310-786-1436
Dirección de correspondencia: jleon@fucsalud.edu.co	
Coinvestigadores Marcela Gómez, 3143572313, mgomez@fucsalud.edu.co, Docente Medicina Camila Campo, 317-459-956, mccampo@fucsalud.edu.co Estudiante Citohistología Diego Alejandro Jimenez Gracia, 3124163554, dajimenez1@fucsalud.edu.co Estudiante Medicina Filiación Institucional: FUCS	
Dirección de correspondencia (Investigador Principal): jleon@fucsalud.edu.co	
* Nombre del Grupo de Investigación (GrupLAC) **Patología: Célula y Tejido** **Ciencias Básicas en Salud (CBS)**	Total de Investigadores 4
Semillero de Investigación que presenta la propuesta **SIMIC	Total de semilleros vinculados 1
*Línea de Investigación: Modelos Animales Invertebrados	
Facultad: CITOHISTOLOGÍA **Asesor Metodológico:** **Área o Servicio:**	
[1]Duración (en meses): 12	
Costo Total: $ 12.441.634 **Desembolsable : $** 3.678.371 **No desembolsable $**8.763.263 **El proyecto será presentado a convocatoria interna: Si_X_ No____** **Descriptores / Palabras claves: Caenorhabditis elegans, luz, longevidad**	
Fecha de Radicación : Octubre 2020	

II. TABLA DE CONTENIDO:

Contenido

I. INFORMACION GENERAL DEL PROYECTO: 4
II. TABLA DE CONTENIDO: 5
III. RESUMEN DEL PROYECTO 6
IV. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO: 7
1. Formulación del problema de investigación 7
2. Marco Teórico 8
2.1 ANTECEDENTES 8
2.2 Envejecimiento 9
2.3 Caenorhabditis elegans 10
3. Objetivos 11
4. Metodología Propuesta 11
Mantenimiento y crecimiento de los cultivos bacterianos y de nematodos 12
Condiciones de luz 12
Experimento 1: Evaluación de la longevidad 12
Experimento 2: Tamaño de la cría 13
Experimento 3: Ensayo Dauer 13
Experimento 4: Tamaño corporal 13
5. Resultados/Productos esperados y potenciales beneficiarios: 15
6. Impactos esperados a partir del uso de los resultados: 16
7. Grupo y línea de investigación al que se adscribe la propuesta y hojas de vida de los investigadores: 16
V. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES 17
VI. PRESUPUESTO 18
VII. BIBLIOGRAFÍA: 21
ANEXO 1 22

III. RESUMEN DEL PROYECTO

El envejecimiento es un proceso de deterioro tanto estructural como funcional que predispone a adquirir enfermedades y desemboca en la muerte. Esta predisposición se aumenta a causa de factores del entorno como por ejemplo la luz solar, la cual produce efectos perjudiciales a la piel cuando nos exponemos a ella de forma excesiva.

En la actualidad se realizan investigaciones de envejecimiento en pequeños organismos como en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Sin embargo, no se sabe si su longevidad puede ser regulada por estímulos ambientales como la luz.

Por esta razón, el objetivo es evaluar el efecto de la luz en la longevidad de Caenorhabditis elegans, comparándola bajo diferentes condiciones de luz y estableciendo el tamaño de la cría bajo condiciones de luz seleccionada, mediante un estudio descriptivo experimental no aleatorio.

Se espera implementar el modelo de *C. elegans* para estudiar los procesos de envejecimiento a nivel celular y plantear nuevos estudios para evaluar otros factores que afectan el envejecimiento. Adicionalmente, la construcción de los ensayos nos permitiran en el futuro evaluar genes y moleculas candidatos que protejan las vias de señalización celular para ser usadas en humanos.

IV. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO:

1. Formulación del problema de investigación

El envejecimiento es un proceso biológico muy complejo. Durante el cual, la estructura y función celular del cuerpo disminuyen gradualmente, mientras que la susceptibilidad a las enfermedades y la muerte aumenta rápidamente. Son muchos los factores que pueden inducir al envejecimiento, como la contaminación ambiental, el estrés mental, la herencia y otros tanto dentro o fuera del cuerpo, en lo que se relaciona con la reducción de células regenerativas, la debilidad de los órganos y el aumento de radicales libres en el cuerpo.

Aunque el sol es la principal fuente de energía para todos los seres vivos, la exposición continua y prolongada a la luz solar produce efectos perjudiciales y mutaciones. La piel humana sufre envejecimiento extrínseco, conocido como fotoenvejecimiento tras la exposición a la luz solar, que se caracteriza por arrugas, sequedad, pérdida de elasticidad, etc.

Ahora sabemos que el proceso de envejecimiento, como tantos otros procesos biológicos, está sujeto a regulación por vías de señalización clásicas y factores de transcripción. Muchas de estas vías se descubrieron en organismos pequeños y de vida corta como levaduras, gusanos y moscas. El nematodo Caenorhabditis elegans se ha usado ampliamente como modelo en estudios de envejecimiento, gracias a su vida útil de 2 a 3 semanas, programas de desarrollo conservados, transparencia, tamaño pequeño, manejabilidad genética y un genoma completamente secuenciado.

Muchas mutaciones que prolongan la vida útil afectan los genes de respuesta al estrés o los sensores de nutrientes. Cuando la comida es abundante y el estrés bajo, estos genes apoyan el crecimiento y la reproducción. En condiciones difíciles, sus actividades cambian: algunas se activan y otras se rechazan y, como consecuencia, el animal experimenta un cambio fisiológico total dirigido a la protección y el mantenimiento de las células. Este cambio protege al animal del estrés ambiental y también prolonga la vida útil (2). No se sabe si la longevidad adulta y la formación dauer, puede regularse mediante estímulos ambientales. Basados en esto nos planteamos la pregunta de investigación:

¿La exposición continua a la luz afecta la longevidad de *C. elegans*?

El grupo utilizara a Caenorhabditis elegans para evaluar el efecto de la luz en la longevidad, ya que muchos grupos han descubierto que las mutaciones que retrasan el envejecimiento también posponen las enfermedades relacionadas con la edad. Este estudio ampliará la comprensión del proceso de envejecimiento en sí y nos permitirá proponer nuevos trabajos en esta línea de investigación.

2. Marco Teórico

2.1 ANTECEDENTES

A parte de los estudios clínicos realizados en humanos, la mayoría de trabajos sobre envejecimiento se han llevado a cabo en diferentes modelos animales. El primer reporte, en 1935 de McCay y col. mostro que la restricción calórica del 30-40% provocaba el aumento en la longevidad de las ratas. El estudio de biología comparada con modelos de vida media corta y genética bien conocida, con *Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster* y levaduras, ha permitido identificar al menos una centena de genes que cuando han sido imitados, alargan la vida, en muchos casos con mantenimiento de la vitalidad fisiológica (3).

La investigación sobre la genética del envejecimiento en *C. elegans* comenzó con Friedman y Johnson en 1987 al describir que una cepa mutante de Caenorhabditis elegans del gen age-1 (hx546) genero un aumento en el promedio de vida útil del 40% y en un promedio de vida máxima del 60% al crecer a 20°C, y a 25°C un aumento del 65% en la esperanza de vida media (25,3 días frente a 15,0 días) y un aumento del 110% en la esperanza de vida máxima (46,2 días frente a 22,0 días para los hermafroditas de tipo salvaje) (4).

Kenyon y col. en 1993 descubren que las mutaciones del gen daf-2 provocaba que los adultos hermafroditas, fértiles y activos de *Caenorhabditis elegans* sobrevivían más del doble del tiempo que el tipo salvaje. Sus hallazgos plantearon la posibilidad de que la longevidad del dauer no se debía simplemente una consecuencia de su crecimiento detenido, sino que sea el resultado de un mecanismo regulado por genes (5).

La síntesis y secreción de la hormona de crecimiento (HG) disminuye con el envejecimiento normal en todas las especies de mamíferos. A medida que disminuye la secreción de HG, hay una disminución en los niveles de factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1). Guarente y Kenyon en 2000, descubrieron una vía que regula tanto la vida útil como la diapausa en *C. elegans*, en los ambientes apropiados se estimuló el crecimiento hasta la adultez activándose la vía de señalización de insulina/IGF-1 (6). Barbieri y col. planteo que la vía de señalización de insulina/IGF-1 es un mecanismo de longevidad conservado evolutivamente desde las levaduras hasta los humanos (7).

Se creía que *Caenorhabditis elegans* carecía de la capacidad de detectar la luz debido a la ausencia de un sistema fotorreceptor y porque se aisló original en muestras de suelo. A pesar de la falta de ojos, *C. elegans* también responde a la luz, de acuerdo a Edwards y col.

mostraron que *C. elegans* acelera fuertemente su locomoción en respuesta a longitudes de onda de luz azul o más cortas, con máxima capacidad de respuesta a la luz ultravioleta (8). El trabajo de Gong y col. con C. elegans ha identificado el fotorreceptor LITE-1, un homólogo del receptor del gusto (GR). Este fotorreceptor es específico de UV y diferente de otros fotorreceptores encontrados en metazoos, microbios y plantas (9).

2.2 ***Envejecimiento***

El envejecimiento es un proceso natural, acompañado de toda clase de dolencias tanto físicas como mentales, derivadas del desarrollo de enfermedades metabólicas, inflamatorias, cardiovasculares o neurodegenerativas que comprometen el estado de salud de las personas. El proceso de envejecimiento se caracteriza por el deterioro progresivo y generalizado de las funciones de los diferentes órganos, que desembocara en la muerte tras el detrimento de numerosos procesos fisiológicos (10).

Las investigaciones que han utilizado a *Caenorhabditis elegans* han destacado el papel fundamental de varias vías de señalización conservadas en la determinación de la longevidad. Las tres vías principales de señalización que modulan el envejecimiento al influir en la vida útil son el factor de crecimiento insulina / similar a la insulina (IGF), diana de la rapamicina (TOR) y las vías de señalización de la línea germinal (figura 1). Aunque estas vías involucran distintos grupos de factores de transcripción, las tres vías modular el envejecimiento en *C. elegans* a través de mecanismos efectores parcialmente superpuestos, incluido el metabolismo de los lípidos y la autofagia (11).

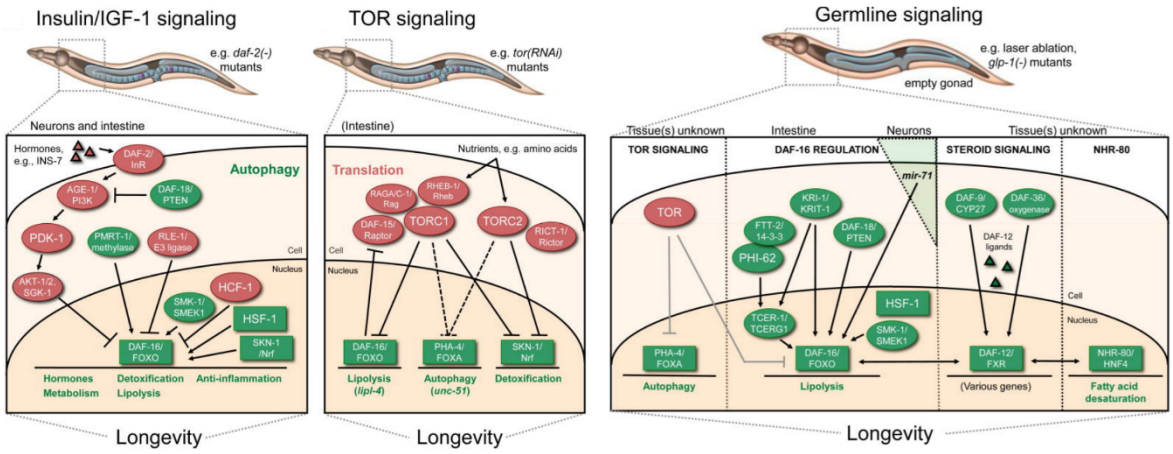


Figura 1 Señalización de Insulina/IGF-1, TOR y Línea germinal en el envejecimiento de C. elegans. (Tomado de Lapierre y Hansen)

El desafío de estos descubrimientos en el campo del envejecimiento es si se pueden traducir a los humanos, la mayoría de los científicos si lo creen ya que los hallazgos a nivel molecular del envejecimiento están altamente conservados en todas las especies. Adicionalmente, se han identificado factores que regulan el envejecimiento tanto a nivel genético como ambiental y que la manipulación de estos reguladores del envejecimiento, a menudo conservados, es suficiente

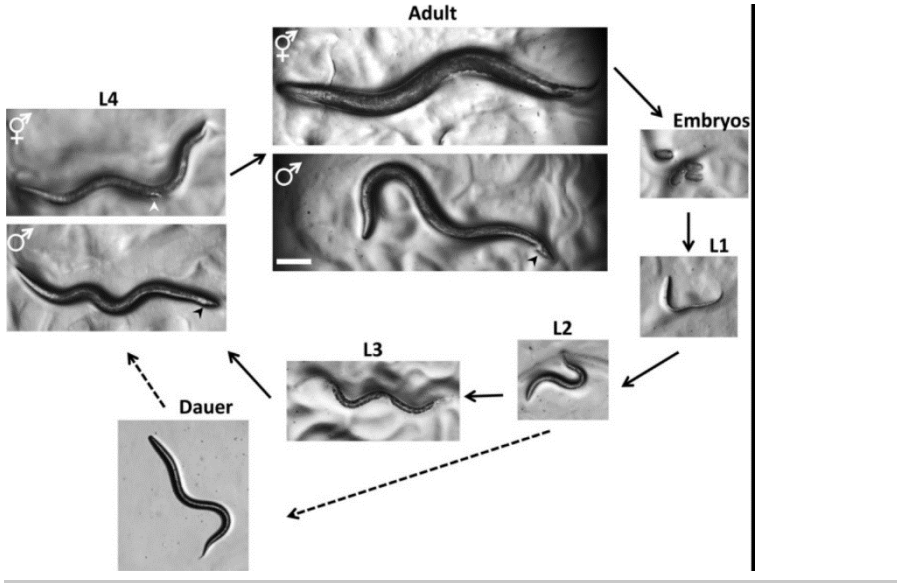
para prolongar la vida útil en organismos evolutivamente diversos, como levaduras, gusanos, moscas, ratones, primates no humanos y seres humanos(12).

2.3 ***Caenorhabditis elegans***

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre que se encuentra en todo el mundo. Las larvas recién nacidas miden 0,25 mm de largo y los adultos 1 mm de largo. Se utiliza como modelo para la biología de eucariotas gracias a sus características únicas de tamaño pequeño, gran tamaño de cría, facilidad de cultivo, bajo costo de mantenimiento, criopreservación a largo plazo, tiempo de generación rápido, transparencia, número y desarrollo de células invariantes y la capacidad de reducir la actividad genética. Además, es benigno para los humanos, debido a que no pueden crecer a la temperatura corporal y por lo tanto no puede crecer en humanos (1).

C. elegans de tipo salvaje tiene dos formas sexuales: hermafroditas autofertilizantes y machos. Los hermafroditas son hembras cuyas gónadas producen temporalmente espermatozoides antes de producir ovocitos. Los hermafroditas pueden producir hasta 300 huevos que son fertilizados por el esperma almacenado en la gónada. Si se aparean con machos, los hermafroditas son capaces de producir alrededor de 1000 descendientes (1).

En el laboratorio se han descrito dos ciclos de vida para *C. elegans*, dependiendo de las condiciones ambientales. Si están bien alimentados, los parásitos recién nacidos pasan por cuatro estadios larvarios (L1, L2, L3, L4) y alcanzan el estadio adulto después de 3 días. En condiciones estresantes (como hacinamiento, suministro limitado de alimentos y estrés por calor), los parásitos pueden cambiar durante la etapa L1 a una ruta de desarrollo alternativa y entrar en una etapa de depredador (L2d), seguida de la etapa de diapausa sin alimentación llamada dauer (un etapa alternativa L3) (Figura 2). Las larvas de Dauer son resistentes a diversas tensiones y pueden sobrevivir durante varios meses sin comida. A su regreso a condiciones más favorables, las larvas de dauer se alimentan nuevamente y reanudan su desarrollo (13).



3. Objetivos

GENERAL

Evaluar el efecto de la luz en la longevidad de *Caenorhabditis elegans*

ESPECIFICOS

Comparar la longevidad de *C. elegans* bajo diferentes condiciones de luz.
Establecer el tamaño de la cría bajo las condiciones de luz seleccionadas
Evaluar las diferencias en el tamaño corporal de las cepas al someterse a diferentes condiciones de luz.

4. Metodología Propuesta

- Diseño de Investigación

Se realizara un estudio descriptivo experimental, no aleatorio.

- Tipo y estrategia de muestreo **No aplica.**
- Tamaño de la muestra **Dependiendo del experimento, será el tamaño. Se especifica en cada uno n.**

- Criterios de selección

Se trabajaran dos cepas salvajes y una Dauer de *Caenorhabditis elegans* adquiridas en Caenorhabditis Genetics Center Universidad de Minesota, USA.

Cepa	Genotipo	Característica
N2	Cepa salvaje var Bristol	Aislada en Bristol, Inglaterra de compost de hongos
JU1440	Cepa salvaje	Aislada en Barcelona, España de fruta de palma podrida
CB1370	daf-2(e1370) III	Dauer sensible a la temperatura constitutivo. Mantener a 15°C. 100% dauers a 25°C. 15% de formación de dauer a 20°C. Larga vida M-MATE + BAJA TEMPERATURA SOLAMENTE.

- Estrategia de reclutamiento **No aplica.**
- **Metodología planteada:**

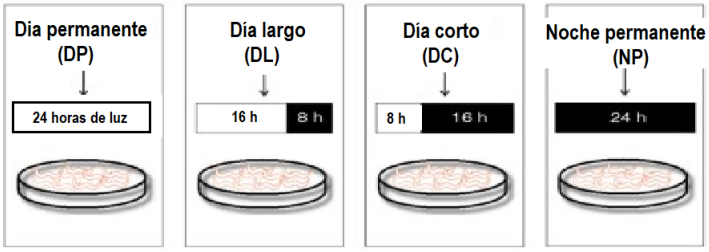
Mantenimiento y crecimiento de los cultivos bacterianos y de nematodos

Las placas de medio GN se mantendrán a 4°C hasta su uso. Dos días antes del uso, las placas se llevan a temperatura ambiente y se colocara 50 µl de cultivo líquido de E. coli OP50 en el centro de las placas y se deja crecer durante 2 días a temperatura ambiente. Luego, se colocan gusanos en las placas usando asa de platino estéril.

Condiciones de luz

Las placas con las larvas se colocaran en incubadora equipada con luz blanca fluorescente manejada con temporizador de horario a 22°C. Se trabajaran cuatro condiciones de luz:

DP	Día permanente	luces encendidas continuamente
DL	Día largo	luces encendidas de 6 a.m. a 10 p.m. y apagadas de 10 p.m. y las 6 a.m.
DC	Día corto	luces encendidas de 10 a.m. a 6 p.m. y apagadas de 6 p.m. y las 10 a.m.
NP	Noche permanente	en caja de cartón cubierta con papel metálico



Experimento 1: Evaluación de la longevidad

Los gusanos se sincronizan por el método de puesta de huevos colocando adultos jóvenes durante 4h en placas sembradas de bacterias y luego retirándolos. Todos los análisis de la vida útil se realizaran a partir de 100 gusanos por condición a 22°C (n=100). La viabilidad se evaluara cada día bajo microscopio estereoscópico, alrededor del mediodía, que corresponderá a la fase de luz de cada tratamiento de luz (DP, DL y DC), la muerte se determinara cuando los gusanos no respondan a un toque suave con el asa. Los gusanos pertenecientes al grupo NP se tendrán en una caja oscura cuando se retiren de la incubadora, se hará el recuento y se coloca inmediatamente a la caja oscura.

Experimento 2: Tamaño de la cría

El tamaño total de la cría se mide colocando solos gusanos L4 tardíos en condiciones DP o NP. Luego, cada gusano adulto se transfiere a una nueva placa cada 12h y la placa anterior se mantiene a 20°C en la oscuridad durante otras 48h y se realiza conteo de progenie viva, visible como larvas L3-L4. Este procedimiento se repite hasta que no se observen progenies vivas después de 4 pases consecutivas (período de 48 h). Las progenies de ocho gusanos se contaran por condición de luz (n = 8).

Experimento 3: Ensayo Dauer

Los adultos jóvenes daf-2 se colocan en placas de medio GN sembradas y se les permite poner huevos durante 4h a 15°C. Los adultos se retiran y las placas se colocaron a 22°C bajo condiciones permanentes de luz o sin luz. Después de 72h, se observaran los gusanos bajo un microscopio estereoscópico y se contaran como dauer o adultos. Para cada condición, (n = 300).

Experimento 4: Tamaño corporal

La superficie del cuerpo del gusano se calculara para gusanos adultos D1 expuestos a diferentes condiciones de luz desde la eclosión. Se hará registro fotográfico de gusanos anestesiados con una solución de levamisol 1mM y se montan inmediatamente en una base de agarosa colocada sobre lámina portaobjetos. Se usa vaselina para sellar el cubreobjetos. El software Image J se utilizara para medir la superficie corporal de gusanos individuales (n = 35).

- Estrategia de seguimiento: Se realizaran conteos y mediciones diarias según el experimento

Definición de Variables :

Nombre de la Variable	Definición Operativa	Relación	Naturaleza y Nivel de Medición	Nivel Operativo
LUZ	Condición de luz	Independiente	Cualitativa Nominal	Horas
EDAD	Tiempo que vive un adulto	Dependiente	Cuantitativa continua	Días
CRIA	Progenie viva	Dependiente	Cuantitativa discreta	Conteo de larvas L3-L4
DAUER	Generación de Dauer	Dependiente	Cuantitativa discreta	Conteo de larvas Dauer
Tamaño	Longitud de la larva	Dependiente	Cuantitativa continua	milimetros

- Control de sesgos: Para evitar sesgos de selección de la muestra los parásitos de todos los experimentos deben ser adultos jóvenes obtenidos post sincronización. Los sesgos del observador se evitaran al realizar entrenamiento de lecturas previas a los experimentos, esto se lograra haciendo ensayos pilotos para adquirir destreza y rapidez en las lecturas.
- Instrumento de Medición: Las lecturas se realizaran diariamente y se llevaran a Hoja Excel de acuerdo al experimento.
- Procesamiento de Datos: Los resultados se procesaran por el programa Stata y se presentaran como media ± error estándar de la media (SEM). Los grupos se compararan usando la prueba t de Student de dos colas. Las curvas de vida útil se trazaran utilizando la estimación de Kaplan-Meier.

Plan de Análisis:. No aplica

Consideraciones Éticas: VER ANEXO 1

Debido a que se trata de un estudio sin intervención y sin riesgo para los pacientes no se requiere del consentimiento informado.

El estudio no generara riesgo porque no involucra seres humanos. La bioseguridad de los investigadores está garantizada por la adherencia a los protocolos establecidos por el laboratorio y el entrenamiento. Por ser un invertebrado que crece únicamente entre 20 y 25°C su supervivencia no es posible a la temperatura humana de 37°C.

Se utilizará cepa de *Escherichia coli* OP50 donadas por el laboratorio de Biotecnología y Genética de UCMC.

De acuerdo a la resolución 8430 de 1993 del Ministerio se Salud, Capítulo I:

De la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, informamos:

1. El proyecto se realizará en el Laboratorio de Microbiología que cuenta con la infraestructura y equipos para el manejo de microorganismos patógenos.
2. El laboratorio cuenta con manual de procedimientos y manual de riegos y bioseguridad.
3. El material contaminado que se genere durante la investigación será manejado de acuerdo al manual de manejo de residuos de la FUCS y lo realizara la auxiliar de laboratorio entrenada para este fin.
4. *Escherichia coli OP50* pertenece al grupo de microorganismos de riesgo I: Microorganismos que representan escaso riesgo para el individuo y para la comunidad.
5. No encontramos ningún tipo de restricciones éticas sobre el manejo de larvas de insectos como modelo de infección, las larvas que sobrevivan serán congeladas para provocar su muerte sin stress y el material biológico que no se procese histológicamente será esterilizado y dispuesto en bolsa roja para su eliminación final.
6. Los estudiantes de semilleros que formarán parte del trabajo recibirán un entrenamiento en manejo de microorganismos y su riesgo. Se les dará a conocer los manuales y procedimientos en caso de accidentes y serán supervisados por Marcela Gómez, quien posee el conocimiento y la experiencia en bioseguridad en microbiología.
7. Los procesos histológicos serán realizados por los profesores y estudiantes de Citohistología con larvas muertas y fijadas previamente.
8. Se contará con las barreras de protección de bioseguridad constantemente (el material fue solicitado para el proyecto).
9. Las pruebas serán realizadas en la cabina de seguridad biológica clase II para evitar la contaminación de los estudiantes al manipular los microorganismos.
10. La universidad cuenta con póliza ARL (Administradora de Riesgos Laborales Bolívar) para estudiantes y trabajadores de la universidad. En caso de accidente

de bioseguridad durante el desarrollo del proyecto se seguirá el protocolo establecido por la universidad y se realizara el reporte en http://www.fucsalud.edu.co/index.php/es/accidente-laboral .

Efectos ambientales: al finalizar los experimentos las larvas y huevos de *C. elegans* y cultivos de *E. coli* serán sometidos a procesos de esterilización en autoclave y almacenados en bolsa roja. Las bolsas rojas serán recogidas por la compañía contratada por la FUCS para incineración, de acuerdo al protocolo existente en el Instituto de Ciencias Básicas.

5. Resultados/Productos esperados y potenciales beneficiarios:

- **Relacionados con la generación de conocimiento y/o nuevos desarrollos tecnológicos:**

Los resultados permitirán establecer metodologías aplicables para estudiar otros factores que afecten el proceso de envejecimiento utilizando como herramienta a *C. elegans.*

- **Conducentes al fortalecimiento de la capacidad científica nacional:**

Esta investigación se desarrollará por profesores FUCS y estudiantes del semillero SIMIC, generando la participación activa de estudiantes en los procesos de investigación de la FUCS. El trabajo permitirá la interdisciplinaridad de los grupos de investigación Patología, Célula y Tejido y Ciencias Básicas en Salud (CBS) y la generación de nuevos proyectos con estudiantes.

Buscamos que muchos estudiantes de diferentes carreras se adhieran en forma activa al semillero SIMIC, al conocer los resultados de nuestro trabajo.

- **Dirigidos a la apropiación social del conocimiento:**

Los estudiantes del semillero presentaran sus resultados en congresos de semilleros, asegurando la difusión del conocimiento y de las experiencias investigativas.

Se realizará 1 artículo de investigación, que permitan presentar los resultados obtenidos.

6. Impactos esperados a partir del uso de los resultados:

Se espera implementar el modelo de *C. elegans* para estudiar los procesos de envejecimiento de los invertebrados.

Los resultados nos permitirán plantear nuevos estudios para evaluar factores que afectan los procesos de envejecimiento. La construcción de los ensayos nos permitirá en el futuro evaluar genes y moléculas candidatos que protejan las vías de señalización celular.

7. Grupo y línea de investigación al que se adscribe la propuesta y hojas de vida de los investigadores:

Grupo: Ciencias Básicas en Salud.
Línea: Modelos Animales Invertebrados

V. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Responsable	Mes					
		2	**4**	**6**	**8**	**10**	**12**
Revisión bibliográfica	Todos	X	X	X	X	X	**X**
Solicitud de compra de reactivos	Investigador Principal	X					
Selección del protocolo	Investigador Principal y Coinvestigadores	X					
Recuperación de cepas	Investigador Principal		X				
Entrenamiento en mantenimiento de cepas	Todos			X			
Montaje experimentos	Todos				X		
Análisis estadístico	Todos					X	
Elaboración de articulo	Todos					X	**X**
Elaboración de Poster	**Todos**						**X**

VI. PRESUPUESTO

FUCS	FUNDACION UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD	VERSIÓN 01
	PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	CODIGO: F-PI-FEP-04
	PRESUPUESTO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	FECHA 14-02-2018

Tabla 1 Presupuesto global de la propuesta por fuentes de financiación

RUBROS	FINANCIADO POR LA FUCS		FINANCIADO POR CONTRAPARTIDA	TOTAL
	Desembolsable	No Desembolsable		
PERSONAL	700000	6150542	0	6850542
OTRO PERSONAL	0	0	0	0
EQUIPOS	0		0	0
EQUIPOS DE USO PROPIO *		2612721		2612721
SOFTWARE	0		0	0
MATERIALES	2978371			2978371
VIAJES **				0
SALIDAS DE CAMPO				0
SERVICIOS TECNICOS				0
CAPACITACIÓN	0		0	0
MATERIAL BIBLIOGRAFICO	0			0
PUBLICACIONES Y PATENTES	0			0
TOTAL	3678371	8763263		12441634

*Corresponde al 10 % de el valor total del equipo (año)

**Este rubro será evaluado una vez se obtengan productos de difusión.

Presupuesto detallado por rubros:

Tabla 2 Personal				Recursos					
Nombre	Formacion academica	Función dentro del proyecto	Dedicación Hora/Semana	Financiado por FUCS		Financiado por contrapartida	Valor mensual	Numero de meses	Total
				Desembolsable	No Desembolsable				
Jeannette León	Especialista	Investigador Principal	2	500000	6348934		337472	12	6848934
Marcela Gómez	Magister	Coinvestigador Lider	1	200000	3491934		198604	12	3691934
									0
			TOTAL	700000	9840868	0	536076	24	10540868

Tabla 7 Materiales y suministros

Materiales	Justificación	Valor unitario	Cantidad	Valor Total
Cepas C elegans	Cepas	92000	3	276000
Cajas de Petri plásticas 94x16 cajax480	Cultivos C elegans	233240	2	466480
Cajas de Petri plasticas 50x15 cajax600	Cultivos E coli	356762	2	713524
10micrascaja 40x25unid	Mantenimiento	230622	1	230622
Puntas desechables blancas 10uL bolsa	Procesamiento	35700	1	35700
Puntas desechables amarillas 200uL bolsa	Procesamiento	41650	1	41650
Puntas desechables azuless 1000uL bolsa	Procesamiento	71400	1	71400
Guantes nitrilo S cajax100	Bioseguridad	67830	2	135660
Guantes nitrilo M cajax100	Bioseguridad	67830	2	135660
Tapabocas cajax50	Bioseguridad	77350	2	154700
Batas desechables blanca M UNIDAD	Bioseguridad	8925	30	267750
Lampara UV longitud 254/365nm	Procesamiento	327250	1	327250
Laminas portaobjetos x50	Procesamiento	7735	10	**77350**
Laminillas x100	Procesamiento	8925	5	**44625**
TOTAL				**2978371**

Plan de ejecución presupuestal:

Tabla 13. Plan de ejecución presupuestal:

Total presupuesto desembolsable: $ 3678371 **Número de meses proyectados por cronograma: 12**			
	Mes 1	**Mes 12**	**Total por actividad**
Compra de insumos	2978371		2978371
Pago Investigadores		70000	70000
Total	2978371	70000	**3678371**

VII. BIBLIOGRAFÍA:

1. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis elegans. Genetics. 2015;200(2):387-407. Epub 2015/06/20.

2. Kenyon CJ. The genetics of ageing. Nature. 2010;464(7288):504-12. Epub 2010/03/26.

3. Pérez V, Sierra F. Biología del envejecimiento. Revista médica de Chile. 2009;137:296-302.

4. Friedman DB, Johnson TE. A mutation in the age-1 gene in Caenorhabditis elegans lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. Genetics. 1988;118(1):75-86.

5. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type. Nature. 1993;366(6454):461-4. Epub 1993/12/02.

6. Kenyon C. A conserved regulatory system for aging. Cell. 2001;105(2):165-8. Epub 2001/05/05.

7. Barbieri M, Bonafè M, Franceschi C, Paolisso G. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2003;285(5):E1064-71. Epub 2003/10/10.

8. Edwards SL, Charlie NK, Milfort MC, Brown BS, Gravlin CN, Knecht JE, et al. A novel molecular solution for ultraviolet light detection in Caenorhabditis elegans. PLoS biology. 2008;6(8):e198. Epub 2008/08/09.

9. Gong J, Yuan Y, Ward A, Kang L, Zhang B, Wu Z, et al. The C. elegans Taste Receptor Homolog LITE-1 Is a Photoreceptor. Cell. 2016;167(5):1252-63.e10.

10. Barzilai N, Gabriely I, Atzmon G, Suh Y, Rothenberg D, Bergman A. Genetic studies reveal the role of the endocrine and metabolic systems in aging. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(10):4493-500.

11. Lapierre LR, Hansen M. Lessons from C. elegans: signaling pathways for longevity. Trends Endocrinol Metab. 2012;23(12):637-44. Epub 2012/08/30.

12. Gao AW, uit de Bos J, Sterken MG, Kammenga JE, Smith RL, Houtkooper RH. Forward and reverse genetics approaches to uncover metabolic aging pathways in Caenorhabditis elegans. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2018;1864(9, Part A):2697-706.

13. Frézal L, Félix M-A. C. elegans outside the Petri dish. eLife. 2015;4:e05849.

ANEXO 1

CONSIDERACIONES ETICAS PARA PROYECTOS CON MODELOS ANIMALES INVERTEBRADOS EN LA FUCS

Desde 1986 la Unión Europea implantó la legislación para el uso de animales con objetivos científicos. El 22 de septiembre de 2010 se adoptó la Directiva 2010/63/EU, que actualizó y reemplazó la de 1986 (Directive 86/609/EEC), y se hizo efectiva a partir de enero de 2013. Su objetivo es fortalecer la anterior legislación, mejorar el bienestar animal y asegurar la aplicación del Principio de las Tres R. Según los datos recogidos en 2011, los roedores y los conejos representaron el 80 %, los animales de sangre fría el 12,5 % y las aves, el 5,9 % del total. Animales invertebrados no fueron considerados en esta reglamentación (1).

En Colombia, la resolución 08430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989, presenta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales. En la cual se describe la forma como se garantizarán los principios éticos en investigación y la protección que asumirán los investigadores para prevenir riesgos a ellos mismos como terceros si es el caso.

Russell y Burch (1959) introdujeron una normatividad alternativa en el uso de animales en experimentación conocidas como “las tres erres”: ***reducción:*** reducir las pruebas a realizar y los animales a utilizar al mínimo, ***reemplazo:*** reemplazar el estudio con animales por otros métodos validados y ***refinamiento*** minimizar el estrés, el dolor y la angustia en los animales; esto con la finalidad de generarle al animal de experimentación el menor sufrimiento o daño posible (2). El concepto de alternativas está estrechamente relacionado con las 3R particularmente con el reemplazo y alternativas que también puede significar modelos animales nuevos y mejores. Por ejemplo, los sistemas biológicos no mamíferos, como los insectos y los gusanos (nematodos), se utilizan cada vez con más frecuencia para estudiar la biología básica en enfermedades como la diabetes y la obesidad (3).

Los Comités Institucionales para el Cuidado y Uso de Animales (CICUAL- CICUALES), han sido asociados generalmente con grupos de asesores o juntas de expertos que evalúan y dan recomendaciones sobre proyectos de investigación que utilizan animales de laboratorio, sin embargo, en las últimas décadas se les reconoce más como comités que evalúan la utilización de animales tanto en docencia como en investigación, principalmente por los cambios en la legislación de muchos países, que entienden al animal de laboratorio o animal de experimentación como todo animal que independiente de su clasificación taxonómica es utilizado como modelo de observación de fenómenos biológicos. La Red CICUALES (Comités de Cuidado y Uso de Animales) de Colombia, basados en las directrices internacionales que hasta el momento definen que los animales invertebrados no sean evaluados en los comités de manejo animal, determinaron no exigir a sus investigadores someter a revisión los protocolos que involucre el uso de animales invertebrados (Información enviada al grupo de Ciencias Básicas de la FUCS).

Los investigadores de la FUCS seguiremos las consideraciones éticas RD 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, al trabajar con modelos animales invertebrados:

1. **Respeto por la vida, por el dolor o el sufrimiento a que éstos pueden ser sometidos en los trabajos bajo su responsabilidad, dentro de la cual se incluye la búsqueda de alternativas al modelo experimental (3).**
   La liga internacional de los derechos del animal y la U.N.E.S.C.O promulgaron la Declaración Universal de los Derechos del Animal en las Naciones Unidas en 1976. En su articulado se indica que:
   Art. 8º: La experimentación animal que implique un sufrimiento físico o psicológico es incompatible con los derechos del animal, tanto si se trata de experimentaciones médicas, científicas, comerciales, como de toda otra forma de experimentación.
   De acuerdo con National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research (NC3Rs), en el apartado de Reemplazo se mencionan tres categorías, en la de "Remplazo parcial" refiere que "El reemplazo parcial incluye el uso de algunos animales que, según el pensamiento científico actual, no se consideran capaces de sufrir dolor. Esto incluye invertebrados como Drosophila, **gusanos (nematodos),** amebas sociales, y formas inmaduras de vertebrados (4).

2. **El reemplazo y reducción de la utilización de animales en procedimientos y el refinamiento de la cría, el alojamiento, los cuidados y la utilización de animales en tales procedimientos (4, 5).**
   - No se podrán utilizar animales invertebrados en vías de extinción.
   - Los animales invertebrados que se utilicen tendrán una procedencia bien establecida, al ser adquiridos en casas comerciales o laboratorios reconocidos. Esto evitara rechazar los resultados y repeticiones de experimentos.
   - Se proporcionarán los ambientes adecuados para la sobrevivencia de los modelos invertebrados, sin provocar su muerte por descuido de sus cuidadores
   - Evitar repetir procedimientos y que el número de copias sea el más bajo, pero representativo estadísticamente.
   - En caso de que sea necesario la eutanasia del animal invertebrado, se utilizara un procedimiento previo que reduzca el dolor, como es el enfriamiento.
   - Durante los tiempos en que no sea utilizado el animal invertebrado, se evitara generar crías innecesarias. En el caso de los netatodos se criopreservarán en nitrógeno líquido para evitar generar mutaciones.
   - Las cepas aisladas del medio ambiente deberán ser georreferenciadas, identificadas y remitidas a centros de referencia para su confirmación, antes de ser utilizadas en estudios.

- Todos los proyectos requerirán la evaluación y autorización de los procedimientos en que se utilicen animales.

3. **Nos adherimos a la Declaración Universal de los Derechos del Animal promulgada por las Naciones Unidas en 1976 (6)**

- Considerando que todo animal posee derechos.
- Considerando que el desconocimiento y el desprecio de dichos derechos han conducido y siguen conduciendo al hombre a cometer crímenes contra la naturaleza y contra los animales.
- Considerando que el reconocimiento por parte de la especie humana de los derechos a la existencia de las otras especies de animales constituye el fundamento de la coexistencia de las especies en el mundo.
- Considerando que el hombre comete genocidio y existe la amenaza de que siga cometiéndolo.
- Considerando que el respeto hacia los animales por el hombre está ligado al respeto de los hombres entre ellos mismos.
- Y considerando que la educación debe enseñar desde la infancia a observar, comprender y amar a los animales.

4. **Novedades en legislaciones de Animales Invertebrados Internacionales y Nacionales**

Los investigadores estarán al tanto de los avances en el conocimiento de los animales invertebrados que puedan cambiar en un momento dado sus condiciones de bienestar o sufrimiento innecesario durante la experimentación para adherirse a las nuevas normativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Europea C. Comisión Europea. Informe de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo. Séptimo Informe sobre las estadísticas relativas al número de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea. Bruselas2013.

2. Osorio A. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. Revista Colombiana de Bioética. 2006;1(1):163-83.

3. Perez M, González A, Camiña M, Hernández D. La ética en la experimentación animal:el principio de las tres erres. IBADER, editor2018.

4. Research NCftRRRoAi. The 3Rs. 2020.

5. Investigación Cdëd. Ensayos con animales de experimentación y ensayos clínicos: información general y normativas. España: Universidad de Murcia; 2020; Available from: https://www.um.es/web/comision-etica-investigacion/experimentacion/ensayos-animales.

6. ONU. Declaración Universal de los Derechos del Animal 1978.