



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE microRNAs EXPRESADOS EN
CONDICIONES DE AYUNO EN *Caenorhabditis elegans*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
LAURA GARCÍA SEGURA

TUTOR PRINCIPAL
DR. JUAN MIRANDA RÍOS
(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
(FACULTAD DE QUÍMICA)
DR. LUIS PADILLA NORIEGA
(FACULTAD DE MEDICINA)

MÉXICO, D. F., MARZO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

I.ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
II. ABREVIATURAS.....	7
III. RESUMEN	10
IV.ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Alimentación y nutrición	12
1.2. Situación nutricional a nivel mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations).....	12
1.3. Situación nutricional en México (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición-ENSANUT 2012) 13	
1.4. Aspectos metabólicos	16
1.4.1. Glucólisis.....	18
1.4.2. Gluconeogénesis	19
1.4.3. Vía de las pentosas fosfato	20
1.4.4. Lípidos	21
1.4.5. Lipólisis	22
1.4.6. β -oxidación	23
1.4.7. Lípogénesis.....	23
1.4.8. Ciclo de Krebs.....	24
1.4.9. Vía de señalización de la insulina	26
1.5. Ayuno.....	27
1.6. Regulación genética del metabolismo.....	28
1.6.1. Regulación metabólica por microRNAs	31
1.6.1.1. Biogénesis de miRNAs	33
1.6.1.2. MiRNAs estrella	35
1.6.1.3. Regulación de la biogénesis de miRNAs.....	36
1.7. C. elegans como organismo modelo en investigación	38
1.7.1. Línea germinal.....	40
1.7.2. microRNAs y regulación metabólica en C. elegans.	43
1.7.3. Vía de señalización de la insulina en C. elegans.....	45
2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	48

3. METODOLOGÍA	49
3.1. Obtención de muestras de larvas L4 alimentadas, en ayuno de 12 horas y realimentadas por 3 horas.	49
3.2. Sincronización	49
3.3. Medición de tamaño larvas L4 alimentados y en ayuno	50
3.4. Progenie	51
3.5. Longevidad	51
3.6. Tamaño de gónadas	51
3.7. Tinción de lípidos con colorante vital Oil-red-O	52
3.8. Purificación de miRNAs y RNAs menores de >200nt	53
3.9. Extracción de RNAs <200 nt	55
3.10. Secuencia de oligonucleotidos	56
3.11. RT-PCR	57
3.11.1. Programa de PCR punto final	57
3.11.2. qPCR microRNAs y mRNAs	57
3.11.3. Programa para qPCR	58
4. PROBLEMA	59
5. JUSTIFICACIÓN	59
6. HIPÓTESIS	59
7. OBJETIVOS	59
8. RESULTADOS	60
8.1. Análisis fenotípico	60
8.1.1. Comparación de tamaños	60
8.1.2. Acumulación de lípidos	61
8.1.3. Progenie	61
8.1.4. Tamaño de gónadas	63
8.1.5. Estudio de longevidad	64
8.2. Perfil de expresión de miRNAs mediante Secuenciación masiva en Larvas L4 de C. elegans en condiciones normales y en ayuno de 12 horas.	65
8.3. Confirmación de cambio de expresión de miR-35-3p y sus mRNAs blanco gld-1 y lin-23 por RT-PCR punto final.	68

8.4.	Confirmación de cambio de expresión de miR-240-5p, miR-246-3p y de tres miembros de la familia miR-35: miR-35-3p, -36-3p, -39-3p y sus mRNAs blanco gld-1 y lin-23 por qRT-PCR.	70
8.5.	Búsqueda de mRNAs blanco predichos para otros microRNAs que cambiaron su expresión de manera significativa.	72
9.	DISCUSIÓN.....	74
10.	CONCLUSIÓN.....	86
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	88
12.	ANEXOS.....	101

I.ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Comparación de la prevalencia nacional de bajo peso, baja talla, emaciación y sobrepeso en menores de cinco años de la ENN-1988* (Encuesta Nacional de Nutrición), ENN-1999 [‡] , ENSANUT 2006 [§] y ENSANUT 2012 [#] . México.....	15
Figura 2. Mecanismo de síntesis y degradación metabólica.....	17
Figura 3. Vía de la glicólisis de glucosa a piruvato y gluconeogénesis.....	20
Figura 4. Metabolismo de lípidos.....	24
Figura 5. Ciclo de Krebs.....	25
Figura 6. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina.....	27
Figura 7. Regulación metabólica dada por el genoma, transcriptoma y proteoma.....	29
Figura 8. Clasificación de RNAs.....	31
Figura 9. Biogénesis de miRNAs.....	35
Figura 10. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	39
Figura 11. Anatomía general de <i>Caenorhabditis elegans</i> (hermafrodita).....	39
Figura 12. Desarrollo gonadal en hermafroditas y machos.....	42
Figura 13. Vía de señalización de la insulina/IGF en <i>C. elegans</i>	46
Figura 14. Comparación de tamaños entre gusanos alimentados, sometidos a ayuno de 12 horas y realimentados por 3 horas.....	60
Figura 15. Comparación de almacenamiento de lípidos entre gusanos alimentados, en ayuno de 12 horas y realimentados por 3 horas.....	61
Figura 16. Progenie de gusanos bien alimentados y en ayuno de 12h en larvas L4 temprano.....	62
Figura 17. Comparación del tamaño de gónadas de gusanos alimentados y en ayuno de 12 horas.....	63
Figura 18. Longevidad de gusanos L4 alimentados y en ayuno de 12 horas...	64
Figura 19. Abundancia de lecturas obtenidas de librerías construidas con RNAs de 16 y 18 pb de longitud, purificados de gusanos alimentados y en ayuno de 12 horas.....	65
Figura 20. microRNAs más abundantes en condiciones de alimentación y en ayuno de 12 horas en larvas L4.....	66
Figura 21. MA-Plot que muestra la expresión diferencial de miRNAs gusanos alimentados y en ayuno de 12 horas.....	66

Figura 22. RT-PCR y densitometría de las bandas observadas de <i>miR-35-3p</i> en gusanos alimentados y en ayuno de 12 horas.....	68
Figura 23. RT-PCR y densitometría de las bandas observadas de <i>gld-1</i> y <i>lin-23</i> en gusanos alimentados y en ayuno de 12 horas.....	69
Figura 24. Cuantificación relativa de la abundancia de <i>miR-240-5p</i> y <i>miR-246-3p</i>	70
Figura 25. Cuantificación relativa de la abundancia de <i>miR-35-3p</i> , <i>-36-3p</i> , <i>39-3p</i> , <i>gld-1</i> y <i>lin-23</i>	71
Figura 26. Mecanismo de regulación entre alimentación, reproducción y longevidad dada por <i>miR-35-3p</i>	87
Tabla 1. Desnutrición alrededor del mundo de 1990-92 a 2012-2014.....	13
Tabla 2. Regulación metabólica dada por microRNAs.....	32
Tabla 3. microRNAs involucrados en la regulación del metabolismo de <i>C. elegans</i>	44
Tabla 4. Secuencia de oligonucleotides para RT-PCR y qRT-PCR.....	56
Tabla 5. microRNAs que cambiaron su expresión después de 12 horas de ayuno.....	67
Tabla 6. mRNAs blanco de miRNAs que cambiaron su expresión significativamente, diferentes de la familia de <i>miR-35-3p</i> , y que están involucrados en procesos metabólicos.....	72
Tabla 7. mRNAs blanco de miRNAs que cambiaron su expresión significativamente, diferentes de la familia de <i>miR-35-3p</i> , y que están involucrados en procesos reproductivos y de desarrollo.....	73

II. ABREVIATURAS

ACC1	Acetil coenzima A carboxilasa 1
ACDH-2	Acyl CoA DeHydrogenase
ACT	Actina
AGE-1	Ageing alteration
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
Ago 2	proteína argonauta 2
AKT	Proteína cinasa B
AMPc	Nucleotido ciclico 3'-5' monofosfato de adenosina
AMPK	Proteín quinasa activada por AMP
ATP	Adenosin trifosfato
CAP	7- metilguanosina trifosfato
CKI	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor
Cl	Cloro
CO2	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
Creb/Crtc2	CREB regulated transcription coactivator 2
CYE-1	Ciclina E-1
CYP450	Citocromo P 450
DAF	Abnormal DAuer Formation
DGCR8	DiGeorge syndrome Critical Region 8 protein
DIC	Differential interference contrast microscopy
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxynucleotide
DTC	Distal tip cells
EGL-3	Egg Laying defective
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ENN	Encuesta Nacional de Nutrición
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FADH	El flavín adenín dinucleótido en su forma reducida
FAO	Food and Agriculture Organization
FASN	Sintasa de ácido graso
FBPasa	Fructosa 1, 6 bifosfatasa
FOXO	Forkhead box
G6pc	Glucose-6-phosphatase catalytic-subunit
GCK	Glucokinase
gld-1	Defective in Germ Line Development
GLP-1	Abnormal Germ Line Proliferation
GLUT	Transportador de glucosa
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	guanosine triphosphate
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HNF4	Hepatocyte nuclear factor 4

hnRNPs	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
HSF-1	Heat shock factor 1
IGF	Insulin-like growth factor
Igf1r	Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor
INS-6	Insulin related
Insr	Insulin receptor
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato de receptor de insulina
Irs2	Insulin receptor substrate 2
KCl	Cloruro de potasio
KH₂PO₄	Fosfato de potasio monobásico
LSH	Lipasa sensible a hormonas
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de magnesio
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
MRWB	Modified Ruvkun's Witches Brew (buffer)
mTOR	mammalian target of rapamycin
Na	Sodio
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio dibásico
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
NaOH	Hidróxido de sodio
ncRNA	non-coding RNA
NGM	Nematode growth medium
NHR	Nuclear hormone receptor
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PABP	poly(A)-binding protein
PACT	Kinase R-activating protein
PBS	Phosphate buffered saline
PBSTx	Phosphate buffered saline, Triton X-100
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PFK	Fosfofructoquinasa
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PIP-3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
piRNA	Piwi-interacting RNA
PKA	Proteína cinasa A
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor

Ppargc1a	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha.
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
QKI	Quaking
q-RT-PCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
RB	Retinoblastoma
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA interference
rRNA	ribosomal RNAs
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCF	Skp1-Cul1-F box
siRNA	Small interfering RNA
SKG-1	Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1
SKN-1	Skinhead/Nuclear factor-erythroid-related factor
snoRNA	Small nucleolar RNA
SRBP	Sterol response element binding proteins
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1
SREBF2	Sterol regulatory element binding transcription factor 2
STAR	Signal transduction and activation of RNA
Taq	Bacteria <i>Thermus aquaticus</i>
TFS	Factores de transcripción
TGF-β	Transforming growth factor beta
TMB	Tetramethylbenzidine
TRBP	TAR RNA binding Protein
tRNA	transfer RNAs
TSC1	Tuberous sclerosis 1
Tyr	Tirosina
UNC-63	Uncoordinated
UTR	Untranslated region

III. RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de ~22 nucleótidos de longitud que regulan la expresión genética mediante la unión al 3' UTR de sus mRNAs blanco interfiriendo así con la traducción. Se ha visto que la expresión de los miRNAs cambia en el desarrollo, bajo distintas condiciones de estrés, y en varios procesos patológicos. En la naturaleza los animales se enfrentan a menudo a condiciones de escasez de alimentos. Nuestro objetivo fue identificar cuáles de los 434 miRNAs conocidos en *Caenorhabditis elegans* cambian su expresión bajo condiciones de ayuno en comparación con gusanos bien alimentados mediante secuenciación masiva de larvas L4 tempranas. Nuestros resultados indican que 13 miRNAs (miR-34-3p, la familia de miR-35-3p a miR-41-3p, miR39-5p, miR-41-5p, miR-240-5p, miR-246-3p y miR-4813-5p) aumentaron su expresión, mientras que 2 miRNAs (let-7-3p y miR-85-5p), disminuyeron su expresión en ayuno de 12 horas vs larvas L4 tempranas bien alimentadas. Algunos de los mRNAs blanco predichos que cambiaron su expresión en condiciones de ayuno están involucrados en procesos metabólicos y de desarrollo. En particular, la expresión de miR-35-3p a miR-41-3p aumentó de 6 a 20 veces en ayuno. Se verificó por qPCR que la expresión de miR-240-5p, -246-3p y de tres miembros de la familia de miR-35-3p (miR-35-3p, -36-3p, 39-3p) aumentó bajo condiciones de ayuno. Demostramos que el comportamiento de la expresión de *gld-1*, cuya proteína producto es importante en la ovogénesis y que ha sido reportado ser blanco de miR-35-3p, fue el contrario a este miRNA mostrando una disminución en ayuno de 12 horas, mientras que la expresión de otro blanco reportado, *lin-23*, un regulador del ciclo celular, se mantuvo sin cambios en ayuno. El presente trabajo, representa un punto de partida para una comprensión más amplia del papel de los miRNAs en condiciones de ayuno en *C. elegans*.

IV. ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs of ~22 nucleotides in length that regulate gene expression by binding to the 3'UTR of mRNAs, interfering with their stability and translation. Their expression is regulated during development, under a wide variety of stress conditions and in several pathological processes. In nature, animals often face feast or famine conditions. Our objective was to identify which of the 434 known miRNAs of *Caenorhabditis elegans* changed their expression under starvation conditions as compared to well-fed worms by means of deep sequencing in early L4 larvae. Our results indicate that 13 miRNAs (miR-34-3p, the family of miR-35-3p to miR-41-3p, miR-39-5p, miR-41-5p, miR-240-5p, miR-246-3p and miR-4813-5p) were upregulated, while 2 miRNAs (let-7-3p and miR-85-5p) were downregulated in 12-hr starved vs well-fed early L4 larvae. Some of the predicted targets of the miRNAs that changed their expression in starvation conditions are involved in metabolic or developmental process. In particular, miRNAs of the miR-35-3p/miR-41-3p family were upregulated 6-20 fold upon starvation. We verified the upregulation of miR-240-5p, 246-3p and three members of the miR-35-3p family (miR-35-3p, 36-3p, 39-3p) with qPCR. Additionally, we showed that the expression of *gld-1*, important in oogenesis, and a validated target of miR-35-3p, was downregulated when the expression of miR-35-3p was higher. The expression of another reported target, the cell cycle regulator *lin-23*, was unchanged during starvation. This study represents a starting point for a more comprehensive understanding of the role of miRNAs during starvation in *C. elegans*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentación y nutrición

La ingestión de la dieta mediante la cual el organismo obtiene del medio los nutrimentos que necesita, junto con los numerosos procesos biológicos que intervienen constituyen la alimentación, y esta desencadena la digestión de los mismos y de los compuestos que contienen, la absorción intestinal de los nutrimentos, su distribución en el organismo, su metabolismo en cada una de las células y la excreción de los desechos; es decir, los procesos que junto con la alimentación constituyen la nutrición, base de la vida y de la salud, que en su mayor parte no es voluntaria, consciente ni perceptible para el individuo (Esther Casanueva, *et al.*, 2013).

La alimentación apropiada es uno de los pilares más importantes para la promoción de la salud por lo cual, cualquier cambio afecta de manera positiva o negativa al organismo.

1.2. Situación nutricional a nivel mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

A nivel mundial la situación del estado de nutrición presenta las siguientes características: las últimas estimaciones de la FAO indican que la tendencia de reducción sobre la desnutrición, continúa. Se ha estimado que 805 millones de personas tienen desnutrición crónica en el periodo 2012-14, 100 millones menos que la década pasada, y 209 millones desde 1990-92. Sin embargo, aproximadamente una de cada nueve personas en el mundo aún sufre la insuficiencia de alimentos para una vida saludable y activa. La gran mayoría de estas personas con desnutrición viven en países en desarrollo donde se estima que existen 791 millones de personas con desnutrición crónica en el periodo 2012-14. Si bien los países en desarrollo son en donde se ha visto una mayor reducción de desnutrición en las últimas dos décadas, con una disminución total de 203 millones de personas desde 1990-92, aún uno de cada ocho individuos de estas regiones (13.5%) permanece con desnutrición crónica (Tabla 1). Por lo tanto aún se requieren considerables esfuerzos para la erradicación de este problema, especialmente en los países en donde se ha registrado un menor progreso (FAO).

	Número de desnutridos (millones) y prevalencia (%) de desnutrición									
	1990-92		2000-02		2005-07		2008-10		2012-14*	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
MUNDIAL	1 014.5	18.7	929.9	14.9	946.2	14.3	840.5	12.1	805.3	11.3
REGIONES DESARROLLADAS	20.4	<5	21.1	<5	15.4	<5	15.7	<5	14.6	<5
REGIONES EN DESARROLLO	994.1	23.4	908.7	18.2	930.8	17.3	824.9	14.5	790.7	13.5
África	182.1	27.7	209.0	25.2	211.8	22.6	216.8	20.9	226.7	20.5
Norte de África	6.0	<5	6.5	<5	6.4	<5	5.6	<5	12.6	6.0
Sub-Sahara África	176.0	33.3	202.5	29.8	205.3	26.5	211.2	24.4	214.1	23.8
Asia	742.6	23.7	637.5	17.6	668.6	17.4	565.3	14.1	525.6	12.7
Caucaso y Centro de Asia	9.6	14.1	10.9	15.3	8.5	11.3	7.4	9.5	6.0	7.4
Oriente de Asia	295.2	23.2	222.2	16.0	218.4	15.3	185.8	12.7	161.2	10.8
Sud-oriental de Asia	138.0	30.7	117.7	22.3	103.3	18.3	79.3	13.4	63.5	10.3
Sur de Asia	291.7	24.0	272.9	18.5	321.4	20.2	274.5	16.3	276.4	15.8
Asia occidental	8.0	6.3	13.8	8.6	17.0	9.3	18.3	9.1	18.5	8.7
América latina y el Caribe	68.5	15.3	61.0	11.5	49.2	8.7	41.5	7.0	37.0	6.1
Caribe	8.1	27.0	8.2	24.4	8.4	23.7	7.6	20.7	7.5	20.1
América Latina	60.3	14.4	52.7	10.7	40.8	7.7	33.9	6.1	29.5	5.1
Oceanía	1.0	15.7	1.3	16.5	1.3	15.4	1.3	13.5	1.4	14.0

Nota: * Proyecciones.
Fuente: FAO

Tabla 1. Desnutrición alrededor del mundo de 1990-92 a 2012-2014.

1.3. Situación nutricional en México (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición-ENSANUT 2012)

En México la situación en el ámbito nutricional ha ido cambiando con el paso del tiempo, recientemente se colocó a nuestro país en el primer lugar en obesidad infantil y segundo lugar en obesidad en edad adulta a nivel mundial. Sin embargo la prevalencia de desnutrición aún existe.

En la última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición realizada en el 2012 se observan diferentes cambios en la prevalencia de desnutrición de 1988 al 2012. La figura 1 muestra la prevalencia nacional de bajo peso, baja talla y emaciación (bajo peso para la talla) de 1988 a 2012 en menores de cinco años de edad. Actualmente, se estima que 302 279 (2.8%) menores de cinco años de edad presentan bajo peso, 1 467 757 (13.6%) baja talla y 171 982 (1.6%) emaciación,

en todo el país. En el contexto nacional se observa una clara y significativa disminución de las diferentes formas de desnutrición a lo largo de casi un cuarto de siglo de monitoreo de las encuestas de nutrición. Por otro lado, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en menores de cinco años ha registrado un ligero ascenso a lo largo del tiempo, casi 2 % de 1988 a 2012 (de 7.8% a 9.7%, respectivamente) (figura 2).

La desnutrición en los menores de cinco años tiene efectos adversos en el crecimiento, el desarrollo y la salud, estos efectos pueden ser a mediano y largo plazo en el rendimiento escolar e intelectual, el desarrollo de capacidades, el rendimiento en el trabajo, y el ingreso laboral en la etapa adulta, lo que repercute en el desarrollo social. La desnutrición en nuestro país ha mantenido una disminución sostenida a lo largo de casi un cuarto de siglo que separa la primera y la última encuesta de nutrición. La velocidad del descenso en los diferentes periodos entre las cuatro encuestas ha sido heterogénea. La prevalencia de desnutrición crónica disminuyó de manera más acelerada entre 1999 y 2006 que entre los periodos previos (1988-1999) y el periodo más reciente (2006-2012). La disminución en desnutrición aguda (bajo peso para talla) alcanzó ya valores compatibles con la eliminación como problema de salud pública, aunque persisten focos de desnutrición aguda en ciertas regiones y grupos de edad. La desnutrición crónica (baja talla para edad) disminuyó a la mitad de la encontrada en 1988. A pesar de esta tendencia sostenida de disminución en la prevalencia de desnutrición crónica, actualmente casi 14 de cada 100 preescolares tienen baja talla para la edad, indicador de desnutrición crónica, lo que representa casi 1.5 millones de menores de cinco años. Estas altas prevalencias son de gran trascendencia dados los efectos adversos de la desnutrición crónica en la morbilidad, mortalidad y el desarrollo psicomotor del niño, así como en el desempeño intelectual y físico del escolar, el adolescente y el adulto, lo que se traduce en desventajas de por vida en el desarrollo de capacidades (ENSANUT 2012).

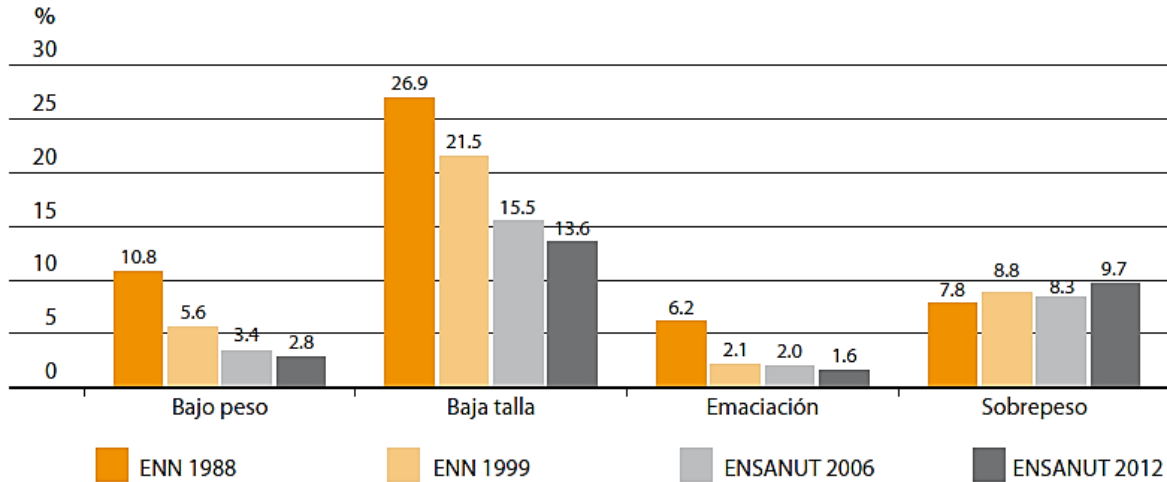


Figura 1. Comparación de la prevalencia nacional de bajo peso, baja talla, emaciación y sobrepeso en menores de cinco años de la ENN-1988* (Encuesta Nacional de Nutrición), ENN-1999[‡], ENSANUT 2006[§] y ENSANUT 2012[#]. México.

* 6 794, que representaron a 8 268 127 menores de cinco años en todo el país

[‡] 7 473, que representaron a 10 125 945 menores de cinco años en todo el país

[§] 7 701, que representaron a 9 405 390 menores de cinco años en todo el país

[#] 10 658, representativos de 10 785 103 menores de cinco años en todo el país

Con lo anterior nos podemos dar cuenta que la falta de disponibilidad de alimentos es un problema que acarrea consecuencias importantes a nivel mundial, y para poder aminorar estas consecuencias es necesario saber de fondo qué eventos están ocurriendo en los organismos que se enfrentan a este tipo de estrés, los procesos celulares bioquímicos, metabólicos y moleculares que están siendo afectados. Cuando un organismo se enfrenta a la falta de alimento, sus células se ven privadas de nutrientes, lo que hace que se desencadene una serie de respuestas ante dicha situación que involucra diferentes vías de señalización intracelulares, con el fin de mejorar sus posibilidades de supervivencia (Levine y Yuan, 2005). Una de esas respuestas ante la falta de nutrientes es la modulación del metabolismo mediante la activación de las vías catabólicas y la supresión de las vías anabólicas, (Van Gilst, *et al.*, 2005) de tal manera que los sustratos metabólicos que se generan son utilizados para el mantenimiento de las actividades celulares básicas y a su vez se genera una reprogramación genética que en el momento ayudará a contender con la situación de estrés que el organismo está pasando, pero que sin duda, generará alteraciones que

repercutirán en el desarrollo, reproducción y esperanza de vida. Por tal motivo el estudio a nivel molecular de las implicaciones de estos cambios, ayudará a entender desde un punto de vista genético, las consecuencias de la falta de alimento en los organismos.

1.4. Aspectos metabólicos

El metabolismo es un proceso dinámico que debe responder a una amplia variedad de necesidades con el fin de mantener al organismo con vida. Todos los organismos responden a muchos tipos de estrés ambiental como calor, frío, falta de oxígeno, limitación de alimentos, etc., ante todos estos tipos de estrés el metabolismo tiene que adecuarse para que el organismo pueda mantenerse lo más estable posible. En unos casos algunos ajustes fisiológicos y bioquímicos son suficientes para adaptar al organismo a nuevas condiciones y que la vida normal continúe. Sin embargo, cuando el estrés ambiental alcanza niveles críticos, el organismo tiene que tomar ciertas decisiones, en donde la muerte, por lo general, no es la opción preferida, así que establece medidas necesarias para asegurar su supervivencia y la de la próxima generación (Lant B y Storey KB, 2010).

La necesidad de un aporte constante de energía a la célula se debe a que ella lo requiere para realizar varias funciones, entre las que destacan: a) la realización de un trabajo mecánico, por ejemplo, la contracción muscular y movimientos celulares, b) el transporte activo de iones y moléculas y c) la síntesis de moléculas. Para la mayoría de los animales, incluyendo al hombre, la energía útil para la célula es la energía química, la cual se encuentra contenida en los nutrientes que se consumen (carbohidratos, lípidos y proteínas principalmente). A través de un conjunto de procesos enzimáticos bien definidos, la célula extrae dicha energía y la hace disponible para que se realicen una gran variedad de procesos celulares, entre los que destacan los encaminados a la síntesis (anabolismo) y degradación (catabolismo) de biomoléculas, a la suma de ambos procesos se le identifica como metabolismo (Figura 2). La regulación metabólica en organismos complejos se basa en varios tipos de control, entre ellos se encuentran: el control alostérico clásico de la actividad de las enzimas que participan en las vías metabólicas, las modificaciones post-traduccionales como

fosforilaciones, glicosilaciones, acetilaciones, etc., la regulación transcripcional, la cual afecta a los niveles de expresión de las proteínas claves del metabolismo y el control post-transcripcional donde participan moléculas como los RNAs pequeños. Una de las enzimas reguladoras importantes del metabolismo es la proteína estimulada por AMP (AMPK), la cual induce una cascada de eventos en las células en respuesta a los constantes cambios de energía para mantener su homeostasis. Una vez activada, la fosforilación mediada por la AMPK cambia a la célula de consumir ATP en forma activa (biosíntesis de ácidos grasos y colesterol) a la producción activa de ATP (oxidación de ácidos grasos y glucosa). Estos eventos son iniciados rápidamente y se les refiere como procesos de regulación a corto plazo. La activación de la AMPK también tiene efectos a largo plazo a nivel de expresión de genes y síntesis de proteínas. La célula ha diseñado para la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos un proceso metabólico único acompañado cada uno de ellos de un estricto mecanismo de regulación (control metabólico) (Arias OF, *et al.*, 2007).

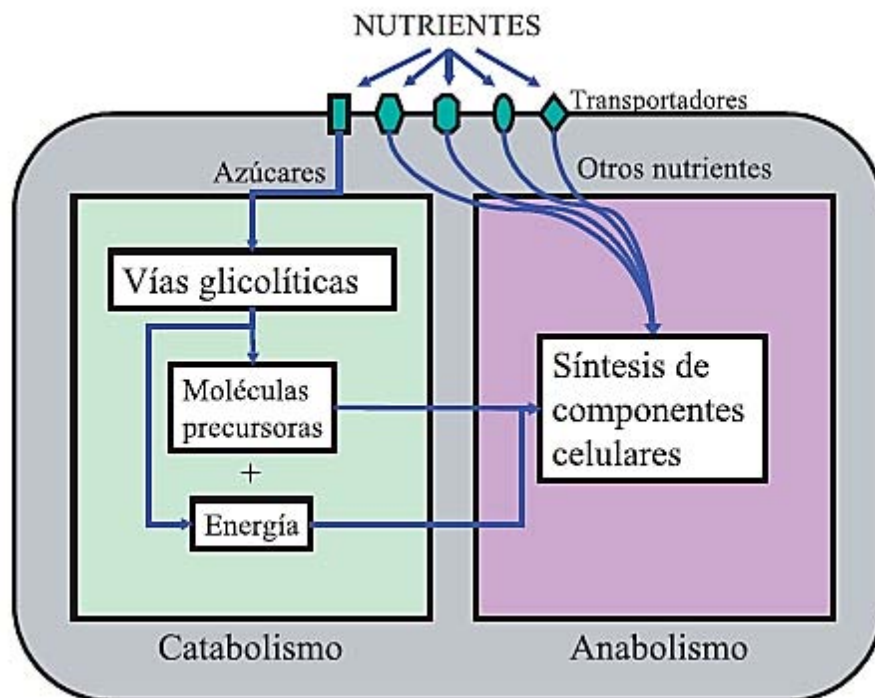


Figura 2. Mecanismo de síntesis y degradación metabólico.

En el ser humano los carbohidratos ingeridos en la dieta como la glucosa, fructosa y galactosa son la principal fuente de energía, son absorbidos en el duodeno y en la parte superior del yeyuno en el intestino delgado. La glucosa ingresa a las células epiteliales en contra de su gradiente de concentración por medio de un cotransporte dependiente de sodio. Por otra parte, la fructosa se absorbe desde la luz intestinal mediante difusión facilitada independiente de sodio (Castrejón V, *et al.*, 2007).

Una vez que la glucosa y la fructosa viajan por los capilares, requieren de otros transportadores para entrar en las células. Dichos transportadores son conocidos como sistemas facilitadores del transporte de glucosa (GLUT). En el ser humano se conocen 14 tipos de GLUT, sin embargo los más estudiados son GLUT 1, que se expresa en varios tejidos, GLUT 2 el cual se expresa en páncreas, hígado y riñón, y también transporta fructosa. GLUT 3 está presente en tejidos que requieren una alta cantidad de glucosa, como el sistema nervioso. GLUT 4 es dependiente de insulina, y es un transportador que se encuentra localizado en adipocitos, músculo y corazón. Cuando se reconoce la señal de presencia de glucosa por parte de la insulina, el transportador es llevado desde el citosol a la membrana, permitiendo el paso de la glucosa al interior de la célula. Finalmente, el transportador GLUT 5 se encuentra principalmente en el intestino delgado y en el riñón, y transporta únicamente fructosa, pues no tiene afinidad por la glucosa (Castrejón V, *et al.*, 2007).

1.4.1. Glucólisis

La oxidación de la glucosa involucra un conjunto de reacciones enzimáticas, ligadas una de la otra y vigiladas por un estricto control metabólico, todo con el único fin, de hacer disponible para la célula, la energía química contenida en la glucosa. La reacción global es: $\text{Glucosa} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP}$. La formación de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP}$ a partir de la glucosa en donde se inducen procesos enzimáticos claramente definidos por sustratos y productos, ellos son: (1) glucólisis, (2) transformación del piruvato en acetil CoA, (3) ciclo de Krebs y (4) fosforilación oxidativa (Figura 4) (Mathews KC, 2004 y Stryer L, 2002).

El proceso glucolítico consta de diez pasos, donde se convierte, mediante procesos enzimáticos, a la glucosa en el compuesto piruvato. Esta vía metabólica se divide en dos fases, cada una constituida por cinco pasos. En la primera fase, conocida como fase preparatoria, se requiere de la inversión de energía por parte de dos moléculas de ATP para lograr fosforilaciones en los pasos 1 y 3, que son procesos irreversibles. El objetivo de esta fase es la producción de dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato, las cuales pasarán a la segunda fase o fase de beneficios, donde producirán 2 moléculas de NADH y 4 moléculas de ATP, para finalmente producir dos moléculas de piruvato (Nelson & Cox, 2013; Salway JG, 2013).

1.4.2. Gluconeogénesis

Los mamíferos pueden sintetizar glucosa a partir de una gama de precursores (piruvato, lactato, glicerol y aminoácidos glucogénicos), la vía ocurre principalmente en hígado y riñón. Muchos de estos precursores son convertidos a oxaloacetato, el cual a su vez es transformado en fosfoenolpiruvato y de ahí, a glucosa (muchas de las reacciones son inversas a las de la glucólisis). Los pasos irreversibles de la glucólisis son rodeados por reacciones hidrolíticas, catalizadas respectivamente por la fructosa - 1, 6 - bisfosfatasa (FBPasa) y glucosa-6-fosfatasa. Ambas enzimas pueden ser, al menos parcialmente, activas simultáneamente lo que ocasiona un ciclo de sustrato. Este ciclo es importante para regular la velocidad y dirección de flujo entre la glucólisis y la gluconeogénesis.

Algunos tejidos como el cerebro, los eritrocitos, el riñón, la córnea del ojo, los testículos y el músculo en condiciones de ejercicio, requieren de un aporte continuo de glucosa como combustible metabólico; el glucógeno del hígado puede mantener estas necesidades entre 10 y 18 horas en ausencia de carbohidratos en la dieta. Después de este periodo, el almacén de glucosa en el hígado disminuye drásticamente y la glucosa es formada a partir de precursores diferentes al glucógeno como el lactato, el piruvato, glicerol (derivado del esqueleto de los triacilglicéridos almacenados en el tejido adiposo) y alfa-cetoácidos (derivados del catabolismo de los aminoácidos). La formación de glucosa no sucede por la

simple reversa de la glucólisis, porque el equilibrio global de esta vía favorece fuertemente la formación de piruvato. Por lo tanto, la glucosa es sintetizada por la gluconeogénesis. Aproximadamente el 90 % de la gluconeogénesis ocurre en el hígado, el 10 % restante es producido por los riñones, que son sumamente importantes en periodos de ayuno prolongados (figura 3) (Vázquez CE, 2003).

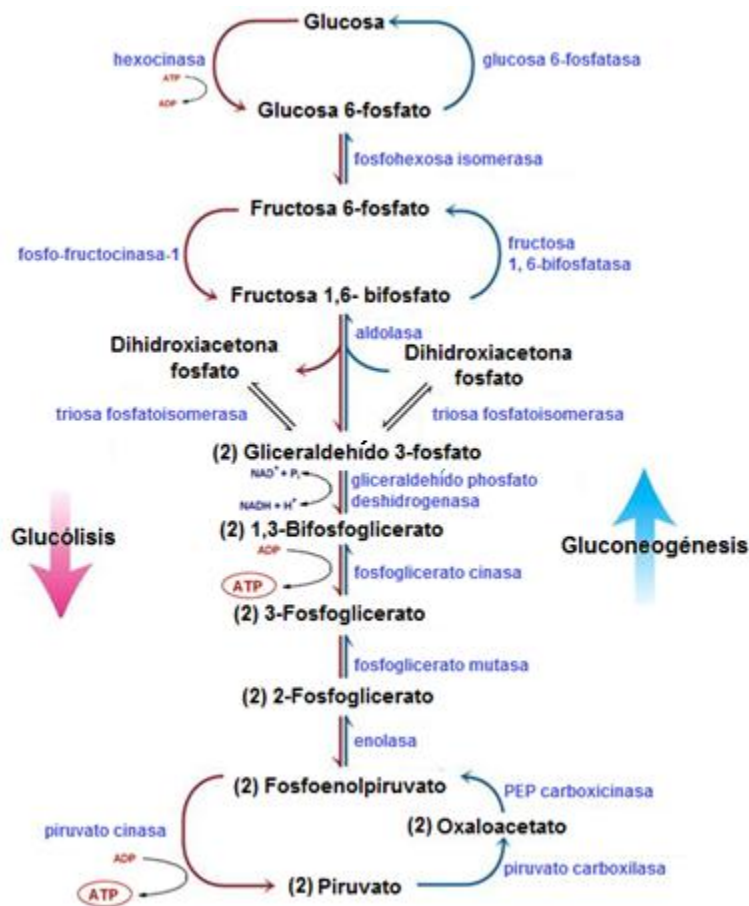


Figura 3. Vía de la glicólisis de glucosa a piruvato y gluconeogénesis. Los substratos y productos están en negro, las enzimas en azul. Los dos intermediarios de alta energía cuya oxidación se acopla a la síntesis de ATP se indican en rojo (1,3-bisfosfoglicerato y fosfoenolpiruvato).

1.4.3. Vía de las pentosas fosfato

Esta vía es de especial importancia debido a que su aceptor de electrones es el NADP⁺, formando NADPH necesario para la biosíntesis reductora o para contrarrestar los efectos perniciosos de los radicales libres. Por otra parte, el producto ribosa 5-fosfato es necesario para producir RNA, DNA y coenzimas.

Todo esto ocurre en la fase oxidativa. En cuanto a la fase no oxidativa, ésta tiene como propósito la formación de gliceraldehído 3-fosfato y fructosa 6-fosfato. Ésta es una vía de escape de la glucólisis cuando se encuentra inhibida alostéricamente en el paso 3 por la enzima fosfofructoquinasa, donde la glucosa 6-fosfato utiliza esta vía y entra nuevamente en el paso 5 del gliceraldehído 3-fosfato (Nelson & Cox, 2013; Salway, 2013).

1.4.4. Lípidos

Las funciones biológicas de los lípidos son muy diversas, además de ser fundamentales en la formación de estructuras celulares, los lípidos son moléculas de almacenamiento energético. Asimismo, proveen de ácidos grasos esenciales necesarios para la síntesis de los eicosanoides y de otros derivados bioactivos que juegan papeles cruciales como cofactores enzimáticos, agentes emulsionantes, hormonas y mensajeros intracelulares (Sánchez SV, 2006).

En los organismos vivos se encuentran dos tipos de compuestos conformados por ácidos grasos, triglicéridos y ceras. Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos, que pueden ser saturados, es decir, que no contienen dobles enlaces ni ramificaciones. También pueden encontrarse con dobles enlaces, anillos de tres carbonos y grupos metilo ramificados (Nelson & Cox, 2013).

Las células pueden obtener ácidos grasos a partir de tres fuentes, las grasas consumidas en la dieta, las grasas almacenadas como gotas de lípidos y las grasas sintetizadas por ciertos órganos que son exportadas a otros. En los vertebrados las grasas se absorben en el intestino delgado, y para poder atravesar la pared intestinal deben convertirse en micelas microscópicas con ayuda de las sales biliares que actúan como detergente, solubilizando las grasas de la dieta en micelas mixtas de ácidos biliares y triglicéridos (Nelson & Cox, 2013).

Las lipasas intestinales degradan los triglicéridos en ácidos grasos. Éstos, junto con otros productos de degradación, son absorbidos por la mucosa intestinal y convertidos nuevamente en triglicéridos, que se incorporan en los quilomicrones, junto con el colesterol y las apolipoproteínas. De esta forma los triglicéridos

pueden viajar a lo largo del organismo hasta llegar a los adipocitos, donde la lipoproteína lipasa se activa por la apolipoproteína C-II que se encuentra en la membrana del quilomicrón. Los ácidos grasos penetran en la célula donde pueden ser oxidados como combustible o re-esterificados para su almacenamiento (Koolman & Röhm, 2005).

1.4.5. Lipólisis

La acumulación de grasa está determinada por el balance entre la síntesis de lípidos (lipogénesis) y su degradación, lipólisis que es la oxidación de ácidos grasos. Este es un proceso metabólico llevado a cabo por los adipocitos durante los períodos de carencia de nutrientes y/o estrés, en el cual los tres ácidos grasos esterificados al esqueleto de glicerol son hidrolizados de los triglicéridos y liberados de la célula. Los ácidos grasos libres (ácidos grasos no esterificados, con un grupo carboxilo libre) circulan por la sangre unidos de una forma no covalente a una proteína portadora, la albúmina sérica. Los ácidos grasos no esterificados (AGNE) en plasma, junto con el glicerol son productos de la hidrólisis de triglicéridos y la fuente de energía más importante para un gran número de órganos. Los AGNE son metabolizados mediante la β -oxidación y la cetogénesis, mientras que el glicerol es canalizado a la vía gluconeogénica hepática. Aproximadamente el 95% de la energía biológicamente disponible de los TAG reside en sus tres ácidos grasos de cadena larga y el glicerol sólo contribuye con un 5%. La lipólisis está bajo control nervioso y hormonal con la acción concertada de numerosas proteínas que implican notablemente a la lipasa sensible a hormona (LSH). La norepinefrina y la epinefrina (catecolaminas) son las sustancias responsables de la estimulación del metabolismo de grasas, vía tres subtipos de receptores β -adrenérgicos. Los eventos metabólicos están conectados principalmente con el incremento en los niveles de AMPc (nucleótido cíclico 3'-5' monofosfato de adenosina), activación de la proteína cinasa A (PKA) y la fosforilación activa tanto de la LSH como de la perilipina A, siendo la LSH la de mayor influencia en la regulación de la lipólisis estimulada por receptores adrenérgicos (Sánchez SV, 2006).

1.4.6. β -oxidación

La β -oxidación ocurre en la mitocondria, y consiste en la eliminación consecutiva de pares de átomos de carbono en forma de acetyl-CoA iniciando en el extremo carbonilo de un ácido graso. Cada vuelta del ciclo de β -oxidación produce una molécula de acetyl-CoA, que puede ser transportada directamente al ciclo de Krebs y además oxidada para generar ATP adicional por la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Mientras que los ácidos grasos de cadena corta se oxidan casi exclusivamente en la mitocondria, los ácidos grasos de cadena larga que contienen más de 14 carbonos pueden ser oxidados también en peroxisomas (Lochner M, *et al.*, 2015).

1.4.7. Lípogénesis

Esta tiene lugar en el citosol de la célula, comenzando con la carboxilación dependiente de ATP de acetyl-CoA a malonil-CoA, este paso es catalizado por la acetyl-CoA carboxilasa 1 (ACC1). El siguiente paso es realizado por la sintasa de ácidos grasos (FASN), un complejo multienzimático que cataliza la condensación de la acetyl-CoA y malonil-CoA para producir el palmitato, ácido graso saturado de 16 carbonos y otros ácidos grasos de cadena larga que pueden modificarse adicionalmente por elongasas o desaturasas para formar otros lípidos más complejos, que luego se utilizarán para la síntesis de fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol, o para la acilación de proteínas (figura 4) (Lochner M, *et al.*, 2015).

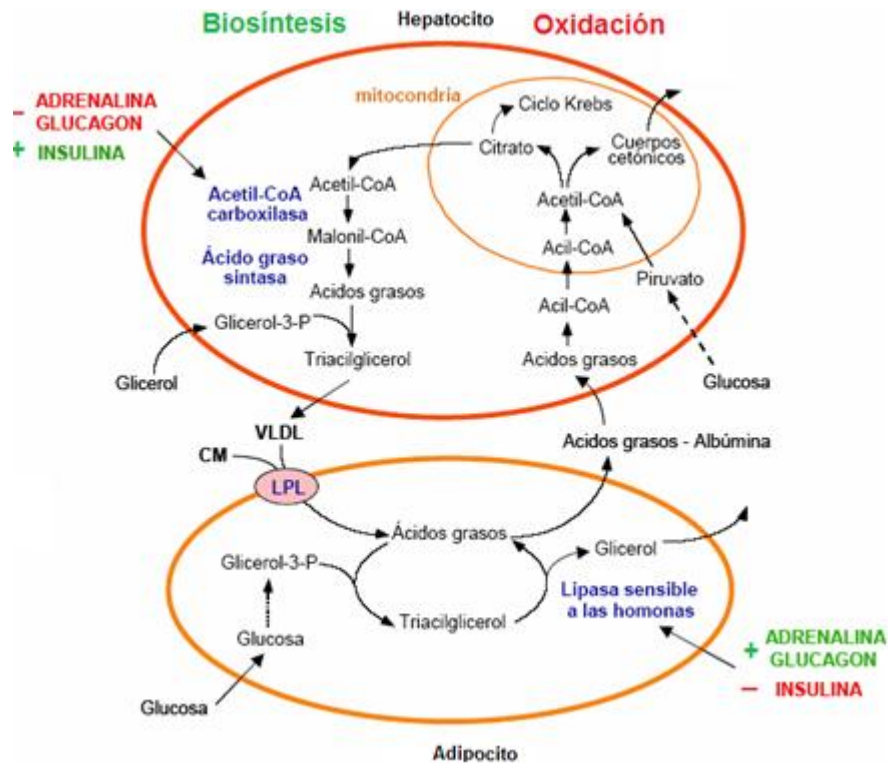


Figura 4. Metabolismo de lípidos.

1.4.8. Ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs es la vía común para la oxidación aeróbica de los sustratos energéticos, condición que convierte a este proceso enzimático en la vía de degradación más importante para la generación de ATP. Los 3 NADH y el FADH₂ liberados en el ciclo de Krebs, son re-oxidados por el sistema enzimático transportador de electrones (Figura 5), estableciendo así un flujo de electrones, los cuales son dirigidos hacia el O₂ como aceptor final, los productos de este proceso son una molécula de agua y una gran cantidad de energía liberada, energía que es utilizada para sintetizar ATP. Al acoplamiento entre la oxidación de los equivalentes reductores (NADH, FADH₂) y la síntesis de ATP (ATP sintetasa) se les conoce como fosforilación oxidativa (Mathews KC, 2004 y Stryer L, 2002).

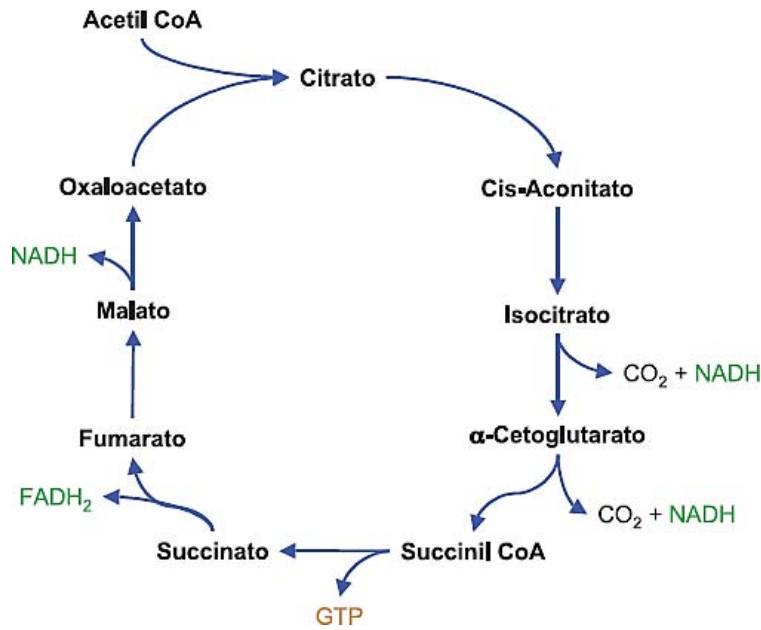


Figura 5. Ciclo de Krebs. Entre las funciones de esta vía se encuentran la síntesis de los metabolitos precursores α -cetoglutarato, succinil CoA y oxaloacetato. Además se genera energía en la forma de NADH y FADH₂.

La entrada en un estado hipometabólico, donde la tasa metabólica es fuertemente reprimida y las actividades normales se suspenden, es en realidad una respuesta generalizada al estrés a través de la filogenia, que proporciona a los organismos una mayor probabilidad de sobrevivir en periodos de estrés. Diversos aspectos hipometabólicos están conservados en todo el reino animal e incluyen (a) una fuerte supresión total de la tasa metabólica, (b) control diferencial sobre las tasas de los procesos metabólicos individuales para que el uso de energía sea prioritariamente para favorecer las funciones vitales básicas de la célula (por ejemplo el mantenimiento del potencial de membrana) y que las actividades “opcionales” (por ejemplo, la síntesis de proteínas, división celular, crecimiento y desarrollo) sean apagadas mientras las condiciones se restablecen, y (c) la ejecución de acciones que protegen a las células y preservan su viabilidad cuando se enfrenten a largos periodos de inactividad (Lant B and Storey KB, 2010).

La mayoría de los órganos animales pueden metabolizar diversas fuentes de carbono para generar energía. Las células animales deben ser capaces de sintetizar glucosa a partir de otros precursores y también de mantener las concentraciones de glucosa dentro de los límites estrechos, tanto para el funcionamiento adecuado de los tejidos como para proporcionar los precursores para la síntesis de glucógeno. Cuando las reservas de glucosa sufren una rápida disminución se inicia la síntesis de glucosa a partir de precursores no carbohidratados (sustratos gluconeogénicos), proceso conocido como gluconeogénesis. Los sustratos gluconeogénicos son: lactato, aminoácidos, glicerol, ácidos grasos, propionato, etc. La gluconeogénesis tiene lugar principalmente en el citosol, aunque algunos precursores se generen en las mitocondrias y deben ser transportados al citosol para utilizarse (Mathews KC, 2004 y Stryer L, 2002).

1.4.9. Vía de señalización de la insulina

La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo. El receptor de insulina (IR) activo y autofosforilado, activa al sustrato del receptor de insulina (IRS) el cual contiene varios sitios de fosforilación en residuos de Tyr (Y) que al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como PI3K. La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la activación de p110 y a consecuencia de ello, p110 tiene acceso a su sustrato PI(4,5)P₂, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI(3,4,5)P₃, que sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt, induciendo una primera fosforilación en la Ser⁴⁷³ que es seguida por una fosforilación en la Thr³⁰⁸, esta última inducida por PDK1. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta, como mTOR, FOXO, GSK3 y caspasa 9 (Figura 6) (Olivares JA, y Arellano AP, 2008).

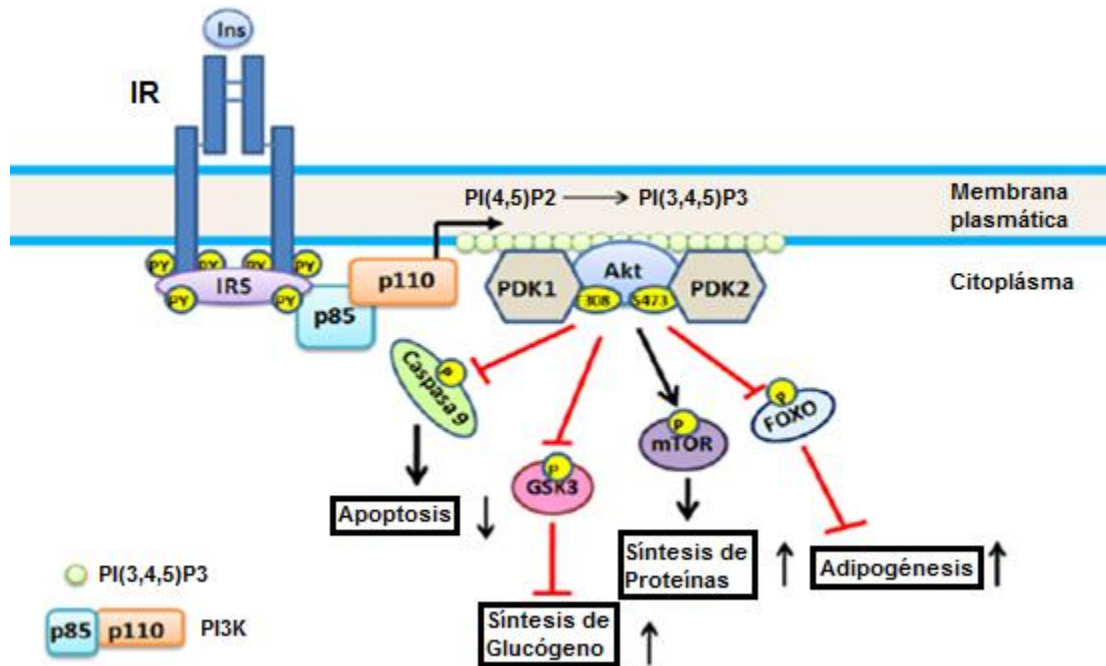


Figura 6. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina.

En situaciones de falta de alimento por tiempo prolongado, FOXO asegura la producción de glucosa suficiente para prevenir la hipoglucemia. La disminución de la concentración de insulina durante el ayuno promueve la localización nuclear de FOXO, donde interactúa con Ppargc1a y Creb/Crtc2 para aumentar la expresión de enzimas gluconeogénicas (G6pc y Pck1) y asegurar el suministro de glucosa a tejidos y órganos vitales (figura 6) (Dong XC, *et al.*, 2008).

1.5. Ayuno

Prácticamente todos los organismos deben hacer frente a las fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes. Una variedad de mecanismos ha evolucionado para amortiguar el desarrollo animal en esta condición. Los efectos de la disponibilidad de nutrientes impactan en el organismo sobre la tasa de crecimiento y la resistencia al estrés, así como el tamaño a alcanzar en la etapa adulta y la fertilidad. La falta de alimento puede también extender la vida útil, aunque la base mecanicista no está bien establecida. En los seres humanos, las alteraciones en la homeostasis de la energía pueden causar enfermedades como desnutrición,

obesidad y diabetes, y el cáncer, a menudo, se deriva de una inapropiada nutrición (Baugh LR, 2013)

El ayuno es la situación metabólica existente ante la falta de ingreso de nutrientes, el organismo pone en marcha unos mecanismos conducentes a la producción de sustratos energéticos que aseguren el metabolismo de órganos vitales, y disminuye simultáneamente el consumo periférico, con el objetivo principal de preservar la supervivencia. Si el ayuno se prolonga en el tiempo, los procesos metabólicos van cambiando, de manera que se modifican los productos energéticos consumidos (glucosa, ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos), inicia la depleción de glucógeno y el catabolismo proteínico, dando como principal fuente de glucosa la gluconeogénesis. Los sustratos provienen inicialmente del catabolismo proteínico y la lipólisis. El metabolismo del ayuno, no es un proceso estático ni homogéneo, sino que va evolucionando a medida que se prolonga en el tiempo. Las primeras horas se ponen en marcha mecanismos metabólicos adaptativos que van cambiando si posteriormente aumenta la duración del ayuno. Así, a largo plazo, hay procesos que cesan, como la glucogenólisis; otros se intensifican, como la lipólisis y cetogénesis; otros sufren oscilaciones, como la gluconeogénesis hepática, que se incrementa y posteriormente disminuye, y otros aparecen, como la gluconeogénesis renal. También hay variaciones en los sustratos energéticos consumidos por el cerebro (sólo glucosa inicialmente y, más adelante, fundamentalmente cuerpos cetónicos y menos glucosa) y por el músculo (glucosa del propio glucógeno inicialmente y más tarde glucosa de la circulación, ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos), así como en el reservorio empleado para producir la energía, que en fases avanzadas es fundamentalmente la grasa corporal y músculo mediante la proteólisis (Albero R, *et al.*, 2004).

1.6. Regulación genética del metabolismo

El transporte de nutrientes y el metabolismo son procesos en los que participa un gran número de proteínas diferentes. La célula posee mecanismos para coordinar cuáles proteínas y en qué cantidad son necesarias dependiendo de las condiciones externas. Algunas cumplen funciones que son necesarias

continuamente por la célula. En cambio, otras sólo se producen cuando su función es requerida. A las primeras se les llama proteínas constitutivas y a las segundas inducibles. Existen proteínas llamadas reguladoras que tienen la función de detectar señales del medio externo y como resultado facilitar o impedir que un gene pueda ser transcrito en RNA. Es importante señalar que la fisiología de cualquier célula está bajo control de redes que regulan o controlan la expresión de los genes. La estructura y organización de estas redes de control genético, es decir, el conjunto de genes particulares que responden a estímulos similares y específicos y la jerarquía de estos conjuntos de genes, está controlada a su vez, por la combinación de regiones y motivos regulatorios a nivel del DNA (promotores, operadores, etc.), y de proteínas que se unen a estas regiones, para modular la expresión de la transcripción de estos genes. Así, mediante la regulación de estas redes de control genético la célula tiene mecanismos para controlar que sólo se sinteticen las proteínas necesarias para una condición nutricional o ambiental determinada. Así, la célula controla, a nivel genético, la producción de las proteínas que participan en las diferentes vías metabólicas específicas que integran a su vez la gran red metabólica celular (Figura 7) (Arias O, *et al.*, 2007).

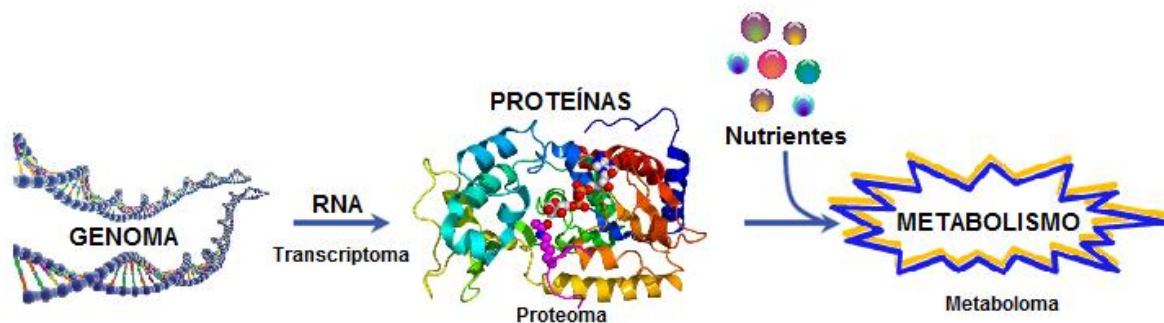


Figura 7. Regulación metabólica dada por el genoma, transcriptoma y proteoma.

Durante décadas, la regulación alostérica dependiente de la disponibilidad de sustratos constituyó el mayor conocimiento sobre la regulación del metabolismo. Posteriormente se avanzó en el descubrimiento del operón de

galactosa en bacterias el cual reveló cómo es que los organismos pueden adaptar su actividad metabólica a cambios ambientales a través de la activación específica de ciertas enzimas y a la actividad enzimática ligada al control transcripcional de la expresión genética, este control requiere de señales específicas para ser transducidas al núcleo en donde ciertos genes serán activados. Este proceso de control transcripcional se basa en tres aspectos para su comprensión: 1) Eventos llevados a cabo río arriba de la actividad transcripcional que definirán las señales involucradas y su ruta para llegar al núcleo; 2) los mecanismos moleculares por los cuales los factores de transcripción operan; 3) los acontecimientos posteriores a la actividad transcripcional que dependerán de los grupos de genes a los que iban dirigidos y cómo más señales se generan para alcanzar un equilibrio dinámico. La mayoría de los factores de transcripción están de una u otra forma implicados en la regulación del metabolismo, sin embargo, unos pocos juegan un papel importante en dicha regulación, tal es el caso de algunos receptores nucleares. Los receptores nucleares son factores de transcripción que se caracterizan por dos propiedades importantes: 1) se activan tras la unión de ligandos específicos, y 2) se unen a elementos situados en la proximidad del promotor de sus genes blanco. Así, en una vista simplificada, la función efectora de los receptores nucleares en una célula es adaptar la expresión génica programa de acuerdo a las señales recibidas; algunos de estos son PPAR (peroxisome proliferator activated receptor), SREBP (sterol response element binding proteins) y HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4) estos regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de glucosa ácidos grasos y colesterol (Desvergne B, *et al.*, 2006).

Además de los factores transcripcionales otros elementos de regulación genética de gran importancia son RNAs no codificantes (ncRNAs) los cuales hasta hace algunos años se desconocía su función. Actualmente se sabe que sólo el 1.5% del genoma codifica para proteínas y el otro 98.5% no codifica para ninguna, el 74% está siendo transcrito a RNA que no codifica para proteínas (ncRNA) pero que posee funciones reguladoras (Feng Y, *et al.*, 2014).

Una gran parte de estos ncRNAs están involucrados en la regulación de la homeostasis celular. Los RNAs se clasifican en base a sus funciones como se muestra en la figura 8, encontramos RNAs mensajeros (mRNAs), de transferencia (tRNAs), ribosomal (rRNA), pequeño nucleolar (SnoRNA), microRNAs (miRNAs), pequeños de interferencia (siRNAs), de interacción con proteínas PIWI (piRNAs) y largos no codificantes (lncRNAs) (figura 8) (Feng Y, *et al.*, 2014).

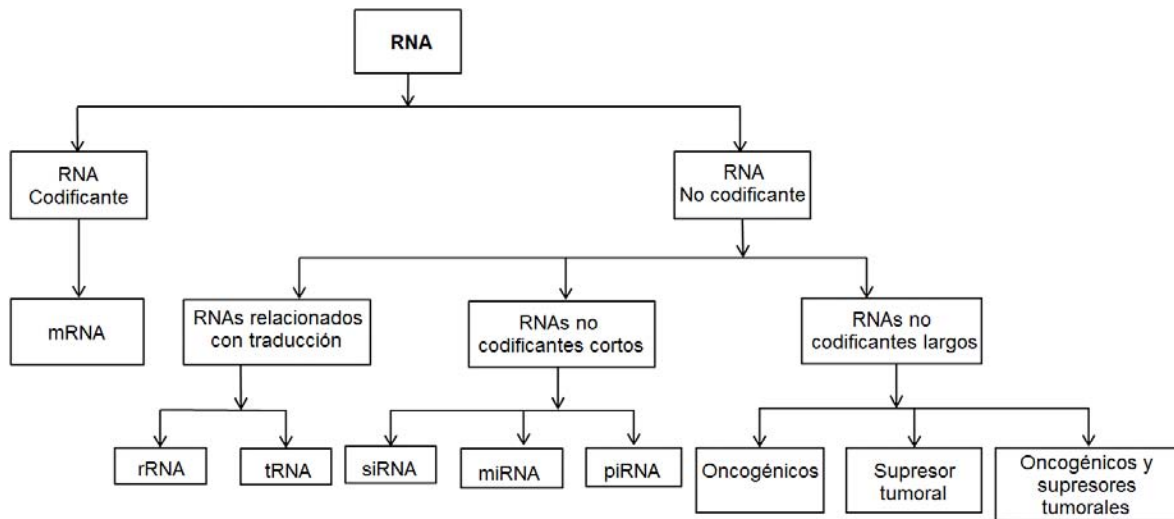


Figura 8. Clasificación de RNAs.

1.6.1. Regulación metabólica por microRNAs

La regulación de la expresión genética dada por miRNAs se lleva a cabo generalmente a nivel post-transcripcional, los miRNAs son una clase de RNAs pequeños no codificantes de ~22 nucleótidos de longitud. Existen aproximadamente 36000 miRNAs maduros reportados en 223 especies estudiadas (miRbase versión 21). Un solo miRNA maduro puede tener varios mRNAs blanco lo que significa que puede regular diferentes procesos celulares y por lo tanto están involucrados en el desarrollo de diferentes enfermedades. Se han encontrado miRNAs que regulan el metabolismo de lípidos y carbohidratos como se muestra en la tabla 1 (Tate R. *et al.*, 2015). Por ejemplo la regulación de la lipoproteína lipasa (LPL) dada por miR-590, se ha visto que este microRNA inhibe la actividad de LPL y la producción de citocinas proinflamatorias de las células lo que lleva a una reducida acumulación de lípidos indicando que pudiese

tener una posible acción antiaterosclerótica (He PP, *et al.*, 2014). De manera relacionada un estudio mostró que miR-223 reprime algunas enzimas como 3-hydroxy-3-metilglutaril-CoA sintetasa 1 y metilesterol monooxigenasa 1 provocan la inhibición de la síntesis de colesterol (Vickers KC, *et al.* 2014). Por otro lado miR-33a y miR-33b se encuentran codificados dentro de un intrón de genes SREBF2 y SRBF1 que codifican para los principales factores de transcripción que controlan metabolismo de colesterol y ácidos grasos (Dávalos A, *et al.*, 2011).

También se ha visto que varios miRNAs intervienen en la regulación del metabolismo de carbohidratos tal es el caso de miR-375, uno de los miRNAs más abundantes en el páncreas y que regula la secreción de insulina independientemente de los cambios de los niveles de glucosa en el plasma. En ratones con mutaciones de este miRNA se observó que tenían niveles normales de insulina pero presentaban hiperglicemia e intolerancia a la glucosa (Poy MN, *et al.*, 2004). Otro miRNA involucrado en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina es let-7. La sobreexpresión de let-7 en ratones produce alteraciones en la tolerancia a la glucosa y reduce la secreción de insulina inducida por glucosa; este miRNA tiene varios mRNAs blanco como Igf1r, Insr, Irs2, PI3K, Akt2, Tsc1, y Rictor, todos ellos componentes de la vía de señalización de la insulina (Frost RJ, *et al.*, 2011). Estos y otros miRNAs se encuentran regulando las redes metabólicas (Tabla 2).

microRNA	Participación	Referencia
miR-590	Acumulación de lípidos.	He PP, <i>et al.</i> 2014.
miR-223	Homeostasis de colesterol.	Vickers KC, <i>et al.</i> 2014.
miR-33a, miR-33b	Metabolismo de colesterol y ácidos grasos.	Davalos A, <i>et al.</i> 2011.
miR-122	Metabolismo de lípidos.	Esau C, <i>et al.</i> 2006.
miR-106, miR-758, miR-26	Regula el flujo celular de colesterol.	Kim J, <i>et al.</i> 2012. Ramirez CM, <i>et al.</i> 2011. Sun D, <i>et al.</i> 2012.
miR-370	Reduce β -oxidación de ácidos grasos.	Iliopoulos D, <i>et al.</i> 2010.
miR-378	Regula síntesis de triglicéridos y la acumulación de lípidos durante adipogénesis.	Gerin I, <i>et al.</i> 2010.
miR-143, miR-335,	Controlan diferenciación de adipositos.	Esau C, <i>et al.</i> 2004.

miR-27.		Kim SY, <i>et al.</i> 2010. Nakanishi N, <i>et al.</i> 2009.
let-7	Controla diferenciación de adipositos y regula la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina.	Sun T, <i>et al.</i> 2009. Frost RJ, <i>et al.</i> 2011
miR-375, miR-124a, miR-9, miR-33a	Regula la secreción de insulina dependiendo de los niveles de glucosa plasmática.	Poy MN, <i>et al.</i> 2004. Lovis P, <i>et al.</i> 2008. Plaisance V, <i>et al.</i> 2006. Wijesekara N, <i>et al.</i> 2012.
miR-103, miR-107, miR-29a/b.	Regulan la vía de señalización de la insulina.	Trajkovski M, <i>et al.</i> 2011. Pullen TJ, <i>et al.</i> 2011. He A, <i>et al.</i> 2007.

Tabla 2. Regulación metabólica dada por microRNAs.

1.6.1.1. Biogénesis de miRNAs

Los miRNAs se distribuyen por todo el genoma, pueden localizarse en las regiones exónicas, intrónicas o intergénicas. Su biogénesis comienza con su transcripción por la ARN polimerasa II, aunque algunos otros miRNAs se transcriben por la ARN polimerasa III, esto resulta en un transcrito primario conocido como pri-miRNA que contiene una estructura de tallo y asa. En general, pri-miRNAs tienen un CAP (7- metilguanosa trifosfato) en el extremo 5' y en el extremo 3' una *cola poli A* (secuencia de bases de adenina). Después de la transcripción, la RNasa III Drosha procesa al pri-miRNA escindiendo la estructura de tallo que lleva incluido el CAP y la *cola poli A*. Durante la biogénesis de los miRNAs, Drosha puede crear 2 complejos diferentes para facilitar la escisión del pri-miRNA. Uno está compuesto por la RNA helicasa, p68 y p72, y las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs). El otro complejo, conocido como el microprocesador, está compuesta por Drosha y la proteína DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region 8 protein), una proteína de unión a RNA de doble cadena que estabiliza Drosha través de la interacción con su dominio C-terminal. DGCR8, también contribuye para dirigir la escisión de Drosha en la estructura de tallo del pri-miRNA, dando como producto un pre-miRNA, que tiene ~ 22 nt en el tallo y ~48nt en el bucle/asa terminal. Por otra parte, existe una vía no canónica de biogénesis que puede ocurrir durante el splicing de mRNA, dando

ligar a los “miRtrones”. Los miRtrones son de hecho el resultado del splicing de los intrones en el mRNA que genera un pre-miRNA funcional independiente de la acción de Drosha. Tras la generación del pre-miRNA, la exportina 5 transporta los pre-miRNAs al citoplasma en un proceso dependiente de GTP, la exportina 5 también protege a los pre-miRNAs de la degradación nuclear. Una vez en el citoplasma, Dicer, una RNasa III, digiere el pre-miRNA en un dúplex de 22 nucleótidos (miRNA:miRNA*), durante este proceso, Dicer se asocia con las proteínas TRBP (TAR RNA binding Protein) y PACT (kinase R-activating protein) para aumentar su estabilidad y actividad de procesamiento. Después de la generación del miRNA dúplex, este se separa, una hebra (el miRNA guía) se une al RISC (RNA-induced silencing complex) formado por la asociación de la proteína argonauta 2 (Ago2) y GW182 proteína que promueve la estabilidad de la Ago2. Anteriormente se creía que la hebra estrella era degradada, sin embargo, datos recientes demuestran que una gran cantidad de estos miRNAs* no se degradan sino que se expresan en iguales o diferentes condiciones, lo que indica que una secuencia de miRNA puede producir 2 diferentes miRNAs maduros, cada uno con mRNAs blanco diferentes y por lo tanto, diferentes funciones biológicas.

Por último, el silenciamiento genético se da por complementariedad de bases para la regulación negativa del mRNA blanco. Durante este proceso la proteína Ago2 junto con GW182 interactúan con PABP (poly(A)-binding protein) y otras proteínas (PAN2-PAN3 y CCR4-NOT deadenilasa) para promover el silenciamiento dado por el miRNA. Hay por lo menos tres mecanismos por los que los miRNAs efectúan la represión génica: 1) hibridación y degradación del mRNA blanco, 2) inhibición de la traducción durante la fase de iniciación y elongación o 3) disminución de la traducción por la formación de cuerpos P (figura 9) (Romero C, *et al.*, 2004).

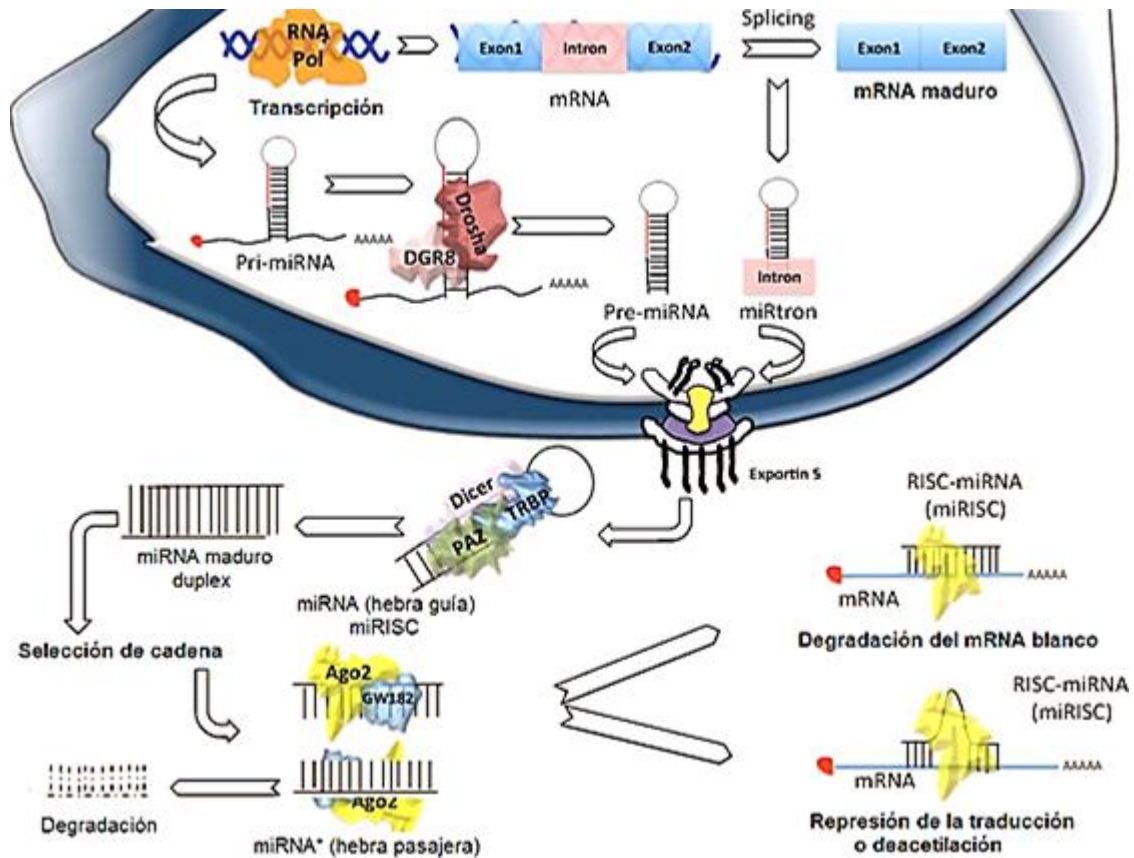


Figura 9. Biogénesis de miRNAs

1.6.1.2. MiRNAs estrella

Los miRNAs estrella son como se mencionó, las cadenas complementarias a los miRNAs maduros, derivados del miRNA dúplex, y se les consideró como subproductos de los pasos de procesamiento de la biogénesis de los miRNAs y que se degradaban rápidamente, pero recientemente, se ha informado que estas hebras se incorporan en el complejo de silenciamiento inducido por RNA en *Drosophila* (Czech, *et al.*, 2009; Okamura, *et al.*, 2009; Ghildiyal, *et al.*, 2010) y en modelos in vitro se observó que reprimían la expresión de mRNAs, lo que demuestra que estos miRNAs también poseen capacidad reguladora (Yang, *et al.*, 2010).

1.6.1.3. Regulación de la biogénesis de miRNAs

La regulación de la biogénesis de miRNAs puede ocurrir a tres niveles: a) durante la transcripción, b) por medio del fenómeno de la edición de moléculas de dsRNA y c) durante los procesamientos por el complejo Drosha/Dgcr8 y por Dicer. La transcripción es controlada mediante factores que regulan la producción de primicroRNAs, que a su vez son específicos del tipo celular, del proceso de desarrollo en que se encuentren las células y de la respuesta de las células a diferentes estímulos. Por ejemplo, factores de transcripción específicos de células troncales embrionarias como Sox2 y Nanog, regulan promotores de genes de miRNA, siendo estos miRNAs preferencialmente expresados en células troncales embrionarias (Marson, *et al.*, 2008). Otro ejemplo asociado a estrés celular se produce tras el inicio del daño en el DNA, P53 activa la transcripción del pri-microRNA-34 (pri-microRNA policistrónico que contiene varios miRNAs de la familia miR-34) y la expresión de los microRNAs de la familia del miR-34 induce la parada del ciclo celular (He, *et al.*, 2007).

Así también la metilación de secuencias promotoras del genoma puede afectar a la expresión de los genes de miRNA del mismo modo que afecta al resto de genes de un organismo. Algunos miRNAs actúan como supresores de tumores y se han observado patrones de hipermetilación de estos miRNAs en líneas celulares cancerosas (Lujambio, *et al.*, 2008).

Por otra parte el fenómeno de “edición” de miRNAs genera modificaciones a nivel de la secuencia de nucleótidos de las moléculas precursoras de miRNAs, aumentando la diversidad de formas maduras originadas a partir de un mismo gen de miRNA. La deaminación de nucleótidos de adenina, transforman estas bases púricas en inosinas, que son reconocidas por la maquinaria celular como guaninas, modificándose el apareamiento de bases de las moléculas precursoras de miRNAs que sufren la edición. En dicho mecanismo, participan las proteínas de la familia ADAR. Las Adenosinas Deaminasas que actúan sobre dsRNA (ADAR) son una familia de proteínas capaces de modificar la secuencia de nucleótidos de las moléculas precursoras de miRNAs (Liu, *et al.*, 1998) (Lehmann and Bass,

2000; Scadden and Smith, 2001; Bass, 2006; Blow, *et al.*, 2006). Los cambios introducidos a nivel de secuencia pueden afectar tanto a nivel del procesamiento de las moléculas precursoras durante la biogénesis de miRNAs, como a nivel del reconocimiento del miRNA y el mRNA objeto de la regulación. Así, la edición del primicroRNA-142 parece interferir en su posterior procesamiento por el complejo Drosha/Dgcr8, provocando una reducción de la expresión de las formas maduras miR-142-3p y miR-142-5p (Yang, *et al.*, 2006).

Además la actividad del complejo microprocesador y de Dicer puede ser modulada durante la biogénesis de miRNAs concretos. Por ejemplo, la ribonucleoproteína hnRNPA1 (“heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1”) se une a la horquilla del pri-microRNA-18a facilitando su procesamiento por delante del resto de los miRNAs de su mismo grupo (grupo miR-17-92) (Michlewski, *et al.*, 2008). La activación de la proteína Erk puede fosforilar a Trbp (proteína que forma un complejo con Dicer para el procesamiento de los pre-microRNAs), estabilizando la unión Trbp/Dicer y aumentando la eficiencia del procesamiento de premicroRNAs (Paroo and Pertsemidid, 2009).

Otro ejemplo lo tenemos en la relación de *lin-28* y la familia de miRNAs *let-7*. El primicroRNA-*let-7* se expresa tanto en células en diferenciación como en células diferenciadas. Sin embargo, los miRNAs maduros de la familia *let-7* sólo se detectan en células diferenciadas. *Lin-28* parece impedir el procesamiento del complejo Drosha Dgcr8 mediante su unión a la región de la horquilla del primicroRNA-*let-7* (Newman, *et al.*, 2008; Viswanathan, *et al.*, 2008).

Aún falta conocer más acerca del procesamiento de estos miRNAs sin embargo los avances en la investigación de esta área nos están ayudando a saber más cada vez sobre la regulación de su biogénesis.

Los miRNAs fueron identificados en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, en 1993 se descubrió a *lin-4* y siete años después a *let-7*. Posteriormente se fueron identificando en distintos organismos desde moscas y plantas, hasta humanos, desde entonces cientos de nuevos miRNAs han sido descubiertos en diferentes especies. (Lee RC, *et al.*, 1993; Pasquinelli AE, *et al.*, 2000).

1.7. *C. elegans* como organismo modelo en investigación

Es un organismo pequeño (de 1 - 1,5 mm de largo), tiene un cuerpo transparente, una esperanza de vida corta (aproximadamente 2-3 semanas), y un genoma completamente secuenciado (The *C. elegans* Sequencing Consortium). Los hermafroditas están formados por 959 células (1031 en machos), está formado por diferentes tejidos (neural, endodérmico, ectodérmico y muscular), su desarrollo lo completa en tres días (una etapa embrionaria, cuatro etapas larvarias L1-L4, y la etapa adulta), existen dos sexos hermafroditas y machos, siendo estos últimos en menor cantidad, su vida media es de 2 a 3 semanas bajo condiciones favorables, en la etapa adulta llegan a poner de 200 a 300 huevecillos (Wixon J, *et al.*, 2000), cuando los embriones eclosionan en ausencia de alimento, hipoxia, altas temperaturas o sobrepoblación, son capaces de entrar en una etapa alternativa en donde frenan su desarrollo, llamado diapausia L1 (Johnson, *et al.*, 1984), si se enfrentan escasez de alimento a finales de la etapa L1 entran a la etapa alternativa llamada etapa dauer en donde se detiene su desarrollo entre las etapas L2 y L3. En la etapas dauer las larvas no se alimentan ni se mueven, además presentan una respiración disminuída y una reducción en el consumo de ATP y son altamente resistentes a condiciones extremas; cuando las condiciones vuelven a ser favorables reanudan el desarrollo larvario y entran a la etapa adulta con una capacidad reproductiva normal (Figura 10) (Paridis, *et al.*, 1999).

Varios eventos biológicos fueron descubiertos en este organismo, tal es el caso del RNAi, la muerte celular programada, y el descubrimiento de los microRNAs, se cuenta con una gran variedad de mutantes disponibles y se han realizado varios trabajos con knockouts y knockdowns por RNAi, es transparente lo que facilita el estudio de sus estructuras (figura 11) y ensayos de expresión genética con proteínas reporteras. *C. elegans* se puede encontrar en los climas templados en todo el mundo y es probable que se encuentre una variedad de especies bacterianas en su hábitat natural, por lo tanto, el nemátodo debe ajustarse a diferencias en macro y micronutrientes proporcionados por estas diferentes dietas. Dependiendo de sus diferentes tipos de alimentación y tipos de

estrés a los que está expuesto muestra respuestas que impactan en su desarrollo, fecundidad y tiempo de vida (Watson E, *et al.*, 2014).

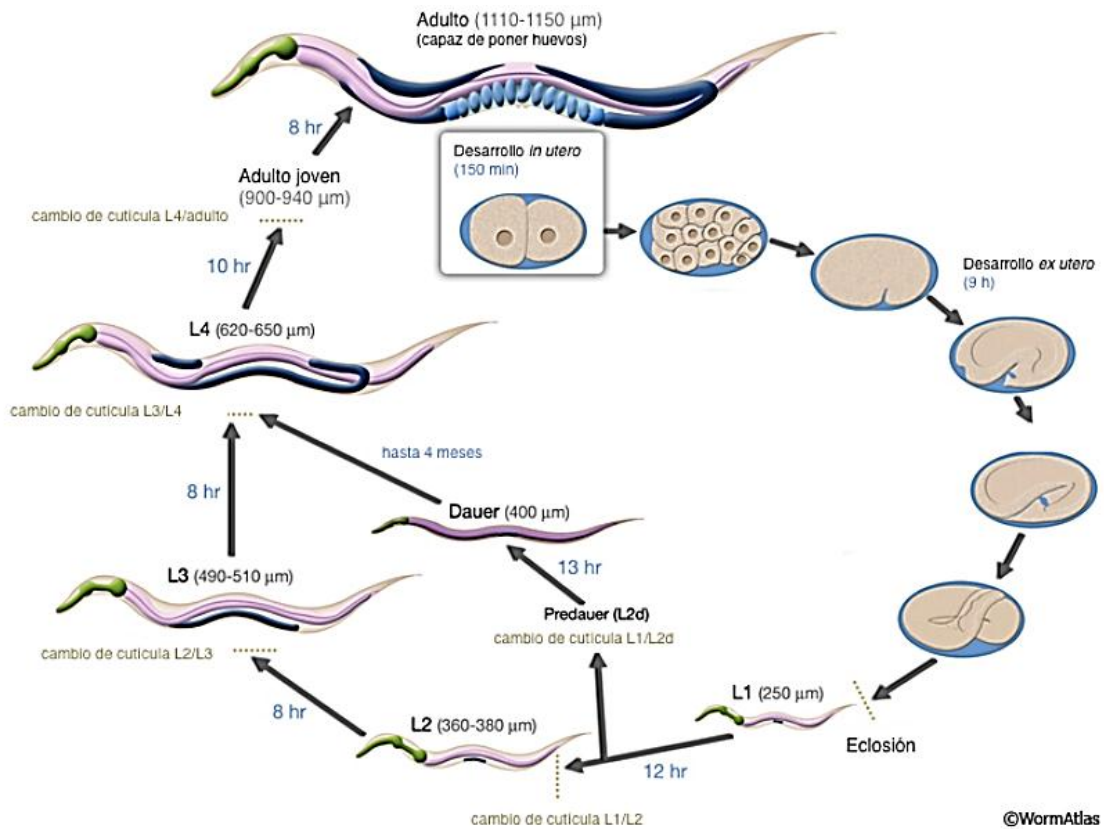


Figura 10. Ciclo de vida de *C. elegans* (embriones, larvas L1-L4, dauer, adulto joven, adulto grávido).

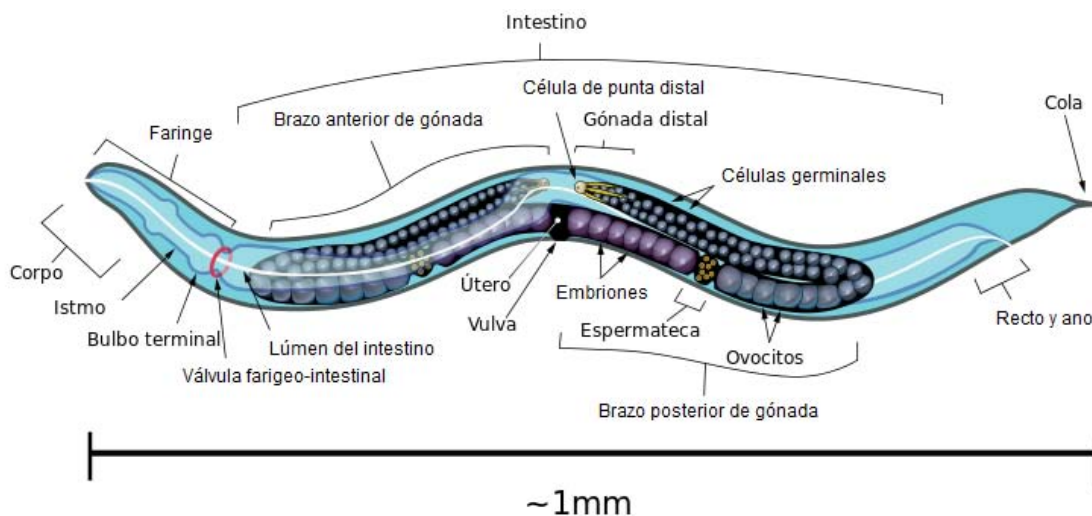


Figura 11. Anatomía general de *Caenorhabditis elegans* (hermafrodita).

1.7.1. Línea germinal

El desarrollo de los sistemas reproductivos en el hermafrodita y macho tienen una morfología y desarrollo diferentes. La gónada del hermafrodita adulto consta de dos brazos tubulares en forma de U, terminando cada uno en una espermateca. Las dos espermatecas se unen en el centro con el útero. Por otra parte, la gónada de los machos consta de un sólo brazo tubular en forma de U que termina proximalmente en las vesículas seminales y el conducto deferente. Una membrana basal encierra completamente la gónada de ambos sexos, en los extremos distales de la gónada se encuentran los DTC (distal tip cells). La línea germinal muestra una progresión de polaridad de distal a proximal desde el patrón de proliferación, progresión de la profase meiótica, hasta la gametogénesis. Las células germinales más distales son proliferativas y contienen células madre, esas células salen del ciclo mitótico para entrar y continuar con la etapa de la profase meiótica. La espermatogénesis tanto en los machos como en los hermafroditas produce sólo en la gónada proximal. La ovogénesis se produce en la región en forma de U y en la gónada proximal (Schedl T, 1997).

Las células germinales se dividen en un patrón variable a lo largo de las etapas larvarias a adulto, generando alrededor de 1000 células por brazo gonadal en hermafrodita y más de 1000 células en la gónada del macho. Al eclosionar cada embrión, las larvas L1 de ambos sexos contienen un primordio gonadal de cuatro células: dos precursoras de las gónadas somáticas, Z1 y Z4 y dos precursoras de la línea germinal, Z2 y Z3; las primeras se dividen durante el desarrollo larvario para producir 143 células en hermafroditas y 56 células en el macho. En la etapa L2 hay una separación de células germinales en dos poblaciones, anterior y posterior. Durante las etapas L3 y L4 se produce la espermateca y el útero. Guiados por el DTC, cada brazo gonadal crece y se alarga para formar una estructura en U. En la etapa L3 las células germinales proximales entran en la profase meiótica y a medida que continúa el desarrollo una mayor cantidad de células germinales se encuentran en esta fase. En hermafroditas, las primeras 40 células germinales, aproximadamente, que entran en la profase meiótica en cada brazo gonadal se desarrollarán como machos, produciendo

alrededor de 160 espermatozoides. A partir de aquí ocurre un cambio en el destino sexual de manera que todas las demás células germinales se diferenciarán como ovocitos dando una población mayoritariamente de hermafroditas (figura 12) (Schedl T, 1997).

La región mitótica incluye células madre de línea germinal. Las divisiones mitóticas de la línea germinal son controladas por las células de la punta distal (DTC) con la vía de señalización. Una vez que las células germinales llegan a la zona de transición, entran en meiosis y luego pasan a través de la del paquitenio. Río abajo de señalización Notch, los genes GLD- 1 y GLD- 2 promueven la fase meiótica. GLD- 1 es una proteína de unión al ARN de la familia de proteínas STAR (signal transduction and activation of RNA metabolism) que están implicadas en varios procesos celulares incluyendo la división celular, la gametogénesis , la apoptosis y el desarrollo embrionario y larvario y se encuentran en todos los metazoos. En *C. elegans* GLD- 1 es necesaria para la decisión de la entrada de mitosis / meiosis (Crittenden SL, *et al.*, 2002; Beadell AV, *et al.*, 2011).

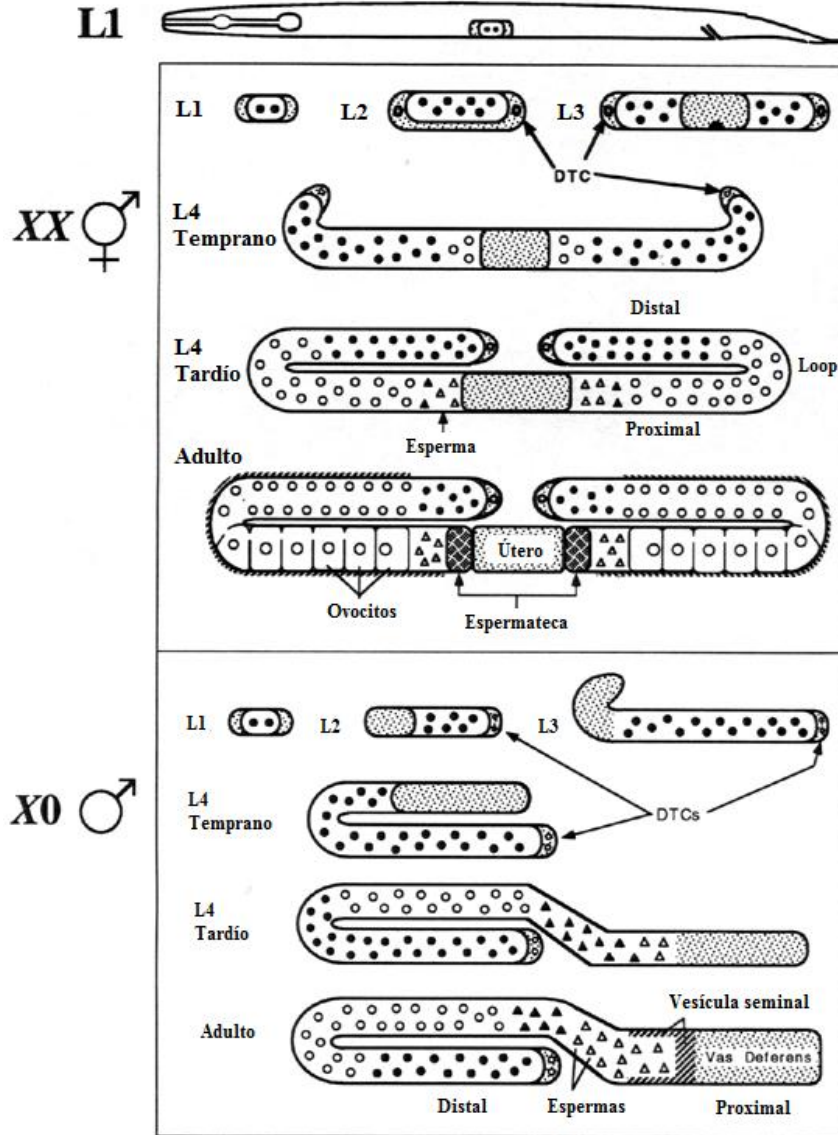


Figura 12. Desarrollo gonadal en hermafroditas y machos.

Caenorhabditis elegans tiene requerimientos nutricionales similares a los de los seres humanos, incluyendo los mismos aminoácidos esenciales, vitaminas y vías de regulación metabólica homólogas, tales como la de insulina y el blanco de la rapamicina (TOR) además se encuentran conservadas las vías de síntesis y degradación de lípidos y carbohidratos. Este organismo ofrece claras ventajas en comparación con los mamíferos para estudios a nivel de regulación metabólica.

Varios principios han comenzado a surgir con respecto a las redes reguladoras de genes del metabolismo en *C. elegans* como la modulación de la organización de los factores de transcripción (TFS), reguladores transcripcionales como Nuclear Hormone Receptors (NHR), miRNAs que regulan directa o indirectamente genes metabólicos y la respuesta a diversas señales sensoriales que son dependientes de la dieta y el flujo metabólico (Watson E, *et al.*, 2014).

1.7.2. microRNAs y regulación metabólica en *C. elegans*.

La participación de los miRNAs en el desarrollo ha sido extensamente estudiado, pero la información de cómo están involucrados en otros procesos celulares aun no es muy claro. Recientemente, una combinación de técnicas genéticas, bioquímicas y bioinformáticas se han usado para entender mejor la función fisiológica y relevancia biológica de las interacciones de varios miRNAs y sus mRNAs blanco para comprender cómo estos miRNAs responden a diferentes condiciones ambientales. Las variaciones en las dietas, causadas por el aumento en la ingesta o deficiencia de nutrientes como carbohidratos, vitaminas, ácidos grasos y aminoácidos se sabe que producen cambios en la expresión de miRNAs (García-Segura, *et al.*, 2013). Se ha reportado que varios miRNAs cambian su expresión bajo condiciones de ayuno, por ejemplo, miR-71 mostró estar involucrado en la supervivencia al ayuno en larvas L1 interactuando con varios genes de la vía IIS (Insulin/IGF-1 signaling), además de su participación en la longevidad (Zhang P, *et al.*, 2011; Karp, *et al.*, 2011; Pincus, *et al.*, 2011; Boulias, *et al.*, 2012). En condiciones de restricción calórica, múltiples miRNAs cambiaron su expresión incluyendo miR-71 y miR-228 entre otros (Smith-Vikos, *et al.*, 2014; Pandit A, *et al.*, 2014).

Los microRNAs son una importante clase de reguladores metabólicos en *C. elegans*, un ejemplo es miR-80 que contribuye a prolongar el tiempo de vida bajo restricción calórica, se ha observado que cuando el gusano se alimenta normalmente la expresión de este miRNA está aumentada mientras que cuando se someten a condiciones de restricción calórica disminuye, se ha reportado que el cofactor transcripcional acetiltransferasa CBP-1 y la interacción de los factores transcripcionales daf-16/FOXO con HSF-1 (heat shock factor-1) son esenciales

para la regulación de miR-80 (Vora M, *et al.*, 2013). Otro importante regulador metabólico es el miRNA conservado let-7 que regula (y está regulado por Daf-12, un receptor nuclear regulador de varios procesos metabólicos como metabolismo de lípidos, desarrollo embrionario y larvario, diapausia, longevidad y resistencia al estrés (Ludewig AH, *et al.*, 2004).

Otro ejemplo es miR-235, que funciona río abajo de la vía de señalización de la insulina para regular a NHR-91 y modular la detención del desarrollo en respuesta a baja disponibilidad de nutrientes. Normalmente los animales entran en diapausia L1 cuando el alimento es escaso, sin embargo los mutantes de miR-235 no logran entrar en esta etapa debido a la expresión aumentada de su mRNA blanco NHR-91. Por lo tanto, en respuesta a la deficiencia de nutrientes la expresión de miR-235 regula negativamente a NHR-91 para permitir la entrada a diapausia L1 (Kasuga H, *et al.*, 2013). Estos y otros miRNAs están involucrados en la regulación de las redes metabólicas de *C. elegans* y responden a diferentes situaciones de estrés ambiental incluyendo la disponibilidad de alimentos (tabla 3).

microRNA	Función	Referencia
miR-80	contribuye a prolongar el tiempo de vida bajo restricción calórica	Vora M, <i>et al.</i> , 2013
miR-786	Regulación de la elongasa de ácido palmítico <i>elo-2</i> .	Kemp BJ, <i>et al.</i> 2012.
Let-7	Regula y es regulado por daf-12.	Ludewig AH, <i>et al.</i> 2004.
miR-235	Funciona río abajo de la vía de señalización de la insulina para regular la entrada a diapausia L1 mediante la regulación negativa de NHR-91.	Kasuga H, <i>et al.</i> 2013.
miR-79	Regula la migración neuronal mediante la glicosilación celular.	Pedersen ME. <i>et al.</i> 2013.
miR-71	Está involucrado en la supervivencia al ayuno en larvas L1 interactuando con varios genes de la vía IIS (Insulin/IGF-1 signaling).	Zhang P, <i>et al.</i> 2011.
miR-228	Regula a PHA-4/FOXA en condiciones de restricción dietética.	Pandit A, <i>et al.</i> 2014.

Tabla 3. microRNAs involucrados en la regulación del metabolismo de *C. elegans*.

1.7.3. Vía de señalización de la insulina en *C. elegans*

La respuesta a la disponibilidad de alimentos involucra cambios en la vía de señalización de la insulina en *C. elegans*, esta vía regula diferentes aspectos como metabolismo, desarrollo y longevidad. A nivel metabólico, la vía de señalización de la insulina se inicia por señales neuronales que dependen de las condiciones ambientales y que involucran a genes *daf* (abnormal dauer formation) y al IGF (insulin-like growth factor) en la membrana celular a través del receptor de insulina. Mutaciones o deficiencias en este receptor se sabe que provocan extensión en el tiempo de vida. El blanco primario de este receptor es Akt (también conocido como proteína quinasa B). Akt tiene importantes reguladores que están conservados en *C. elegans*. El blanco más importante de Akt es el factor de transcripción FOXO (forkhead box), en *C. elegans* se le llama DAF-16, es un regulador crítico para entrada a dauer, altamente conservado en diferentes especies. Estos factores de transcripción (FOXOs) intervienen en procesos importantes como regulación del metabolismo celular, respuesta al estrés oxidativo, proliferación celular y apoptosis.

Daf-2 codifica para el receptor tirosina kinasa que se une a factor de crecimiento en la membrana plasmática activándose a sí mismo mediante autofosforilación. AGE-1 (equivalente en mamíferos de fosfatidil-inositol 3 kinasa-PI3K-) genera PIP3 (phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate) un activador de cinasas que continúa con la señalización insulina/IGF. DAF-2 continúa la activación canónica de AKT el cual es fosforilado por AGE-1 (PI3K) y PDK (3-phosphoinositide dependent kinase). La inhibición de la fosforilación de AKT regularmente resulta en la movilización al núcleo de DAF-16 para la entrada a dauer, la actividad de DAF-16 se basa en la regulación de proteínas como p27, p130 y 4EBP para la regulación del ciclo celular.

La desfosforilación dada por PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) en *C. elegans* conocida como DAF-18 actúa suprimiendo la señalización removiendo los grupos fosfatos de los miembros de esta vía como Akt.

La vía de TOR es dependiente de la vía insulina/IGF, los componentes homólogos son DAF-15 (Raptor) y LET-363 (TOR) son regulados por el factor transcripcional DAF-16 (FOXO). Cuando hay alta disponibilidad de nutrientes, en la vía de señalización de insulina se activa AGE-1 (PI3K) y se fosforila Akt, que a su vez fosforila a DAF-16, impidiendo su entrada al núcleo y activando así la transcripción de genes de TOR. Pero cuando la fosforilación de Akt es bloqueada por DAF-18 (PTEN), DAF-16 entra al núcleo e inhibe la transcripción de los genes de TOR y promueve la entrada a dauer (figura 13). (Lant B, *et al.*, 2010)

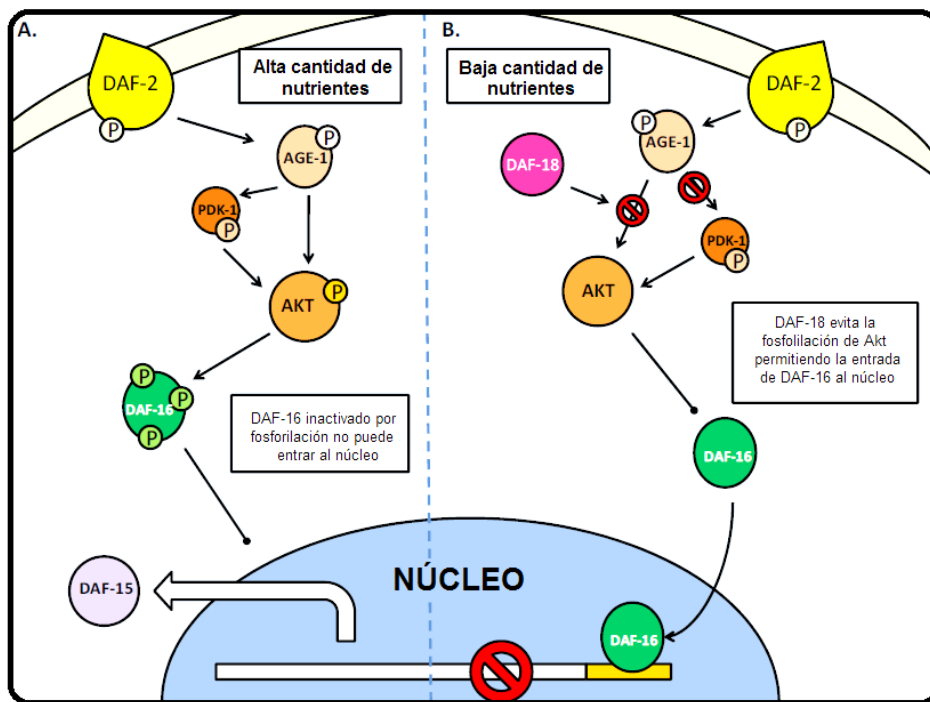


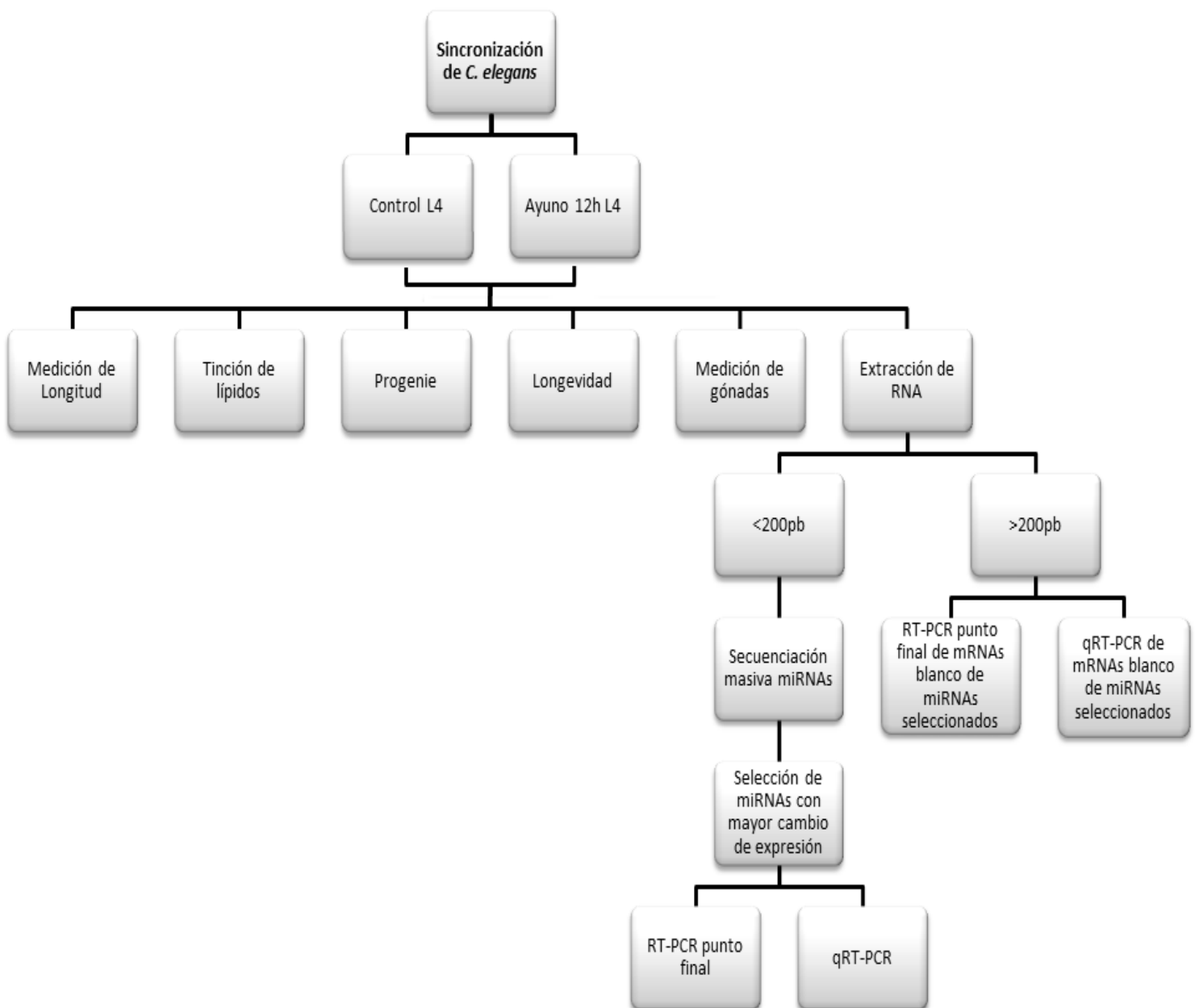
Figura 13. Vía de señalización de la insulina/IGF en *C. elegans*, A) condiciones de alta cantidad de nutrientes y B) baja cantidad de nutrientes.

La homología que presenta *C. elegans* con las vías metabólicas y regulación de las mismas con el humano, lo hacen un modelo de investigación adecuado para el estudio de estrés nutricional. En el laboratorio *C. elegans* puede estar sujeto a una variedad de condiciones de estrés, como bajos niveles de oxígeno, altas o bajas temperaturas y ayuno. Se han realizado estudios de respuesta al ayuno enfocados a proteínas, como cambio en actividad y/o abundancia de enzimas metabólicas, vías de señalización y factores

transcripcionales. Estos estudios han sido realizados sólo en ciertos tejidos (músculo, hígado, etc.) y no en organismos completos lo que llevaría a mejores análisis de efectos sistémicos. Recientemente, Larance y colaboradores (2015) reportaron que aproximadamente 5,000 proteínas cambian su abundancia bajo condiciones de ayuno en *C. elegans*, muchas de ellas involucradas en vías metabólicas. Es muy posible que muchos de los cambios observados en el proteoma en estas condiciones sean el resultado de la regulación dada por miRNAs.

2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se siguió la siguiente estrategia experimental partiendo de gusanos sincronizados para la obtención de muestras de larvas L4 alimentadas y en ayuno, Posteriormente se realizó el análisis fenotípico (longitud, acumulación de lípidos, progenie, longevidad y tamaño de gónadas) y de expresión de miRNAs así como de sus mRNAs mensajeros blanco por secuenciación masiva, RT-PCR punto final y qRT-PCR.



3. METODOLOGÍA

3.1. Obtención de muestras de larvas L4 alimentadas, en ayuno de 12 horas y realimentadas por 3horas.

Buffer M9 isotónico:

6 gr de Na_2HPO_4 (J.T. BAKER CAT. 3828-01)
3 gr de KH_2PO_4 (J.T. BAKER CAT. 3246-01)
5 gr de NaCl (J.T. BAKER CAT. 3624-01)
0.105 gr de MgSO_4 (Anhidro J.T. BAKER CAT. 2506-01)
1 Lt de agua desionizada

Pesar todas las sales y disolverlas en 900 ml de agua desionizada, una vez disueltas aforar a 1 litro y repartir en dos frascos con capacidad de 1 litro para esterilizar (20 minutos, 2.5 libras de presión a 120°C).

3.2. Sincronización

Preparación de reactivos: Disolver 200mg de NaOH en 5 ml de agua desionizada estéril, pasar a otro tubo 2.5 ml de esta solución y agregar 600 μl de agua, 1.9 ml de Cl al 5%.

Se parte de gusanos grávidos después de la primera puesta de huevecillos, esperar a que éstos eclosionen y separar por tamaños lavando con 1 ml de buffer M9 dejando que los gusanos grávidos sedimenten y retirar el sobrenadante, si aún tienen bacteria hacer tres lavados con el buffer M9.

Quitar todo el M9 posible y agregar 700 μl de NaOH y 700 μl de la mezcla de NaOH , Cl y agua, agitar en vortex por 1 minuto y centrifugar a 4000 rpm, en este paso el botón de gusanos toma un color amarillo, retirar el sobrenadante y repetir este paso, aquí se obtendrá un botón blanco que contiene solo los huevecillos, éste se lavará por lo menos 5 veces con buffer M9, para verificar que ya no haya cloro el sobrenadante del último lavado se transfiere a otro tubo y se le agregan unas gotas de Trimetil Bencidina (TMB) si permanece transparente indica que no hay cloro, si se torna azul o amarillo es necesario hacer más lavados.

Los huevecillos se resuspenden en 1 ml de buffer M9 y se dejan en agitación a 900 rpm toda la noche para su eclosión, si se tienen muchos

huevecillos se puede dividir en dos tubos o más para evitar que se hagan cúmulos de huevecillos y no eclosionen.

Al día siguiente se observa al microscopio si eclosionaron los huevecillos, si es así, se centrifugan a 4000 rpm a 4°C, se retira el sobrenadante y el botón de larvas L1 se coloca sobre una caja de NGM con 200 µl de cultivo de *E. coli* OP50.

Esperar a que las larvas se desarrollen y alcancen el estadio L4 temprano (aproximadamente 48 horas), una vez alcanzado este estadio se lava la caja con 1 ml de buffer M9, se recolectan en un tubo de 1.5 ml y se deja que las larvas sedimenten cuando el botón de larvas está en el fondo del tubo se retira el sobrenadante y se hacen otros tres lavados para eliminar los restos de bacteria.

El botón obtenido se divide en tres cajas con NGM, una con 100 µl de bacteria OP50 y dos sin bacteria, en este momento se comienzan a contar 12 horas, al término de este periodo se colectan los gusanos alimentados y una de las cajas en ayuno por separado en tubos de 1.5 ml, a los gusanos alimentados se les hacen tres lavados para eliminar los restos de bacteria. A ambos tubos se les retira el sobrenadante dejando sólo el botón de gusanos, se sumergen en nitrógeno líquido y se almacenan a -70°C hasta su uso para extracción de RNA. La segunda caja de gusanos en ayuno se realimentan con 50 µl de bacteria *E.coli* OP50 durante 3 horas después de este periodo se sigue el proceso de lavado y congelación descrito anteriormente.

3.3. Medición de tamaño larvas L4 alimentados y en ayuno.

Después de sincronizar los gusanos se siembran en cajas de agar con bacteria *E. coli* OP50 y se espera a que alcancen la etapa L4, a la mitad de los gusanos se les da tres lavados con M9 para eliminar los restos de bacteria, después de estos lavados se colocan en una caja de agar sin bacteria para que comience su ayuno de 12 horas, mientras que la otra parte continúan alimentándose normalmente. Al término de este periodo ambas muestras por separado se recolectan después de un lavado con buffer M9, se toma una gota de M9 con gusanos y se coloca sobre

una cámara de Newbauer para realizar las mediciones, se midieron 30 gusanos de cada condición.

3.4. Progenie

Después de mantener a los gusanos en ayuno como se mencionó anteriormente, se colocó un gusano por caja de Petri con 100uL de bacteria OP50, lo mismo se hizo con los gusanos bien alimentados (n=21, tres réplicas por condición), después de tres días se contaron las larvas producidas por cada gusano en el microscopio estereoscópico Nikon SMZ800. El análisis estadístico se hizo mediante una prueba de t considerando un valor de $p \leq 0.05$.

3.5. Longevidad

Seguir el procedimiento anterior hasta transcurrido el tiempo de ayuno, una vez que los gusanos cubren este tiempo se realimentan y cuando alcanzan la etapa adulta, se separan 100 gusanos de cada condición en cajas diferentes y se comienza a contar diariamente el número de gusanos muertos en cada condición mismos que son retirados de la caja con un asa de platino. Las cajas se lavan cada tercer día para retirar embriones y larvas L1.

3.6. Tamaño de gónadas

Se lavaron las muestras control y ayuno de 12 horas tres veces con buffer M9, después del último lavado se retiró el sobrenadante y se agregaron 300uL de metanol a -20°C dejando reposar durante 5 minutos, después de transcurrido el tiempo se agregaron 200uL de PBS-tw (PBS 1x con 0.1% Teen 20) y se centrifugaron a 3000rpm. Se hicieron dos lavados con 500uL de PBS-tw, se centrifugaron nuevamente para finalmente colocar una gota de la muestra, más una de glicerol sobre el portaobjetos y colocar el cubreobjetos. Se observaron 5 gusanos de cada condición en Olympus Laser Scanning Confocal Microscope a un objetivo de 100X. Las mediciones de las áreas se hicieron usando el programa *ImageJ* reportando una medida de pixel/micra².

3.7. Tinción de lípidos con colorante vital Oil-red-O

Stock Oil-red-O (0.5% Oil-red-O)

0.5g de Oil-red-O en 100ml de Isopropanol anhidro. Mezclar a temperatura ambiente por dos días para equilibrar, posteriormente filtrar con papel filtro para eliminar las trazas insolubles y almacenar en un frasco limpio a temperatura ambiente.

Buffer MRWB 2X

160mM KCl

40mM NaCl

14mM Na₂EGTA

0.2% β-mercaptoetanol

Colectar gusanos en etapa L4 temprana, lavar por lo menos tres veces con M9 o PBS 1X, dejar que por gravedad se asienten en el fondo y retirar la mayor cantidad de sobrenadante posible.

Resuspender el botón de gusanos en 120uL de PBS 1X y un volumen igual de buffer MRWB 2X que contenga paraformaldehído al 2%. Agitar en thermomixer a 1000rpm por 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente retirar de la agitación y dejar que los gusanos sedimenten por gravedad y desechar el sobrenadante. Lavar en tres ocasiones con PBS 1X para eliminar el paraformaldehído.

Las muestras se resuspenderán en una solución de isopropanol al 60% con agua destilada o desionizada y se incubarán a temperatura ambiente por 15 min, con el propósito de deshidratar las muestras.

Preparar una solución de trabajo de Oil-red-O al 60% con agua desionizada a partir del stock, mezclar la solución de trabajo al menos una hora a temperatura

ambiente para equilibrarse, posteriormente, filtrar la solución de trabajo con un filtro de pirinola de 0.45 o 0.22 μ m.

Para teñir las muestras, retirar el isopropanol que se empleó para deshidratar los gusanos y agregar a la muestra 1mL de solución de trabajo Oil-red-O, las muestras se incubarán a temperatura ambiente y en agitación a 1000rpm en thermomixer toda la noche.

Al día siguiente se deja sedimentar a los gusanos y se descarta el sobrenadante, lavar la muestra con 200 μ L de pBStX 1X (PBS 1X con 0.01%v/v Triton X-100), dejar que los gusanos sedimenten y descartar el sobrenadante, repetir hasta completar tres lavados. Montar los gusanos en un portaobjetos colocando una gota de la muestra de gusanos teñidos y sobre esta agregar una gota de glicerol, colocar el cubre objetos para observar al microscopio y documentar la imagen.

3.8. Purificación de miRNAs y RNAs menores de >200nt

Se utiliza el kit miRNesy Mini KIT (Cat. No. 217004) y RNeasy MinElute Cleanup KIT (Cat. No. 74204).

Utilizar material nuevo y estéril así como guantes y bata.

Preparar etanol al 70 y 80% con agua tratada con DEPC.

Agua tratada con DEPC: 1.5 ml de DEPC en 13.5 ml de etanol absoluto, mezclar y aforar a 1500 ml con agua destilada, dejar una noche en agitación y esterilizar en autoclave (15 minutos a 15 lb de presión y 120°C).

Se parte de muestras de gusanos almacenados a -70°C.

- Agregar 700 μ l de QIAzol (reactivo de lisis que contiene Isotiocianato de Guanidina y fenol), se homogeniza en vortex hasta que se descongele la muestra.
- Sumergir en nitrógeno líquido hasta que todo el contenido del tubo quede completamente congelado, descongelar a 37°C, este paso se repite tres veces.

- Agitar en vortex por 30 segundos y se deja reposar 30 segundos hasta completar 5 veces.
- Agregar 140 µl de cloroformo al contenido de tubo y mezclar suavemente por 15 segundos, dejar reposar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- Centrifugar a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos. Al término de la centrifugación en el contenido del tubo se observarán dos fases. Subir la temperatura entre 15 y 25°C para las centrifugaciones posteriores.
- Transferir la fase superior que contiene el RNA a un tubo nuevo. Calcular el volumen de esta fase para agregar un volumen similar de etanol al 70% y mezclar en vortex.
- Depositar 500 µl de la mezcla anterior en una columna RNeasy Mini colocada en un tubo de microcentrifuga de 2 ml y centrifugar a 8000 rpm por 15 segundos, repetir esto hasta pasar todo el volumen obtenido en el paso anterior.
- Pasar el eluido de la columna a otro tubo y agregar 0.65 volúmenes de etanol al 100% y mezclar en vortex. (La columna anterior se guarda en refrigeración).
- Pasar la mezcla anterior por la columna RNeasy MinElute y centrifuga a 10000 rpm por 15. El eluido de este paso se desecha.
- Lavar la columna con 700 µl de buffer RWT y centrifugar a 10000 rpm por 15 segundos. El eluido de este paso se desecha.
- Agregar 500 µl de buffer RPE a la columna y centrifugar a 10000 rpm por 15 segundos. El eluido de este paso se desecha.
- Agregar 500 µl de etanol al 80% a la columna y centrifugar por 2 minutos. Pasar a otro tubo de microcentrifuga de 2 ml y centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos con la tapa de la columna abierta, esto para asegurar que ya no eluya nada de etanol.
- Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml nuevo, agregar 14 µl de agua DEPC y centrifugar para obtener la fracción enriquecida de miRNAs.

3.9. Extracción de RNAs <200 nt

Utilizar las columnas guardadas en refrigeración (RNeasy MinElute).

- Lavar la columna con 700 μ l de buffer RWT, centrifugar a 10000 rpm por 15 segundos y descartar el eluido de este paso.
- Tratamiento con DNasa: hacer otro lavado con 300 μ l de buffer RWT, centrifugar a 10000 rpm durante 15 segundos y descartar el eluido, mezclar en un tubo ependorf de 1.5 ml 8 μ l de buffer DNasa 10x, 71 μ l de agua tratada con DEPC y 1 μ l de DNasa; agregar la mezcla (80 μ l) a la columna e incubar a 30°C por 15 minutos, centrifugar por 5 segundos para eluir la solución anterior y descartarla.
- Agregar 500 μ l de buffer RPE a la columna, centrifugar a 10000rpm por 15 segundos, descartar el eluido y repetir este paso.
- Secar bien la membrana de la columna centrifugando a 13000 rpm durante un minuto con la tapa de la columna abierta.
- Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml y agregar 15 μ l de agua DEPC, cerrar la columna y centrifugar a 8000 rpm, repetir este paso para obtener un volumen de 30 μ l.
- Verificar la integridad del RNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% se deberán observar los RNAs ribosomales 28S y 18S en una relación 2:1 respectivamente.
- Cuantificar en espectrofotómetro cuidando que la relación A_{260}/A_{280} esté dentro del rango de 1.9 – 2.1.

3.10. Secuencia de oligonucleotidos

Nombre	Secuencia
RTCEL35	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACA CTG CT
FCEL35	GCG GCG GTC ACC GGG TGG AAA CT
RTCEL36	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACC ATG CG
FCEL36	GCG GCG GTC ACC GGG TGA AAA TT
RTCEL39	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACC AAG CT
FCEL39	GCG GCG GTC ACC GGG TGT AAA TC
RTCEL240	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACG CAT TC
FCEL240	GCG GCG GCG AGG ATT TTG AGA CTA
RTCEL246	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACG CTC CT
FCEL246	GCG GCG GTT ACA TGT TTC GGG T
RTCEL58	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACA TTG CC
FCEL58	GCG GCG GTG AGA TCG TTC AGT AC
UPR	GTG CAG GGT CCG AGG T
LIN23-forward	TGT TCC GCC TGC AGT TTG A
LIN23-reverse	GTC CAA AAA GTC CCA AAT GAG AA
GLD-forward	GGA AAG TGC TCA CCG TGG AA
GLD-reverse	TGT TCG AGT GCT GCT TGC A
ACT-forward	CCG TGA AAA GAT GAC CCA AAT C
ACT-reverse	GGT ACG TCC GGA AGC GTA GA

Tabla 4. Secuencia de oligonucleotides para RT-PCR y qRT-PCR.

3.11. RT-PCR

Se trabajó con concentraciones de RNA de 2000ng/μl para realizar la transcripción reversa de los miRNAs y para la de los mRNAs con 300ng/μl.

Las condiciones para la transcripción reversa son las siguientes:

Incubar la mezcla de que contiene el oligonucleótido [250fmol/μl], RNA, y agua a 70°C por 5 minutos, después a esta mezcla se le agrega dNTPs, enzima transcriptasa reversa (RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase Fermentas) buffer 5x RT y agua y se vuelve a incubar a 37°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora y 70°C por 10 minutos.

Para la PCR a la mezcla anterior se le adiciona MgCl₂, dNTPs, oligonucleótidos forward y reverse (para miRNAs [100fmol/μl] y para mRNAs [200fmol]), enzima *Taq* polimerasa (*Taq* DNA Polymerase, Recombinant, invitrogen), buffer 10x y agua.

3.11.1. Programa de PCR punto final

CICLOS	miR-35 y miR-58	rncs-1, gld-1, lin-23 y actina
1	95°C – 2 minutos	95°C – 2 minutos
30	95°C – 15 segundos	95°C – 15 segundos
	45°C – 10 segundos	50°C – 10 segundos
	72°C – 1 minuto	72°C – 1 minuto
1	72°C – 5 minutos	72°C – 5 minutos
Final	4°C ∞	4°C ∞

3.11.2. qPCR microRNAs y mRNAs

Para cuantificación de miRNAs se utilizó cDNA a una concentración de 2000ng/uL para cada reacción (cada reacción se hizo por duplicado) y se utilizó el equipo LightCycler 2.0 de Roche. La concentración de los primers fue 1μM, el Master mix (LightCycler TaqMan Master) se usó al 1x y Hydrolysis Probes 0.1μM en un volumen final de 18 μL.

La cuantificación de mRNAs se hizo con el equipo Step One Applied Biosystems, la concentración de cDNA que se utilizó fue de 100ng/uL para cada

reacción (cada reacción se hizo por triplicado). La concentración de los primers fue de 50nM, el Master mix (**SYBR Green PCR Master Mix**) se utilizó al 1x.

3.11.3. Programa para qPCR

CICLOS	miR-35-3p, -36-3p, -39-3p, -240-5p, -246-3p y miR-58	gld-1, lin-23 y β -actina
1	95°C – 15 minutos	95°C – 2 minutos
40	94°C – 15 segundos	95°C – 15 segundos
	45°C – 30 segundos	50°C – 10 segundos
	70°C – 30 segundos	72°C – 1 minuto
Final	27°C ∞	27°C ∞

4. PROBLEMA

La falta prolongada de alimento es un problema que con frecuencia enfrentan los organismos provocando alteraciones metabólicas que tienen consecuencias sobre el desarrollo y la salud.

5. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento a nivel molecular de este problema podría ayudar a disminuir los efectos negativos que produce la falta de alimento en los organismos.

Recientemente se ha destacado la participación de miRNAs en diversos procesos celulares por lo cual es importante estudiar su posible participación en respuesta al estrés nutricional.

6. HIPÓTESIS

El ayuno de 12 horas como un tipo de estrés nutricional desencadenará cambios en la expresión de microRNAs.

7. OBJETIVOS

Objetivo general:

Identificar microRNAs que cambien su expresión después de 12 horas de ayuno en larvas L4 de *Caenorhabditis elegans*.

Objetivos específicos:

- Montaje de condiciones de ayuno de larvas L4.
- Determinación de fenotipo asociado al ayuno de 12 horas en larvas L4.
- Perfil de expresión de miRNAs mediante Secuenciación Masiva en larvas L4 de *C. elegans* en condiciones normales y en ayuno de 12 horas.
- Selección de algunos miRNAs candidatos que cambian su expresión y confirmar los cambios mediante el uso de otras metodologías.
- Identificación de los mRNAs blanco de los miRNAs elegidos y determinar si su expresión se ve afectada en condiciones de ayuno.

8. RESULTADOS

8.1. Análisis fenotípico

8.1.1. Comparación de tamaños

Utilizamos larvas L4 para evitar la entrada en diapausia L1 o dauer, debido a que la condición en la que se trabajó fue la falta de alimento, así como para evitar la etapa adulta la cual se encuentra comprometida con procesos reproductivos.

Encontramos que las larvas L4 temprana sometidos a un período de ayuno por 12 horas eran más pequeñas en comparación con los animales bien alimentados (Fig. 11A). La longitud de los animales fue de $0,75 \pm 0,01$ mm y $0,59 \pm 0,01$ mm (media \pm error estándar de la media) para los animales bien alimentados y 12 horas de ayuno, respectivamente (Fig. 11B). También observamos que al realimentar a los gusanos durante 3 horas, recuperaron su tamaño, alcanzando una longitud de 0.8 mm \pm $0,01$, mostrando una diferencia significativa entre el grupo control y los que permanecieron en ayuno de 12 horas, y entre éstos y los realimentados por 3 horas, con una $p < 0.0001$.

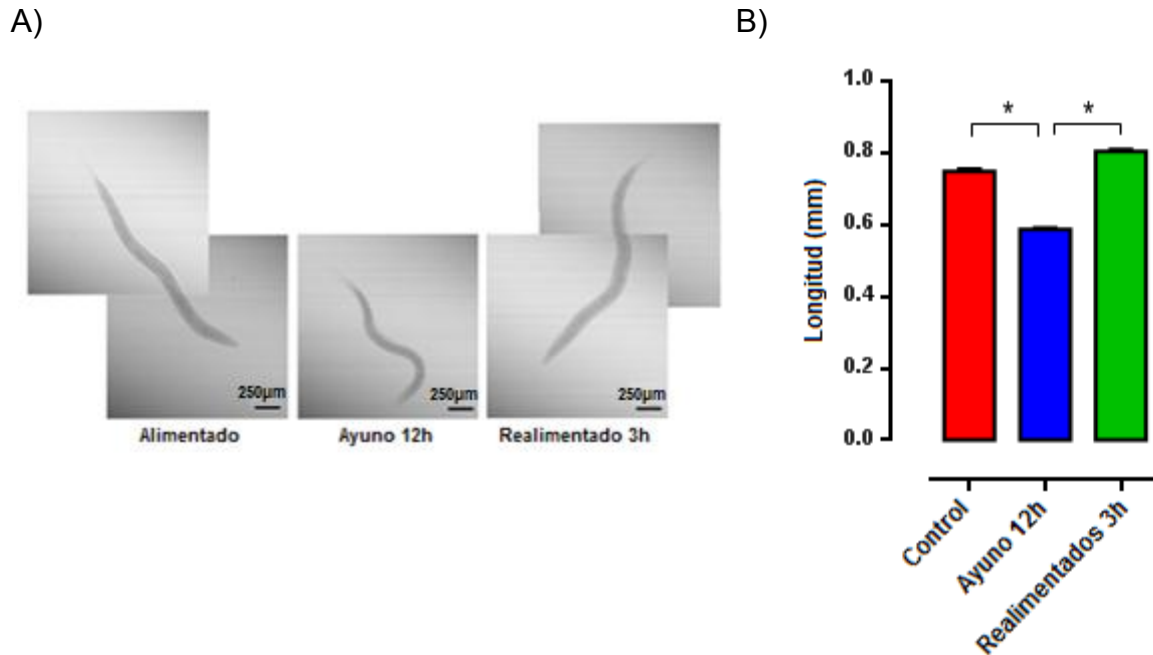


Figura 14. Comparación de tamaños entre gusanos alimentados, sometidos a ayuno de 12 horas y realimentados por 3 horas mediante Differential Interference Contrast microscopy (DIC). $n=30$ gusanos por grupo, $p < 0.0001$, Wilcoxon Signed Rank Test.

8.1.2. Acumulación de lípidos

Examinamos la acumulación de lípidos en los gusanos de las tres condiciones de trabajo (alimentados, ayuno de 12 horas y realimentados por 3 horas) mediante la tinción con el colorante vital Oil-Red, se observaron fuertes cambios después de la falta de alimento y la reincorporación de este, sobre la tinción de lípidos. (Figura 15).



Figura 15. Comparación de almacenamiento de lípidos entre gusanos alimentados, en ayuno de 12 horas y realimentados por 3 horas. Los gusanos se tiñeron con el colorante vital Oil-Red.

La acumulación de lípidos se da en unas estructuras llamadas gotas de grasa (fat droplets), debido a que *C. elegans* no cuenta con adipocitos para el almacenamiento de lípidos. Los gusanos expuestos a ayuno exhiben una ausencia de dichas estructuras lo que indica que el contenido de grasa fue utilizado como fuente de energía para su supervivencia, después de dicho periodo de ausencia de alimento, se les agregó bacteria para su realimentación durante 3 horas y este tiempo fue suficiente para que volvieran a acumular lípidos en una cantidad considerable, incluso aún más que lo observado en el grupo de animales alimentados.

8.1.3. Progenie

Analizamos la progenie en gusanos alimentados y en ayuno, para observar si la falta de alimento en etapas de desarrollo influye en la reproducción del gusano adulto (figura 16).

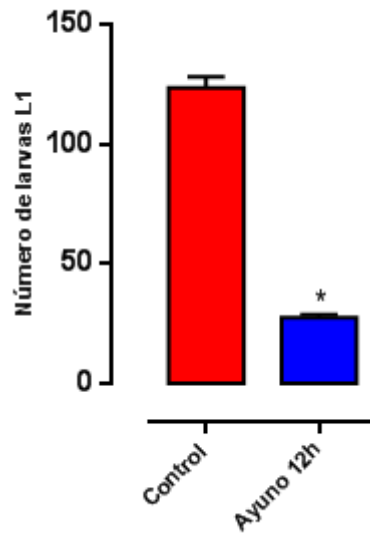


Figura 16. Progenie de gusanos bien alimentados y en ayuno de 12h en larvas L4 temprano. Se contaron las larvas producidas por cada hermafrodita después de tres días de adulto de este. $p < 0.0001$, $n = 21$, 123.4 ± 4.6 ; 27.5 ± 1.3 , para control y ayuno de 12 h respectivamente. *t* test.

Observamos una disminución en la progenie en los gusanos que atravesaron por un ayuno de 12 h en larvas L4 tempranas, en comparación con los gusanos bien alimentados mostrando una disminución del 78% en el número de larvas producidas por cada gusano después de tres días de la etapa adulta. Los gusanos control tuvieron una progenie media de 123 larvas mientras que los gusanos que pasaron por el ayuno de 12 horas sólo presentaron 27 larvas. Con esto podemos decir que la falta total de alimento durante la etapa L4, está ocasionando un fuerte impacto en la reproducción de *C. elegans*.

8.1.4. Tamaño de gónadas

Con los resultados anteriores pudimos observar que la reproducción está siendo afectada por la falta de alimento y esto puede ser debido quizá a defectos en el desarrollo gonadal, por lo cual decidimos medir el tamaño de las gónadas y ver si hay diferencias entre los gusanos alimentados y los que pasaron por 12 horas de ayuno (figura 17).

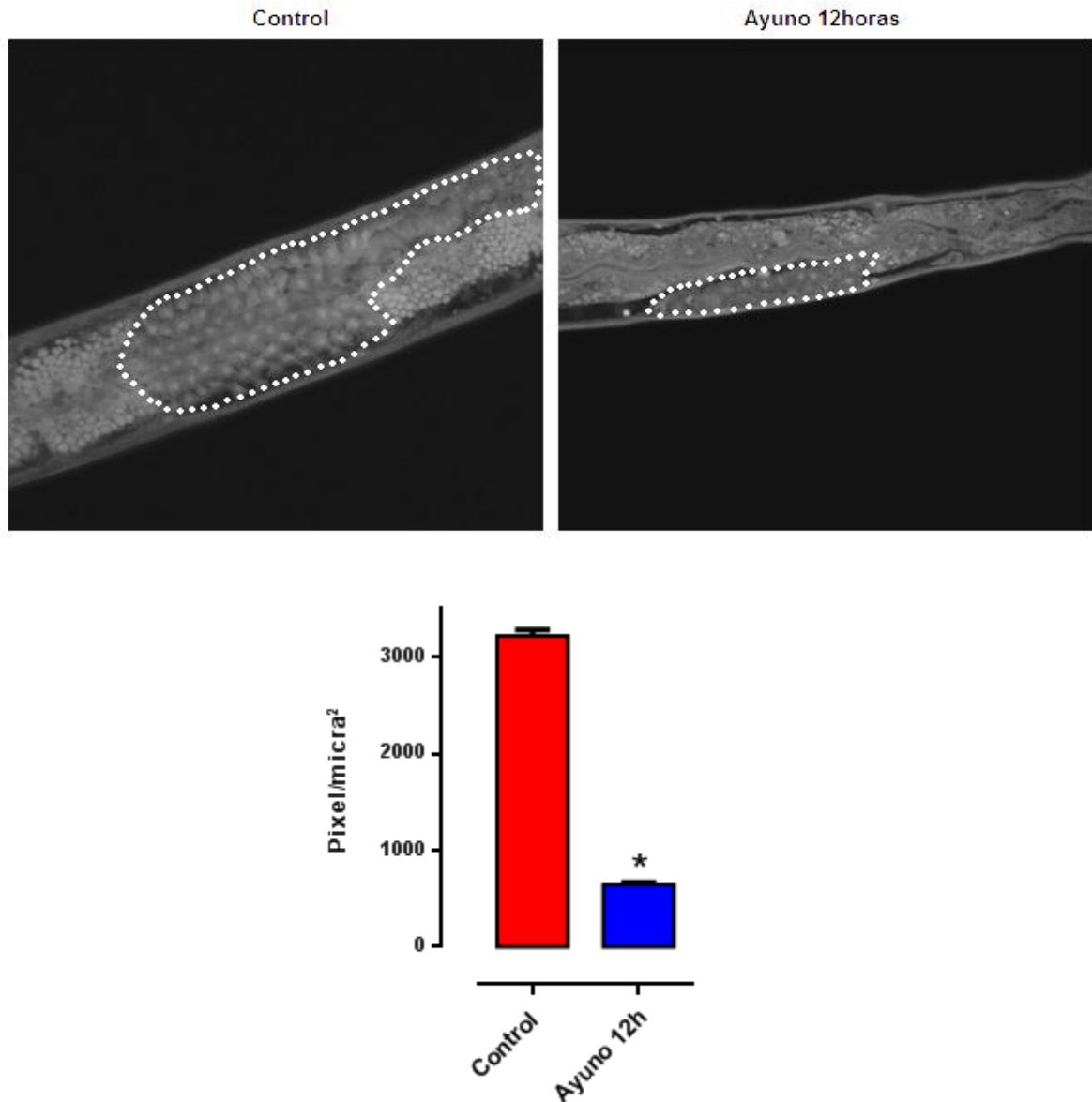


Figura 17. Comparación del tamaño de gónadas de gusanos alimentados y en ayuno de 12 horas. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. n=5 gusanos por grupo. , $p < 0.0079$, Wilcoxon Signed Rank Test.

El análisis mostró una disminución en el tamaño gonadal de los gusanos que pasaron por 12 horas de ayuno en comparación con los gusanos alimentados, este resultado se relaciona con la disminución en la progenie (figura 16), que muestra una dramática disminución.

8.1.5. Estudio de longevidad

Se ha observado en trabajos anteriores que la falta de alimento aumenta la longevidad de algunos organismos, por lo cual decidimos medir el tiempo de vida de los gusanos sometidos a ayuno de 12 horas y posterior realimentación hasta su muerte. (Figura 18).

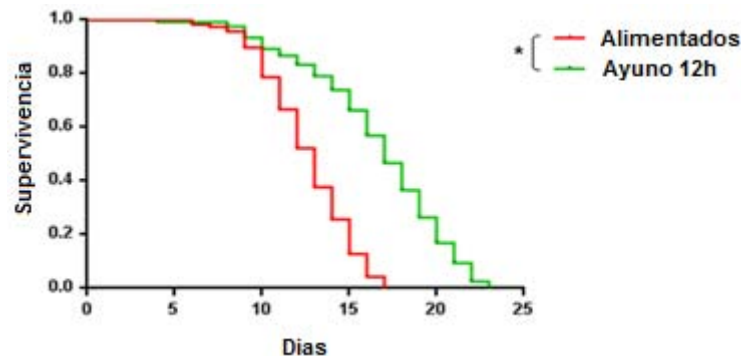


Figura 18. Longevidad de gusanos L4 alimentados y en ayuno de 12 horas. La vida media de los gusanos en ayuno se incrementó ($p < 0.0001$), 12.4 ± 0.2 (alimentados: $n=117$) y 16.9 ± 0.3 (ayuno 12h: $n=112$). Log-rank (Mantel-Cox) test.

La falta de alimento provocó un aumento en la vida media de los gusanos que fueron sometidos a ayuno, este incremento en la vida media de los gusanos en ayuno de 12 horas fue significativo, aumentando un 36% en comparación con el grupo de gusanos alimentados, los días de vida media fueron 16.9 ± 0.3 contra 12.4 ± 0.2 de los alimentados con un valor de $p < 0.0001$.

Con los datos anteriores pudimos comprobar que a nivel fisiológico la falta de alimento provocó cambios dramáticos en el desarrollo normal del gusano, la acumulación de grasa y la vida media. Sin embargo, estos datos no nos dan información de lo que está ocurriendo a nivel molecular para lo cual utilizamos las técnicas como secuenciación masiva, RT-PCR punto final y q-RT-PCR para

analizar qué es lo que ocurre a nivel molecular, en particular, a nivel de microRNAs, en estas condiciones.

8.2. Perfil de expresión de miRNAs mediante Secuenciación masiva en Larvas L4 de *C. elegans* en condiciones normales y en ayuno de 12 horas.

Se construyeron dos bibliotecas a partir de RNA de 20 a 30 bases de longitud, extraído de larvas bien alimentadas y en ayuno de 12 horas, se obtuvieron 30 270 857 y 29 656 856 lecturas respectivamente. Después de la eliminación de secuencias de adaptadores se seleccionaron lecturas de 16 a 28 bases y se obtuvo un total de 23 724 403 lecturas para larvas alimentadas y 22 626 023 lecturas para larvas en ayuno de 12 horas, de las cuales la fracción que corresponde a microRNAs maduros fue del 92% y 89% para larvas alimentadas y en ayuno de 12 horas respectivamente (Figura 19). Encontramos dos miRNAs altamente expresados: miR-58-3p y miR-1-3p, los cuales representan el 50% y 20% respectivamente, de las lecturas que se corresponden a larvas L4 alimentadas y 48% y 18% a larvas en ayuno de 12 horas, la expresión de miR-58-3p y miR-1-3p no cambió de manera significativa entre las muestras de larvas alimentadas y en ayuno.

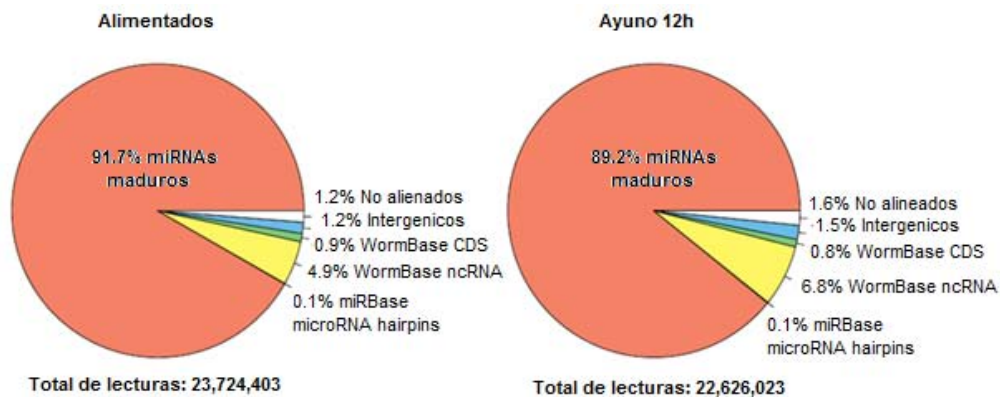


Figura 19. Abundancia de lecturas obtenidas de librerías construidas con RNAs de 16 y 18 pb de longitud, purificados de gusanos alimentados y en ayuno de 12 horas.

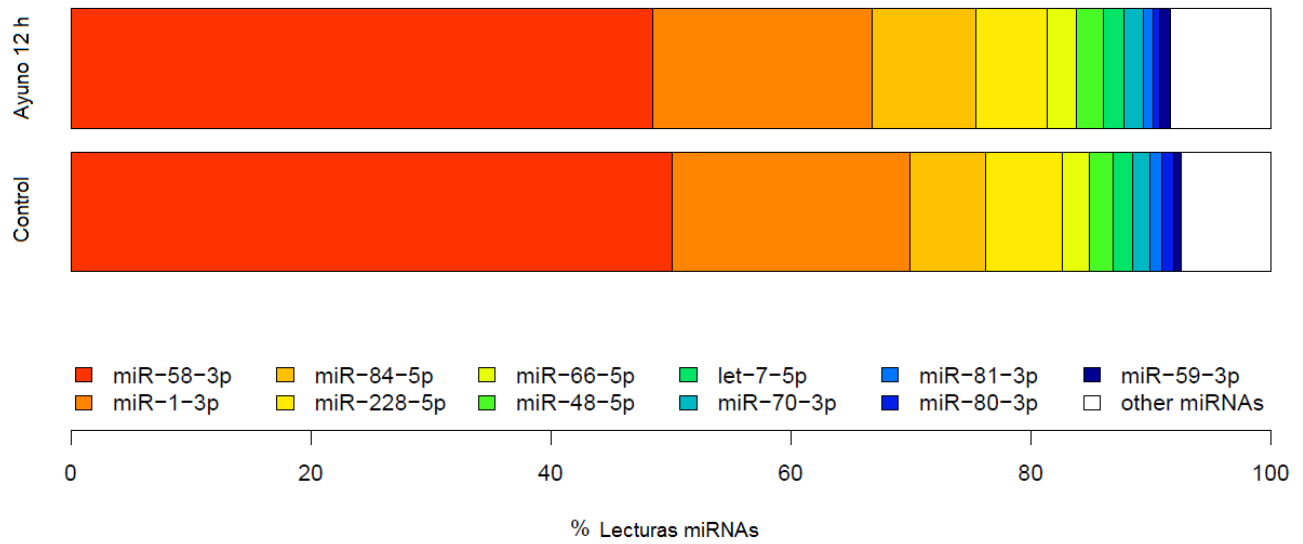


Figura 20. microRNAs más abundantes en condiciones de alimentación y en ayuno de 12 horas en larvas L4.

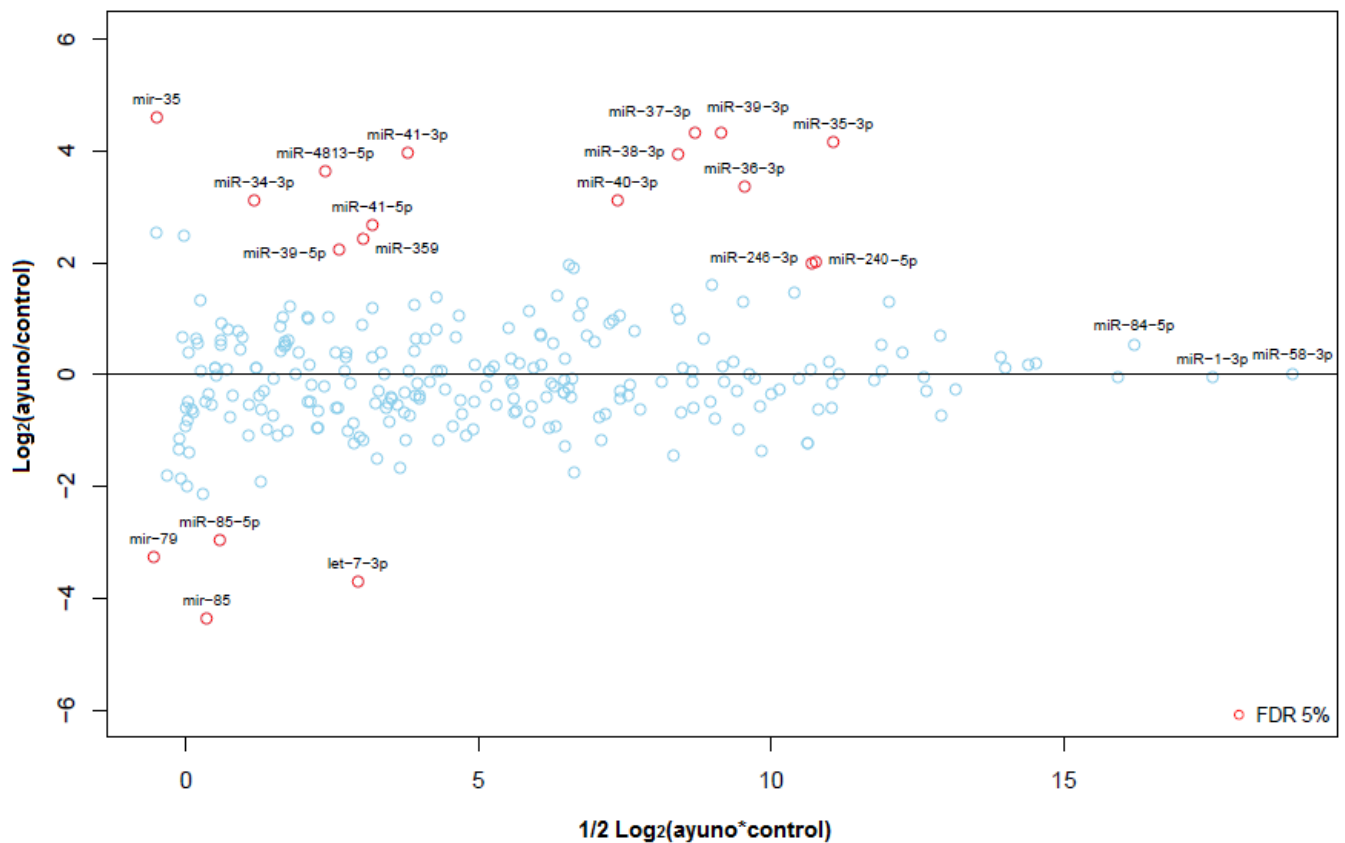


Figura 21. MA-Plot que muestra la expresión diferencial de miRNAs gusanos alimentados y en ayuno de 12 horas. (False Discovery Rate <5%).

La gráfica anterior muestra la expresión de todos los miRNAs conocidos con al menos 1 lectura por millón en cualquier biblioteca. Los miRNAs que se encuentran en la parte superior e inferior con círculos rojos son los que cambiaron su expresión significativamente en condiciones de ayuno. Los textos en gris indican miRNAs precursores que también son expresados diferencialmente. Dentro de los que aumentaron su expresión encontramos a la familia de miR-35-3p (miR-35-3p a miR-41-3p), miR-4813-5p y miR-34-3p, dentro de los que disminuyeron encontramos a miR-85-5p y let-7-3p.

<i>microRNAs</i>	Alimentados	Ayuno 12 horas	Veces de cambio	Log2(Fold Change)
<i>miR-85</i>	2.2	0.1	↓22	-4.29
<i>miR-39-3p</i>	49.9	1008.5	20.2	4.33
<i>miR-37-3p</i>	38.2	768	20.1	4.33
<i>miR-35-3p</i>	230.1	4053.5	17.61	4.13
<i>miR-38-3p</i>	41.3	636.1	15.4	3.94
<i>miR-41-3p</i>	1.7	25.8	15.17	3.94
<i>let-7-3p</i>	13.9	1.1	↓12.6	-3.69
<i>miR-4813-5p</i>	0.8	9.5	11.87	3.61
<i>mir-36-3p</i>	133.3	1356.2	10.1	3.34
<i>miR-79</i>	1	0.1	↓10	-3.2
<i>miR-34-3p</i>	0.4	3.9	9.75	3.08
<i>miR-40-3p</i>	34.3	296.4	↓8.64	3.1
<i>miR-41-5p</i>	2.4	15.5	6.45	2.67
<i>miR-359</i>	2.6	13.9	5.34	2.4
<i>miR-39-5p</i>	2.1	10	4.76	2.23
<i>miR-240-5p</i>	687.2	2784.7	4.04	2.01
<i>miR-246-3p</i>	665.3	2646.1	3.9	1.99

Tabla 5. microRNAs que cambiaron su expresión después de 12 horas de ayuno. En la segunda y tercera columna se muestran las cuentas por millón normalizadas. En la cuarta y quinta columna, las veces de cambio y el logaritmo base 2 de éstas, respectivamente.

8.3. Confirmación de cambio de expresión de miR-35-3p y sus mRNAs blanco *gld-1* y *lin-23* por RT-PCR punto final.

Hemos encontrado que la expresión de todas las formas -3p de los miRNAs que constituyen la familia de miR-35-41 aumentó su expresión de 6 a 20 veces en condiciones de ayuno en larvas L4 tempranas (Tabla I). Se confirmó la expresión *mir-35-3p* (Figura 22) y sus mRNAs blanco *gld-1* y *lin-23* (Figura 23) por RT-PCR punto final, Para estos experimentos, se utilizó como control interno *miR-58-3p*, debido a que su expresión no cambió significativamente en larvas L4 con 12 horas de ayuno en comparación con larvas L4 bien alimentadas.

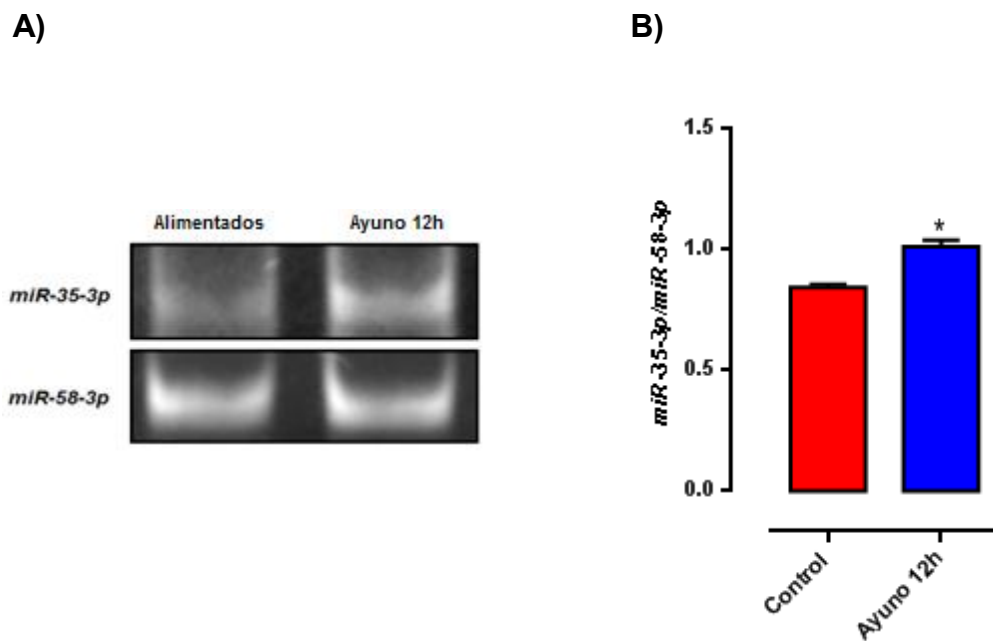


Figura 22. A) RT-PCR punto final de *miR-35* y *miR-58* como control de carga, B) densitometría de las bandas observadas de *miR-35-3p* en gusanos alimentados y en ayuno de 12 horas, normalizadas con *miR-58-3p*. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias de tres experimentos independientes ($p=0.01$), calculado por la prueba t de Student.

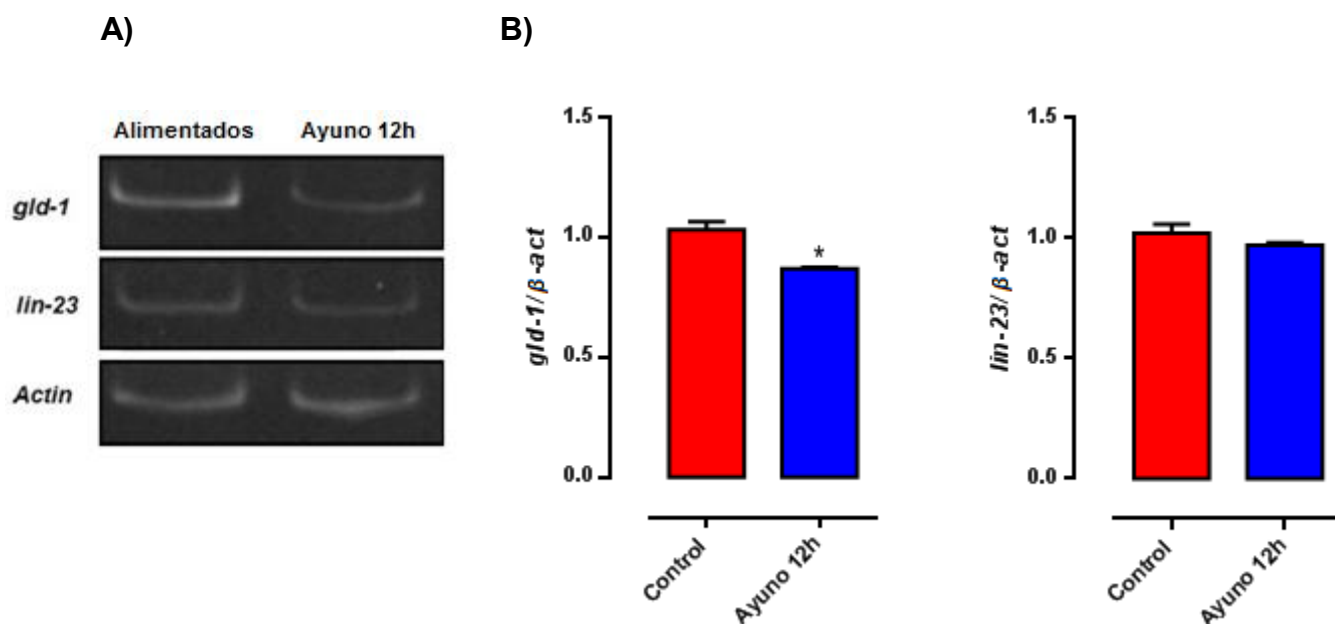


Figura 23. A) RT-PCR punto final de *gld-1* y *lin-23* en gusanos alimentados y en ayuno de 12 horas, B) densitometría de las bandas observadas de *gld-1* y *lin-23* en ambas condiciones y normalizadas con la expresión de *actina*. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias de tres experimentos independientes ($p=0.05$ y 0.1 respectivamente), calculado por Wilcoxon Signed Rank Test.

Los experimentos de RT-PCR punto final confirman los datos obtenidos por secuenciación masiva en donde la expresión de la familia de miR-35-3p presenta un incremento, en este caso se evaluó solo la expresión de un miembro de la familia, y en los valores dados por el análisis de densitometría presentan un cambio significativo las muestras sometidas a ayuno de 12 horas en comparación con los alimentados (Figura 22) y se observa una posible regulación de *gld-1*, mRNA blanco reportado de miR-35-3p, donde se observa una disminución en su expresión después de 12 horas de ayuno, cambio no observado con otro de sus mRNAs blanco, *lin-23*, que permanece sin cambios significativos después de la exposición a la falta de alimento.

8.4. Confirmación de cambio de expresión de miR-240-5p, miR-246-3p y de tres miembros de la familia miR-35: miR-35-3p, -36-3p, -39-3p y sus mRNAs blanco *gld-1* y *lin-23* por qRT-PCR.

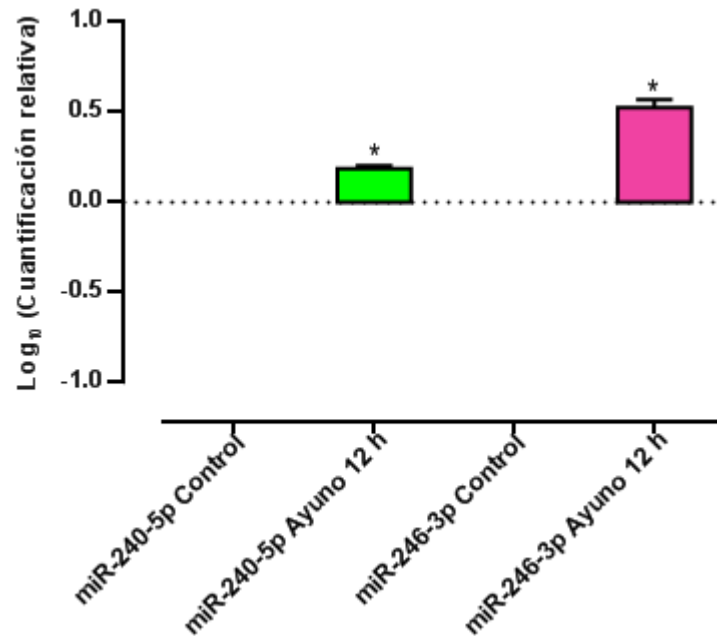


Figura 24. Cuantificación relativa de la abundancia de miR-240-5p y miR-246-3p, normalizados con miR-58-3p en gusanos bien alimentados y en larvas L4 tempranas en ayuno de 12 horas. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos independientes. (miR-240-5p, SEM=12.43; miR-246-3p, SEM=55.02) $p=0.03$, calculado por Wilcoxon Signed Rank Test.

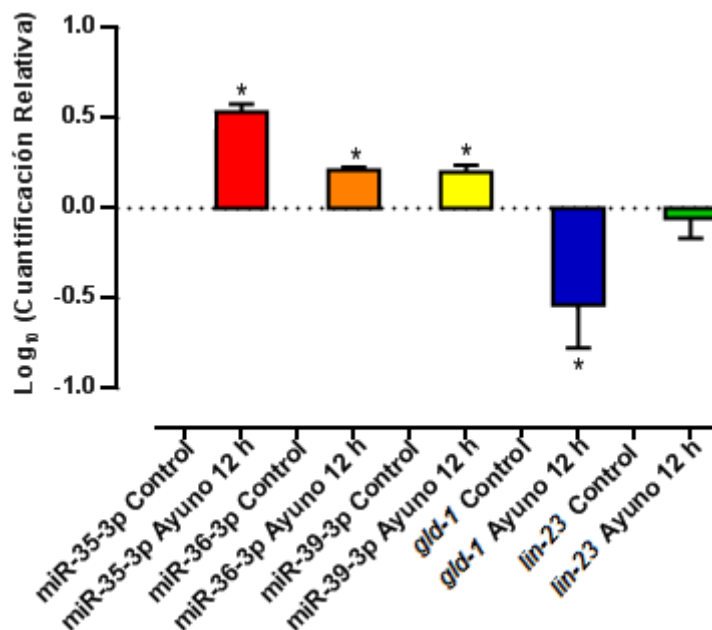


Figura 25. Cuantificación relativa de la abundancia de miR-35-3p, -36-3p, 39-3p, *gld-1* y *lin-23*, los miRNAs fueron normalizados con miR-58-3p; y para *gld-1* y *lin-23* se usó β -actin en gusanos bien alimentados y en larvas L4 tempranas en ayuno de 12 horas. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos independientes. (miR-35-3p, SEM=37.6; miR-36-3p, SEM=14.33; miR-39-3p, SEM=14.73; *gld-1*, SEM= 20.87; *lin-23*, SEM=19.74), $p=0.03$, calculado por Wilcoxon Signed Rank Test.

Se confirmó el cambio de expresión de cinco microRNAs (miR-240-5p, -246-3p, -35-3p, -36-3p, -39-3p) por qRT-PCR los cuales mostraron un cambio significativo en su expresión similar a lo observado en los resultados de secuenciación masiva (Figura 24 y 25). Los genes que se han reportado ser regulados por miR-35-3p son *gld-1* y *lin-23*, por lo que analizamos su expresión en nuestras condiciones, y pudimos observar una disminución significativa de *gld-1* en ayuno de 12 horas en comparación con los gusanos alimentados, no así con *lin-23*, este no muestra cambios significativos (figura 25). Dado que *gld-1* muestra una disminución en su expresión y está expresado en línea germinal suponemos que está relacionado con el notable retardo en el desarrollo gonadal que pudimos observar después de 12 horas de ayuno en larvas L4 (figura 17) y que puede afectar así también la progenie (figura 16).

8.5. Búsqueda de mRNAs blanco predichos para otros microRNAs que cambiaron su expresión de manera significativa.

Se realizó una búsqueda de mRNAs blanco predichos para los miRNAs que cambiaron su expresión después de 12 horas de ayuno, diferentes a la familia de *miR-35-3p*, utilizando las bases de datos microRNA.org, miRanda, TargetScan (Betel D, *et. al.* 2008; Miranda KC, *et. al.* 2006 y Jan CH, *et. al.* 2011) y pudimos observar varios mRNAs de genes involucrados en procesos metabólicos y de desarrollo entre los que encontramos los siguientes:

microRNA	mRNAs blanco	Función	Referencia
miR-35-3p	<i>egl-3</i>	EGL-3, (prohormona convertase) que se une de forma agonista a los ligandos INS-4 y INS-6 (insulin/IGF) , en neuronas.	Hung WL, <i>et al.</i> , 2013.
let-7-3p	<i>gsy-1</i>	Ortólogo del gen glucógeno sintasa-1 en humanos, regula la síntesis de glucógeno que juega un papel importante en la supervivencia durante la falta energía.	Gal TZ, <i>et al.</i> , 2001.
miR-4813-5p	<i>B0301.1</i>	Codifica para una proteína específica transmembranal en el nemátodo; la pérdida de la actividad de B0310.1 vía RNAi resulta en la reducción del contenido de grasa en animales wild-type; en animales mutantes de <i>tub-1</i> se ha visto que interviene en el metabolismo de lípidos.	Ashrafi K, <i>et al.</i> , 2003.
miR-34-3p	<i>atp-5</i>	Asociado a metabolismo energético.	Li H, <i>et al.</i> , 2010.
miR-41-5p	<i>vang-1</i>	Interviene en la regulación de la esperanza de vida, los mutantes en <i>vang-1</i> muestran defectos en la reproducción, disminuye la ovulación y prolonga el tiempo de reproducción. El aumento en la esperanza de vida en mutantes de <i>vang-1</i> depende del receptor Daf-2 (insulin/IGF receptor-1) y Daf-16.	Honnen SJ, <i>et al.</i> , 2012.
miR-85-5p	<i>nhr-28</i>	NHRs son sensores metabólicos, en particular, el producto del gen <i>nhr-28</i> está involucrado en el almacenamiento de lípidos.	Arda HE, <i>et al.</i> , 2010.
miR-39-5p	<i>ins-9</i>	Codifica para un péptido insulín-like. Estos genes son expresados en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y están involucrados el desarrollo post-embriónico.	Chen Y, <i>et al.</i> , 2014.
miR-240-5p	<i>skn-1</i>	SKN - 1 actúa en respuesta al estrés oxidativo. Mediante la vía de señalización de la insulina / IGF- 1. La red de la transcripción regulada por SKN - 1 promueve la longevidad y es un blanco directo importante de la vía de la insulina.	Tullet JM, <i>et al.</i> , 2008.
miR-246-3p	<i>aakg-1</i>	Codifica para una de las cinco subunidades reguladoras gamma de AMPK de <i>C. elegans</i> .	Beale EG, 2008.

Tabla 6. mRNAs blanco de miRNAs que cambiaron su expresión significativamente, diferentes de la familia de *miR-35-3p*, y que están involucrados en procesos metabólicos.

microRNA	mRNAs blanco	Función	Referencia
miR-35-3p	lin-23	Regula proliferación celular.	Liu M, <i>et al.</i> , 2011.
	gld-1	Juega un papel importante en la entrada a meiosis y regula indirectamente la proliferación de la línea germinal.	Liu M, <i>et al.</i> , 2011.
	sup-26	SUP-26 está asociado con PAB-1 (poly (A)-binding protein 1), reprime la expresión de <i>tra-2</i> para regular el desarrollo sexual y la diferenciación de tejidos en <i>C. elegans</i> .	Mapes J, <i>et al.</i> , 2010.
let-7-3p	nasp-2	Interviene en el desarrollo embrionario y la locomoción.	Piano F, <i>et al.</i> , 2002.
	mbk-2	Promueve la transición de ovocito a embrión.	Cheng KC, <i>et al.</i> , 2009.
miR-4813-5p	hsp-3	HSP-3 se expresa constitutivamente a lo largo del desarrollo, siendo más abundante durante el estadio larvario L1.	Heschl MF, <i>et al.</i> , 1990.
miR-34-3p	hbl-1	Es un regulador transcripcional clave para la transición de la etapa L2 a L3 e interviene en la formación de la entrada a dauer.	Karp X, <i>et al.</i> , 2011.
miR-41-5p	vang-1	Interviene en la regulación de la esperanza de vida, los mutantes en <i>vang-1</i> muestran defectos en la reproducción, disminuye la ovulación y prolonga el tiempo de reproducción. El aumento en la esperanza de vida en mutantes de <i>vang-1</i> depende del receptor Daf-2 (insulin/IGF receptor-1) y Daf-16.	Honnen SJ, <i>et al.</i> , 2012.
	elt-4	Codifica para un pequeño factor GATA que está expresado en intestino embrionario y puede intervenir en el desarrollo de éste.	Maduro MF, <i>et al.</i> , 2002.
miR-85-5p	dlg-1	Está situado en uniones adherentes apicales en todos los epitelios y es necesario para la organización del epitelio del intestino embrionario.	Segbert C <i>et al.</i> , 2004.
miR-39-5p	gck-4	Las proteínas GCK (germinal center kinases) están implicadas en una gran variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento y proliferación celular, polaridad, migración y respuesta al estrés.	Schouest KR, 2008.
miR-240-5p	glh-2	Juega un papel importante en el desarrollo de la línea germinal y la fertilidad, en particular en la proliferación, ovogénesis y la producción de espermatozoides en <i>C. elegans</i> .	Kuznicki KA, <i>et al.</i> , 2000.
	lag-1	Interviene río abajo de <i>lin-12</i> y <i>glp-1/Notch-lik</i> , regulando la línea germinal y desarrollo embrionario.	Petcherski AG, <i>et al.</i> , 2000.
miR-246-3p	lin-37	Se localiza en el núcleo y está involucrado en el desarrollo embrionario y larval del nematodo, así como su reproducción y la regulación del desarrollo de su vulva.	Harrison M, <i>et al.</i> , 2006.

Tabla 7. mRNAs blanco de miRNAs que cambiaron su expresión significativamente, diferentes de la familia de *miR-35-3p*, y que están involucrados en procesos reproductivos y de desarrollo.

9. DISCUSIÓN

En nuestros resultados observamos que la falta de alimento por 12 horas en larvas L4 produjo grandes cambios a nivel de fenotipo y de expresión genética .

Algunas características son las siguientes: se observó una menor longitud así como una cantidad de lípidos almacenados disminuída en comparación con los gusanos bien alimentados. Esto se ha visto en estudios anteriores en donde gusanos sometidos a periodos de ayuno de 4-6 horas sufren un agotamiento de sus reservas de grasa (Srinivasan, 2014). Esto puede ser una consecuencia del catabolismo lipídico como mecanismo para volver a establecer la homeostasis.

Otra alteración que observamos fue la disminución de la fecundidad en los gusanos que pasaron por un ayuno de 12 horas, disminuyendo un 78% su progenie en comparación con el grupo bien alimentado. En situaciones de ausencia de alimento la reproducción se ve disminuída con el propósito de reasignar energía a procesos celulares indispensables para la supervivencia (Holliday R, 1989). Se ha visto algo similar en situaciones de restricción dietética, en donde se ha reportado que la disminución en la ingesta de nutrientes incrementa la longevidad de muchas especies, incluyendo primates, pero a menudo se acompaña de deterioro de la función reproductiva (Mattison JA, *et al.*, 2012). En particular, la fecundidad se correlaciona negativamente con la cantidad de fuente de alimento bacteriana en *C. elegans* (Klass MR, 1977). Se han propuesto algunas vías participantes en tal efecto como son la vía de señalización de la insulina (insulin/IGF) y mTOR (*let-363*) así como el citocromo P450 (DAF-9/CYP450), la hormona esteroide Δ (7) ácido -dafacronico (DA) y el receptor nuclear hormonal NHR-8/NHR (Thondamal M, *et al.*, 2014), sin embargo aún no está completamente claro cómo es que se regula esta relación entre alimentación, reproducción y longevidad (figura 16).

Además observamos que después del tratamiento de 12 horas de ayuno, el área ocupada por la gónada proximal fue mucho menor que la de los gusanos alimentados (figura 17), una gónada de menor tamaño podría representar uno de los muchos factores que podrían explicar la reducción de la progenie que se

observó en la figura 16, estos datos concuerdan con reportes anteriores en donde ven que la falta de alimento en L4 presentaron una disminución en el tamaño de gónada (Seidel HS, 2011). También se ha observado que esta falta de alimento puede ocasionar muerte por embolsado (eclosión de huevecillos dentro del hermafrodita), diapausia reproductiva, defectos en la gametogénesis y la longevidad. (Angelo G, 2009; Seidel HS, 2011).

Tomando en cuenta que los datos anteriores de defectos en la reproducción afectan la longevidad, quisimos examinar si el ayuno de 12 horas producía cambios, como se ha reportado con la restricción dietética, en donde una reducción en la ingesta calórica sin malnutrición puede aumentar la esperanza de vida en diferentes organismos como levaduras, gusanos, moscas, roedores y posiblemente en primates y humanos (Roth and Polotsky, 2012). Nosotros encontramos que la falta de alimento por 12 horas en larvas L4 provocó un incremento del 36% en la esperanza de vida (Fig. 18). Este aumento es comparable con la extensión en la longevidad provocada por la falta total de alimento en gusanos adultos observada por Kaeberlein y colaboradores (2006), en donde vieron un aumento del 50% en la longevidad.

Hay varios estudios en los que se reporta que el aumento en la longevidad depende de la disminución en la fecundidad, lo que ha llevado a la teoría de que existe una correlación entre el estado reproductivo y el tiempo de vida de los organismos, sin embargo, una relación de causalidad directa aún no se ha establecido.

En un trabajo se reportó que el sistema reproductivo está involucrado no sólo en la propagación de la especie, sino también está regulando el metabolismo y la longevidad. Diversos factores transcripcionales participan en la regulación de la longevidad como DAF-12, DAF-16 (FOXO), PHA-4 (FOXA) y NHR-80 (NHF-4), éstos están involucrados en la regulación de la lipólisis, autofagia, resistencia al estrés y otros procesos que en conjunto mejoran la homeostasis y a su vez prolongan la vida (Antebi A, 2012). Así también se ha visto que las mutaciones en la vía de señalización de la insulina/IGF y la restricción dietética pueden prolongar

la vida en algunos organismos como *Drosophila*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans*, y posiblemente primates, además se ha observado que los organismos con reducida o nula reproducción viven más tiempo que los organismos que se han reproducido (Partridge, *et al.*, 2005). Con lo anterior se puede ver que los mecanismos de señalización coordinan el metabolismo hacia el crecimiento y la reproducción, así como al mantenimiento y la supervivencia de los organismos.

En general, el ayuno de 12hr durante la etapa L4 temprana dio como resultado la modificación del fenotipo normal de los gusanos, encontramos gusanos más delgados y cortos, con una disminución en la acumulación de lípidos, progenie disminuída, reducción en el tamaño de gónadas y un aumento en su longevidad.

El siguiente aspecto que se evaluó fue el cambio en la expresión de microRNAs producido por 12 horas de ayuno, los resultados que arrojó la secuenciación masiva indican que la falta de alimento afecta la expresión de varios miRNAs.

Primeramente, encontramos que la expresión de miR-58-3p y miR-1-3p (microRNAs más abundantes) no cambió significativamente entre las larvas alimentadas y en ayuno de 12 horas (50.1% y 19.8% en larvas alimentadas y 48.5% y 18.2% en larvas que pasaron por 12 horas de ayuno), esto es similar a lo que reportó Kato y colaboradores (2009) en dónde observaron que en larvas alimentadas normalmente la expresión de miR-58-3p y miR-1-3p fue de 46% y 25% respectivamente, además encontraron que la expresión de miR-58-3p estuvo en un rango entre 44% y 54% y la de miR-1-3p entre 22% y 32% en diferentes etapas del desarrollo (embriones, L1, L2, L3, L4, adultos hermafroditas y adultos machos) (Kato, *et al.*, 2009).

El homólogo de miR-58-3p en *Drosophila* (miRNA *bantam*), interviene en el crecimiento de dendritas en células epiteliales, crecimiento larval y regeneración dendrita/axón en el sistema nervioso periférico (Parrish, *et al.*, 2009; Song, *et al.*, 2012). En *C. elegans*, miR-58-3p es miembro de una familia de miRNAs que son altamente expresados (miR-80, miR-81, miR-82 y miR-1834). Se ha observado que mientras mutantes de miR-58-3p no muestran defectos obvios, las mutantes

de cuatro miembros de la familia (miR-58, 80, 81, 82) presentan daños severos como menor tamaño, deficiencias en la puesta de embriones, afección en locomoción e incapacidad para formar dauer (Alvarez-Saavedra, *et al.*, 2010). Los mRNAs blanco predichos que se han identificado para miR-58-3p participan en la replicación, reparación y recombinación de DNA (RPA-1), la remodelación de la cromatina (ISW-1), en la regulación del mecanismo de iRNA (GFL-1) entre otras funciones (Jovanovic, *et al.*, 2010).

Recientemente se demostró que la familia de miR-58/80-82 regula la expresión génica tejido específico de PMK-2 p38 MAPK, proteína que regula la respuesta a ataques bacterianos y que actúa de forma redundante con PMK-1, se ha visto que miR-58/80-82 desestabiliza al mRNA de PMK-2 en tejidos no neuronales. (Pagano, *et al.*, 2015).

El otro miRNA más abundante fue miR-1-3p, es uno de los miRNAs más antiguos identificado en animales y su expresión está conservada durante la diferenciación muscular en todos los animales bilateria, este microRNA interviene en las uniones neuromusculares, regula aspectos de la función pre y post-sináptica de las uniones neuromusculares en *C. elegans* además regula la expresión de dos receptores nicotínicos de la acetil colina (subunidades UNC-29 y UNC-63) alterando así la sensibilidad a la acetil colina (Simon, *et al.*, 2008; Christodoulou, *et al.* 2010). En *Drosophila* se ha demostrado que el homólogo de miR-1-3p tiene un papel importante en el desarrollo muscular (Sokol, *et al.*, 2005).

Se encontraron otros miRNAs abundantes en ambas condiciones, algunos miembros de la familia de let-7 como miR-84-5p, miR-48-5p y let-7-5p que junto con miR-7, miR-241, miR-793, miR-794 y miR-795 forman la familia de let-7 (Mondol, *et al.*, 2012). Let-7 es un gen heterocrónico que regula el tiempo de desarrollo de las transiciones larvarias en *C. elegans*, fue uno de los primeros miRNAs identificado en este nemátodo y esta conservado entre especies (gusanos, moscas, humanos) se ha demostrado que se une al 3'UTR de lin-4,

además se ha visto que mutaciones en este gen causan retraso en las últimas etapas larvarias y letalidad. Es un RNA de 21 nucleótidos que es complementario a las regiones 3' UTR de *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42*, y *daf-12*, lo que indica que la expresión de estos genes puede ser directamente regulada por let-7. (Reinhardt, *et al.*, 2000). Let-7 no se expresa en embriones ni en las primeras etapas larvarias, es hasta las etapas L3, L4 y adulta en las que se ve un aumento de su expresión. (Kato, *et al.*, 2009). La expresión de transcritos primarios de let-7 varía durante cada etapa larvaria, mientras que la expresión de los precursores y los miRNAs maduros de let-7 aumenta hasta etapas tardías del desarrollo cuando la actividad de lin-28 ha disminuído. Se ha reportado que LIN-28 se une a transcritos primarios endógenos de let-7, bloqueando así el procesamiento de Drosha (Van Wynsberghe, *et al.*, 2011). Su regulación también está dada por HBL-1, un factor transcripcional zinc-finger que es homólogo a hunchback en *Drosophila* que reprime la expresión de let-7 (Roush SF, 2009) y por let-60/RAS una GTPasa que se ha observado que su región 3'UTR muestra múltiples sitios de unión para la familia de let-7 (Johnson SM, *et al.*, 2005).

Se identificaron otros miRNAs altamente expresados como miR-228-5p, miR-66-5p, miR-70-3p y miR-59-3p pero se desconoce su función (Figura 20).

Mediante la realización de un análisis de expresión diferencial de los datos obtenidos por secuenciación masiva, identificamos 18 miRNAs que cambiaron su expresión después de 12 horas de ayuno, 14 aumentaron su expresión (miR-34-3p, la familia de miR-35-3p a miR-41-3p, miR-39-5p, miR-41-5p, miR-240-5p, miR-246-3p y miR-4813-5p, y la estructura tallo-asa miR-359) y 4 disminuyeron (let-7-3p y miR-85 -5p, y las estructuras tallo-asa miR-79 y miR-85) (Figura 21, tabla 5).

En el caso de miR-240-5p su función aún no es muy clara, de acuerdo a sus mRNAs blancos predichos se creé que juega un papel importante en el desarrollo de la línea germinal y la fertilidad, en particular en la proliferación, ovogénesis y la producción de espermatozoides en *C. elegans* (Kuznicki KA, *et al.*, 2000).

Por otra parte, miR-246-3p, se ha informado que de alguna manera promueve la longevidad, mutantes en este miARN muestran un menor tiempo de vida que los animales de tipo salvaje y su sobreexpresión aumenta la longevidad, sin embargo sus mRNAs blanco aún no se han identificado, sólo se han predicho dos AAKG-1, una de las cinco subunidades gamma de la quinasa AMP; y lin-37 que se ha visto expresado en embriones y larvas, participando en el desarrollo de la vulva (de Lencastre, *et al.*, 2010).

En nuestros datos observamos miRNAs que cambiaron su expresión que corresponden a las formas menos abundantes de las dos hebras codificadas en cada estructura tallo-asa de miRNAs, denominadas comúnmente como hebras “estrella” (*). Estos miRNAs fueron miR-34-3p, miR-39-5p, miR-41-5p, miR240-5p y miR-48-13-5p que mostraron un aumento en su expresión, mientras que let-7-3p y miR-85-5p disminuyeron su expresión después de 12 horas de ayuno. De estos miRNAs se desconoce su función así como sus mRNAs blanco, pero el marcado cambio en su expresión bajo nuestras condiciones suponemos que tienen un importante papel en la regulación genética, sin embargo hace falta investigarlos para descubrir su función.

El procesamiento de las estructuras tallo-asa de los pre-miRNAs por Dicer genera un miRNA maduro, un miRNA * (estrella) y un loop-miR (estructura tallo-asa pre-miRNA), estos últimos fueron considerados como subproducto de la biogénesis de los miRNAs, actualmente se ha demostrado que también tienen un papel regulador. Recientemente se encontró que ciertos loop-miRs se encuentran en complejos de argonautas en *Drosophila* y humanos, y pueden dar origen a miRNAs maduros activos derivados de la estructura tallo-asa-loop (loop-miR), se ha visto que estas moléculas son capaces de incorporarse en el complejo de silenciamiento inducido por RNA y reprimir la expresión de un mRNA por el apareamiento de bases mediante ensayos estándar de luciferasa (Okamura, *et al.*, 2013; Winter, *et al.*, 2013). En nuestros resultados pudimos identificar tres estructuras tallo-asa de miRNAs que son expresados diferencialmente, miR-359 que aumentó y miR-79 y miR-85 que disminuyeron su expresión, llama la atención que estén cambiando diferencialmente su expresión debido que también pudiesen

estar regulando ciertos procesos en condiciones de falta de alimento, sin embargo falta determinar si se pueden incorporar a complejos Argonautas para identificar su posible papel regulador.

Se realizó una búsqueda de mRNAs blanco predichos para los miRNAs que cambiaron su expresión después de 12 horas de ayuno, diferentes a la familia de miR-35-3p, y pudimos observar varios mRNAs de genes involucrados en procesos metabólicos y de desarrollo.

En los referentes a procesos metabólicos identificamos genes involucrados en la vía de señalización de la insulina (IGF) tales como *ins-9*, *vang-1* y *skn-1*, mRNAs blanco predichos de *miR-39-5p*, *miR-41-5p* y *miR-240-5p* respectivamente (Tabla 6) (Chen Y, *et al.*, 2014; Honnen SJ, *et al.*, 2012; Tullet JM, *et al.*, 2008 y Gerisch B, *et al.*, 2004), debido a su participación en la vía de señalización de la insulina se ha reportado que son expresados en respuesta a disponibilidad de nutrientes y que intervienen en el incremento de la esperanza de vida, los cuales pudiesen ser responsables del fenotipo observado en nuestros resultados de ayuno de 12 horas en los que el tiempo de vida de gusanos en estas condiciones, incrementó.

También identificamos algunos mRNAs que intervienen en procesos metabólicos tal es el caso de *B0301.1* que pudiera ser blanco de *miR-4813-5p* que se ha reportado que está involucrado en la acumulación de lípidos (Ashrafi K, *et al.*, 2003) y *NHR-28*, que codifica para un receptor de la hormona nuclear que interviene en el almacenamiento de lípidos y podría ser blanco de *miR-85-5p*. Estas predicciones parecen ser consistentes con los resultados reportados por Van Gils (2005) en los que mencionó que el ayuno provoca cambios en los niveles de expresión de mRNAs de varios genes implicados en procesos como la beta-oxidación mitocondrial y la síntesis de ácidos grasos mono y poliinsaturados, cuya expresión podría ser regulada por miRNAs (Van Gils, *et al.*, en 2005).

Dentro de los que intervienen en procesos de desarrollo encontramos a *gck-4* mRNA blanco de *miR-39-5p* y *glh-2* y *lag-1*, mRNAs blanco de *miR-240-5p*,

(Tabla 7), estos juegan un papel importante en el desarrollo de la línea germinal, proliferación celular, fertilidad, ovogénesis y crecimiento (Schouest KR, 2008, Kuznicki KA, *et al.*, 2000; Petcherski AG, *et al.*, 2000).

Esta información nos da una idea de las vías que pudieran encontrarse afectadas cuando no hay disponibilidad de nutrientes y las alteraciones que puede llegar a ocasionar en un organismo la falta de alimento en etapas tempranas de desarrollo.

En nuestros resultados observamos que la familia de miR-35-41 aumentó su expresión de 6 a 20 veces después de un ayuno de 12 horas, todos ellos se encuentran localizados en el cromosoma II, un cluster contiene a miR-35, -36, -37, -38, -39, -40 y -41 y otro contiene a miR-42, -43 y -44, sin embargo miR-43 y -44 no pertenecen a la familia de miR-35, esta familia de microRNAs se encuentra conservada en gusanos y planaria (Lau, *et al.*, 2001; Lu YC, *et al.*, 2009). En *C. briggsae* y *C. remanei* está compuesta por 17 miembros, mientras que *C. brenneri* tiene 27 (Shi Z, *et al.*, 2013). Se ha encontrado que miR-35 se expresa en la mayoría de las células embrionarias, primero en el inicio de la gastrulación y aumenta en el inicio de la elongación, mutantes termosensibles de miR-35-41 presenta letalidad embrionaria y larvaria (Miska, *et al.*, 2007; Kato, *et al.*, 2009, Alvarez-Saavedra y Horvitz 2010). Esta letalidad fue rescatada por la introducción de cada uno de los miembros de la familia de manera individual, por lo que se concluyó que los miRNAs de esta familia tienen una función redundante y es suficiente la presencia de uno sólo para completar el desarrollo embrionario. También se reportó que esta familia se expresa específicamente en la ovogénesis y no así en la espermatogénesis (Alvarez-Saavedra y Horvits, 2010). Aparte de su participación en la proliferación de las células germinales, esta familia juega un papel importante en la transición de la fase G1 / S en células intestinales, la pérdida los miembros de la familia de miR-35 muestra una disminución significativa en el número de núcleos intestinales y de la gónada distal mitótica (Liu, *et al.*, 2011).

Recientemente, se encontró que la familia de miR-35-41 es importante para las funciones relacionadas con el RNA de interferencia (RNAi), se ha visto que los gusanos que carecen de miR-35-41 muestran una expresión reducida de lin35 /Rb homólogo en *C. elegans* del gen supresor de tumor de Retinoblastoma, que también está implicado en la regulación de la capacidad de respuesta de RNAi. La familia de miR-35-41 inhibe la vía de RNAi exógeno mediante la regulación positiva de la expresión de la proteína LIN35/Rb, este trabajo demuestra que los miRNAs además de regular la expresión génica mediante la unión directa a mRNAs, también tienen la capacidad de afectar la actividad de otras vías como la de interferencia de RNA (Massirer, *et al.*, 2012).

También se le ha encontrado un papel esencial a la familia de miR-35 en el desarrollo embrionario como un importante regulador de la capacidad reproductiva; se observó que en mutantes termosensibles las cuales tenían una delección del cluster de miR-35 lo que provocó que presentaran una reducción en la fecundidad en hermafroditas como resultado de defectos en los espermatozoides y disfunción de gónadas, esos miRNAs juegan un papel importante en la fertilidad de los machos promoviendo una adecuada morfogénesis de estructuras específicas de éstos lo que indica que la actividad de esta familia de miRNAs no sólo es esencial para el desarrollo embrionario sino que también le permite al gusano desarrollar posteriormente plena capacidad reproductiva (McJunkin and Ambros, 2014). En la condición de ayuno de 12 horas, la sobre expresión de miR-35-3p regulará negativamente la transición G1 / S en las células intestinales y regulará negativamente ovogénesis (Liu M, *et al.*, 2011), centrándose sólo en la supervivencia del organismo. Además se ha observado que mutantes de miR-35-41 también muestran una mayor sensibilidad al RNAi endógeno (Massirer KB, *et al.*, 2012), se puede decir que el ayuno puede causar una reducción en la sensibilidad al RNAi endógeno, ya que la expresión de los miembros de la familia miR-35-41 ha aumentado en esta condición. Si este es el caso, será interesante investigar cuáles son las consecuencias fisiológicas de tener sensibilidad reducida al RNAi endógeno durante el ayuno.

Se ha reportado que los genes conservados *lin-23* y *gld-1* son blancos directos de miR-35-3p (Liu M, *et al.*, 2011), los cuales están involucrados en la proliferación celular en el intestino y en la regulación de la línea germinal respectivamente. Se ha descrito que la transición de la fase G1/S es regulada por tres vías, CKI (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor), SCF (Skp1-Cul1-F box) y Rb (Retinoblastoma)/ E2F. El complejo SCF muestra la actividad de ubiquitina ligasa E3 implicada en la degradación de algunas proteínas CYE-1 (ciclina E-1) (Dealaly, *et al.*, 1999; Wang, *et al.*, 1999) y CDC-25.1 (cell division cycle related) regula de manera negativa la transición de la fase G1 / S. Los genes *cul-1* (Culin) y *lin-23* (abnormal cell Lineage) codifican para componentes del complejo SCF (Kipreos, *et al.*, 2000), también se ha visto que mutantes de *lin-23*, presentan hiperplasia intestinal (Hebeisen y Roy, 2008). Es así que mediante la regulación de *lin-23*, miR-35 participa en la transición de la fase G1 / S a través de la inhibición de la vía Rb / SCF en el desarrollo del intestino.

GLD-1 (defective in Germ Line Development) juega un papel importante en la determinación del inicio de la meiosis y por medios indirectos, regula la proliferación mitótica de la línea germinal (Francis, *et al.*, 1995; Jones, *et al.*, 1996), también forma parte de la vía de señalización GLP-1 (abnormal Germ Line Proliferation)/Notch, GLP-1 es un regulador crítico de al menos dos vías de desarrollo distintas. Es el regulador central del paso de la mitosis a la meiosis en el brazo distal de la gónada (Austin y Kimble, 1987), y se requiere para la formación de células endodérmicas en la parte anterior del embrión en la etapa celular 4 (Mickey, *et al.*, 1996). GLD-1 es una proteína de unión a RNA, miembro de la familia STAR (for signal transduction and activation of RNA metabolism) que incluye humano/ratón Quaking (QKI), Sam68 y en *Drosophila* HOW. Las proteínas STAR contienen una región conservada con un dominio de unión KH-maxi y dos dominios conservados que flanquean (Qua1 y Qua2). Las múltiples funciones en el desarrollo de la línea germinal indicadas por mutantes de *gld-1* sugieren que *gld-1* tiene varios mRNAs blanco, una mutante de *gld-1* ocasiona defectos en la ovogénesis y formación de tumores en la parte proximal de la gónada (Lee y Schedl, 2010).

Debido al considerable cambio de expresión de miR-35-3p en los datos obtenidos en la secuenciación masiva, a sus mRNAs blanco reportados (*gld-1* y *lin-23*) y a la importancia de las vías que se ha descrito que regulan, nos interesó evaluar la expresión de estos genes en nuestras condiciones de ayuno de 12 horas en larvas L4. Se encontró que mientras miR-35-3p aumentó, la expresión del mRNA *gld-1* disminuyó, resultado que es consistente con la idea de que un aumento en la expresión de miR-35-3p posiblemente podría conducir a la degradación del mRNA de *gld-1*, uno de los posibles resultados de la regulación mediada por miRNAs. En el caso de mRNA *lin-23*, su expresión no mostró diferencia significativa lo que nos lleva a pensar que esta regulación podría estar dada a nivel de la inhibición de la síntesis de la proteína, para lo cual es necesario verificarlo mediante las técnicas correspondientes.

Tomando en cuenta los aspectos anteriores, la regulación dada por miR-35-41 sobre las funciones de la división celular y la ovogénesis nos hacen explicar cómo la falta de alimento por 12 horas ocasiona que dichos eventos se vean frenados, esto tiene sentido ya que ante la falta de alimento estas funciones no son esenciales, pues las células están enfocadas en la supervivencia y no en la proliferación ni en funciones reproductivas.

En estudios anteriores se ha observado que la falta de alimento por periodos prolongados en el estadio L1 ocasiona el cambio en la expresión de RNAs pequeños, Oded Rechavi y colaboradores (2014), encontraron que RNAs pequeños (secuencias 22Gs y 26Gs, diferentes especies de endo-siRNAs) cambiaron su expresión después de 6 días de ayuno y observaron que estos RNAs pueden estar involucrados en la regulación de la respuesta al estrés, tráfico de lípidos, longevidad y reproducción, incluso pueden ser heredables por lo menos tres generaciones, controlando así la expresión genética de su descendencia. Sugieren que hay una memoria transgeneracional de la historia dietética, que afecta la supervivencia de la progenie (Rechavi, *et al.*, 2014).

Si bien las condiciones a las que nuestros gusanos fueron expuestos difieren a las de ese trabajo, los resultados coinciden en lo referente al cambio en

la expresión genética así como al aumento de la longevidad, metabolismo de grasas y posible regulación de la línea germinal, con lo que es posible explicar que la falta de nutrientes en diferentes etapas del desarrollo tiene un impacto no sólo en el sujeto que pasa por ese tipo de estrés, como se observa en nuestro trabajo, sino que también influirá de manera relevante en la regulación genética de próximas generaciones como ocurrió en el estudio realizado por Rechavi (2014).

Se ha estudiado la conexión entre metabolismo, reproducción y longevidad mediante la regulación de algunas vías de señalización como la de insulina/IGF y TOR, aunque aún no es muy clara esta interacción de eventos ni cómo se regulan exactamente, se han descubierto distintos elementos que participan en estos mecanismos (Hansen M, *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha visto que diferentes mutaciones en la vía de señalización de la insulina como DAF-2 y DAF-16 incrementan el tiempo de vida en gusanos mediante la afectación de genes involucrados en las respuestas a estrés, metabolismo, inmunidad innata, señalización, línea germinal, entre otros (Zhang P, *et al.*, 2013). Por otra parte se sabe que la restricción dietética aumenta la longevidad en varias especies incluyendo primates y que interviene a nivel reproductivo a través de la regulación de DAF-9/CYP450, hormona esteroidea Δ^7 - ácido dafacrónico/DAF-12, NHR-8/NHR y *let-363*/TOR (Thondamal M, *et al.*, 2014), así también en esta regulación se ha reportado la participación de algunos microRNAs como miR-71, miR-84 y miR-241 los cuáles se ha visto que inhiben a AKT-1 y LIN-14, activando la actividad transcripcional de DAF-16 (Shen Y, *et al.*, 2012). Con esto nos podemos dar cuenta que la regulación del metabolismo, reproducción y longevidad está dada por diferentes moléculas que hacen que estos procesos interactúen entre sí. En nuestros resultados observamos que la falta de alimento provocó un cambio en la expresión de distintos miRNAs que pudieran estar regulando diferentes procesos. De los miRNAs que más cambiaron su expresión bajo nuestras condiciones fueron los miembros de la familia de miR-35-3p los cuales aumentaron de 6 hasta 20 veces y que se sabe tienen como mRNA blanco a *gld-1* (gen importante en la proliferación de la línea germinal) y que en nuestras condiciones se encontró disminuído, esto nos indica que la disponibilidad de

nutrientes en etapas tempranas del desarrollo afecta de manera indirecta la longevidad mediante la disminución en la línea germinal que, por lo que se observa en nuestros resultados, puede estar regulada por microRNAs (figura 26).

10. CONCLUSIÓN

Encontramos que las larvas L4 tempranas sometidas a ayuno de 12 horas son de menor longitud que los animales bien alimentados, y al realimentarlas por tres horas recuperan su tamaño normal. En cuanto al gasto de lípidos almacenados observamos que a las 12 horas de ayuno los gusanos utilizaron sus lípidos como fuente de energía para su supervivencia durante este periodo de escasez de alimentos, y al ser realimentados por tres horas almacenaron incluso más grasa que el control, reflejando un comportamiento de prevención ante futuros periodos de estrés por falta de alimento como sucede en humanos. También observamos que el ayuno, seguido de la alimentación normal, produjo un aumento en el tiempo de vida del gusano aumentando su longevidad en un 36% en comparación con el grupo control.

En condiciones normales de alimentación los miRNAs de la familia de miR-35-3p se expresan en estado embrionario (Kato, *et al.*, 2009) pero en nuestros resultados se encontró que la expresión de la familia miR-35-3p aumentó en ayuno de 12 horas en larvas L4 mediante secuenciación masiva y se confirmaron algunos miembros de ésta familia (miR-35-3p, -36-3p, -39-3p), y dos miRNAs diferentes de la familia de miR-35-3p (miR-240-5p y miR-246-3p) por qRT-PCR, mientras que la expresión de *gld-1* muestra una disminución significativa en ayuno de 12 horas con respecto a los gusanos alimentados, lo que indica que los cambios observados en la abundancia de los miembros de la familia de miR-35-3p y de mRNA *gld-1* se relacionan con el estado de alimentación.

Aunque aún falta mucho por descubrir acerca de esta relación entre metabolismo, reproducción y longevidad esta posible regulación dada por microRNAs puede contribuir a una mejor comprensión de la interacción de estos procesos y de otros diferentes como es el caso del cáncer.

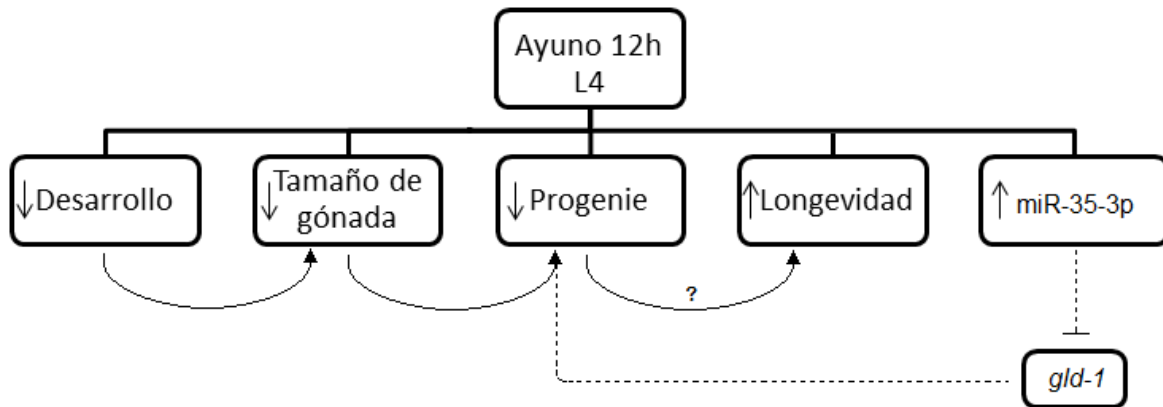


Figura 26. Mecanismo de regulación entre alimentación, reproducción y longevidad dada por la familia miR-35-3p. La falta de alimento en la etapa L4 ocasiona una disminución en el tiempo de desarrollo, por lo que las gónadas presentan un menor tamaño provocando que la progenie se vea disminuida, esto posiblemente está regulado por la inducción de la familia de miR-35-3p en esta condición que puede estar interfiriendo con la traducción de su mRNA blanco *gld-1* involucrado en la proliferación de la línea germinal, ocasionando también un aumento en la longevidad.

11. BIBLIOGRAFÍA

Albero R, Sanz A, Playán Y J. 2004. Metabolismo en el ayuno. *Endocrinol Nutr*;51(4):139-48.

Alvarez-Saavedra E, Horvitz HR. 2010. Many families of *C. elegans* microRNAs are not essential for development or viability. *Current Biology* 20: 367-373.

Angelo G, Van Gilst MR (2009) Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science* 326: 954-958.

Antebi A. 2010. Regulation of longevity by the reproductive system. *Exp Gerontol. Jul*;48(7):596-602

Arda HE, Taubert S, MacNeil LT, Conine CC, Tsuda B, Van Gilst M, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Yamamoto KR, Walhout AJ.2010. Functional modularity of nuclear hormone receptors in a *Caenorhabditis elegans* metabolic gene regulatory network. *Mol Syst Biol. May* 11;6:367.

Arias OG Bolívar ZF, , Ascacio MJ, et al. 2007. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. 2ª Ed. El Colegio Nacional, Academia Mexicana de Ciencias, UNAM, CONACyT. 718p.

Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G.. 2003. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature. Jan* 16;421(6920):268-72.

Austin J, Kimble J. 1987. glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell. 51*:589–599.

Bass, B.L. (2006). How does RNA editing affect dsRNA-mediated gene silencing? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 285-292.

Baugh LR. 2013. To grow or not to grow: nutritional control of development during *Caenorhabditis elegans* L1 arrest. *Genetics*;194(3):539-55.

Beadell AV, Liu Q, Johnson DM, Haag ES. 2011. Independent recruitments of a translational regulator in the evolution of self-fertile nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*.108(49):19672-7.

Beale EG. 2008. 5'-AMP-Activated Protein Kinase Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Biol Med (Maywood). Jan*;233(1):12-20.

Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. 2008. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Research* 36: D149-D153

Blow, M.J.; Grocock, R.J.; van Dongen, S.; Enright, A.J.; Dicks, E.; Futreal, P.A.; Wooster, R., and Stratton, M.R. (2006). RNA editing of human microRNAs. *Genome Biol* 7, R27.

Boulias K, Horvitz HR. 2012. The *C. elegans* microRNA mir-71 acts in neurons to promote germline-mediated longevity through regulation of DAF-16/FOXO. *Cell Metab.* 15:439-50.

Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur AB, Arroyo P. 2013. *Nutriología Médica*. México: Editorial Médica Panamericana.

Castrejón, V., Carbó, R., & Martínez, M. 2007. Mecanismos Moleculares que Intervienen en el Transporte de la Glucosa. *REB*, 26(2), 49–57.

Chen Y, Baugh LR. 2014. *Ins-4* and *daf-28* function redundantly to regulate *C. elegans* L1 arrest. *Developmental Biology* 394; 314–326.

Cheng KC, Klancer R, Singson A, Seydoux G. 2009. Regulation of MBK-2/DYRK by CDK-1 and the Pseudophosphatases EGG-4 and EGG-5 during the Oocyte-to-Embryo Transition. *Cell*. 2009 Oct 30;139(3):560-72.

Christodoulou, F., Raible F, Tomer R, Simakov O, Trachana K, Klaus S, Snyman H, Hannon GJ, Bork P, Arendt D. 2010. Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity. *Nature* 463: 1084–1088.

Crittenden SL, Bernstein DS, Bachorik JL, Thompson BE, Gallegos M, Petcherski AG, Moulder G, Barstead R, Wickens M, Kimble J. 2002. A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*;417(6889):660-3.

Czech B, Zhou R, Erlich Y, Brennecke J, Binari R, Villalta C, Gordon A, Perrimon N, Hannon GJ. 2009. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol Cell*. 36:445-56.

Davalos A, Goedeke L, Smibert P, *et al.* 2011. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108:9232–9237.

Dealy MJ, Nguyen KV, Lo J, Gstaiger M, Krek W, Elson D, Arbeit J, Kipreos ET, Johnson RS. 1999. Loss of *Cul1* results in early embryonic lethality and dysregulation of cyclin E. *Nat Genet* 23:245-248.

de Lencastre A, Pincus Z, Zhou K, Kato M, Lee SS, Slack FJ. 2010. MicroRNAs both promote and antagonize longevity in *C. elegans*. *Curr Biol*. 20(24):2159-68.

Desvergne B, Michalik L, Wahli W. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev*. 86(2):465-514.

Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA, White MF. 2008. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell Metab*; 8 (1):65-76.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012. Instituto Nacional de Salud Pública.

Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. 2006. Mir-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.*; 3:87–98.

Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R, Dean NM, Freier SM, Bennett CF, Lollo B, Griffey R. 2004. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*; 279:52361–52365.

Feng Y, Fan Y, Huiqing C, Zicai L, Quan D. 2014. The emerging landscape of long non-coding RNAs. *Yi Chuan*; 36(5):456-68.

Francis R, Barton MK, Kimble J, Schedl T. 1995. *gld-1*, a tumor suppressor gene required for oocyte development in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139:579-606.

Frost RJ, Olson EN. 2011. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the let-7 family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:21075–21080.

Gal TZ, Solomon A, Glazer I, Koltai H. 2001. Alterations in the levels of glycogen and glycogen synthase transcripts during desiccation in the insect-killing nematode *Steinernema feltiae* is-6. *J. Parasitol.*, 87(4), 2001, p. 725–732.

García-Segura L, Pérez-Andrade M, Miranda-Ríos J. 2013. The emerging role of microRNAs in the regulation of gene expression by nutrients. *J. Nutrigenet Nutrigenomics* 6: 16-31.

Gerin I, Bommer GT, McCoin CS, Sousa KM, Krishnan V, MacDougald OA. 2010. Roles for mirna-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 299:E198–E206.

Ghildiyal M, Xu J, Seitz H, Weng Z, Zamore PD. 2010. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA* 16:43-56.

Hansen M, Flatt T, Aguilaniu H. 2013. Reproduction, fat metabolism, and life span: what is the connection? *Cell Meta*. 17 :10-9.

Harrison MM, Ceol CJ, Lu X, Horvitz HR. 2006. Some *C. elegans* class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 7;103(45):16782-7.

He, L.; He, X.; Lim, L.P.; de Stanchina, E.; Xuan, Z.; Liang, Y.; Xue, W.; Zender, L.; Magnus, J.; Ridzon, D., et al. 2007. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134.

He PP, Ouyang XP, Tang YY, et al. 2014. MicroRNA-590 attenuates lipid accumulation and pro-inflammatory cytokine secretion by targeting lipoprotein lipase gene in human THP-1 macrophages. *Biochimie*; 106:81–90.

Hebeisen M, Roy R. 2008. CDC-25.1 stability is regulated by distinct domains to restrict cell division during embryogenesis in *C. elegans*. *Development* 135:1259-1269.

Heschl MF, Baillie DL. 1990. The hsp70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol B*. 1990;96(4):633-7.

Holliday R. 1989. Food, reproduction and longevity: is the extended lifespan of calorie-restricted animals an evolutionary adaptation? *Bioessays* 10: 125-7.

Honnen SJ, Buchter C, Schroder V, Hoffmann M, Kohara Y, et al. 2012. *C. elegans* VANG-1 Modulates Life Span via Insulin/IGF-1-Like Signaling. *PLoS ONE* 7(2): e32183.

Hung WL, Hwang C, Gao S, Liao EH, Chitturi J, Wang Y, Li H, Stigloher C, Bessereau JL, Zhen M. 2013. Attenuation of insulin signalling contributes to FSN-1-mediated regulation of synapse development. *The EMBO Journal* 32, 1745–1760.

Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and cpt1alpha and affects lipid metabolism. *J Lipid Res*. 2010; 51:1513–1523.

Jan CH, Friedman RC, Ruby JG, Bartel DP (2011) Formation, regulation and evolution of *Caenorhabditis elegans* 3'UTRs. *Nature* 469: 97-101.

Jones AR, Francis R, Schedl T. 1996. GLD-1, a cytoplasmic protein essential for oocyte differentiation, shows stage- and sex-specific expression during *Caenorhabditis elegans* germline development. *Dev Biol* 180:165-183.

Johnson TE, Mitchell DH, Kline S, Kemal R, Foy J. 1984. Arresting development arrests aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 28: 23-40.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, et al. (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120: 635-647.

Jovanovic M, Reiter L, Picotti P, Lange V, Bogan E, Hirschler BA, Blenkiron C, Lehrbach NJ, Ding XC, Weiss M, Schimpf SP, Miska EA, Grosshans H, Aebersold R, Hengartner MO. 2010. A quantitative targeted proteomics approach to validate predicted microRNA targets in *C. elegans*. *Nat Methods*. 7:837-42.

Kaeberlin, TL, Smith ED, Tsuchiya M, Linnea Welton K, Thomas JH, Fields S, Kennedy BK, Kaeberlin M. 2006. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food. *Aging Cell* 5: 487-494.

Karp X, Ambros V. 2011. The Developmental Timing Regulator hbl-1 Modulates the Dauer Formation Decision in *Caenorhabditis elegans* *Genetics*. *Jan*;187(1):345-53.

Kato M, de Lencastre A, Pincus Z, Slack FJ. 2009. Dynamic expression of small non-coding RNAs, including novel microRNAs and piRNAs/21U-RNAs, during *Caenorhabditis elegans* development. *Genome Biology* 10:R54.

Kasuga H, et al. 2013. The microRNA miR-235 couples blast-cell quiescence to the nutritional state. *Nature* 497, 503–506.

Kim J, Yoon H, Ramirez CM, Lee SM, Hoe HS, Fernandez-Hernando C. 2012. Mir-106b impairs cholesterol efflux and increases abeta levels by repressing abca1 expression. *Exp Neurol*; 235:476–483.

Kim SY, Kim AY, Lee HW, Son YH, Lee GY, Lee JW, Lee YS, Kim JB. 2010. Mir-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing ppargamma expression. *Biochem Biophys Res Commun*; 392:323–328.

Kipreos ET, Gohel SP, Hedgecock EM. 2000. The *C. elegans* F-box/WD-repeat protein LIN-23 functions to limit cell division during development. *Development* 127:5071-5082.

Klass MR. 1977. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech Ageing Dev* 6: 413-429.

Koolman J, & Röhm KH. 2005. Color Atlas of Biochemistry. Thieme Retrieved from http://books.google.com.mx/books/about/Color_Atlas_of_Biochemistry.html?id=hjrcWquBnusC&pgis=1

Kuznicki KA, Smith PA, Leung-Chiu WM, Estevez AO, Scott HC, Bennett KL. 2000. Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*. *Development Jul*;127(13):2907-16.

Lant B, Storey KB. 2010. An Overview of Stress Response and Hypometabolic Strategies in *Caenorhabditis elegans*: Conserved and Contrasting Signals with the Mammalian System. *Int J Biol Sci.* 7;6(1):9-50.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858–862.

Lee MH, Schedl T. 2010. *C. elegans* star proteins, GLD-1 and ASD-2, regulate specific RNA targets to control development. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 693:106–122.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–854.

Lehmann, K.A., and Bass, B.L. 2000. Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities. *Biochemistry* 39, 12875-12884.

Levine B, Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 115(10):2679-88.

Li H, Ren C, Shi J, Hang X, Zhang F, Gao Y, Wu Y, Xu L, Chen C, Zhang C. 2010. A proteomic view of *Caenorhabditis elegans* caused by short-term hypoxic stress. *Proteome Science*, 8:49

Liu M, Liu P, Zhang L, Cai Q, Gao G, Zhang W, Zhu Z, Liu D, Fan Q. 2011. mir-35 is involved in intestine cell G1/S transition and germ cell proliferation in *C. elegans*. *Cell Research* 21:1605-1618.

Liu, Y.; Herbert, A.; Rich, A., and Samuel, C.E. 1998. Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase: nucleic acid binding properties. *Methods* 15, 199-205.

Lochner M, Berod L, Sparwasser T. 2015. Fatty acid metabolism in the regulation of T cell function. *Trends Immunol*;36(2):81-91.

Lovis P, Gattesco S, Regazzi R. 2008. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by micrnas. *Biol Chem.* 389:305–312.

Lu YC, Smielewska M, Palakodeti D, Lovci MT, Aigner S, et al. (2009) Deep sequencing identifies new and regulated microRNAs in *Schmidtea mediterranea*. *RNA* 15: 1483-1491.

Ludewig AH, et al. 2004. A novel nuclear receptor/coregulator complex controls *C. elegans* lipid metabolism, larval development, and aging. *Genes Dev.* 18, 2120–2133.

Lujambio, A.; Calin, G.A.; Villanueva, A.; Ropero, S.; Sanchez-Cespedes, M.; Blanco, D.; Montuenga, L.M.; Rossi, S.; Nicoloso, M.S.; Faller, W.J., et al. 2008. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13556-13561.

Maduro MF, Rothman JH. 2002. Making Worm Guts: The Gene Regulatory Network of the *Caenorhabditis elegans* Endoderm. *Dev Biol.* Jun 1;246(1):68-85.

Mapes J, Chen JT, Yu JS, Xue D. 2010. Somatic sex determination in *Caenorhabditis elegans* is modulated by SUP-26 repression of tra-2 translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 19;107(42):18022-7.

Marson, A.; Levine, S.S.; Cole, M.F.; Frampton, G.M.; Brambrink, T.; Johnstone, S.; Guenther, M.G.; Johnston, W.K.; Wernig, M.; Newman, J., et al. 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134, 521-533.

Massirer KB, Perez SG, Mondol V, Pasquinelli AE. 2012. The miR-35-41 family of microRNAs regulates RNAi sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *PloS Genetics* 8: e1002536.

Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, et al. 2012. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature.* 489: 318-21.

Mathews KC, van Holde EK, Aher GK. 2004. Bioquímica. 3th Edición. Pearson Addison Wesley, España.

McJunkin K, Ambros V. 2014. The embryonic mir-35 family of microRNAs promotes multiple aspects of fecundity in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)*;4(9):1747-54.

Michlewski, G.; Sanford, J.R., and Caceres, J.F. 2008. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell* 30, 179-189.

Mickey KM, Mello CC, Montgomery MK, Fire A, Priess JR. 1996. An inductive interaction in 4-cell stage *C. elegans* embryos involves APX-1 expression in the signalling cell. *Development.*122:1791–1798.

Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, et al. 2006. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126: 1203-1217.

Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Abbott AL, Lau NC, Hellman AB, McGonagle SM, Bartel DP, Ambros VR, Horvitz HR. 2007. Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genet* 3:e215.

Mondol V, Pasquinelli AE. Let's make it happen: the role of let-7 microRNA in development. In Eran Hornstein, editor: *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 99, Burlington: Academic Press, 2012, pp. 1-30.

Nakanishi N, Nakagawa Y, Tokushige N, Aoki N, Matsuzaka T, Ishii K, Yahagi N, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Urayama O, Yamada N, Shimano H. 2009. The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. *Biochem Biophys Res Commun*; 385:492–496.

Nelson DL, & Cox MM. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=n9e1NAEACAAJ&pgis=1>

Newman, M.A.; Thomson, J.M., and Hammond, S.M. 2008. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* 14, 1539-1549.

Okamura K, Liu N, Lai EC. 2009. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Mol Cell*. 36:431-44.

Olivares JA, Arellano AP. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev* 27(1): 9-18.

Okamura K, Liu N, Lai EC. 2009. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Mol Cell*. 36:431-44.

Pagano DJ, Kingston ER, Kim DH. 2015. Tissue expression pattern of PMK-2 p38 MAPK is established by the mir-58 family in *C. elegans*. *PLOS Genetics* 11:e1004997.

Pandit A, Jain V, Kumar N, Mukhopadhyay A. 2014. PHA-4/FOXA-regulated microRNA feed forward loops during *Caenorhabditis elegans* dietary restriction. *Aging* 6: 835-855.

Paridis S, Ailion M, Toker A, Thomas JH, Ruvkun G. 1999. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 13: 1438-1452.

Paroo, Z., and Pertsemlidis, A. 2009. microRNAs mature with help from cancer biology. *Genome Biol* 10, 310.

Parrish JZ, Xu P, Kim CC, Jan LY, Jan YN. 2009. The microRNA bantam functions in epithelial cells to regulate scaling growth of dendrite arbors in *drosophila* sensory neurons. *Neuron*. 63:788-802.

Partridge L, Gems D, and Withers DJ. 2005. Sex and death: what is the connection? *Cell* 120, 461–472.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F et al. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86–89.

Pedersen ME. et al. 2013. An epidermal microRNA regulates neuronal migration through control of the cellular glycosylation state. *Science* 341, 1404–1408.

Petcherski AG, Kimble J. 2000. LAG-3 is a putative transcriptional activator in the *C. elegans* Notch pathway. *Nature May 18;405(6784):364-8*.

Piano F, Schetter AJ, Morton DG, Gunsalus KC, Reinke V, Kim SK, et al. 2002. Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*. *Curr Biol*. 12: 1959-64.

Pincus Z, Smith-Vikos T, Slack FJ. 2011. MicroRNA predictors of longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*. 7:e1002306.

Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. 2006. MicroRNA-9 controls the expression of granuphilin/slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem*; 281:26932–26942.

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. 2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*; 432:226–230.

Pullen TJ, da Silva Xavier G, Kelsey G, Rutter GA. 2011. Mir-29a and mir-29b contribute to pancreatic beta-cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (mct1). *Mol Cell Biol*. 31:3182–3194.

Ramirez CM, Davalos A, Goedeke L, Salerno AG, Warriar N, Cirera-Salinas D, Suarez Y, Fernandez-Hernando C . 2011. MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of atp-binding cassette transporter a1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 31:2707– 2714.

Rechavi O, Hourri-Ze'evi L, Anava S, Goh WS, Kerk SY, Hannon GJ, Hobert O. 2014. Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. *Cell*. Jul 17;158(2):277-87.

Reinhart, BJ, Slack, FJ, Basson, M, Pasquinelli, AE, Bettinger, JC, Rougvie, AE, Horvitz, HR, Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.

Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. 2014. miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther.* ;15(11):1444-55.

Roth LW, Polotsky AJ. 2012. Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. *Maturitas* 71(4):315-9.

Roush SF, Slack FJ. 2009. Transcription of the *C. elegans* let-7 microRNA is temporally regulated by one of its targets, *hbl-1*. *Dev Biol* 334: 523-534.

Tate R, Rotondo D, and Davidson J. 2015. Regulation of lipid metabolism by microRNAs. *Curr Opin Lipidol*, 26:243–244

Salway, JG. 2013. *Metabolism at a Glance*. John Wiley & Sons. Retrieved from <https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=dz3JWIFed9IC&pgis=1>.

Sánchez SV, 2006. Vías de señalización que participan en la regulación de la lipólisis en adipocitos. *REB* 25(3): 80-84, 2006.

Scadden, A.D., and Smith, C.W. 2001. RNAi is antagonized by A→I hyper-editing. *EMBO Rep* 2, 1107-1111.

Schedl T. 1997. *C. elegans* II. 2nd edition. Chapter 10 Developmental Genetics of the Germ Line. Department of Genetics, Washington University School of Medicine.

Schouest KR, Kurasawa Y, Furuta T, Hisamoto N, Matsumoto K, et al. 2008 The Germinal Center Kinase GCK-1 Is a Negative Regulator of MAP Kinase Activation and Apoptosis in the *C. elegans* Germline. *PLoS ONE* 4(10): e7450.

Segbert C, Johnson K, Theres C, Van Fürden D, Bossinger O. 2004. Molecular and functional analysis of apical junction formation in the gut epithelium of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol. Feb* 1;266(1):17-26.

Seidel HS, Kimble J (2011) The oogenic germline starvation response in *C. elegans*. *PLoS One* 6: e28074.

Shen Y, Wollam J, Magner D, Karalay O, Antebi A. 2012. A steroid receptor-microRNA switch regulates life span in response to signals from the gonad. *Science*. 338 :1472-6.

Shi Z, Hayes G, Ruvkun G (2013) Dual regulation of the *lin-14* target mRNA by the *lin-4* miRNA. *PLoS One* 8: e75475.

Simon DJ, Madison JM, Conery AL, Thompson-Peer KL, Soskis M, Ruvkun GB, Kaplan JM, Kim JK. 2008. The microRNA miR-1 regulates a MEF-2-dependent retrograde signal at neuromuscular junctions. *Cell* 133:903-915.

Smith Vikos T, de Lencastre A, Inukai S, Shlomchik M, Holtrup B and Slack FJ. 2014. MicroRNAs mediate dietary restriction induced longevity through PHA-4/FOXA and SKN-1/Nrf transcription factors. *Curr Biol.* 24:2238-2246.

Sokol NS, Ambros V. 2005. Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev.* 19:2343-2354.

Song Y, Ori-McKenney KM, Zheng Y, Han C, Jan LY, Jan YN. 2012. Regeneration of *Drosophila* sensory neuron axons and dendrites is regulated by the Akt pathway involving Pten and microRNA *bantam*. *Genes Dev.* 26:1612-25.

Srinivasan S. 2014. Regulation of body fat in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol.* 77: 16.1-16.8.

State of Food Insecurity in the World. FAO: 2014.

Stryer L, Berg, M.J., Tymoczko L.J. 2002. Bioquímica. 5 th Edición. Reverté, S.A. Barcelona, España.

Sun D, Zhang J, Xie J, Wei W, Chen M, Zhao X. 2012. Mir-26 controls Ixr-dependent cholesterol efflux by targeting *abca1* and *arl7*. *FEBS Lett.*; 586:1472–1479.

Sun T, Fu M, Bookout AL, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. 2009. MicroRNA let-7 regulates 3t3-l1 adipogenesis. *Mol Endocrinol*; 23:925–931.

Tate R, Rotondo D, and Davidson J. 2015. Regulation of lipid metabolism by microRNAs. *Curr Opin Lipidol*, 26:243–244.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012–2018.

Thondamal M, Witting M, Schmitt-Kopplin P, Aguilaniu H. 2014. Steroid hormone signalling links reproduction to lifespan in dietary-restricted *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun.* 5 :4879.

Tullet JM, Hertweck M, An JH, Baker J, Hwang JY, Liu S, Oliveira RP, Baumeister R, Blackwell TK. 2008. Direct Inhibition of the Longevity-Promoting Factor SKN-1 by Insulin-like Signaling in *C. elegans*. *Cell*; 132(6):1025-38

Van Gilst MR, Hadjivassiliou H, Yamamoto KR. 2005. A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13496-501.

Van Wynsberghe PM, Kai ZS, Massirer KB, Burton VH, Yeo GW, Pasquinelli, AE. 2011. LIN-28 co-transcriptionally binds primary let-7 to regulate miRNA maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:302–308.

Vázquez CE. 2003. Bioquímica y biología molecular. <http://bq.unam.mx/~evazquez>.

Vickers KC, Landstreet SR, Levin MG, et al. 2014. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proc Natl Acad SciUS A*; 111:14518–14523.

Viswanathan, S.R.; Daley, G.Q., and Gregory, R.I. 2008. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320, 97-100.

Vora M, et al. 2013. Deletion of microRNA-80 activates dietary restriction to extend *C. elegans* healthspan and lifespan. *PLoS Genet.* 9, e1003737.

Wang Y, Penfold S, Tang X, Hattori N, Riley P, Harper JW, Cross JC, Tyers M. 1999. Deletion of the Cul1 gene in mice causes arrest in early embryogenesis and accumulation of cyclin E. *Curr Biol* 9:1191-1194.

Watson E, Walhout AJ. 2014. *Caenorhabditis elegans* metabolic gene regulatory networks govern the cellulareconomy. *Trends Endocrinol Metab.* 25(10):502-8.

Wijesekara N, Zhang LH, Kang MH, Abraham T, Bhattacharjee A, Warnock GL, Verchere CB, Hayden MR. 2012. Mir-33a modulates abca1 expression, cholesterol accumulation, and insulin secretion in pancreatic islets. *Diabetes.* 61:653–658.

Winter J, Link S, Wizigmann D, Hildebrand C, Previti C, Diederichs S. 2013. Loop-miRs: active microRNAs generated from single-stranded loop regions. *Nucl Acid Res* 41: 5503-5512.

Wixon J, Blaxter M, Hope I, Barstead R, Kim S. 2000. *Caenorhabditis elegans*. *Yeast.*17(1):37-42.

Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC, Lai EC. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. 2011. *RNA* 17:312-26.

Yang, W.; Chendrimada, T.P.; Wang, Q.; Higuchi, M.; Seeburg, P.H.; Shiekhattar, R., and Nishikura, K. 2006. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol* 13, 13-21.

Zhang P, Judy M, Lee SJ, Kenyon C. 2013. Direct and indirect gene regulation by a life-extending FOXO protein in *C. elegans*: roles for GATA factors and lipid gene regulators. *Cell Metab.* 17 :85-100.

12. ANEXOS



Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido

Orden de Importancia	Causas	Clave Lista Mexicana	Defunciones
	Total	[01-E59]	611,829 ^b
1	Enfermedades del corazón ^c	[26-29]	113,240
	Enfermedades isquémicas del corazón	[28]	77,284
2	Diabetes mellitus	[20D]	87,245
3	Tumores malignos	[08-15]	73,426
4	Accidentes	[E49-E53, E57-E58]	36,295
	De tráfico de vehículos de motor	[E49B]	15,850
5	Enfermedades del hígado	[35L-35M]	34,156
	Enfermedad alcohólica del hígado	[35L]	12,579
6	Enfermedades cerebrovasculares	[30]	31,997
7	Agresiones	[E55]	23,063
8	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	[33G]	20,062
9	Influenza y neumonía	[33B-33C]	16,902
10	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal ^d	[46]	12,933
	Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el período perinatal	[46F]	5,844
11	Insuficiencia renal	[38C]	11,777
12	Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	[47]	9,308
13	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	[21]	8,264
14	Lesiones autoinfligidas intencionalmente	[E54]	5,909
15	Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	[33D-33E]	5,369
16	Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana	[06H]	4,971
17	Septicemia	[03I]	4,900
18	Anemias	[19A-19B]	3,627
19	Enfermedades infecciosas intestinales	[01]	3,491
20	Úlceras gástrica y duodenal	[35D]	2,457
	Subtotal		509,392
	Paro cardíaco	[29C]	0
	Síntomas, signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio, no clasificados en otra parte	[48]	10,773
	Las demás causas	[-]	91,664

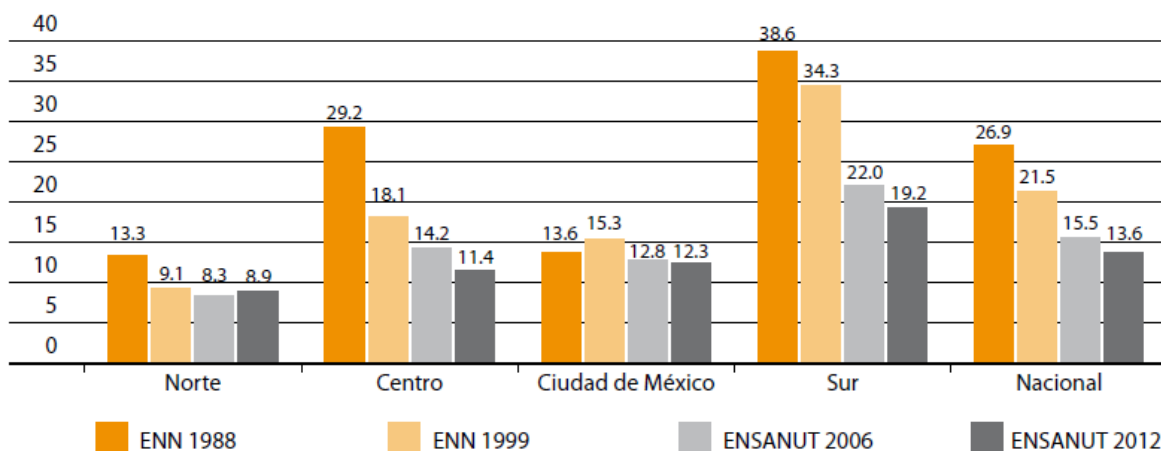
^aPrincipales causas de mortalidad por residencia habitual, sexo y grupo de edad del fallecido. Los criterios para la selección de las 20 principales causas de muerte consideran la Lista Mexicana de Enfermedades y comprende por lo menos el 80% del total de defunciones registradas. Se excluyen los grupos de causas insuficientemente especificadas.

^bSe excluye paro cardíaco (29C).

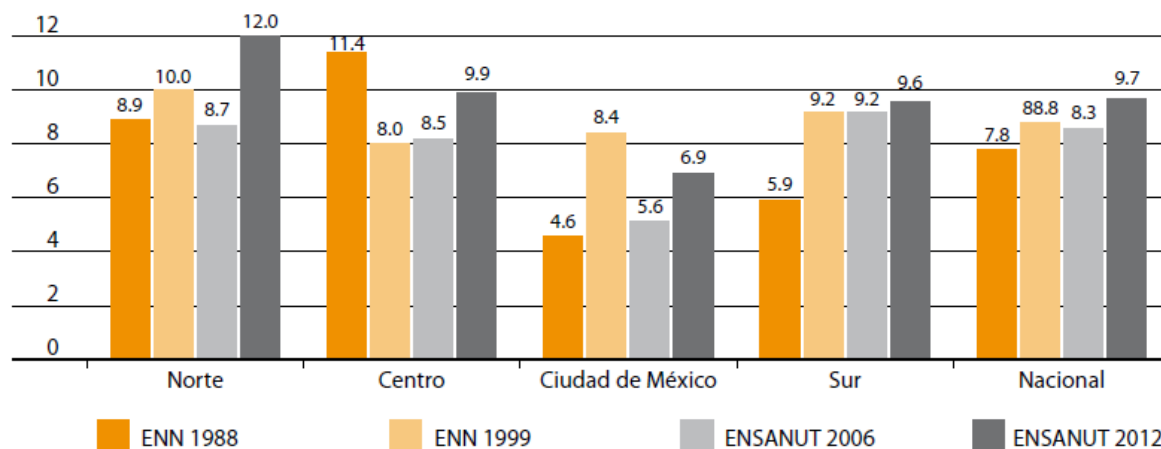
^cIncluye tétanos neonatal (A33).

^dIncluye tétanos obstétrico (A34), trastornos mentales y del comportamiento asociados con el puerperio (F53), y osteomalacia puerperal (M83.0), se exceptúa el subgrupo (43R).

Fuente: INEGI. Estadísticas de mortalidad.



Prevalencia nacional de baja talla en menores de cinco años de la ENN 88, ENN 99, ENSANUT 2006 y ENSANUT 2012 por región de residencia. México, (ENSANUT 2012).



Prevalencia nacional de sobrepeso más obesidad en menores de cinco años de la ENN 88, ENN 99, ENSANUT 2006 y ENSANUT 2012 por región de residencia. México, (ENSANUT 2012)