



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

El exceso de glucosa activa a HLH-30/TFEB y desacopla la vía
autofágica de la longevidad en *C. elegans*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

BERENICE FRANCO JUÁREZ

ASESOR:

DR. DANIEL D. ORTEGA CUELLAR

CO-ASESOR:

DR. ANTONIO VELÁZQUEZ ARELLANO



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.

Dedicatorias

A mis padres. Por enseñarme y demostrarme que tarde o temprano los sueños se cumplen. Sé que el inicio no fue fácil, sin embargo, todo lo que soy es gracias a ustedes.

A mi mamá: porque gracias a tus desvelos, regaños, advertencias, consejos, pero, sobre todo, paciencia e infinito amor, he logrado cumplir una meta que jamás creí posible. Gracias Má por tanta dedicación, por escucharme y tratar de entenderme; siempre ten presente que tú, Papá y Yu son parte de mi "todo". Gracias por ser ese pilar clave e importante en la familia, por enseñarme a ser fuerte y perseverante. Gracias por nunca dejarme caer. Te Amo Má ♥.

A mi papá: por consentirme tanto. Por tu paciencia y comprensión a lo largo de toda mi formación académica. Por resolver todas y cada una de mis dudas (por simple o complejas que pudieran ser) desde que inicié el kínder. Nunca te lo he dicho Pá, pero siempre quise ser Química, como tú. Siempre fuiste y seguirás siendo mi inspiración y ejemplo a seguir. Eres y seguirás siendo uno de mis tesoros más preciados. Aunque esté grande, nunca dejaré de ser "tu amor pequeño". Te Amo Pá ♥.

A Pandita: Yu, desde el momento en que supe que tendría una hermana mi existencia fue más feliz. Gracias por ser tan tú conmigo. Gracias por ser mi cómplice y confidente, por tantas peleas y discusiones; por emprender conmigo nuevas aventuras a pesar de yo iniciarlas con miedo. Si algo te admiro es la seguridad con la que conduces tu vida, sin miedo al fracaso. Gracias por hacerme reír tanto con cada ocurrencia que te inventas. Gracias por estar conmigo en cada paso que doy. También te Amo ♥ 😊

A mis Tí@s, "los Juárez". Por su apoyo incondicional pese a todas las adversidades. También son parte de este pequeño gran logro. Especialmente a mi Tío Hugo Juárez (Gracias por el préstamo ☺) a mi Tía Malena Juárez (†), a mi abuelita Ángela Estrada (†) y a mi abuelito José Juárez (†).

A mi Tío, Armando Franco: porque conoces el verdadero significado de dos palabras: lealtad y hermandad, lo cual se ve reflejado en tu ayuda incondicional, en las buenas y en las malas.

A Claus: Gemelita... qué puedo decirte que no sepas ya! Gracias por todo tu apoyo y por echarme porras jeje, sobre todo en esta última etapa que, sabes bien, no fue nada fácil. Agradezco tu amistad incondicional, consejos y complicidad. Algún día seremos Doctoras, nos iremos de estancia y colaboraremos en muchos proyectos ☺ . ¡Ya estamos en el camino!! ¡Te quiero ♥... eres la mejor!

Al Dr. Daniel Ortega: por confiar en mí y hacerme creer que tengo la capacidad de lograr grandes sueños y metas. Gracias por impulsarme a ser mejor profesionista y por despertar en mí la inquietud, curiosidad y amor por la investigación. Gracias por ser paciente y perseverante.

"...And if we talk about coincidences, you are my favorite one..." Always, Little grasshopper.

A Fanny: Gracias por iniciar y recorrer, junto conmigo, este camino que alguna vez pareció interminable; por soportar mis tonterías y tratar de entenderlas, pero sobre todo gracias por tu amistad y por tantos momentos divertidos en el laboratorio. Te quiero ☺.

A mis amigos Gie Bele y Cele...chamaquitos: los adoro!. Siempre dispuestos a sacarme una sonrisa. Gracias por todos los divertidos momentos que hemos vivido y por siempre escucharme y darme su mejor consejo, tanto en lo profesional como en cosas de la vida. Los quiero! ☺ ☺.

A mis amigos de la Fac: Gaby, Alan, Itzel, Rocío, Mara y Lety. Por hacer de esta etapa de estudiantes una de las más bonitas. Gracias por formar parte de una etapa tan increíble y maravillosa que fue la Licenciatura. Sin duda alguna cada uno de ustedes contribuyó para que hoy pueda decir "lo logré". Los adoro!

Agradecimientos

Al Dr. Antonio Velázquez y a Alain Hernández por recibirnos en el Laboratorio de Nutrición Experimental y brindarnos todas las facilidades para la realización del Servicio Social y de este trabajo experimental.

Al Dr. Arreguín y a los chicos del Instituto de Química de la UNAM por el apoyo técnico otorgado durante mi corta estancia en su laboratorio.

A mi jurado asignado: M en C. Nydia Berenice González Ángeles, M en C. Tais Nopal Guerrero, QFB. Luis Alberto Parra Oaxaca y QFB. Alejandro Gutiérrez García por sus valiosas observaciones emitidas durante la revisión del presente trabajo.

A Elizabeth Moreno por compartir un poco de su conocimiento y experiencia profesional durante mis inicios en la investigación. Gracias.

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por albergar en sus aulas profesores de gran calidad humana y profesional.



Instituto
Nacional
de Pediatría

El presente trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Pediatría, en la Unidad de Genética de la Nutrición perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) Bajo la Dirección del Dr. Daniel D. Ortega Cuellar y fue financiado con recursos del Proyecto CONACYT CB-2012/221953.

Índice

1.	Introducción.....	7
2.	Marco Teórico.....	8
2.1	Autofagia.....	8
2.1.1	La macroautofagia.....	9
2.1.2	La microautogafia.....	9
2.1.3	La autofagia mediada por chaperonas.....	9
3.	Mecanismo de activación de la autofagia.....	11
3.1	Organización funcional del mecanismo autofágico.....	11
3.2	Mecanismo de señalización para la activación de la autofagia.....	15
3.2.1	Vía de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK).....	15
3.2.2	Vía dependiente de mTOR.....	16
3.3	TFEB, regulador maestro de la biogénesis lisosomal y del proceso autofágico.....	18
4.	Otros reguladores del proceso Autofágico- lisosomal.....	22
4.1	El Calcio lisosomal estimula la autofagia.....	22
4.2	El NAD ⁺ estimula la autofagia.....	23
5.	Autofagia en la enfermedad.....	26
6.	<i>Caenorhabditis elegans</i> , organismo modelo para el estudio de la autofagia.....	27
7.	Justificación.....	31
8.	Hipótesis.....	32
9.	Objetivo general.....	32
9.1	Objetivos particulares.....	32
10.	Materiales y métodos.....	33
10.1	Mantenimiento, cultivo y cepas de <i>C. elegans</i>	33
10.2	Obtención de poblaciones sincronizadas de <i>C. elegans</i>	33
10.3	Condiciones experimentales.....	34
10.4	Ensayos de longevidad.....	34
10.5	Extracción de RNA total y análisis por RT-qPCR.....	34
10.6	Análisis por microscopía confocal.....	35
10.7	Determinación de NAD ⁺ por HPLC.....	36
10.8	Detección del flujo autofágico por Western blot.....	37
11.	Resultados.....	39
12.	Discusión.....	52
13.	Conclusión.....	58
14.	Referencias.....	59

1. Introducción

Los mecanismos que tienen los organismos para sentir y responder a cambios en la disponibilidad de nutrientes o de energía son muy importantes para su supervivencia, sin embargo, la pérdida de éstos ha propiciado el desarrollo de enfermedades metabólicas como obesidad, Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) y enfermedades cardiovasculares. Estas enfermedades se generan en parte, porque la sociedad actual ha incrementado el consumo de alimentos hipercalóricos que provocan daños celulares y consecuentemente disminuye la esperanza de vida de los individuos (Koopman et al., 2014). Por lo tanto, uno de los principales retos para la medicina moderna es desarrollar estrategias que permitan mantener la homeostasis celular, a través de mecanismos reguladores que compensen las fluctuaciones nutricionales y así mantener una vida saludable (S. S. Choi, 2011; Wang et al., 2015). En este contexto, incidir sobre la autofagia, un programa celular evolutivamente bien conservado entre *Caenorhabditis elegans* y mamíferos, que se activa para garantizar su supervivencia cuando éstos son sometidos a diversos tipos de estrés; puede ser una herramienta prometedora que mitigue el deterioro de la salud que causan las enfermedades metabólicas.

Recurrentemente se señala a la dieta hipercalórica como un determinante que afecta la esperanza de vida, al impactar negativamente en la longevidad, mientras que la restricción calórica tiene un efecto contrario y se ha considerado como un factor prolongevidad; sin embargo, aún no son del todo entendidos los mecanismos celulares que afectan el exceso de nutrientes, en particular el de glucosa, sobre la

autofagia. La glucosa, es una fuente esencial de energía para muchos procesos celulares, cuyo metabolismo deberá ser regulado eficientemente para mantener la vida saludable de los organismos (Z. Yang & Klionsky, 2010).

Similar a los seres humanos, el exceso de glucosa en el nematodo *Caenorhabditis elegans* desencadena efectos tóxicos, que se observan por la disminución de su vida saludable repercutiendo en su longevidad, indicando que la modificación del entorno sobre el que se desarrolla tendrá consecuencias sobre su sobrevivencia. Dada la importancia del proceso autofágico sobre la longevidad, es plausible sugerir que el excesivo aporte de glucosa podría afectar su actividad, ocasionando la disminución de la esperanza de vida. Sin embargo, las consecuencias de activar el proceso autofágico para la prevención de enfermedades metabólicas es poco claro, por lo que, se requiere de más investigaciones que permitan determinar el impacto que induce el exceso de glucosa sobre la autofagia y si estos cambios están asociados al daño en la regulación metabólica en *C. elegans*.

Por lo tanto, en este trabajo estudiamos la relación que existe entre el exceso de glucosa con el proceso autofágico y la longevidad en *C. elegans*.

2. Marco Teórico

2.1 Autofagia

La palabra “autofagia” (del griego autós “por sí mismo” y phagía “acción de comer”) fue propuesta por el Dr. Christian de Duve en la década de los 60’s durante una conferencia sobre enzimas lisosomales. Desde entonces, la autofagia se ha reconocido como un proceso catabólico importante mediante el cual se reciclan y reutilizan componentes celulares importantes para satisfacer las necesidades energéticas, y evitar la acumulación de compuestos metabólicos que podrían dañar

a la célula. En suma, la activación de la autofagia permite el recambio de proteínas agregadas, de organelos dañados y de patógenos intracelulares. Hasta ahora, se han reconocido tres tipos de autofagia: la macro y micro autofagia y la mediada por chaperonas (Mizushima, 2009; Tooze & Yoshimori, 2010).

2.1.1 La macroautofagia: es un proceso que se realiza en múltiples pasos, en ésta; el contenido citoplásmico es envuelto en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas que, al fusionarse con los lisosomas, llevarán a cabo la degradación de componentes celulares. Brevemente, el proceso completo incluye la iniciación de la formación membranaral, nucleación, elongación, maduración del autofagosoma y la fusión con el lisosoma. Es de mencionarse que la doble membrana de la estructura autofágica es similar a la de otros organelos, como por ejemplo; la del retículo endoplasmático (RE), el complejo de Golgi y la mitocondria, sin embargo el origen de las membranas autofagosomales aún no es del todo entendido y aún está a debate si provienen del RE o del Golgi (Tooze & Yoshimori, 2010).

2.1.2 La microautogafia, un proceso no selectivo de degradación lisosomal, donde la membrana del lisosoma forma pequeñas invaginaciones que internaliza al material citosólico a degradar. Se ha sugerido que la activación de la microautogafia es un evento importante que mantiene el balance energético, tanto en condiciones basales como de estrés (Michalski et al., 2001; Mizushima, 2009).

2.1.3 La autofagia mediada por chaperonas: este tipo de autofagia, no precisa de la formación previa de vesículas, ya que las proteínas

citosólicas que sufrirán degradación tienen un código específico, un pentapéptido Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ), el cual es reconocido por un complejo de chaperonas localizadas en la membrana lisosomal, y mediante éstas se logra la internalización a los lisosomas. En el reconocimiento peptídico participan también otras proteínas que se ubican en la membrana lisosomal (LAMP-2A) y con el complejo chaperona-cochaperona, HspA8 (Tooze & Yoshimori, 2010).

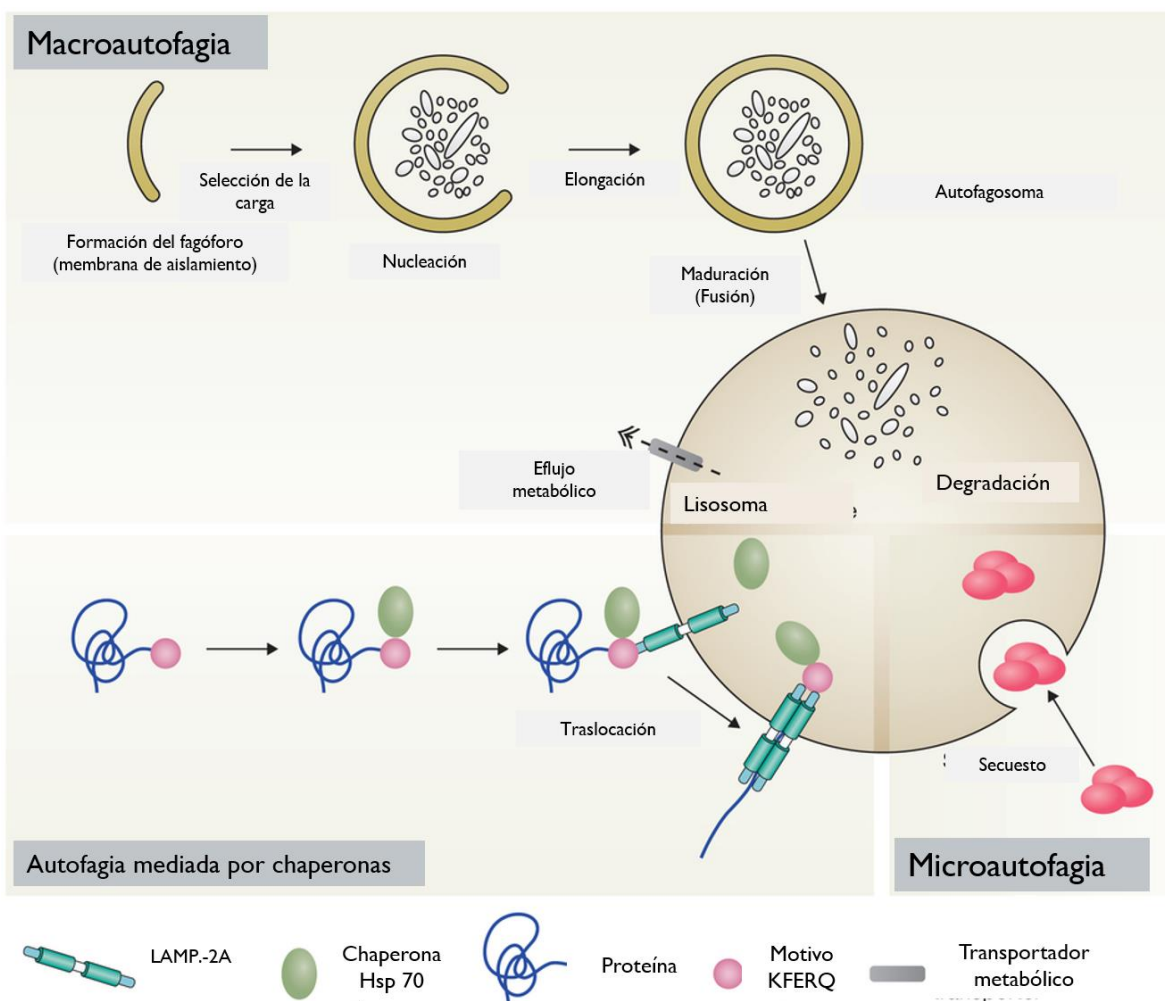


Figura 1. Tipos de autofagia. En mamíferos se han identificado tres tipos de autofagia. A) Macroautofagia: La carga es rodeada junto con una porción del citoplasma por una membrana de aislamiento o fagóforo para la formación del autofagosoma. B) Autofagia mediada por chaperonas: las proteínas a degradar poseen un pentapéptido, secuencia que les permitirá ser reconocidas directamente por la membrana lisosomal para poder ser internalizadas C) Microautofagia: la membrana del lisosoma forma invaginaciones que favorecen la internalización de la carga. (Boya et al., 2013)

3. Mecanismo de activación de la autofagia

3.1 Organización funcional del mecanismo autofágico

La macroautofagia, de aquí en adelante referida como autofagia, es una vía catabólica dinámica que se activa en respuesta a un estrés celular (carencia de nutrientes, hipoxia, organelos dañados, estrés oxidativo, etc.). Para su estudio se divide en 6 fases: 1) Inducción, 2) selección de la carga 3) nucleación, 4) elongación de la membrana de aislamiento, 5) maduración (fusión del autofagosoma con el lisosoma) y 6) degradación de la vesícula.

La inducción, es el primer evento del proceso autofágico donde se forma el pre-autofagosoma (PAS), una estructura que sirve como “andamio” para la formación del fagóforo durante la fase de nucleación. Esta fase es regulada por diversos componentes como el complejo proteico con actividad cinasa que incluye a las proteínas UNC51 (ULK1/ULK2), ATG13, FIP200 y ATG 101 (Noda & Inagaki, 2015). Durante la activación de la autofagia, proceso de degradación no selectivo, se “secuestra” material citoplásmico, el cual contiene tanto organelos como proteínas dañadas que están marcadas con ubiquitina y mediante la proteína p62 permite su reconocimiento para que el material sea internalizado al autofagosoma emergente. A la fecha, no se logrado identificar todas las proteínas encargadas de conducir la carga hacia los autofagosomas, sin embargo; la proteína p62 también denominada secuestrosoma 1 (SQSTM1) funciona como una molécula adaptadora capaz de interactuar con proteínas de fases tardías de la autofagia; como la proteína de cadena ligera 3 (LC3, por sus siglas en inglés), debido a que posee un dominio C-terminal de unión a ubiquitina y una secuencia corta, LIR, que le permite interactuar con la LC3 en la fase tardía del proceso autofágico (Lippai & Low, 2014).

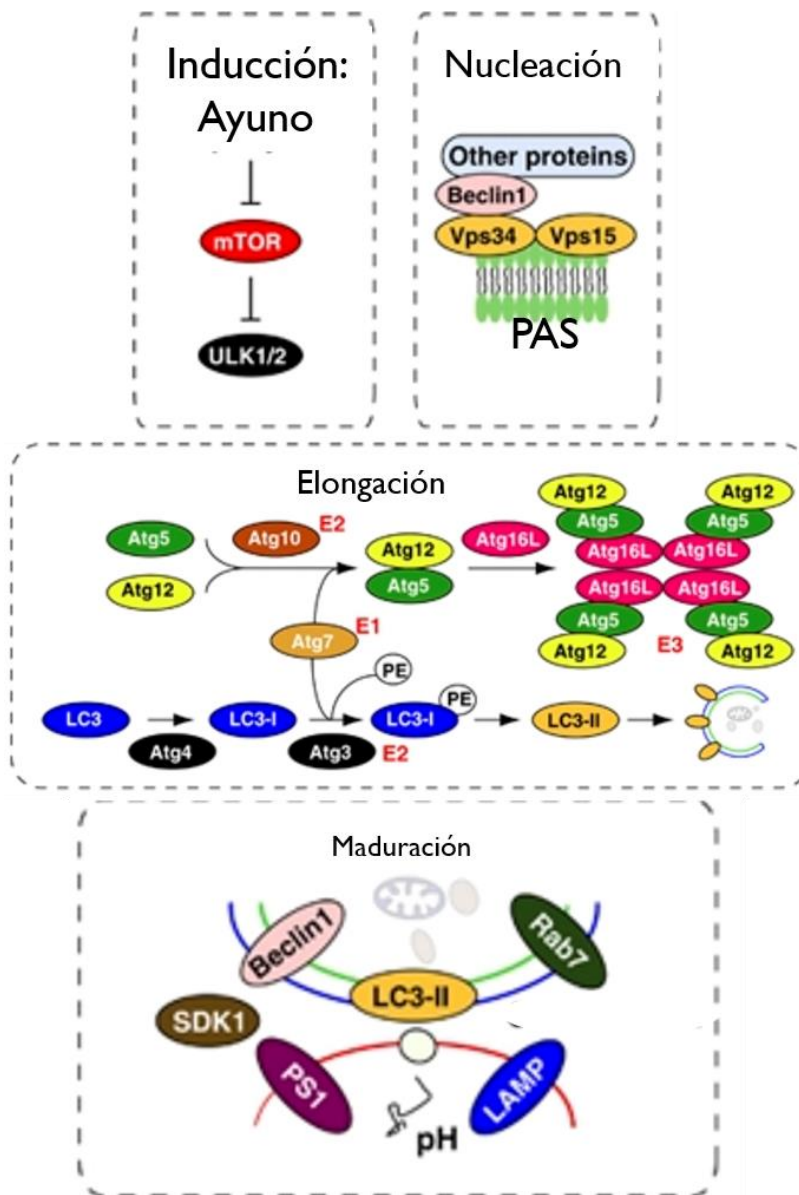


Figura 2. Fases de la autofagia y proteínas que intervienen. El proceso autofágico de forma general se divide en Inducción, Nucleación, Elongación y Maduración. En cada paso se requiere de la participación de distintas proteínas que en su mayoría son codificadas por genes ATG (Autophagy related genes). (R. Kang et al., 2011)

Una vez que el complejo está activo, y que contiene el material a degradar, se inicia la fase de nucleación que conjuntará a las proteínas y lípidos que constituirán al autófagosoma; esto ocurre a través de la activación del complejo PI3K tipo III que lo conforman las proteínas VPS34 junto con la subunidad reguladora BEC-1, ATG14L (UVRAG) y VPS15. A la fecha, la fase de nucleación es uno de los eventos menos entendidos. Una controversia actual es referente al origen de la membrana

que forma parte del fagóforo, diversos autores consideran que es una estructura que se genera *de novo* y otros que la membrana proviene de organelos como el retículo endoplásmico (RE) o complejo de Golgi, sin embargo aún no se ha logrado esclarecer del todo la fase de nucleación (Figura 2) (Levine & Klionsky, 2004).

La elongación de la membrana permitirá separar la “carga” del resto de los componentes citosólicos formando el autofagosoma. Las proteínas que actúan en la expansión incluyen a dos sistemas de conjugación similares a ubiquitina: La LC3-I, una proteína similar a ubiquitina, que es modificada de su forma soluble a una proteína asociada a la membrana, dicha modificación se logra mediante su procesamiento proteolítico a cargo de la proteína ATG4, una cisteína proteasa, que específicamente reconoce y corta al extremo C-terminal de la LC3-I. El residuo de glicina resultante de la escisión, se unirá covalentemente con la fosfatidiletanolamina (PE) a través de la enzima ATG7 originando así la forma activa de la proteína LC3-II (LC3-PE). La segunda reacción de conjugación, ocurre a través de la proteína ATG12, también similar a la ubiquitina, la cual se conjugará con otra proteína, la ATG5, mediante la acción de ATG7 y la enzima similar a E2, ATG10. Tras la formación del complejo ATG12-ATG5 la proteína ATG16 se asocia, resultando en un complejo trimérico ATG12-ATG5-ATG16 que previene la fusión prematura con el lisosoma. En resumen, el primer sistema de conjugación resulta en el procesamiento proteolítico de la proteína LC3-I a su forma activa que da origen a una proteína que forma parte de la estructura vesicular (LC3-II), el segundo sistema se sugiere que proporciona soporte dinámico que permitirá la deformación o curvatura de la membrana sin provocar su desensamble y evita la fusión anticipada con el lisosoma (Figura 2) (Klionsky, 2005).

La fase de maduración depende de moléculas que permiten a los autofagosomas fusionarse con los compartimentos vesiculares del sistema vacuolar (lisosomas), además esta fase también es dependiente de moléculas que regulan la acidificación de los compartimentos autofágicos; como las proteínas vATPasas (ATPasas vacuolar) que son bombas de protones que establecen y mantienen un ambiente ácido en los lisosomas.(Esclatine et al., 2009).

La fusión del fagosomas con el lisosoma depende tanto del citoesqueleto, como de las proteínas SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor) que son elementos básicos requeridos para dicha función (Glick et al., 2010) y que de acuerdo con su rol en el transporte de vesículas se dividen en dos grupos: las v-SNAREs (de vesícula) y t-SNAREs (target/diana) que a su vez son reguladas por las proteínas Rab, un grupo de GTPasas monoméricas que facilitan y regulan el anclaje de las proteínas v-SNARE con t-SNARE, de las cuales se han identificado a varias proteínas como las Rab 7, Rab 22 y Rab 24; además de componentes del complejo HOPS (Homotypic fusion and protein sorting) como VPS33 A y VPS16 y proteínas de membrana lisosomal LAMP-1 y LAMP-2 que en su conjunto facilitan la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Figura 2).

Finalmente, después de la fusión del autofagosoma con el lisosoma, la estructura resultante (autofagolisosoma) degrada, mediante las hidrolasas ácidas lisosomales, al material citoplasmático engullido y los productos de degradación son reciclados al citoplasma donde pueden ser reutilizados para la biosíntesis o producción de energía. Una vez ocurrida la degradación, el lisosoma puede fusionarse con otro autofagosoma o bien con otras vesículas como endosomas; si la degradación no se llevó a cabo en su totalidad el autofagolisosoma se convertirá en un cuerpo residual,

estos cuerpos residuales contendrán material indigerible y el pigmento lipofucsina (Eskelinen & Saftig, 2009).

3.2 Mecanismo de señalización para la activación de la autofagia

3.2.1 Vía de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK)

Como se describió anteriormente, el proceso autofágico se activa durante la escasez de nutrientes, como un mecanismo que degrada componentes celulares, para aportar energía a la célula y permitir su supervivencia. Diversos estudios han mostrado que la disminución en los niveles de ATP (por bajos niveles de nutrientes) es reestablecido en parte por la proteína AMPK, considerada el sensor de energía que se activa por los nucleótidos de adenina (AMP, ADP) (Hardie et al., 2016). La AMPK es un complejo heterotrimérico con actividad cinasa formado por tres subunidades: una catalítica alfa (con dos isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$), dos reguladoras, beta y gama (con isoformas $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, respectivamente). La activación de la AMPK se lleva a cabo por la fosforilación de la subunidad catalítica en el residuo de treonina 172 (T172), ésta fosforilación es dependiente de la proteína cinasa LKB1, y por el cambio conformacional que resulta de la unión del ADP y/o AMP a la subunidad reguladora que como consecuencia, inhiben la desfosforilación de la T172 (Hardie, 2011; Mihaylova & Shaw, 2011).

Tras la activación de AMPK, se inicia el proceso autofágico por diversos mecanismos:

- 1) Mediante la fosforilación directa de proteínas que forman el complejo de iniciación y nucleación: Brevemente, la AMPK fosforila a la proteína ULK1 en diversos residuos para activarla, si bien esta modificación postraduccional se ha comprobado, a la fecha siguen siendo motivo de controversia. Algunos

autores reportan que la activación de ULK1 se lleva a cabo por la fosforilación de los residuos de serinas 317 (S317) y 777 (S777) mientras otros sugieren que se debe a los residuos de serinas S467, S555, S637 y treonina 574 T574. Sin embargo, a pesar de dichas discrepancias, la fosforilación de ULK1 dependiente de AMPK es esencial para la inducción de la autofagia .(Russell et al., 2014)

- 2) Además de la proteína ULK1, recientemente otras proteínas del complejo de nucleación, la BEC1 y la VPS34, se han identificado como blancos de la AMPK. Particularmente, ante una privación de glucosa, la AMPK fosforila a la BEC1 en el residuo de serina S93, S96 y a la VPS34 en los residuos de treonina T163 y S165 (Galluzzi et al., 2014).
- 3) Inhibición de mTOR: mTOR es complejo proteico regulador del crecimiento celular altamente conservado que será descrito más a detalle en la siguiente sección, sin embargo la forma sobre la cual AMPK lo inhibe es a través de su fosforilación directa (Kim et al., 2011).

3.2.2 Vía dependiente de mTOR

La proteína serina/treonina cinasa, mTOR (blanco mecanístico de rapamicina) es muy importante para regular el crecimiento y la proliferación celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Shimobayashi & Hall, 2014). Sin embargo, también modula el proceso autofágico. En mamíferos, mTOR está formado por dos complejos protéicos, mTORC1 y mTORC2. Sin embargo, mTORC1 es el complejo que se ha asociado con la autofagia, cuya regulación es negativa. En disponibilidad de nutrientes, particularmente en presencia de aminoácidos, mTORC1 causa su translocación a la membrana del lisosoma y se activa para que subsecuentemente

fosforile e inhiba a proteínas del complejo de iniciación, esto es, fosforila a ULK1 y a ATG13 así como proteínas del complejo de nucleación AMBRA1 y ATG14,(Figura 3) (Galluzzi et al., 2014; Russell et al., 2014). El descubrimiento de la asociación de mTOR con lo lisosomas, sugiere que el lisosoma podría tener un importante rol como organelo encargado de sensar nutrientes a través de la maquinaria compleja donde interviene mTOR y que, algún daño sobre componentes de ésta, también afecta la función de mTOR y viceversa. Estudios enfocados en esta idea, indican que mTOR es un regulador indirecto de la autofagia al controlar la biogénesis lisosomal. Esta función se lleva a cabo mediante el factor de transcripción EB (TFEB), considerado el regulador maestro de la transcripción de genes lisosomales y autofágicos. En abundancia de nutrientes, mTORC1 y TFEB colocalizan en la membrana lisosomal donde mTORC1 fosforila a TFEB, y a través de la proteína 14-3-3, inhibe su función al retener a TFEB en el citoplasma. Por el contrario, en escasez de nutrientes, mTORC1 es inactivado y conduce a la defosforilación de TFEB que le permite migrar a núcleo y promover la transcripción de sus genes blanco, los cuales están relacionados con la biogénesis lisosomal. En suma, a través de la represión de TFEB, de las proteínas del complejo ULK1 y del complejo cinasa VPS34, mTOR es capaz de regular negativamente tanto la iniciación como la maduración del autofagosoma (Russell et al., 2014).

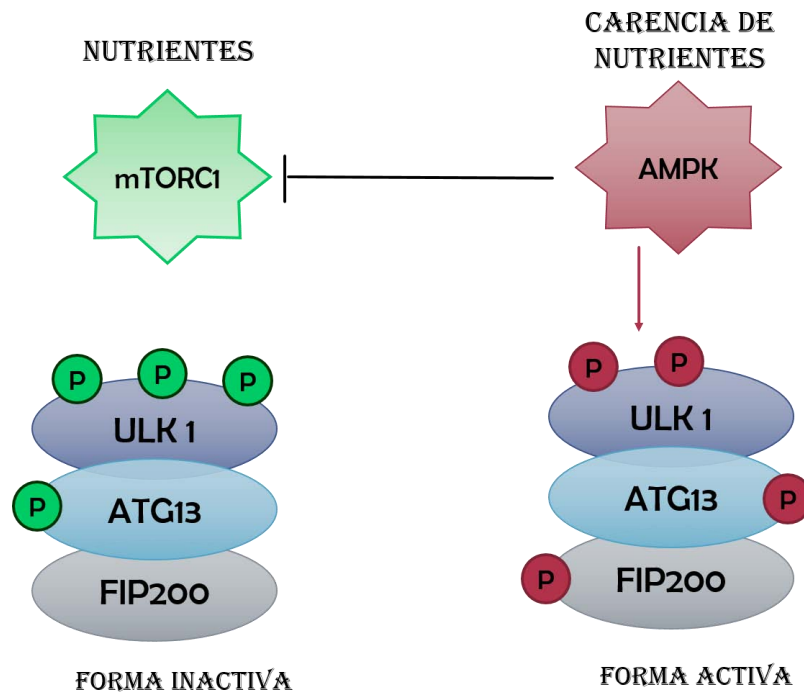


Figura 3. Proteínas Cinasas reguladoras de la autofagia. En disponibilidad de nutrientes, la cinasa mTORC1 inhibe el inicio de la autofagia al fosforilar a las proteínas ULK1 y ATG13, componentes del complejo de iniciación. En contraparte, la cinasa AMPK se activa en carencia de nutrientes y fosforila en otros aminoácidos a las mismas proteínas, regulándolas positivamente y activar el proceso autofágico. Imagen tomada y modificada de (Yamahara et al., 2013)

3.3 TFEB, regulador maestro de la biogénesis lisosomal y del proceso autofágico

El factor de transcripción EB (TFEB), es miembro de la familia microftalmia (Familia MiT) que son factores transcripcionales tipo, por su nombre en inglés, basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-Zip) que regulan diversos procesos celulares mediante su unión a secuencias de DNA denominadas cajas E (CACGTG), éstas secuencia también son reconocida por otros factores transcripcionales de tipo bHLH-Zip como las proteínas MYC, MAX y MAD (Napolitano & Ballabio, 2016) .

La familia MiT está conformada por otros tres factores altamente relacionados con TFEB: MiTF, TFE3 y TFEC, los cuales pueden unirse al DNA ya sea como homodímeros o heterodímeros, sin embargo, éstos reconocen a secuencias denominadas cajas M (TCATGTG). Otra notable diferencia entre los miembros de

la familia MiT es que solamente pueden dimerizarse con miembros de esa misma familia, pero no con otros factores de tipo basic hélix-loop-helix, empero la relevancia funcional de los homodímeros MiT comparado con los heterodímeros, aún se desconoce (Napolitano & Ballabio, 2016).

Los miembros de esta familia están implicados en diversos procesos celulares como la maduración de melanocitos (MiTF), activación de células B (TFE3) y la vascularización placentaria (TFEB) (Lin & Fisher, 2007; Pastore et al., 2016). Importantemente, TFEB se une específicamente a un motivo de 10 pares de bases (GTCACGTGAC), que se encuentran en la región promotora de diversos genes codificantes para proteínas lisosomales y autofágicos, por tal motivo se le considera a TFEB como el regulador maestro de la función y biogénesis de los lisosomas y autofagia (Figura 4) (Sardiello et al., 2009). Específicamente, TFEB se activa dependiendo del contexto metabólico, en condiciones basales, TFEB se localiza en los lisosomas vía una interacción física con proteínas GTPasas Rag sobre la superficie de los lisosomas, es así que mTOR interacciona con TFEB para inactivarlo mediante su fosforilación en la serina 142 y 211 (Ser and Ser211). Esta modificación postraduccional evita la transcripción de los genes lisosomales y por ende el proceso autofágico (Roczniak-Ferguson et al., 2012). Por el contrario, durante una escasez de energía o en un estrés lisosomal, TFEB sufre defosforilación y rápidamente se transloca al núcleo para activar la expresión de genes que codifican para la estructura y función del proceso autofágico-lisosomal. La regulación ocurre debido a la unión directa de TFEB a las secuencias tipo caja E, que se encuentran en la región promotora de genes de autofagia así como en secuencias consenso denominados elementos CLEAR (Elementos coordinados de

expresión y regulación lisosomal) localizados a 200 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Kuiper et al., 2004; Napolitano & Ballabio, 2016; Palmieri et al., 2011; Sardiello et al., 2009). Así, el efecto neto de la activación de TFEB, es un incremento en el flujo autofágico acompañado por una expansión del compartimento lisosomal, que permite a las células adaptarse a condiciones de estrés energético y lisosomal.

Recientes hallazgos han indicado que TFEB también regula el metabolismo de lípidos, en un proceso dependiente de la autofagia conocida como lipofagia (Settembre et al., 2013). En ayuno, los lípidos que están almacenados en organelos especializados denominados gotas de lípidos (lipid droplets) son engullidos por el autofagolisosoma, y degradados por la lipasa ácida (LAL), hasta ácidos grasos libres los cuáles servirán como sustratos para β -oxidación y glucólisis. Es de resaltar que TFEB también regula la expresión de la lipasa lisosomal (LAL) y de genes relacionados con el metabolismo de lípidos, como PPAR- α y PGC1- α (Settembre & Ballabio, 2014).

A la fecha, se ha demostrado la conservación evolutiva de los cuatro miembros de la familia MIT, entre los que se encuentra TFEB, en vertebrados y en organismos inferiores como el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Así el ortólogo funcional TFEB en nematodo es conocido como HLH-30 (Lapierre et al., 2013b). HLH-30 también mantienen conservadas las regiones básicas y los dominios HLH-Zip, lo que sugiere que la forma en la cual se une al DNA es similar al TFEB de los mamíferos. Es de resaltar que en *C. elegans*, solamente se ha encontrado un ortólogo de TFEB, sugiriendo que el gen ancestral tuvo múltiples rondas de duplicación que le permitió su especialización (Grove et al., 2009). Similar al TFEB en los mamífero, HLH-30 se

une a cajas E para regular la expresión de genes involucrados en la formación del autofagosoma y flujo autofágico, como el de Igg-1/LC3, sqst-1/SQSTM1/p62 y genes para la función lisosomal, como Imp-1/LAMP1, subunidades de ATPasas vacuolares (vha-15,vha-16), sulfatasas sul-2/ASRA y diversas catepsinas (Figura 4) (Napolitano & Ballabio, 2016).

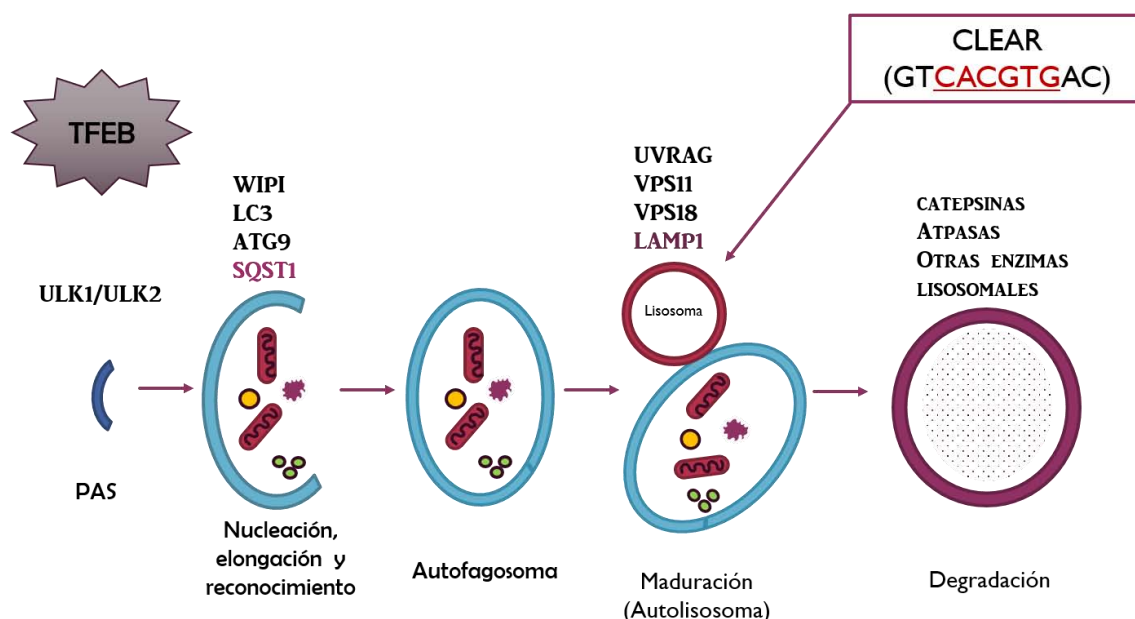


Figura 4. TFEB regula el proceso autofágico-lisosomal. TFEB regula genes que codifican proteínas para la formación y elongación del fagóforo (ATG 9, WIPI, LC3), reconocimiento de la carga (SQSTM1), fusión de membrana (VPS 11, VPS18, LAMP1) y diversas catepsinas así como enzimas lisosomales encargadas de la degradación de componentes celulares. Imagen tomada y modificada de (Lapierre et al., 2013a).

Estudios recientes han observado que HLH-30 no solo regula el metabolismo de lípidos en forma similar a TFEB de mamíferos, sino también modula a otros procesos fisiológicos como longevidad y la respuesta inmune (O'Rourke & Ruvkun, 2013; Visvikis et al., 2014). Así, TFEB/HLH-30 media mecanismos celulares que permiten a los organismos la obtención de energía derivada de los lípidos de almacén, estableciendo una estrecha comunicación con la función lisosomal para mantener la homeostasis energética.

4. Otros reguladores del proceso Autofágico- lisosomal

4.1 El Calcio lisosomal estimula la autofagia

Como se ha expuesto anteriormente, los lisosomas son los organelos encargados de la degradación de un amplio espectro de sustratos, convirtiéndolos en la principal maquinaria para generar y reciclar componentes celulares que genera energía. Sin embargo, otra función lisosomal, subestimada en el pasado, es su capacidad para almacenar calcio (Ca^{2+}), puesto que en la membrana lisosomal están presentes diversas canales de calcio. Estudios relacionados con el Ca^{2+} y la expresión genética, indican que el Ca^{2+} regula la actividad de diversos factores transcripcionales a través de la inducción de cinasas y fosfatasa dependientes de calcio (Tong & Song, 2015). Interesantemente, un estudio realizado por *Medina et al* mostró que el calcio lisosomal puede regular a la autofagia a nivel transcripcional (Medina et al., 2015). El mecanismo de activación de la autofagia por calcio propone que la calcineurina, una proteína fosfatasa dependiente de calcio, se activa principalmente por el incremento en los niveles de calcio liberado del lisosoma, que en consecuencia defosforila a los residuos de Serina 142 y 211 (Ser 142 y 221) de TEFB y así promueve su entrada al núcleo y finalmente la autofagia (Medina et al., 2015). De forma similar, el ayuno a través de la potenciación de la liberación de Ca^{2+} proveniente del lumen lisosomal vía la proteína MCOLN1/TRPML1, un transportador dependiente de iones lisosomales, activa la autofagia, mientras que la mutación de MCOLN1/TRPML1 evita la translocación de TFEB y la concomitante activación de la autofagia (X. Zhang et al., 2016).

4.2 El NAD⁺ estimula la autofagia

La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es una coenzima que participa en diversas rutas metabólicas como aceptora de electrones cuando se encuentra en el citoplasma o mitocondria (Figura 5). Sin embargo, cuando se localiza en el núcleo, actúa como sustrato de enzimas consumidoras de NAD⁺, tales como las sirtuinas (deacetilasas de histona), la ADP ribosa transferasa, poli ADP ribosa polimerasa (PARP), las dos últimas participan en la reparación de daño al DNA (Belenky et al., 2007).

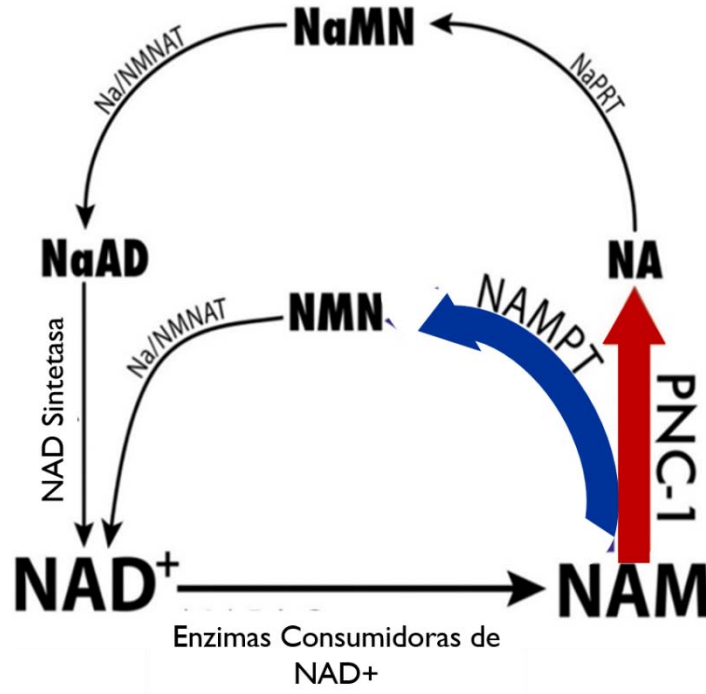


Figura 5. Vía de reciclaje (salvamento) de NAD⁺ en mamíferos e invertebrados. Las enzimas consumidoras de NAD⁺ generan NAM (Nicotinamida) a través de su hidrólisis. La NAM es reciclado para formar NAD⁺ de forma similar tanto en mamíferos (Flecha azul) como en invertebrados como el *C. elegans* (flecha roja). (Vrablik et al., 2009).

La síntesis de NAD⁺ puede llevarse a cabo a partir de precursores como la nicotinamida ribosa, nicotinamida (NAM) o la niacina (vitamina B3), o sintetizarse *de novo* a través de triptófano (Figura 5). La síntesis ocurre en varios pasos, en el

primero, la NAM, que en mamíferos es el principal precursor de NAD⁺, sufre ataque nucleofílico por la enzima nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT) generando nicotinamida mononucleótido (NMN), seguidamente, ésta molécula será convertida a NAD⁺ vía la enzima ácido nicotínico/nicotinamida adenililtransferasa (NMNAT) (Figura 5) (Vrablik et al., 2009; Yoshino & Imai, 2013).

Interesantemente, el genoma de organismos invertebrados -incluyendo el *C. elegans*- codifica para una nicotinaminidasa (PNC-1) en vez de una transferasa (Vrablik et al., 2009), por lo que el primer paso de la reacción para generar NAD⁺ será la conversión de la NAM en ácido nicotínico, el cual posteriormente se convertirá en ácido nicotínico mononucleótido mediante la ácido nicotínico fosforibosiltransferasa (NaPRT), subsecuentemente la ácido nicotínico/nicotinamida adenililtransferasa (Na/NMNAT) originará ácido nicotínico dinucleótido que finalmente será convertido a NAD⁺ por la NAD sintasa (Houtkooper et al., 2010). Cabe señalar que a pesar de que la NAMPT y la nicotinaminidasa son enzimas distintas, ambas poseen funciones equivalentes en la generación de NAD⁺ a partir de la NAM (Figura 5) (Vrablik et al., 2009; Yoshino & Imai, 2013).

En 2015, Baixauli, et.al. reportaron que la mitocondria y el estado redox celular, específicamente el par redox NAD⁺/NADH juegan un papel importante en el proceso de fusión del fagosoma con el lisosoma. Específicamente, células deficientes del factor transcripcional TFAM, conduce a una disfunción mitocondrial que disminuye no solamente la función de la cadena respiratoria, sino que también a los niveles de NAD⁺ y la movilización de Ca²⁺ lisosomal; que en conjunto genera un tráfico anormal de lípidos y acumulación de mitocondrias dañadas, las cuales no pueden ser removidas debido a alteraciones en fases tardías de la autofagia. Además, los

mismos autores también señalan que la adición extracelular de NAD^+ eficientemente activa a TFEB y sus genes blanco como respuesta al estrés lisosomal y promueve la sobrevivencia celular (Baixauli et al., 2015).

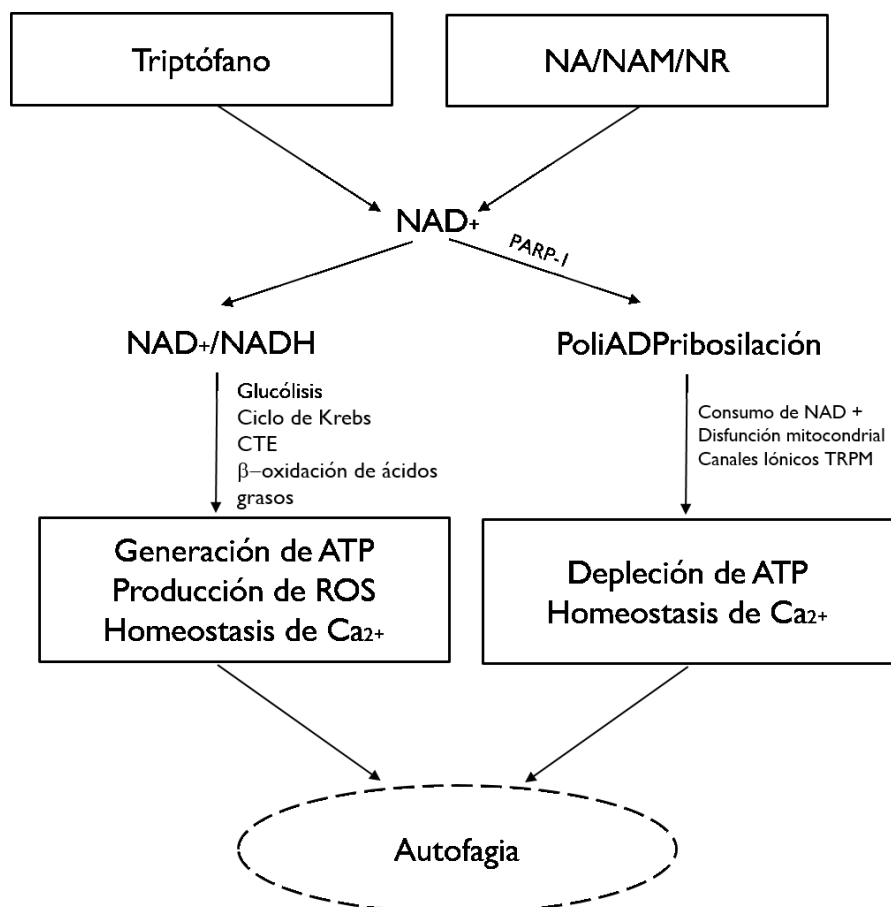


Figura 6.

Metabolismo y regulación del NAD^+ en la autofagia. En mamíferos, el NAD^+ puede sintetizarse *de novo* a partir del triptófano o por precursores (vía de salvamento) a partir de la vitamina B3 (niacina, NA, NAM y NR). Su metabolismo se ha asociado a la regulación de la autofagia mediante diversas vías. La homeostasis del par redox NAD^+/NADH influye sobre diversas señales (glucólisis, ciclo de Krebs, Cadena Transportadora de Electrones y β -oxidación de ácidos grasos) que controlan río arriba la autofagia. Imagen tomada y modificada de (D. X. Zhang et al., 2016).

El complejo I mitocondrial es esencial para el mantenimiento de los niveles NAD^+/NADH mediante la NADH deshidrogenasa, un desbalance del estado redox NAD^+/NADH provocado por mutaciones en alguna de las subunidades del complejo I están relacionadas con una autofagia defectiva lo cual se ve reflejado por la

acumulación de la proteína p62, por lo que es plausible suponer que la biogénesis y funcionalidad lisosomal no solamente son regulados a nivel transcripcional y postraducciona, sino que también por el nivel intracelulares de NAD⁺/NADH (Figura 6) (Mimaki et al., 2012).

5. Autofagia en la enfermedad

Como se describió previamente, la autofagia actúa como mecanismo protector en respuesta a varias condiciones de estrés, y que es esencial para la sobrevivencia en condiciones fisiológicas. Dada ésta importancia, no es de sorprenderse que su desregulación provoca diversas enfermedades humanas (Luzio et al., 2007). Si bien, las características de las enfermedades provocadas por la ineficiente autofagia no se abordan a detalle en este trabajo, sólo mencionaremos algunas de importancia clínica. Las enfermedades de Gaucher o Niemann Pick están íntimamente relacionados con un proceso de degradación ineficiente por parte de los lisosomas, entre otras cosas, se caracterizan por tener elevada acumulación de sustratos no degradados o al almacén anormal de lípidos como esfingomielina, triacilglicéridos, glicoesfingolípidos, o esfingosinas (Baixauli et al., 2015). Otro rol importante de la autofagia es la de mantener la función cardiovascular en condiciones óptimas, evidencias indican que la desregulación de la autofagia impacta negativamente en la función cardiovascular, probablemente por aumento de la vía de señalización de mTORC1 (J. C. Choi et al., 2012). En enfermedades metabólicas, como la obesidad y diabetes, la autofagia también influye de manera muy importante. Específicamente, estudios realizados en ratones que tienen delección del gen ATG7 (no se forma el autofagosoma) tienen síntomas de pacientes diabéticos tipo I, por ejemplo, bajos niveles de insulina, hiperglicemia y reducidos niveles de células beta pancreáticas

(Quan et al., 2012). En suma, es de resaltar la importancia que tiene el proceso autofágico en respuesta a estrés celular para mantener la homeostasis metabólica bajo condiciones fisiológicas. Mutaciones en genes que forman parte de la maquinaria autofágica, tiene un papel importante durante la patogénesis de varias enfermedades humanas, por lo que las investigaciones en muestras humanas o modelos animales, tanto vertebrados como invertebrados; por ejemplo, en nematodo *C. elegans*, podrían proporcionar una visión profunda de los procesos patológicos y la función de la autofagia.

6. *Caenorhabditis elegans*, organismo modelo para el estudio de la autofagia

Diversos modelos animales se han empleado para estudiar los mecanismos por los cuales la autofagia y la longevidad están relacionados, entre los cuales destaca el *C. elegans*, organismo propuesto en la década de 1960 por el Biólogo molecular Sydney Brenner para el estudio del desarrollo y de la neurobiología (Brenner, 1974). *C. elegans* es un nematodo de vida libre, que ofrece ventajas particulares para estudiar los mecanismos de autofagia a nivel de todo el organismo. Es una especie hermafrodita, que se cultiva fácilmente y se mantiene en el laboratorio. Es transparente, lo que permite la visualización microscópica de células específicas y estructuras subcelulares. *C. elegans* completa su ciclo de vida en un lapso de tres días, y su periodo de vida es de 21 días, característica que permite el estudio de la longevidad. Es importante destacar que el linaje de sus 959 células del nematodo adulto está completamente descrito y es invariable entre ellos. Su desarrollo consta de cuatro estados larvarios antes de convertirse en adulto grávido; los adultos son generalmente hermafroditas, aunque una pequeña parte de la población (<0.5%)

suelen ser machos. Cada nematodo hermafrodita es capaz de producir hasta 300 embriones, siendo esta característica una ventaja debido a que con pocos ejemplares se pueden obtener grandes poblaciones de nematodos. El mantenimiento de *C. elegans* es relativamente sencillo y de bajo costo, en parte debido a su tamaño pequeño (1mm de longitud) y a que es capaz de crecer a un amplio rango de temperatura que van desde los 12 a los 25°C. En el laboratorio, los nematodos se mantienen en cajas Petri con medio NGM-lite sólido y se alimentan con la bacteria, *Escherichia coli* OP50-1. Además, la información anatómica detallada para todo el animal está disponible y el diagrama de su red neuronal es completa y totalmente conocida (Dittman, 2009). Finalmente, la disponibilidad de su genoma completamente secuenciado ("Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology," 1998), junto con las metodologías eficientes de genética avanzada, tales como la mutagénesis dirigida, la transgénesis y la interferencia del RNA (RNAi), facilita enormemente la caracterización molecular de genes y rutas metabólicas (Fire et al., 1998). Estas características excepcionales como modelo de estudio de *C. elegans*, ha permitido la disección detallada de los mecanismos autofágicos en el contexto del desarrollo animal, la función del sistema nervioso y la longevidad (Madeo et al., 2015). Las investigaciones de autofagia se han facilitado en gran medida por el descubrimiento y caracterización de genes de autofagia en levaduras y posteriormente en otros organismos, como la *Drosophila melanogaster*, ratones y *C. elegans* (Glick et al., 2010). Este último tiene un único ortólogo de la mayoría de las proteínas Atg de levadura, excepto para las proteínas atg-4, atg-8 y atg-16 (Tabla 1).

Tabla 1. Genes de autofagia (ATG) en mamíferos y en *C. elegans* (Zhang et al., 2015)

Función	Gen de mamífero	Gen homólogo en <i>C. elegans</i>
Cinasa Serina/treonina implicada en el inicio de la formación de la membrana de aislamiento	ULK 1	Unc-51
Proteína que interactúa con ATG 18	ATG 2, ATG2B	Atg-2
Enzima similar a E2	ATG 3	Atg-3
Cisteína Proteasa	ATG 4, ATG4B, ATG4C, ATG4D	Atg.4.1 Atg.4.2
Proteína la cual se conjuga con Atg-12	ATG 5	Atg-5
Enzima similar a E1	ATG 7	Atg-7
Proteína similar a ubiquitina que se conjuga con fosfatidiletanolamina y se localiza en la membrana de aislamiento	LC3, GABARAP,	Lgg-1 Lgg-2
Proteína transmembrana que proporciona membrana para la formación del autofagosoma	ATG9	Atg-9
Proteína que conjuga Atg12 a Atg5	ATG 10	Atg-10
Proteína similar a ubiquitina que se conjuga con Atg 5	ATG 12	Lgg.3
Componente del complejo VPS34	BECN1	Bec-1
Nucleación de membrana. PI3K envuelta en el inicio	PIK3C3 VMP1 EPG 5	Vps-34 Epg-3 Epg-5

En suma, la autofagia es un proceso celular que conduce el material citoplasmático a los lisosomas para su eventual degradación, que se activa en respuesta a diversos tipos de estrés celular y que esta evolutivamente conservado en organismos

eucariontes como *C. elegans* y mamíferos.

El conocimiento del proceso autofágico relacionado con enfermedades humanas , (Jiang & Mizushima, 2014), sugieren que el desarrollo de agentes farmacológicos que modulan la autofagia es crítico. Es de resaltar que los enfoques farmacológicos para activar o inhibir la autofagia también son necesarios porque la autofagia puede desempeñar una función dual ya que puede proteger o destruir a las células en diferentes enfermedades, incluso en diferentes etapas de las mismas enfermedades. En este trabajo usamos a *C. elegans* como modelo de investigación para evaluar el papel de la autofagia sobre la longevidad de un organismo multicelular expuesto a un exceso de glucosa.

7. Justificación

El aumento en la ingesta de carbohidratos por la sociedad actual ha traído como consecuencia el desarrollo de diversas enfermedades relacionadas con el metabolismo energético como la diabetes y obesidad. Ambas enfermedades han propiciado una significativa disminución de la esperanza de vida de los individuos. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en 2012 la diabetes y sus comorbilidades fue la causa de muerte de alrededor de 3.5 millones de personas menores de 70 años de edad. Adicionalmente, estas enfermedades también impactan la economía mundial, puesto que la saturación de los servicios de salud ha incrementado los costos de inversión en salud pública.

A nivel celular, el proceso autofágico, es un mecanismo evolutivamente conservado, requerido para mantener la homeostasis metabólica y para favorecer la extensión de la longevidad que podría ser un blanco de manipulación farmacológica que coadyuve a mejorar la vida sana de los organismos alimentados con dietas ricas en carbohidratos. Por lo tanto, entender los mecanismos moleculares subyacentes del proceso que controlan la longevidad y la vida saludable relacionada con la autofagia resulta prioritario. En este trabajo estudiaremos la relación que existe entre éstos dos procesos, determinando si el proceso autofágico esta desregulado durante una ingesta elevada de carbohidratos y discerniremos el mecanismo molecular que subyace los efectos adversos que provoca el aporte de alta glucosa en *C. elegans*, lo que nos permita proponer un posible blanco terapéutico que mejore la vida saludable de los organismos.

8. Hipótesis

El exceso de glucosa reduce la longevidad en el nematodo *C. elegans* debido a la disminución del flujo autofágico mediado por el factor transcripcional HLH-30/TFEB y por los niveles de NAD⁺.

9. Objetivo general

Determinar si la disminución de la longevidad por un exceso de glucosa se debe a la desregulación del proceso autofágico dependiente de HLH-30/TFEB asociado a los niveles de NAD⁺ en el nematodo *C. elegans*.

9.1 Objetivos particulares

- Determinar el efecto que tiene la administración de una dieta con alta glucosa sobre la longevidad del nematodo *C. elegans*.
- Establecer si el exceso de glucosa en la dieta afecta el proceso autofágico dependiente del factor transcripcional HLH-30/TFEB en *C. elegans*.
- Evaluar si los cambios en las concentraciones de NAD⁺ debido al exceso de glucosa afectan el proceso autofágico.

10. Materiales y métodos

10.1 Mantenimiento, cultivo y cepas de *C. elegans*.

Las cepas de *C. elegans*: la N2 Bristol (cepa silvestre), HLH-30::GFP (MAH235), bec-1 (vc517, que tiene una deleción del gen bec-1, alelo bp613) y LGG-1::DFP (DLM1) se obtuvieron del Caenorhabditis Genetics Center (CGC). Todas las cepas se mantuvieron a 20°C, en medio NGM-lite sólido (Nematode Growth Media) que contenía 2g de NaCl, 4g de bactotripton, 3g de KH₂PO₄, 0.5g de eK₂HPO₄, 0.0085 g de colesterol, 30g de agar y disueltos en 1 L de H₂O bidestilada. Los nematodos se alimentaron con la bacteria *E. coli* OP50-1 (auxótrofa de uracilo) la cual provenía de un cultivo a 37°C en medio líquido de Luria Bertani (10 g de Bacto tripton, 5g de Bacto yeast, 5g de NaCl, 200 µl de NaOH 5N).

10.2 Obtención de poblaciones sincronizadas de *C. elegans*

La sincronización de nematodos se realiza con el objetivo de que todos los organismos utilizados en los experimentos se encontraran en el mismo estadio larval. Para este fin, a cajas Petri de 100 mm que contenía aproximadamente 1x10⁵ de nematodos grávidos, se lavaron tres veces con Buffer M9 (6g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 5g NaCl, 1 µL MgSO₄ 1M y H₂O hasta 1 L) para eliminar el exceso de bacterias; en cada lavado, los nematodos se centrifugaron a 1000 rpm por 1 minuto. Al pellet de gusanos obtenido, se le adicionó una solución de lisis que contenía 300 µL de NaClO y 150 µL de NaOH 5N, y se agitó vigorosamente con el vortex por aproximadamente 3 minutos. Al termino de este tiempo, se realizó otra centrifugación (1000 rpm por 1 minuto) y se obtuvo el pellet que contiene los embriones, a los que se les realizó 3 lavados con buffer M9. Para la obtención del cultivo sincronizado, se permitió la eclosión de los embriones en buffer M9 durante

24 horas a 20 °C. Después de este tiempo, los nematodos se desarrollaron hasta el estado larval L1 y posteriormente se colocaron sobre NGM-lite sólido con *E. coli* OP50-1 (como fuente de alimento) y se crecieron hasta el estado larvario L4 (adultos jóvenes). En el estadio L4 se realizaron los experimentos en las condiciones requeridas.

10.3 Condiciones experimentales

Después del crecimiento de los nematodos hasta estadio larval L4, éstos se colocaron durante 24 horas o 30 días aproximadamente (para los ensayos de longevidad) en cajas Petri de 35mm con 3 mL de NGM sólido suplementado con glucosa y fluorodesoxiuridina (FUDR) a una concentración final de [100mM] y [49.5mM] respectivamente. La glucosa fue esterilizada por filtración con una membrana de 0.2µm.

10.4 Ensayos de longevidad

Los ensayos de longevidad se realizaron colocando de 20 a 25 nematodos sincronizados en el estadio larval L4 por cada condición experimental. Los nematodos se contabilizaron diariamente, y se transfirieron a cajas nuevas cada tercer día. Los nematodos se consideraban muertos sino respondían al toque con el asa de platino. Estos ensayos se realizaron por quintuplicado.

10.5 Extracción de RNA total y análisis por RT-qPCR

Los nematodos de cada condición experimental fueron recolectados con buffer M9 e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Previo a la extracción del RNA total, los nematodos se lisaron con la proteinasa K.

Brevemente, a un pellet de aproximadamente 1×10^5 nematodos se le adicionó una solución que contenía 2mg/ml de proteinasa K (Boehringer-Ingelheim, cat 83421535-55) y se incubó a 60 °C por 10 minutos, durante este tiempo se realizaron 3 agitaciones vigorosas (con vortex). Al termino de ese tiempo, la proteinasa K se inactivo por calentamiento a 90°C durante 5 minutos. La extracción de RNA total se realizó por el método de TRIzol® (Ambion® 15596) de acuerdo al protocolo del fabricante y se cuantificó en un NanoDrop® a 260nm. El DNA complementario (cDNA) fue generado empleando la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen™ cat 28025-021) y hexámeros aleatorios (Invitrogen™ cat 28025-021) con base al protocolo del fabricante. El análisis de la expresión de los diferentes mRNAs se realizó empleando diferentes sondas Taqman®: para hlh-30 (cat 4351372), lgg-1 (cat. 4331182), pgp-2 (cat. 4351372), unc-51 (cat. 4351372), Imp-1 (cat. 4351372) por PCR en tiempo real (qPCR) empleando un sistema de detección de éstas en el equipo StepOne™ System mediante el StepOne™ Software v2.2. El nivel de expresión de los diferentes RNAs mensajeros fueron normalizados al del gen endógeno 18S rRNA (Eukaryotic 18S rRNA 4319413E) y las veces de cambio se calcularon siguiendo el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Livak & Schmittgen, 2001)

10.6 Análisis por microscopía confocal

La localización subcelular del factor transcripcional HLH-30::GFP, se realizó siguiendo el protocolo de fijación de Ed. Harlow (Harlow & Lane, 2006), brevemente los nematodos fueron recolectados con buffer M9, y fijados con un buffer que contenía 50% metanol, 1M de EGTA ,10Mm de espermidina, 4% de paraformaldehído. La fijación de los nematodos se realizó congelando (en nitrógeno líquido) y descongelando (en baño María a 57°C) tres veces. Posteriormente, las

muestras se almacenaron a 4°C durante 17 h. Transcurrido este tiempo, se descartó el sobrenadante y se lavó con PBS-tritón 0.05% y se adicionó buffer de lavado (DTT 200 mM, borato de sodio 20 mM pH=9.6, Tritón X-100 10%), se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se descartó el sobrenadante y se adicionó 0.3% H₂O₂ en 20mM borato de sodio por 15 min. Finalmente se realizaron tres lavados con PBS-Tritón 0.05%. Para la tinción de los núcleos con 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), se adicionaron 5µL de colorante (2µL/mg) y se incubó por 10 min protegido de la luz. Los nematodos teñidos se colocaron en portaobjetos cubiertos con una capa de agarosa al 2% y se observaron en microscopio confocal FlowView™ 1000 de Olympus®. La obtención de las imágenes se realizó con el objetivo 60X.

10.7 Determinación de NAD⁺ por HPLC

La cuantificación de NAD⁺, se realizó mediante el protocolo de Yoshino et al (Yoshino & Imai, 2013). Alrededor de 1X10⁵ nematodos N2 fueron recolectados y lavados tres veces con buffer M9 e inmediatamente congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C. La extracción del NAD⁺, se realizó mediante una extracción ácida con 1.6M de HClO₄, mediante homogenización mecánica de tres ciclos durante 30 segundos en hielo. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 20000g/15min/4°C y el sobrenadante fue transferido a tubos eppendorf de 1.5 ml y se neutralizó con 3M K₂CO₃. La mezcla se agitó vigorosamente y fue centrifugada a 20000g/15min/4°C para sedimentar las sales. El sobrenadante neutralizado se utilizó para determinar el contenido de NAD⁺ mediante sistema HPLC. Las condiciones para la medición son las siguientes: La fase móvil constó de acetonitrilo y agua con 0.1% de Ácido Trifluoroacético (TFA) que se formó en dos reservorios

independientes, en uno se colocó 0.1% de TFA en agua (Buffer A) y en otro 0.1% de TFA en 100% acetonitrilo (Buffer B). La velocidad de flujo fue de 1mL/min y las condiciones de corrida fueron de 0-5min de gradiente lineal con 100% Buffer A y de 5 a 32.5 min y gradiente lineal a 100% de Buffer A de 32.5-35 min.

Las muestras fueron procesadas en Sistema HPLC Shimadzu™, una bomba LC-10 AT VP, acoplado a un detector UV/vis. Para la determinación se empleó una columna SUPELCOSIL™ LC-18T HPLC column.

10.8 Detección del flujo autofágico por Western blot

Los nematodos de cada condición experimental se recolectaron con buffer M9 y se congelaron en nitrógeno líquido. La extracción de proteína se realizó mediante homogenización mecánica empleando buffer de lisis (HEPES 50mM, KCl 50mM, EDTA 1mM, EGTA 1Mm y Tritón X-100 al 0.1%) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0.2mM, NAF 1mM, DTT 1mM, Ortovanadato 1mM, NAPPi 5mM, Complete 1x). Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como estándar y posteriormente se procedió a preparar las muestras con buffer de carga 2x que contenía mercaptoetanol al 10%. Se cargó 30 µg de proteína total, las cuales fueron separadas mediante SDS-PAGE en un gel 12%. Las condiciones de corrida fueron 125 volts/1'20". La transferencia se realizó en membranas de nitrocelulosa 0.45µm; se bloqueó durante 18 horas con leche semidescremada al 5%. La membrana se incubó con anticuerpo anti-GFP policlonal de conejo (Thermofisher™) en dilución 1:500 para la detección de mFP (proteína fluorescente monomérica) o dGFP (proteína fluorescente verde dimérica) durante una hora. Se incubó 1 hora con anticuerpo secundario anticonejo conjugado

con peroxidasa (Cell signalling™) en dilución 1:2000. La detección se llevó a cabo empleando el sustrato quimioiluminiscente (Immobilon™). Las membranas se sometieron al equipo Fusion Mx, Vilber Quantum para detectar las proteínas de interés.

11. Resultados

La glucosa en la dieta disminuye la longevidad de *C. elegans*

C. elegans se ha utilizado como modelo para evaluar los mecanismos que afectan la longevidad ante diversas condiciones de estrés celular (Munoz, 2003; Park et al., 2009; Zhou et al., 2011), sin embargo, aún no son del todo entendidos de los mecanismos subyacentes que se afectan por la alta concentración de glucosa. Trabajos previos han mostrado que altas concentraciones de glucosa afectan la longevidad del nematodo (Lee et al., 2009), sin embargo, nosotros decidimos corroborar dichos hallazgos. Para este fin, los nematodos de la cepa silvestre N2 se crecieron en cajas de cultivo que contenían una capa de *E. coli* OP50 (dieta estándar para *C. elegans*) control y otra, además de la *E. coli*, se le adicionó 100mM de glucosa y evaluamos la sobrevivencia a 20 °C.

Nuestros resultados confirman los datos previos, encontrando que la longevidad de los nematodos N2 disminuyó significativamente (hasta de un 35%) por la alta concentración de glucosa, al pasar de 28 a 18 días, respectivamente (Figura 7).

Sobrevivencia de N2

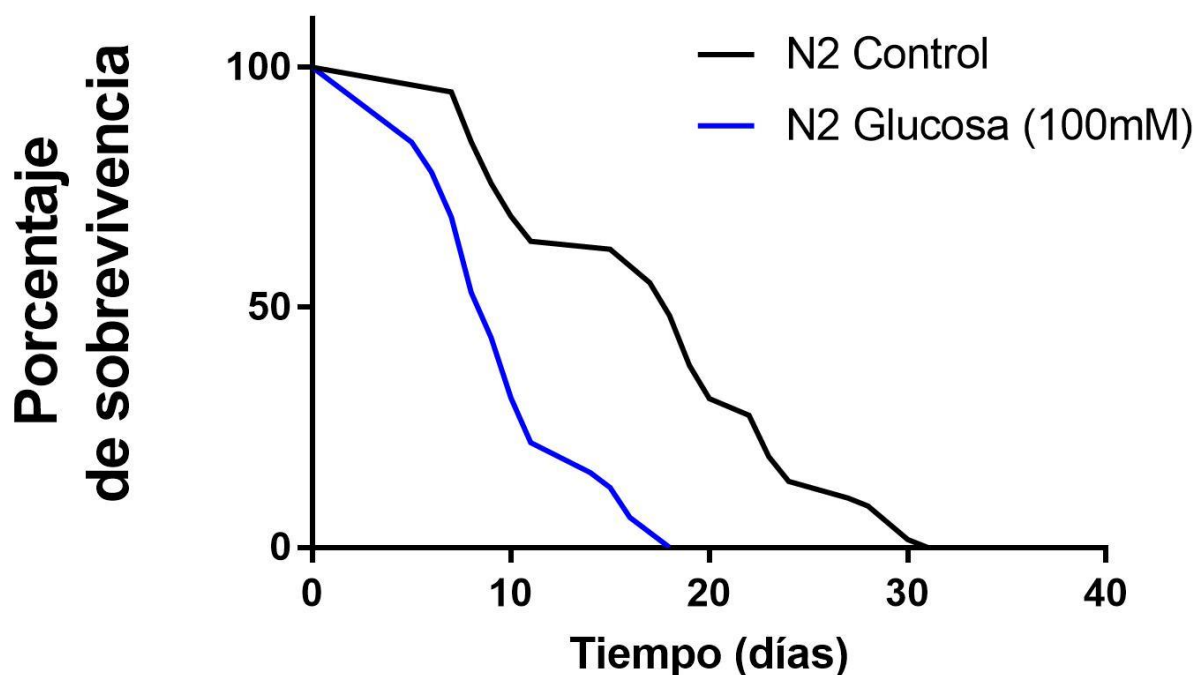


Figura 7. La glucosa en la dieta disminuye la longevidad de *Caenorhabditis elegans*. La glucosa se administró a una concentración de 100mM y los nematodos se cambiaron de caja cada tercer día. (n=3)
Análisis Supervivencia Kaplan-Meier Survival Analysis. GraphpadPrism Software

La disminuida longevidad por glucosa esta mediada por la autofagia

La autofagia es un proceso multifacético que paradójicamente se ha reportado tanto promotor de la supervivencia como de la muerte celular. Para determinar si la autofagia está implicada en la reducción de la esperanza de vida mediada por glucosa en *C. elegans* (Figura 7), evaluamos la longevidad en animales con reducida autofagia debido a la mutación del gen *bec-1*, que codifica para la proteína beclina, el ortólogo de BECN1/Beclin 1 en humano el cual promueve la formación del autofagosoma (Ruck et al., 2011).

En concordancia con datos previos, se encontró que la mutante de BEC-1 tiene una

marcada reducción de su longevidad media en comparación con los de la cepa silvestre N2 (Figura 8). Esta reducción fue de aproximadamente 25 %, modificándose de 31 a 23 días (Figura 8). Sin embargo, la cepa mutante de BEC-1 expuesta a la dieta con alta glucosa no disminuye aún más su longevidad (Figura 8), sugiriendo que la autofagia podría ser responsable de la muerte temprana de los organismos en condiciones de elevada glucosa en la dieta.

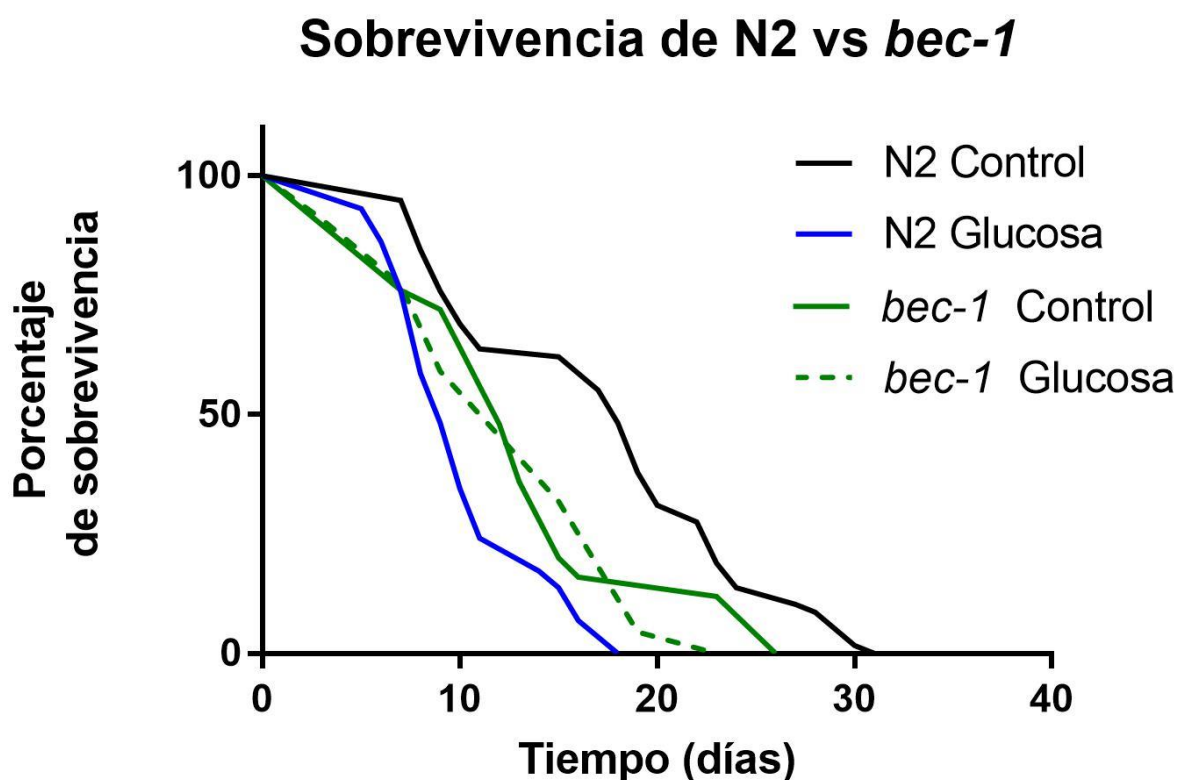


Figura 8. Disminuida longevidad por glucosa es mediada por la autofagia. La cepa *bec-1*, que tiene suprimida la autofagia, ya no reduce aún más la longevidad por el tratamiento de glucosa, sugiriendo que la autofagia es la responsable de la reducida longevidad por glucosa en *C. elegans*.

Dieta alta en glucosa induce la activación del factor transcripcional HLH-30/TFEB

El factor transcripcional HLH.30/TFEB es un regulador evolutivamente conservado que promueve la longevidad a través de la autofagia y la biogénesis lisosomal en *C. elegans*. Dado que la glucosa disminuye la longevidad, fue plausible hipotetizar que la dieta alta en glucosa podría afectar su localización celular.

Para determinar el efecto de la glucosa sobre HLH-30/TFEB, nosotros evaluamos animales transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) que está bajo control del promotor de HLH-30 (HLH-30::GFP), en condiciones de alta glucosa por 24 h. Inesperadamente, los resultados muestran una prominente inducción de la localización nuclear de HLH-30::GFP en condiciones de alta glucosa comparado con la dieta sin glucosa (Figura 9 y 10 A). Estudios previos han reportado que HLH-30/TFEB es capaz de auto activarse en respuesta a nutrientes (O'Rourke & Ruvkun, 2013). Por esta razón se evaluó la expresión de su RNA mensajero, obteniendo que similar con la aumentada translocación nuclear de HLH-30/TFEB, los nematodos con la dieta alta en glucosa también incrementa, más de dos veces, la expresión del RNA mensajero de HLH-30/TFEB (Figura 10 B). Estos resultados sugieren que elevada concentración de glucosa podría activar a la autofagia, vía la translocación nuclear del HLH-30/TFEB.

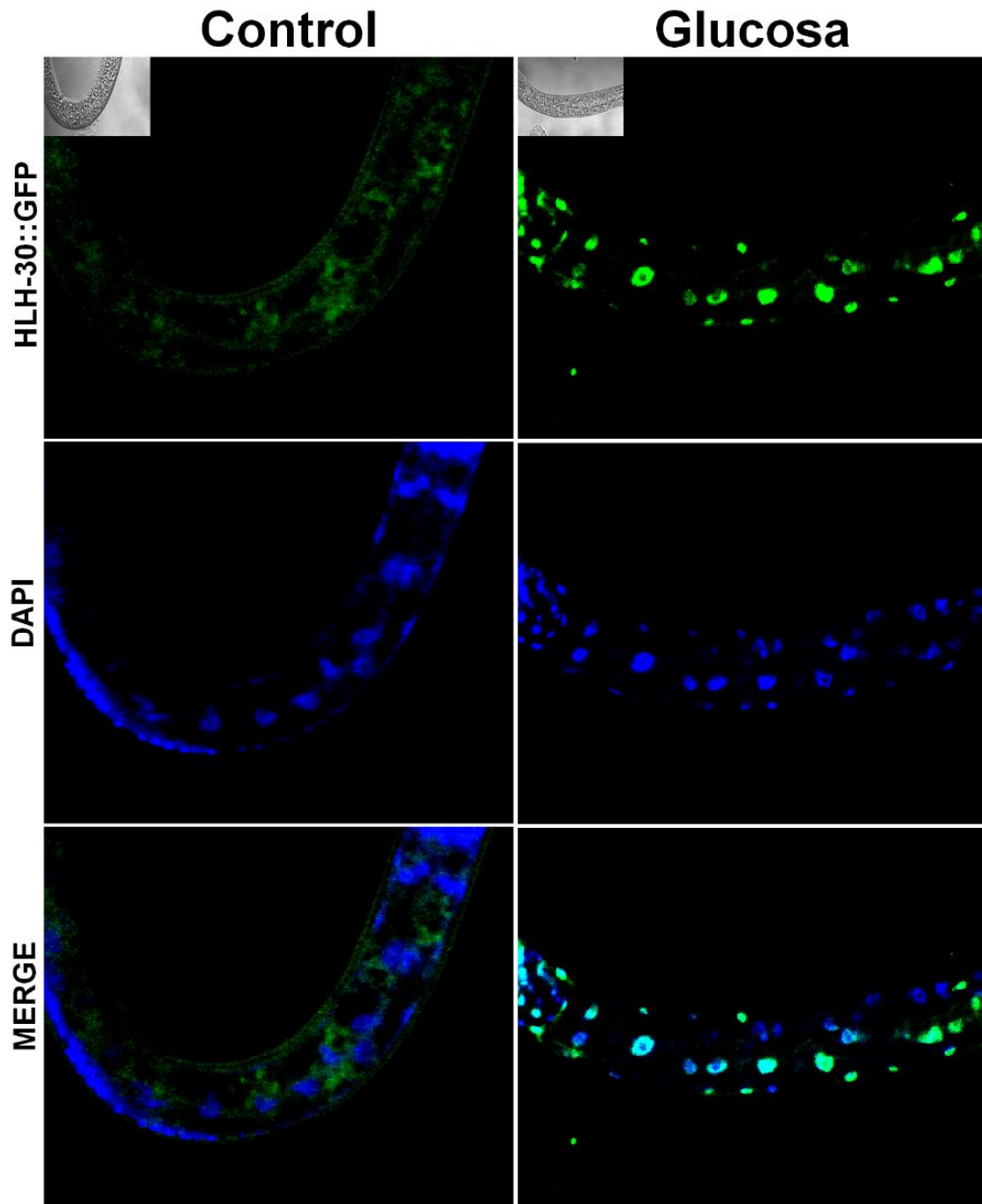
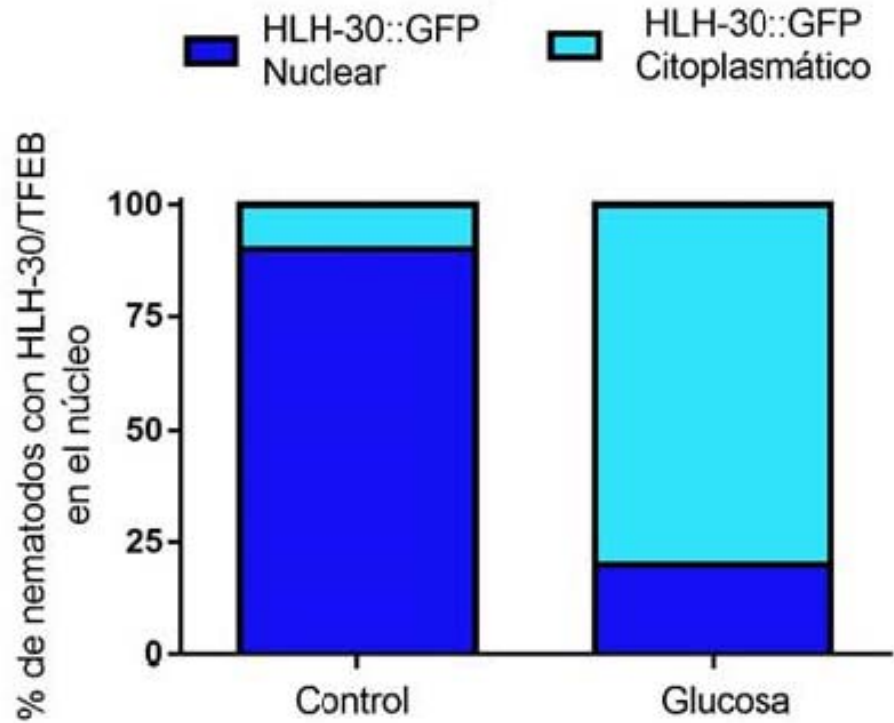


Figura 9. HLH-30::GFP modifica su localización celular y expresión en respuesta a alta glucosa. Imágenes representativas de nematodos transgénicos de HLH-30 con la proteína verde fluorescente (GFP).

A)



B)

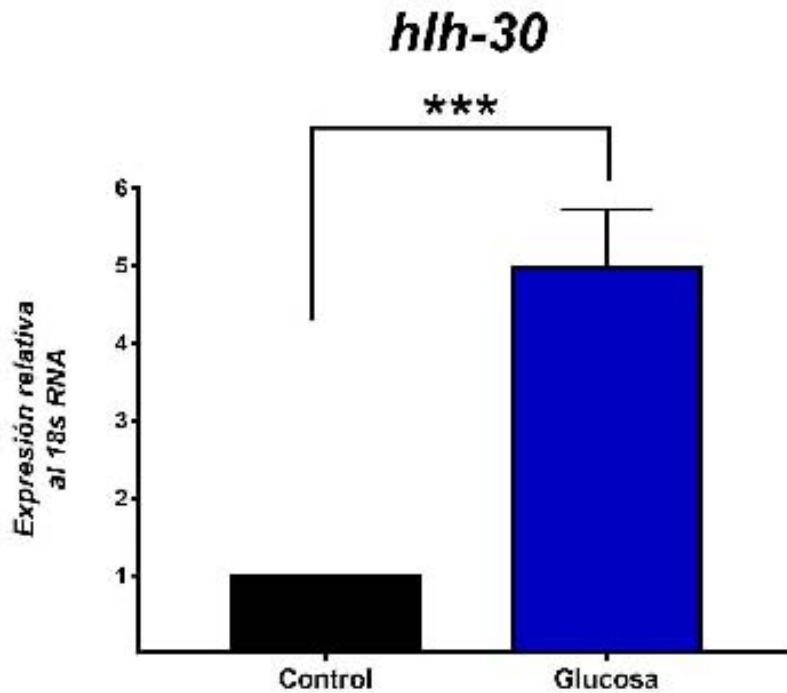


Figura 10. HLH-30::GFP modifica su localización celular y expresión en respuesta a alta glucosa. A) Gráfica que representa el porcentaje de nematodos con HLH-30 en el núcleo y citoplasma. B) Expresión de HLH-30 en respuesta a glucosa.*** $p < 0.001$ contra grupo control. ANOVA, Bonferroni post test. GraphpadPrism Software.

Dieta alta en glucosa eleva la expresión de genes asociados a autofagia

Para confirmar la activación del factor transcripcional HLH-30/TFEB, se determinó la expresión de genes relevantes para la autofagia y que son blancos positivos de HLH-30/TFEB, así determinamos los niveles de expresión de los diferentes RNA mensajeros para los genes *lgg-1*, *unc-51*, *Imp-1* y *pgp-2*, respectivamente, mediante qRT-PCR.

Los resultados se muestran en la figura 11, y se observa que la dieta alta en glucosa incrementó en forma similar la expresión de cada uno de los genes: *lgg-1*, *unc-51*, *Imp-1* y *pgp-2*, que están involucrados en la formación del fagosoma (*lgg-1*, *unc-51*,) y de los lisosomas (*Imp-1* y *pgp-2*). El aumento de la expresión de estos genes correlaciona con la ubicación nuclear de HLH-30/TFEB por la dieta alta en glucosa. Este efecto es similar a lo observado por O'Rourke et al, aunque en condiciones metabólicas diferentes (O'Rourke & Ruvkun, 2013). En conjunto dichos hallazgos sugieren que la glucosa, a través de HLH-30/TFEB, ejerce un control positivo a nivel transcripcional de los genes de autofagia, y posiblemente se vea reflejado en la activación del proceso autofagia que, sin embargo, no da lugar a un aumento de su longevidad.

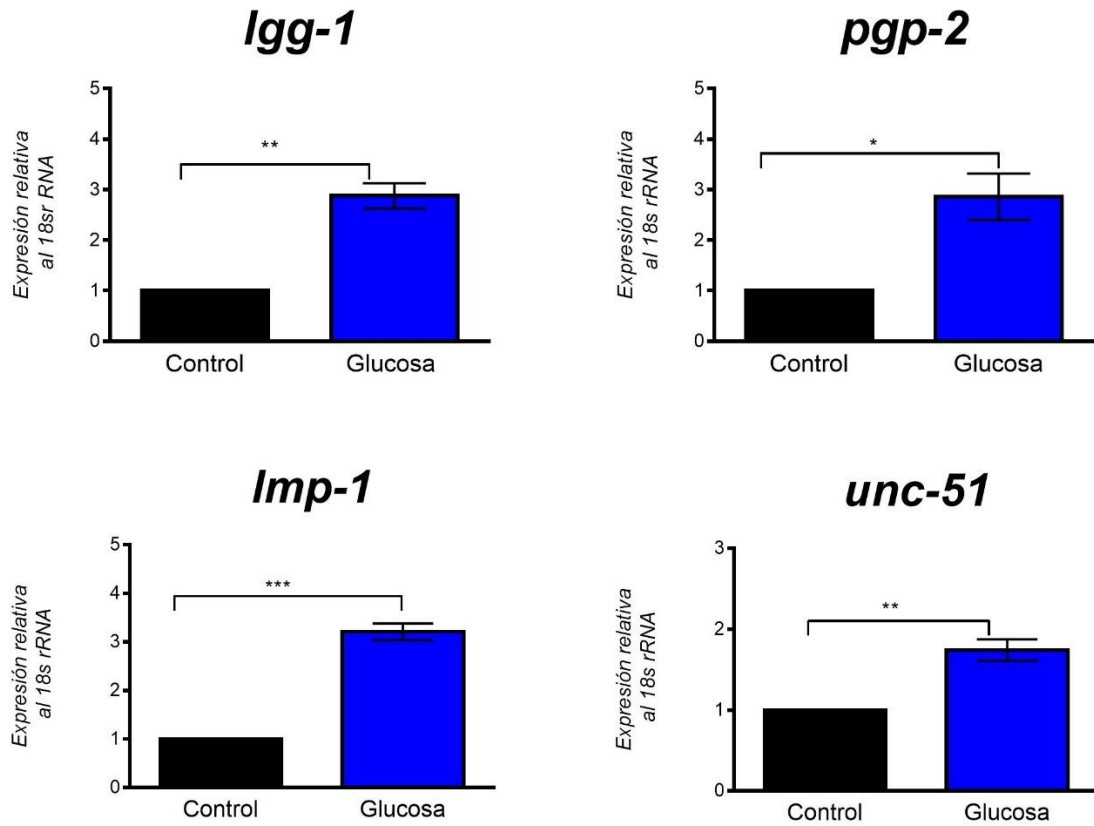


Figura 11. Alta glucosa aumenta la expresión de genes relacionados al proceso autofágico-lisosomal. Análisis por qRT-PCR indican incremento en la expresión de genes marcadores de autofagia. Las barras representan el promedio del error estándar de tres replicas biológicas relativas a la muestra control. (n=3), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 contra grupo control. ANOVA, Bonferroni post test. GraphpadPrism Software.

HLH-30/TFEB estimula la biogénesis lisosomal

A continuación, investigamos el rol de HLH-30/TFEB en la biogénesis de los lisosomas, que como se mencionó en los antecedentes, HLH-30/TFEB se une al elemento CLEAR en los promotores de los genes lisosomales (Sardiello et al., 2009). Para evaluar si existe una asociación entre la expresión aumentada, en condiciones de alta glucosa de HLH-30/TFEB y genes lisosomales Imp-1 y pgp-2, con la biogénesis de los lisosomas, nosotros semi-cuantitativamente evaluamos la cantidad de los lisosomas mediante tinción específica con los colorantes lysotracker y el rojo de Nilo. Como se muestra en la figura 12 A y B, los nematodos crecidos con alta glucosa tienen mayor tinción de ambos colorantes, indicando un aumento en la cantidad de los lisosomas. Así, elevada concentración de glucosa causa aumento de los lisosomas y sugiere que existe la maquinaria necesaria para llevar a cabo el proceso autofágico-lisosomal.

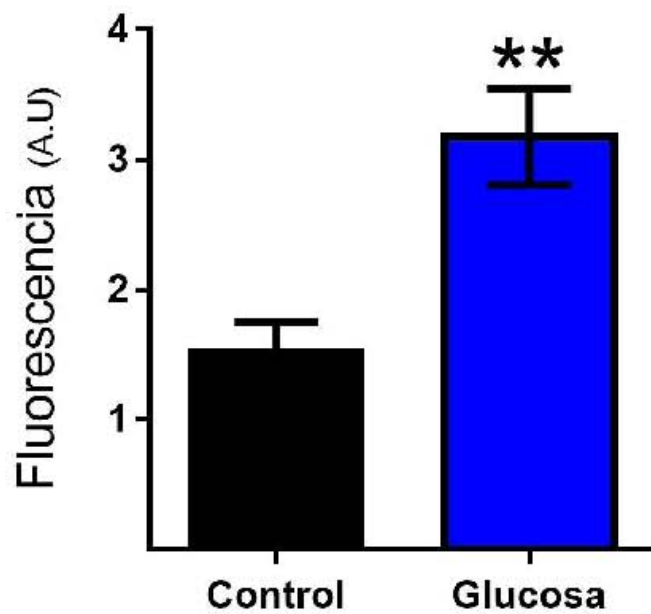
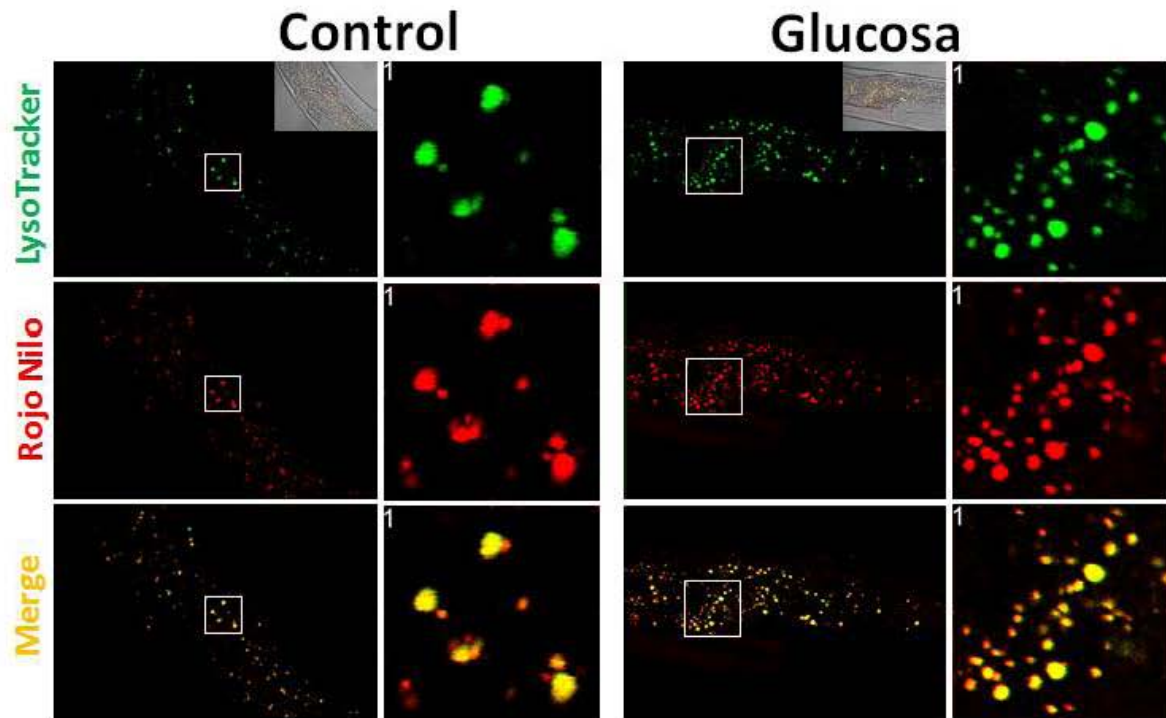


Figura 12. Alta glucosa aumenta la biogénesis lisosomal. A) Las imágenes de fluorescencia de nematodos vivos cultivados en dos colorantes específicos de lisosomas, lysoTracker (verde) y Rojo de Nilo (rojo), en presencia de glucosa. B) Semicuantificación de las imágenes de fluorescencia en (A) con el software ImageJ. La intensidad de la fluorescencia (mostrada como unidades arbitrarias) se normalizaron a la condición control (A.U., unidades arbitrarias). ** $p < 0.01$ contra grupo control . ANOVA, Bonferroni post test. GraphpadPrism Software

La dieta alta en glucosa aumentó el contenido de NAD⁺

Anteriormente se demostró que la suplementación con precursores de NAD⁺, tales como la nicotinamida mononucleótido (NAM), promueve la longevidad del *C. elegans* o ratones (Mouchiroud et al., 2013). Sin embargo, las razones de este efecto aún no son bien entendidas. Interesantemente, Baixauli et. al., mostraron que la homeostasis de NAD⁺ correlaciona con la autofagia (Baixauli et al., 2015) y dado que la dieta alta en glucosa disminuye la longevidad, fue plausible suponer que la glucosa podría afectar negativamente la concentración de NAD⁺. Por lo tanto, nosotros determinamos el nivel de NAD⁺, mediante HPLC, en nematodos crecidos con alta glucosa durante 24 h. Inesperadamente, nuestros resultados mostraron que el nivel de NAD⁺ aumentó significativamente por la exposición a dieta alta en glucosa respecto a la condición control (Figura 13). Estos resultados son consistentes con el aumento del factor transcripcional HLH-30/TFEB y los genes de autofagia, sin embargo, no explica la reducida longevidad que provoca el exceso de glucosa en *C. elegans*, y sugiere un efecto a nivel del flujo autofágico.

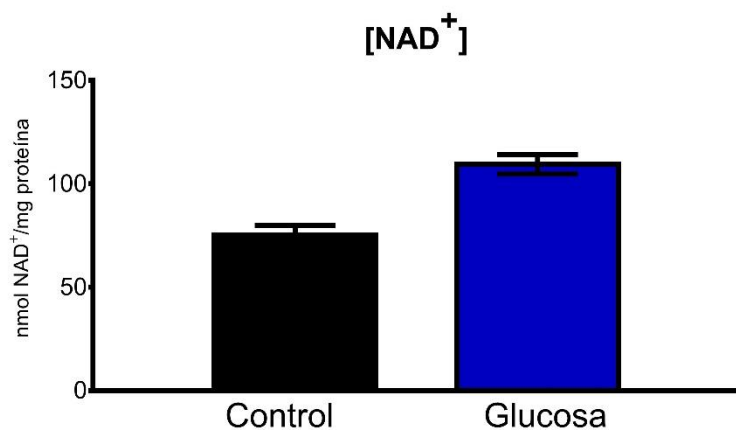


Figura 103. Alta glucosa aumenta la concentración intracelular de NAD⁺. Nematodos N2 se cultivaron en 100mM de glucosa por 24 h y el nivel de NAD⁺ se determinó mediante HPLC. La concentración de NAD⁺ se normalizaron a la condición control.

La dieta alta en glucosa aumentó el flujo autofágico

Un ensayo ampliamente usado para determinar la activación de la autofagia, es mediante la cuantificación de la acumulación de la proteína LC3, LGG-1 en *C. elegans*, en los autofagosomas como “puntos” fluorescentes (Alberti et al., 2010). Basados en lo anterior, se determinó el flujo autofágico empleando una cepa transgénica de *C. elegans* que lleva la GFP fusionada a la proteína LGG-1 (LGG1::GFP). Como se muestra en la figura 14, la glucosa incrementó la cantidad de LGG1::GFP (puntos fluorescentes), sin embargo los resultados no son del todo concluyentes.

En la literatura existen evidencias que indican que los ensayos de fluorescencia para determinar el flujo autofágico pueden tener errores de interpretación. Por lo anterior, Chapin *et al* desarrollaron un método en el que fusionaron a la proteína LGG-1 con dos proteínas verdes fluorescentes, cuya unión (linker) es sensible a proteasas lisosomales (Chapin et al., 2015). Durante la degradación, las proteasas hidrolizan al linker de las proteínas fluorescentes y generan proteínas monoméricas (mFP) que son resistentes a proteasas las cuales pueden ser identificadas con anticuerpos anti-FP; además mediante este método también se puede identificar la proteína dimérica (dFP::LGG-1). Por lo tanto, el incremento de la relación entre la mFP/dFP::LGG-1 es indicativo de un flujo autofágico incrementado (Chapin et al., 2015). Para determinar si la elevada concentración de glucosa altera el flujo autofágico, nosotros semi-cuantitativamente evaluamos la relación entre las bandas dFP y mFP. Como se muestra en la figura 15, la relación mFP/dFP::LGG-1 aumentó muy significativamente, indicando que los nematodos expuestos a alta

concentraciones de glucosa tienen incrementado significativamente el flujo autofágico.

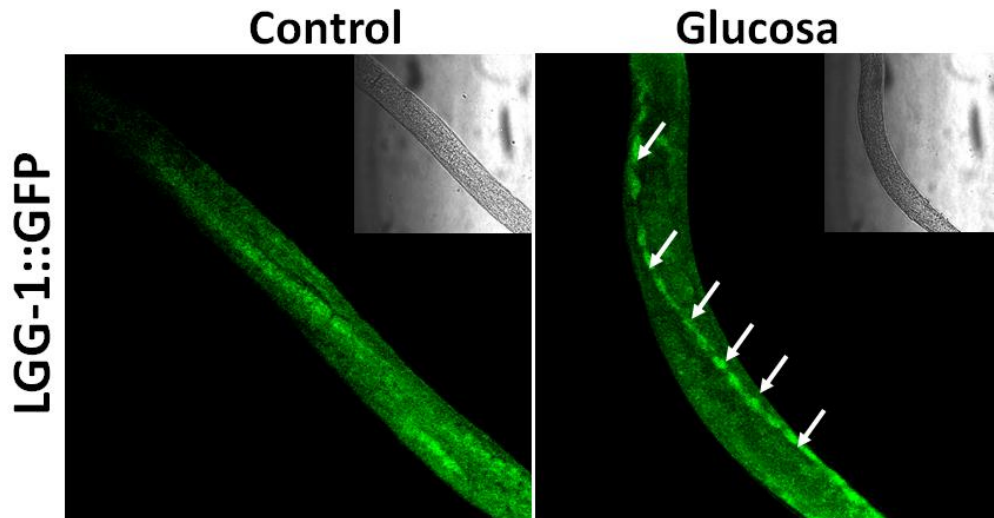


Figura 14. Alta glucosa incrementa la autofagia. Imágenes de fluorescencia representativas de nematodos transgénicos de LGG-1::GFP. Las flechas indican puntos positivos de membranas autofágicas en la condición de alta glucosa.

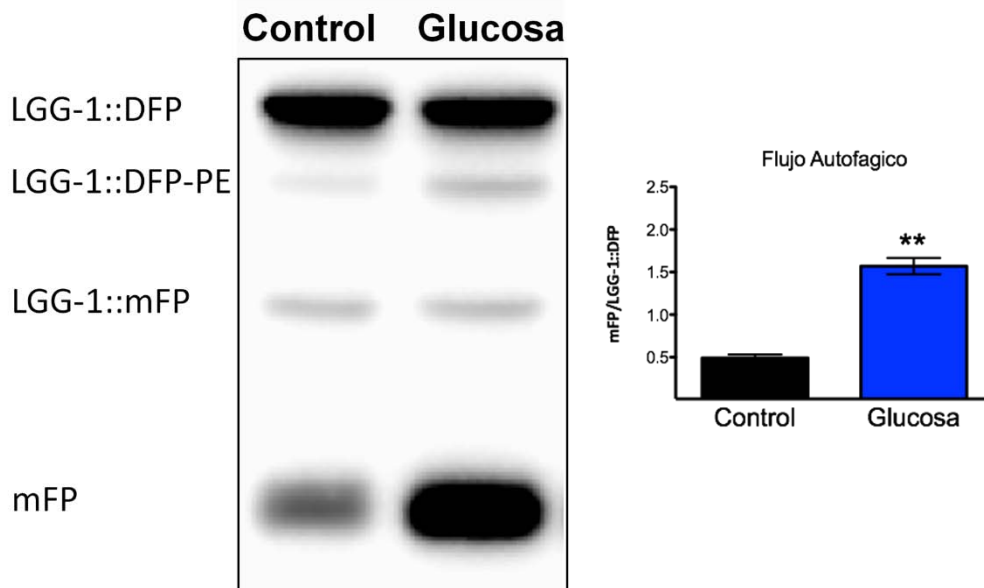


Figura 15. Alta glucosa aumenta el flujo autofágico. A) Western blot que muestra el incremento de la proteína fluorescente monomérica (mFP), indicador del incrementado flujo autofágico, que proviene de la proteína LGG-1::DFP (dimérica). B) Representa la cuantificación entre la relación de las bandas mFP/LGG-1::DGFP-PE, con alta glucosa y es relativa a la condición control. LGG-1::DFP, proteína LGG-1 fluorescente dimétrica, LGG-1::DFP-PE: proteína LGG-1 fluorescente dimétrica fosfatidiletanolamina, LGG-1::mFP proteína LGG-1 fluorescente monomérica, mFP: proteína verde fluorescente monomérica. ** $p < 0.01$ contra grupo control. ANOVA, Bonferroni post test. GraphpadPrism Software.

12. Discusión

La autofagia es un proceso intracelular catabólico evolutivamente conservado, que mantiene la homeostasis celular al remodelar y reciclar los componentes celulares dañados. Se ha sugerido que la autofagia también desempeña un papel importante en la longevidad de diversos organismos como levadura, ratones y *C. elegans* (Glick *et al.*, 2010).

Específicamente, se concibe a la autofagia como un mecanismo pro-sobrevivencia al proporcionar metabolitos resultantes de la degradación de lípidos, proteínas, aminoácidos etc, para generar energía metabólica durante un estrés celular, sin embargo, algunos reportes sugieren que la autofagia también puede promover la muerte celular (Decuyper *et al.*, 2011; Pei *et al.*, 2015; S. Y. Yang & Winslet, 2011). Como se describió en los antecedentes, altas concentraciones de glucosa pueden disminuir la longevidad del *C. elegans*, sin embargo el mecanismo de este efecto aun no es del todo claro. Inicialmente, nosotros hipotetizamos que la alta glucosa suprimía la autofagia y por lo tanto la disminución de la longevidad. Inesperadamente, nuestros resultados mostraron que alta glucosa activa la autofagia, a través de aumentar la expresión del factor transcripcional HLH-30/TFEB, algunos de sus genes blanco: *lgg-1*, *unc-51*, *pqp-2*, y *Imp-1*, y también el flujo autofágico como lo demostró el incremento de la proteína monomérica fluorescente (mFP) que proviene de la proteína dimérica (dFP::LGG-1), que es un indicador del flujo autofágico, y que apoya la idea de la función dual de la autofagia.

La activación de la autofagia bajo condiciones de estrés puede realizarse por diversas vías de señalización celular, sin embargo, se ha reconocido al factor transcripcional HLH-30/TFEB como un regulador maestro de los genes de autofagia

y biogénesis lisosomal (Sardiello et al., 2009). HLH-30/TFEB, es miembro de la familia MiT, la cual está conformada por otros tres factores altamente relacionados con HLH-30/TFEB: MiTF, TFE3 y TFEC, que se unen al DNA en forma de homodímeros o heterodímeros, al reconocer secuencias denominadas cajas E (CACGTG) (Kuiper et al., 2004). Un análisis de las regiones promotoras de muchos genes, revelaron que los genes lisosomales presentan uno o más motivos de alrededor de 10 pares de bases (GTCACGTGAC) los cuales presentan en su secuencia una caja E ubicada principalmente 200 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción, este motivo se denomina CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation) el cual es reconocido por el factor transcripcional HLH-30/TFEB que es importante para estimular la autofagia y mantener la homeostasis celular (Sardiello et al., 2009). La función de HLH-30/TFEB, fue descubierta en organismos sometidos a un estrés nutricional (O'Rourke & Ruvkun, 2013). Bajo estas condiciones, HLH-30/TFEB induce la expresión de genes para obtener energía metabólica, dicha función está conservada desde *C. elegans* hasta los mamíferos (O'Rourke & Ruvkun, 2013; Settembre et al., 2013).

Es comúnmente aceptado que la glucosa inhibe la autofagia, en parte porque su privación modula la vía de señalización dependiente de las proteínas AMPK y mTOR, y como éstas participan en diversos procesos celulares, su malfuncionamiento está asociado a diversas patologías (Galluzzi et al., 2014). De hecho, estudios realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* evidenciaron que la glucosa induce proteólisis dependiente de autofagia (Delorme-Axford et al., 2015) mientras que, contrariamente en mamíferos, la falta de glucosa también la

induce, consistente con la idea de que la glucosa tiene un efecto inhibitor sobre la autofagia. Por lo tanto, estas evidencias indican una controversia del efecto que provoca este sacárido sobre la autofagia.

En *C.elegans* y mamíferos, HLH-30/TFEB se transloca al núcleo en respuesta a la privación de nutrientes y desencadena la inducción de genes relacionados con la autofagia y biogénesis lisosomal, mediante los cuales se ha propuesto se incrementa la longevidad (Settembre et al., 2013). Basados en estos datos, era plausible especular que alta concentración de glucosa podría impedir la función de HLH-30/TFEB y por ende no activar el proceso autofágico. Sorprendentemente, nuestros resultados mostraron que los nematodos crecidos en alta glucosa incrementan la ubicación nuclear de HLH-30/TFEB. Estos resultados pueden ser explicados desde que la adición de altas concentraciones de sacarosa (glucosa y fructosa) al medio de cultivo de células HeLa puede producir estrés lisosomal e induce la expresión y translocación de TFEB del citoplasma al núcleo (Pastore et al., 2013; Sardiello et al., 2009). Esta observación propone que la activación endógena de TFEB es una respuesta al estrés lisosomal. Estos hallazgos se comprobaron posteriormente en modelos experimentales que cursan con estrés lisosomal, por ejemplo, células provenientes de pacientes con enfermedad de Huntington, una enfermedad caracterizada por la acumulación de inclusiones celulares de la proteína huntingtina, acumulación de α sinucleína, que desarrolla Parkinson, tienen acumulación nuclear de TFEB (Raben & Puertollano, 2016). Adicionalmente, se ha propuesto que el aumento de la translocación de TFEB surge como una respuesta adaptativa a diversas condiciones promotoras de estrés celular, que incluyen exposición a arsénico, a metales como el cobre o hierro y al estrés

oxidativo (Pena & Kiselyov, 2015). Interesantemente, Yu, *et al* propusieron que la hiperglicemia induce la fragmentación mitocondrial, provocando sobreproducción de ROS (Yu et al., 2006) que activa la autofagia. Este efecto se evaluó mediante la proteína LC3/ LGG-1 o de la cisteína proteasa (ATG 4). Además, los ROS derivados de la alta concentración de glucosa, aumentan los niveles de Ca^{2+} citosólico (Yu et al., 2011) que concebiblemente fueron liberados de los lisosomas a través del canal TRPML1 ubicado en la membrana del lisosoma o por liberación de éste del retículo endoplásmico, otro organelo que sirve de almacén de Ca^{2+} (Glover-Cutter et al., 2013; X. L. Zhang et al., 2016). Por lo tanto, una consecuencia de la liberación de Ca^{2+} por ROS explicaría la translocación nuclear de TFEB, a través de su desfosforilación dependiente de calcineurina como previamente se ha reportado (Martina et al., 2016). Consistente con la ubicación nuclear de HLH-30/TFEB, observamos que algunos genes representativos del proceso autofágico también se incrementaron, indicando que la glucosa podría generar un estrés celular que activa la maquinaria autofágica-lisosomal. Adicionalmente, la disfunción mitocondrial está asociada con la disminución de los niveles intracelulares de NAD^+ y desde que esta coenzima es prolongevidad (Mouchiroud et al., 2013), en parte al regular la fusión del fagolisosoma, es posible sugerir que exceso de glucosa reduciría los niveles intracelulares de NAD^+ y por lo tanto el flujo autofágico, y que aun cuando la maquinaria formadora del proceso autofago-lisosoma este activo no podría ser funcional debido al desacople del flujo autofágico, lo que explicaría la reducción de la longevidad del nematodo con glucosa. Esta propuesta es apoyada por resultados obtenidos por Baixauli et al quienes encontraron que células que tienen una disfunción mitocondrial debido a la falta del factor transcripcional Tfam, regulador

de genes mitocondriales, tienen además disminuida la actividad lisosomal la cual puede ser restaurada eficientemente por la administración exógena de precursores de NAD⁺ (NAM), es decir niveles elevados de NAD⁺ eficientemente aumentan la fusión fagosoma-lisosoma e incrementa el flujo autofágico (Baixauli et al., 2015). Basados en estos datos, se midieron los niveles de NAD⁺ en nematodos crecidos en alta glucosa, sin embargo nuestros resultados mostraron un aumento significativo en dichos niveles, indicando que el flujo autofágico no estaba afectado, y que no explicaba el incremento de la longevidad por glucosa.

Como ya se ha mencionado, la autofagia puede tener un papel dual, es decir que puede promover tanto la sobrevivencia como la muerte de los organismos, sugiriendo que los efectos de la activación de la autofagia (sobrevivencia o muerte) dependerá del nivel de estrés con el cual cursen los organismos, es decir; en un estrés moderado, éste puede ser contrarrestado por la autofagia, sin embargo, el estrés severo la activa aún más y coadyuva a la muerte celular. Este concepto es apoyado por evidencias aportadas por Kang et. al., quienes mostraron que cuando al *C. elegans* se le activa simultáneamente la autofagia por restricción de nutrientes y por mutación genética, ocasiona un aumento excesivo de autofagia, provocando la muerte prematura de los nematodos (C. Kang et al., 2007). Por lo tanto, la potenciación de la autofagia no fue protectora de la sobrevivencia, sino más bien contribuyó a la desregulación de la homeostasis celular y por lo tanto la muerte del organismo. Este efecto dual de la autofagia también se ha reportado en órganos como el hígado, en donde se ha evidenciado que su activación es esencial para mantener funcionales las mitocondrias y controlar el nivel de estrés oxidativo y así prevenir carcinogénesis, sin embargo; si la carcinogénesis se establece, la

autofagia puede promover la enfermedad (Dash et al., 2016). En línea con nuestros resultados, nosotros observamos que elevadas concentraciones de glucosa incrementan elementos claves de la maquinaria autofágica-lisosomal, dentro de éstos el regulador maestro HLH-30/TFEB y el flujo autofágico, medido por la relación mFP/dFP::LGG-1 que incrementó hasta 3 veces. Estos resultados plausiblemente explicarían la paradójica disminución de la longevidad con el incremento de la autofagia de *C. elegans* debido a altas concentraciones de glucosa.

Interesantemente, Martina *et al* han demostrado que TFEB forma parte de una vía que responde al estrés del retículo endoplásmico (ER). En dicho estudio se encontró que TFEB se transloca al núcleo en respuesta al estrés del ER inducido por agentes químicos (Martina et al., 2016). La activación de TFEB depende de PERK, una cinasa que activa la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y de la fosfatasa calcineurina que lo desfosforila para enviarlo al núcleo y así activar la autofagia y biogénesis lisosomal (Martina et al., 2016). Está bien establecido que cuando las células son incapaces de alcanzar la homeostasis en presencia de un estrés prolongado, la vía UPR puede inducir la muerte celular, inesperadamente la presencia de un estrés de ER prolongado mediante tunicamicina demostró que el TFEB es promotor de la muerte celular, ya que en la pérdida de TFEB por mutación la disminuyó considerablemente, sugiriendo que TFEB promueve apoptosis bajo condiciones de estrés prolongado (Martina et al., 2016; Senft & Ronai, 2015). Este hallazgo sugiere que la disminución de la longevidad de *C. elegans* por glucosa, podría deberse a que ésta provoca un estrés del ER y que la activación de HLH-30/TFEB que nosotros observamos aumentaría vías que conducen a la muerte celular y concomitantemente la observada disminución de la longevidad.

13. Conclusión

Contrario a lo reportado en la literatura respecto al papel pro longevidad que representa la activación de la autofagia, este trabajo evidencia que elevada concentración de glucosa actúa como un potente inductor del proceso autofágico. Además, la inducción de la autofagia esta mediada por el factor transcripcional HLH-30/TFEB que contribuye a la muerte prematura del *C. elegans* y revela una función no descrita de HLH-30/TFEB.

14. Referencias

1. Alberti, A., Michelet, X., Djeddi, A., & Legouis, R. (2010). The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in dauer formation and longevity in *C. elegans*. *Autophagy*, 6(5), 622-633.
2. Baixauli, F., Acin-Perez, R., Villarroya-Beltri, C., Mazzeo, C., Nunez-Andrade, N., Gabande-Rodriguez, E., . . . Mittelbrunn, M. (2015). Mitochondrial Respiration Controls Lysosomal Function during Inflammatory T Cell Responses. *Cell Metab*, 22(3), 485-498.
3. Belenky, P., Bogan, K. L., & Brenner, C. (2007). NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci*, 32(1), 12-19.
4. Boya, P., Reggiori, F., & Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol*, 15(7), 713-720.
5. Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94.
6. Chapin, H. C., Okada, M., Merz, A. J., & Miller, D. L. (2015). Tissue-specific autophagy responses to aging and stress in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)*, 7(6), 419-434.
7. Choi, J. C., Muchir, A., Wu, W., Iwata, S., Homma, S., Morrow, J. P., & Worman, H. J. (2012). Temsirolimus activates autophagy and ameliorates cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Sci Transl Med*, 4(144), 144ra102.
8. Choi, S. S. (2011). High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. *Nutr Res Pract*, 5(3), 214-218.
9. Dash, S., Chava, S., Chandra, P. K., Aydin, Y., Balart, L. A., & Wu, T. (2016). Autophagy in hepatocellular carcinomas: from pathophysiology to therapeutic response. *Hepat Med*, 8, 9-20.
10. Decuypere, J. P., Bultynck, G., & Parys, J. B. (2011). A dual role for Ca²⁺ in autophagy regulation. *Cell Calcium*, 50(3), 242-250.
11. Delorme-Axford, E., Guimaraes, R. S., Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2015). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an overview of methods to study autophagy progression. *Methods*, 75, 3-12.
12. Dittman, J. (2009). Worm watching: imaging nervous system structure and function in *Caenorhabditis elegans*. *Adv Genet*, 65, 39-78.

13. Esclatine, A., Chaumorcet, M., & Codogno, P. (2009). Macroautophagy signaling and regulation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 335, 33-70.
14. Eskelinen, E. L., & Saftig, P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1793(4), 664-673.
15. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
16. Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., & Kroemer, G. (2014). Metabolic control of autophagy. *Cell*, 159(6), 1263-1276.
17. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. (1998). *Science*, 282(5396), 2012-2018.
18. Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221(1), 3-12.
19. Glover-Cutter, K. M., Lin, S., & Blackwell, K. (2013). Integration of the Unfolded Protein and Oxidative Stress Responses through SKN-1/Nrf. *Plos Genetics*, 9(9).
20. Grove, C. A., De Masi, F., Barrasa, M. I., Newburger, D. E., Alkema, M. J., Bulyk, M. L., & Walhout, A. J. (2009). A multiparameter network reveals extensive divergence between *C. elegans* bHLH transcription factors. *Cell*, 138(2), 314-327.
21. Hardie, D. G. (2011). AMPK and autophagy get connected. *EMBO J*, 30(4), 634-635.
22. Hardie, D. G., Schaffer, B. E., & Brunet, A. (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol*, 26(3), 190-201.
23. Harlow, E., & Lane, D. (2006). Fixing *Caenorhabditis elegans* in Paraformaldehyde. *CSH Protoc*, 2006(4).
24. Houtkooper, R. H., Canto, C., Wanders, R. J., & Auwerx, J. (2010). The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev*, 31(2), 194-223.
25. Jiang, P., & Mizushima, N. (2014). Autophagy and human diseases. *Cell Res*, 24(1), 69-79.
26. Kang, C., You, Y. J., & Avery, L. (2007). Dual roles of autophagy in the survival of *Caenorhabditis elegans* during starvation. *Genes Dev*, 21(17), 2161-2171.

27. Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 18(4), 571-580.
28. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13(2), 132-141.
29. Klionsky, D. J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*, 118(Pt 1), 7-18.
30. Koopman, K. E., Caan, M. W., Nederveen, A. J., Pels, A., Ackermans, M. T., Fliers, E., . . . Serlie, M. J. (2014). Hypercaloric diets with increased meal frequency, but not meal size, increase intrahepatic triglycerides: a randomized controlled trial. *Hepatology*, 60(2), 545-553.
31. Kuiper, R. P., Schepens, M., Thijssen, J., Schoenmakers, E. F., & van Kessel, A. G. (2004). Regulation of the MiTF/TFE bHLH-LZ transcription factors through restricted spatial expression and alternative splicing of functional domains. *Nucleic Acids Res*, 32(8), 2315-2322.
32. Lapierre, L. R., De Magalhaes Filho, C. D., McQuary, P. R., Chu, C. C., Visvikis, O., Chang, J. T., . . . Hansen, M. (2013a). The TFEB orthologue HLH-30 regulates autophagy and modulates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications*, 4, 2267.
33. Lapierre, L. R., De Magalhaes Filho, C. D., McQuary, P. R., Chu, C. C., Visvikis, O., Chang, J. T., . . . Hansen, M. (2013b). The TFEB orthologue HLH-30 regulates autophagy and modulates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*, 4, 2267.
34. Lee, S. J., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2009). Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metab*, 10(5), 379-391.
35. Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6(4), 463-477.
36. Lin, J. Y., & Fisher, D. E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445(7130), 843-850.
37. Lippai, M., & Low, P. (2014). The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res Int*, 2014, 832704.
38. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
39. Luzio, J. P., Pryor, P. R., & Bright, N. A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(8), 622-632.

40. Madeo, F., Zimmermann, A., Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2015). Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest*, *125*(1), 85-93.
41. Martina, J. A., Diab, H. I., Brady, O. A., & Puertollano, R. (2016). TFEB and TFE3 are novel components of the integrated stress response. *EMBO J*, *35*(5), 479-495.
42. Medina, D. L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., . . . Ballabio, A. (2015). Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol*, *17*(3), 288-299.
43. Michalski, A. I., Johnson, T. E., Cypser, J. R., & Yashin, A. I. (2001). Heating stress patterns in *Caenorhabditis elegans* longevity and survivorship. *Biogerontology*, *2*(1), 35-44.
44. Mihaylova, M. M., & Shaw, R. J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, *13*(9), 1016-1023.
45. Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, *1817*(6), 851-862.
46. Mizushima, N. (2009). Physiological functions of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, *335*, 71-84.
47. Mouchiroud, L., Houtkooper, R. H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Canto, C., . . . Auwerx, J. (2013). The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell*, *154*(2), 430-441.
48. Munoz, M. J. (2003). Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*, *124*(1), 43-48.
49. Napolitano, G., & Ballabio, A. (2016). TFEB at a glance. *J Cell Sci*, *129*(13), 2475-2481.
50. Noda, N. N., & Inagaki, F. (2015). Mechanisms of Autophagy. *Annu Rev Biophys*, *44*, 101-122.
51. O'Rourke, E. J., & Ruvkun, G. (2013). MXL-3 and HLH-30 transcriptionally link lipolysis and autophagy to nutrient availability. *Nat Cell Biol*, *15*(6), 668-676.
52. Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., & Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet*, *20*(19), 3852-3866.

53. Park, S. K., Tedesco, P. M., & Johnson, T. E. (2009). Oxidative stress and longevity in *Caenorhabditis elegans* as mediated by SKN-1. *Aging Cell*, 8(3), 258-269.
54. Pastore, N., Blomenkamp, K., Annunziata, F., Piccolo, P., Mithbaekar, P., Maria Sepe, R., . . . Brunetti-Pierri, N. (2013). Gene transfer of master autophagy regulator TFEB results in clearance of toxic protein and correction of hepatic disease in alpha-1-anti-trypsin deficiency. *EMBO Mol Med*, 5(3), 397-412.
55. Pastore, N., Brady, O. A., Diab, H. I., Martina, J. A., Sun, L., Huynh, T., . . . Puertollano, R. (2016). TFEB and TFE3 cooperate in the regulation of the innate immune response in activated macrophages. *Autophagy*, 12(8), 1240-1258.
56. Pei, F., Lin, H., Liu, H., Li, L., Zhang, L., & Chen, Z. (2015). Dual role of autophagy in lipopolysaccharide-induced preodontoblastic cells. *J Dent Res*, 94(1), 175-182.
57. Pena, K. A., & Kiselyov, K. (2015). Transition metals activate TFEB in overexpressing cells. *Biochem J*, 470(1), 65-76.
58. Quan, W., Lim, Y. M., & Lee, M. S. (2012). Role of autophagy in diabetes and endoplasmic reticulum stress of pancreatic beta-cells. *Exp Mol Med*, 44(2), 81-88.
59. Raben, N., & Puertollano, R. (2016). TFEB and TFE3: Linking Lysosomes to Cellular Adaptation to Stress. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 32, 255-278.
60. Roczniak-Ferguson, A., Petit, C. S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., . . . Ferguson, S. M. (2012). The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal*, 5(228), ra42.
61. Ruck, A., Attonito, J., Garces, K. T., Nunez, L., Palmisano, N. J., Rubel, Z., . . . Melendez, A. (2011). The Atg6/Vps30/Beclin 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*, 7(4), 386-400.
62. Russell, R. C., Yuan, H. X., & Guan, K. L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res*, 24(1), 42-57.
63. Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., . . . Ballabio, A. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, 325(5939), 473-477.
64. Senft, D., & Ronai, Z. A. (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*, 40(3), 141-148.
65. Settembre, C., & Ballabio, A. (2014). Lysosome: regulator of lipid degradation pathways. *Trends Cell Biol*, 24(12), 743-750.

66. Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., Saha, P. K., Vetrini, F., Visvikis, O., . . . Ballabio, A. (2013). TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat Cell Biol*, *15*(6), 647-658.
67. Shimobayashi, M., & Hall, M. N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(3), 155-162.
68. Tong, Y., & Song, F. (2015). Intracellular calcium signaling regulates autophagy via calcineurin-mediated TFEB dephosphorylation. *Autophagy*, *11*(7), 1192-1195.
69. Tooze, S. A., & Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol*, *12*(9), 831-835.
70. Visvikis, O., Ihuegbu, N., Labed, S. A., Luhachack, L. G., Alves, A. M., Wollenberg, A. C., . . . Irazoqui, J. E. (2014). Innate host defense requires TFEB-mediated transcription of cytoprotective and antimicrobial genes. *Immunity*, *40*(6), 896-909.
71. Vrablik, T. L., Huang, L., Lange, S. E., & Hanna-Rose, W. (2009). Nicotinamidase modulation of NAD⁺ biosynthesis and nicotinamide levels separately affect reproductive development and cell survival in *C. elegans*. *Development*, *136*(21), 3637-3646.
72. Wang, X. Y., Li, S., Wang, G., Ma, Z. L., Chuai, M., Cao, L., & Yang, X. (2015). High glucose environment inhibits cranial neural crest survival by activating excessive autophagy in the chick embryo. *Sci Rep*, *5*, 18321.
73. Yamahara, K., Yasuda, M., Kume, S., Koya, D., Maegawa, H., & Uzu, T. (2013). The role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Res*, *2013*, 193757.
74. Yang, S. Y., & Winslet, M. C. (2011). Dual role of autophagy in colon cancer cell survival. *Ann Surg Oncol*, *18 Suppl 3*, S239.
75. Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, *12*(9), 814-822.
76. Yoshino, J., & Imai, S. (2013). Accurate measurement of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) with high-performance liquid chromatography. *Methods Mol Biol*, *1077*, 203-215.
77. Yu, T., Jhun, B. S., & Yoon, Y. (2011). High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxid Redox Signal*, *14*(3), 425-437.

78. Yu, T., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8), 2653-2658.
79. Zhang, D. X., Zhang, J. P., Hu, J. Y., & Huang, Y. S. (2016). The potential regulatory roles of NAD(+) and its metabolism in autophagy. *Metabolism*, 65(4), 454-462.
80. Zhang, H., Chang, J. T., Guo, B., Hansen, M., Jia, K., Kovacs, A. L., . . . Wu, F. (2015). Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy*, 11(1), 9-27.
81. Zhang, X., Cheng, X., Yu, L., Yang, J., Calvo, R., Patnaik, S., . . . Xu, H. (2016). MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nat Commun*, 7, 12109.
82. Zhang, X. L., Cheng, X. P., Yu, L., Yang, J. S., Calvo, R., Patnaik, S., . . . Xu, H. X. (2016). MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nature Communications*, 7.
83. Zhou, K. I., Pincus, Z., & Slack, F. J. (2011). Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)*, 3(8), 733-753.