

Implicaciones genéticas en la longevidad: análisis multigénico en el macho y en la hembra

Ana Lloret Alcañiz, Juan Sastre Belloch, Federico V. Pallardó Calatayud y José Viña Ribes

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. Valencia. España.

RESUMEN

Introducción: las hembras viven más que los machos. Hemos demostrado que los estrógenos son capaces de aumentar la expresión de genes asociados a la longevidad. Sin embargo, nos hemos centrado en el estudio de genes cuya relación con la longevidad está muy bien establecida. Por esto, nos planteamos el estudio de 9.000 genes mediante el método del Genechip. Estudiamos la expresión de estos genes en machos y los comparamos con la expresión en las hembras.

Material y método: la expresión de los genes se estudió mediante la tecnología Affymetrix. En esencia, aislamos ARN total y lo pasamos a ADNc de doble cadena por retrotranscripción. Obtenemos ARN marcado con biotina a partir del ADNc y lo purificamos. La muestra se introduce en un *bioarray* U34A y se procesa en la estación de fluidos Affymetrix. Los resultados se escanean y analizan con el programa Microarray Suite 3.0.

Resultados: encontramos 33 genes cuya expresión es significativamente mayor en el macho que en la hembra y 53 genes que se sobreexpresan en la hembra comparada con el macho. Estudiamos en particular los genes cuya expresión cambiaba más de 2 veces, y vemos que todos estos genes están relacionados con el envejecimiento. Por tanto, encontramos genes que se sobreexpresan en la hembra respecto del macho y previamente no habían sido identificados como relacionados con el sexo.

Conclusiones: el análisis multigénico es una herramienta útil para identificar genes sobreexpresados en las hembras en relación con los machos y que sean relevantes en el proceso de envejecimiento.

Palabras clave

Genechip. Affymetrix. Sexo. Análisis multigénico. Longevidad.

Este trabajo ha sido financiado gracias al Premio de la SEGG 2004 de investigación en Geriatria y Gerontología concedido a JVR, como investigador principal, y gracias a los proyectos SAF2004-03755, cuyo investigador principal es el Dr. José Viña, y el proyecto GV2004-A-112, cuya investigadora principal es la Dra. Ana Lloret.

Correspondencia: Dr. J. Viña Ribes.
Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina.
Universidad de Valencia.
Avda. Blasco Ibáñez, 15. 46010 Valencia. España.
Correo electrónico: jose.vina@uv.es

Recibido el 30-12-05; aceptado el 3-02-06.

Genetic implications in longevity: a multigenic analysis in males and females

ABSTRACT

Introduction: females live longer than males. We have traced the gender-associated advantage to the up-regulation of longevity-associated genes by oestrogens. However, we restricted our analysis to the well-known longevity-associated genes. A more general approach can be adopted through the use of Genechip analysis, which allows the expression of 9,000 genes to be studied. We studied the expression of these genes in the brains of male rats and compared the results with those in females.

Material and method: genome-wide expression was studied using Affymetrix technology. Essentially, total ARN was extracted and double-stranded cDNA was obtained by reverse transcription. New biotinylated complementary ARN was obtained and purified. The sample was hybridised and introduced into an Affymetrix fluidics station. The results were scanned and analysed by a Microarray Suite 3.0.

Results: we found 33 genes whose expression was significantly increased in males versus females and 53 genes that were over-expressed in females in comparison with males. In particular, we studied genes whose expression was twofold higher or more in males than in females and found that these genes were all related to ageing. Thus, we identified age-related genes that are over-expressed in females when compared with males and whose expression was not previously identified as being gender-specific.

Conclusions: genome-wide analysis is a powerful tool to identify genes that are over-expressed in females versus males and to determine which of these genes are relevant to the study of ageing.

Key words

Genechip. Affymetrix. Gender. Multigenic analysis. Longevity.

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores logros del siglo xx es el aumento de la esperanza de vida en nuestra especie. En Europa, ésta se ha duplicado entre 1900 y 1992¹. En todos los casos la esperanza de vida de las mujeres supera a la de los varones. Es más, el porcentaje de diferencia de longevidad entre ambos sexos es mayor en épocas en que la morta-

lidad se debe fundamentalmente a enfermedades asociadas al envejecimiento. De hecho, en España en 1900, la esperanza de vida para los varones era de 33,7 años y para las mujeres, de 35,1, es decir, un 3,8% superior en las mujeres que en los varones. En 1992, la esperanza de vida de los varones era de 73,7 años, mientras que la de las mujeres era 83,8, lo cual supone un 9,9% más en las mujeres que en los varones.

La base de la diferencia de esperanza de vida entre varones y mujeres está aún por esclarecer. Este fenómeno no es atribuible exclusivamente a diferencias sociológicas, puesto que también se reproduce en otras especies. En nuestro laboratorio, las ratas Wistar hembra muestran un 16% más vida media que las ratas Wistar macho, y en este caso ambos sexos están sometidos a las mismas condiciones de vida.

En estudios anteriores de nuestro grupo demostramos que las diferencias de longevidad entre machos y hembras tienen una base biológica: los estrógenos suponen una ventaja para la supervivencia de las hembras, puesto que inducen la expresión de enzimas antioxidantes, y ello las protege del estrés oxidativo y, por tanto, les confiere una mayor longevidad². Continuando con nuestra línea de investigación, hemos querido averiguar si existen diferencias de expresión génica entre hembras y machos a la misma edad cronológica. Para ello, hemos utilizado la plataforma de análisis multigénico Genechip de la compañía Affymetrix®. Esta técnica nos permite analizar la expresión de 9.000 genes a la vez. Hemos observado que en la diferencia de longevidad entre sexos hay una base génica que describimos en este trabajo.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales de experimentación

Se utilizó el cerebro de una rata macho y el de una hembra de 3 meses de edad. Se sacrificó a los animales por decapitación y se les extrajo el cerebro, que inmediatamente fue congelado con nitrógeno líquido.

Preparación de las muestras

El protocolo que debe seguirse en la preparación de las muestras es el recomendado por la empresa Affymetrix®, y es de suma importancia no realizar otra clase de métodos de trabajo cuyo buen rendimiento no haya sido confirmado.

El protocolo de preparación de las muestras consta de 10 pasos:

1. Aislamiento de ARN total. Conseguimos aislar ARN de buena calidad usando TRIzol (Sigma-Aldrich Química). Seguidamente realizamos lavados usando el kit QIAGEN Rneasy Total RNA Isolation (Invitrogen Corporation) y precipitamos el ARN con etanol.

2. Cuantificación del ARN. Cuantificamos el ARN por análisis espectrofotométrico, usando el cálculo convencional de absorbancias en el que se sabe que 1 OD a 260 nm equivale a 40 µg de ARN por ml. Además de la absorbancia a 260 nm, calculamos la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración y la pureza de la muestra. El cociente A260/A280 debe ser cercano a 2,0 en el caso de ARN puro.

También realizamos una electroforesis de agarosa convencional, para comprobar la calidad de las bandas mayoritarias de ARN ribosómico.

3. Síntesis de ADNc de doble cadena a partir del ARN total. Se usan aproximadamente 10 µg de ARN total como material de partida. Para sintetizar la primera cadena de ADNc y posteriormente la segunda cadena, seguimos las instrucciones proporcionadas por Gibco BRL (Invitrogen Corporation) SuperScript Choice System y el cebador T7-(dT)24 sintetizado por la compañía Affymetrix® (Santa Barbara): 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTA-TAGGGAGGCGG-(dT)24-3'.

4. Lavado del ADNc de doble cadena. Este paso lo realizamos usando la extracción con fenol/cloroformo/isoamilo alcohol (25:24:1) y el kit Phase Lock Gels (PLG) de la marca comercial Eppendorf. El kit PLG forma una barrera inerte de separación entre las fases acuosa y orgánica de la extracción con fenol/cloroformo. Esta barrera sólida permite recuperar la muestra (fase acuosa) y minimiza la contaminación de la interfase.

5. Síntesis del ARNc marcado con biotina (IVT). Para llevar a cabo este paso usamos el kit RNA Transcript Labeling (Enzo), que fundamentalmente consiste en transcribir el ADNc a ARNc, pero usando nucleótidos marcados con biotina.

6. Lavado y cuantificación del IVT ARNc. Para el lavado del ARNc marcado, usamos las columnas Rneasy spin de QIAGEN, y seguidamente realizamos una precipitación con etanol absoluto. La concentración de ARN se calcula espectrofotométricamente igual que en el paso 3.

7. Fragmentación del ARNc previo a la hibridación y gel de electroforesis. Fragmentamos el ARNc por calor (94 °C; 35 min) y estimamos el tamaño de los transcritos marcados mediante electroforesis en gel de agarosa.

8. Hibridación de la muestra. Realizamos este paso en un horno de hibridación en el que la muestra se introduce en un *bioarray* U34A que contiene 9.000 genes de rata, y mantenemos en agitación constante durante 16 h a una temperatura de 45 °C.

9. Lavado y tinción de los bioarrays. El proceso de lavado y tinción de los *bioarrays* U34A lo llevamos a cabo en una estación de fluidos acoplada a un ordenador. Este aparato procede a la tinción de los *bioarrays* por medio de

anticuerpos biotinilados y, posteriormente, realiza varias fases de lavado con el fin de eliminar el exceso de señal.

10. Escaneado de los bioarrays. Para ello usamos el escáner Agilent de la compañía Hewlett Packard (Palo Alto). La imagen (archivos .cel) se convierte posteriormente en un archivo de datos (archivos.dat).

Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos se analizan por medio de varios programas informáticos: el Microarray Suite 3.0, el Data Mining Tool 2.0 y la plataforma Netaffx, que permite identificar la función de los genes y las proteínas asociadas a ellos.

RESULTADOS

La figura 1 muestra los cambios encontrados en la expresión de los genes comparando la hembra y el macho. De los 9.000 estudiados, hemos encontrado 33 genes cuya expresión es significativamente mayor en el macho que en la hembra. El 25% de estos genes corresponden a la subfamilia del citocromo p450.

Asimismo, hemos encontrado 53 genes, de los 9.000 estudiados, cuya expresión es mayor en la hembra que en el macho. De ellos hemos estudiado los que muestran el mayor grado de expresión, que corresponden a los especificados en la tabla 1. En esa tabla se menciona las diferencias de expresión respecto al macho, así como la función de la proteína asociada al gen.

DISCUSIÓN

La teoría de los radicales en el envejecimiento³ es una de las más fundamentadas experimentalmente en la actualidad. En nuestro grupo demostramos que las diferencias de longevidad entre machos y hembras se pueden explicar por el hecho de que las hembras poseen más defensas antioxidantes que los machos. Sabemos que sobreexpresan las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y manganeso superóxido dismutasa. Asimismo,

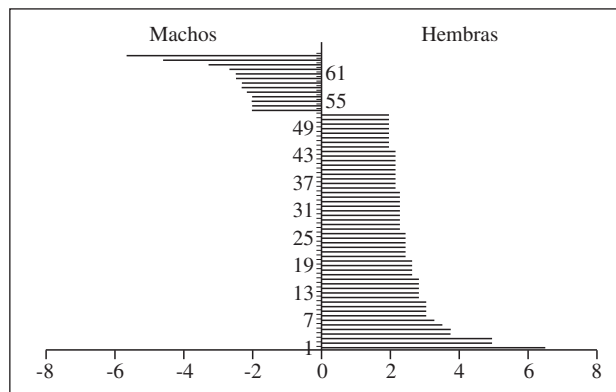


Figura 1. Comparación de la expresión de genes entre machos y hembras. La gráfica muestra el número de veces que cambian las hembras con respecto a los machos. Cada línea es un gen individual. Las líneas hacia la izquierda indican que en el macho ese gen se expresa más y las líneas hacia la derecha, que se expresa más en la hembra.

también demostramos que la expresión del gen 16S ARNr mitocondrial es significativamente menor en los machos que en las hembras². Se sabe que la expresión de este gen disminuye con la edad, y esta disminución se correlaciona con la curva de supervivencia de la mosca *Drosophila*⁴. Esto supone que, con una misma edad cronológica, las hembras poseen una edad biológica menor que los machos, es decir, las hembras son biológicamente más jóvenes que los machos.

Con el trabajo que aquí presentamos pretendemos hacer un barrido de la expresión de 9.000 genes a la vez para ver si existen diferencias entre el macho y la hembra. Esta expresión global nos ayudará a comprender la complejidad del proceso biológico del envejecimiento e identificar nuevas dianas que puedan tener relación con la diferencia de vida máxima de hembras y machos, de modo que nunca antes hubiera sido posible.

Con respecto a los genes cuya expresión es mayor en el macho, hemos visto que un porcentaje importante pertenece a la familia del citocromo p450. Está descrito que miembros de esta familia en rata aumentan su expresión

TABLA 1. Expresión de genes que más aumentan en la hembra respecto al macho

Nombre del gen	Cambio relativo al control	Función de la proteína
Proteína hnRNP	4,6	Tráfico citosólico de ARN
Calgranulina	4	Proteína de unión a calcio
Neurofisina	4	Transporte de vasopresina
Vasopresina	4	Hormona vasopresina
Defensina 3A (parecida a la SOD)	3,23	Propiedades antimicrobianas
Osteopontina	2,3	Proteína de la matriz ósea
Procolágeno (tipo 1)	2,2	Precursor de colágeno
Receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas	5,7	Receptor de membrana

con el envejecimiento⁵. El que estén más expresados en el macho, pues, nos dice que tendrían una edad biológica mayor que las ratas hembra de su misma edad cronológica.

Con respecto a los genes cuya expresión es mayor en la hembra, vemos que todos disminuyen su expresión con el envejecimiento. Esto nos indica que la hembra tiene más expresión de estos genes que el macho y, por tanto, están más protegidas de los cambios génicos que se dan con la edad.

La riboproteína hnRNP está implicada en tráfico citosólico del ARN. Se ha demostrado que es importante en la defensa contra las infecciones⁶. También se sabe que participa en la biogénesis de los telómeros⁷ y está implicada en la regulación de la actividad telomerasa.

La calgranulina es un miembro de la familia S100 de proteínas que contienen un motivo de unión a calcio EF. Las proteínas S100 pueden localizarse tanto en el citosol como en el núcleo, y están involucradas en la regulación de un gran número de procesos celulares, como la progresión del ciclo celular y la diferenciación. Se ha descrito que este gen disminuye su expresión en el envejecimiento⁸.

La neurofisina es una proteína involucrada en el transporte de vasopresina. Se ha publicado que el número de las neuronas inmunorreactivas para la neurofisina disminuye con la edad⁹. Además, se sabe que en la enfermedad de Alzheimer la cantidad de neurofisina disminuye¹⁰. Asimismo, también se ha demostrado que la vasopresina disminuye un 25% con la edad¹¹.

El receptor PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) se activa por medio de la vía de la MAP cinasa. Se ha visto que esta activación disminuye significativamente con la edad¹² y, además, se correlaciona con una disminución de la presencia del receptor con el envejecimiento¹³.

Con estos resultados, corroboramos la hipótesis de que las diferencias de longevidad entre machos y hem-

bras tienen una base génica y no sociológica. Estos datos tienen gran importancia debido a que abren nuevas vías de investigación en el envejecimiento, y además dan lugar a nuevas dianas genéticas para conseguir disminuir estas diferencias de longevidad entre los sexos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández Ballesteros R, Díez-Nicolás J, Ruiz-Torres A. Spain. En: Schrots J, Fernández-Ballesteros R, Rudinger G, editores. *Aging in Europe*. Amsterdam: IOS Press; 1999. p. 107,121-2.
2. Borràs C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Vina J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:546-52.
3. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11:298-300.
4. Thomas RP, Guigneaux M, Wood T, Evers BM. Age-associated changes in gene expression patterns in the liver. *J Gastrointestinal Surg*. 2002;6:445-54.
5. Calleja M, Peña P, Ugalde C, Ferreiro C, Marco R, Garesse R. Mitochondrial DNA remains intact during *Drosophila* aging, but the levels of mitochondrial transcripts are significantly reduced. *J Biol Chem*. 1993;268:18891-7.
6. Levin MC, Lee SM, Kalume F, Morcos Y, Dohan FC, Hastly KA, et al. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nature Med*. 2002;8:509-13.
7. LeBranche H, Dupuis S, Ben-David Y, Bani MR, Wellinger RJ, Chabot B. Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nature Genetics*. 1998;19:199-202.
8. Domorov I, Galecki A, Chang Y, Krzesicki R, Vergara M, Miller RA. Gene expression profile of long-lived snell dwarf mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2002;57:99-108.
9. Fotheringham AP, Davidson YS, Davies I, Morris JA. Age-associated changes in neuroaxonal transport in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the mouse. *Mech Ageing Dev*. 1991;60:113-21.
10. North WG, Harbaugh R, Reeder T. An evaluation of human neurophysin production in Alzheimer's disease: preliminary observations. *Neurobiol Aging*. 1992;13:261-5.
11. Van der Zee EA, Jansen K, Gerkema MP. Severe loss of vasopressin-immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of aging voles coincides with reduced circadian organization of running wheel activity. *Brain Res*. 1999;816:572-9.
12. Hu Y, Schett G, Zou Y, Dietrich H, Xu Q. Abundance of platelet-derived growth factors (PDGFs), PDGF receptors and activation of mitogen-activated protein kinases in brain decline with age. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;53:252-9.
13. Sarzani R, Arnaldi G, Takasaki I, Brecher P, Chobanian AV. Effects of hypertension and aging on platelet-derived growth factor and platelet-derived growth factor receptor expression in rat aorta and heart. *Hypertension*. 1991;18:III93-9.