



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

ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES A LA
GLUCOTOXICIDAD EN EL NEMATODO *CAENORHABDITIS ELEGANS*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
JONATHAN ALCÁNTAR FERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. JUAN MIRANDA RÍOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme realizar mis estudios doctorales en su plan académico, por las facilidades otorgadas durante la realización de este proyecto en todas las entidades participantes en este programa. Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, así como a su comunidad, por brindarme un espacio y los recursos para la realización de este proyecto. Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en el cual se desarrollaron varios de los experimentos documentados en este trabajo.

Al Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Secretaría de Salud, así como a su comunidad académica, de investigación, y profesionales de la salud, por las facilidades otorgadas durante la realización de este proyecto. Al laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, así como al Dr. Víctor Manuel Dávila Borja, por las facilidades técnicas y académicas otorgadas durante la realización de este proyecto. A la Unidad de Genética de la Nutrición - UNAM/INP, por recibirme en sus instalaciones y permitirme formar parte de su comunidad.

La realización de esta tesis fue posible gracias a los apoyos recibidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Beca: 384151), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (proyecto: IN203514), al Instituto Nacional de Pediatría por el financiamiento a través del programa de Fondos Federales-INP (proyecto: 036/2015)

Además quiero agradecer por el apoyo técnico y su participación en este proyecto a:

QFB. Martha Elva Pérez Andrade por su apoyo técnico a este proyecto en distintas metodologías y experimentos desarrollados en este proyecto.

Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera por su apoyo técnico a este proyecto durante la implementación de técnicas de análisis bioquímico y de biología molecular.

M. en C. Alain de Jesús Hernández Vázquez por su apoyo técnico a este proyecto en la realización de técnicas especiales de análisis bioquímico y molecular.

M en C. Laura Silvia Salinas Velázquez por su apoyo técnico a este proyecto en la realización de técnicas especiales en *C. elegans*.

M en C. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño por su apoyo técnico a este proyecto en la implementación y adaptación de técnicas bioquímicas durante este proyecto.

A los Doctores, María Cristina Fernández Mejía, Antonio Velázquez Arellano y Silvestre Frenk Freund y la M en C. Zazil Olivares Sandoval por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto, sus enseñanzas y lecciones las cuales enriquecieron este proyecto. Mi profundo reconocimiento y agradecimiento al comité tutor conformado por los doctores: Dr. Juan Miranda Ríos, Dra. Rosa Estela Navarro González y Dra. Ana María Salazar Martínez, por brindarme su confianza, guiarme y compartir su conocimiento y experiencia los cuales fortalecieron mi formación académica; además de acompañarme con paciencia, consejos, supervisión, fraternidad y empatía durante todas las etapas de este proyecto.

CONTENIDO

1	RESUMEN.....	9
2	ABSTRACT.....	11
3	INTRODUCCIÓN	12
3.1	La pandemia de la diabetes	12
3.2	Epidemiología de la diabetes en México	12
3.3	La diabetes y la glucotoxicidad.....	12
3.4	Glucotoxicidad, especies reactivas de oxígeno y disfunción mitocondrial	13
3.5	Organismos modelo para el estudio de la glucotoxicidad	15
3.5.1	Caenorhabditis elegans	15
3.5.2	Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	16
3.5.3	Etapas alternativas del desarrollo de <i>C. elegans</i>	16
3.5.4	Caenorhabditis elegans, un organismo modelo de estudio en biomedicina	17
3.5.5	Un vistazo al metabolismo de <i>C. elegans</i>	18
3.6	Principales vías de señalización conservadas en <i>C. elegans</i>	19
3.6.1	Vía de señalización de la insulina.....	19
3.6.2	Vía de señalización de TOR	21
3.6.3	El sensor energético AMPK	21
3.7	Factores de transcripción de respuesta a estrés.....	22
3.7.1	Factor de transcripción DAF-16/FOXO	22
3.7.2	Factor de transcripción SKN-1/NRF-2	24
3.7.3	Factor de transcripción CEP-1/p53.....	26
3.7.4	Factor de inducción por hipoxia, HIF-1	28
3.7.5	Factor de transcripción SBP-1/SREBP	30
3.7.6	Factor de transcripción CRH-1/CREB	32
4	JUSTIFICACIÓN.....	34
5	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	34
6	HIPÓTESIS	34
7	OBJETIVOS.....	34
7.1	Objetivo general.....	34
7.2	Objetivos específicos	34
8	MATERIALES Y MÉTODOS	35
8.1	Cepas de <i>C. elegans</i> empleadas en este estudio.....	35

8.2	Mantenimiento de cepas y sincronización de cultivos de <i>C. elegans</i>	35
8.3	Establecimiento de condiciones de glucotoxicidad en <i>C. elegans</i>	35
8.4	Cosecha de gusanos y almacenamiento de muestras	35
8.5	Preparación de homogenados de <i>C. elegans</i>	36
8.6	Medición del contenido de glucosa y triglicéridos	36
8.7	Ensayo de asimilación/captación de glucosa	36
8.8	Actividad de Superóxido dismutasa mitocondrial (mtSOD).	37
8.9	Actividad de Catalasa.	37
8.10	Peroxidación de Lípidos.....	37
8.11	Cuantificación de glutatión.	37
8.12	Control positivo de estrés oxidante	38
8.13	Evaluación de la puesta de huevecillos	38
8.14	Cuantificación de la frecuencia de retención de huevecillos o fenotipo "embolsado"	38
8.15	Determinación de las actividades enzimáticas de Aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FAL).....	38
8.16	Expresión del gen reportero GFP en la cepa transgénica Psod-3::GFP ..	38
8.17	Ensayos de longevidad	39
8.18	Preparación de RNA de interferencia (RNAi) para silenciamiento de genes de <i>C. elegans</i>	39
8.19	Silenciamiento génico con RNAi en <i>C. elegans</i>	40
8.20	Ensayos de longevidad en gusanos RNAi.....	40
8.21	Extracción de RNA	40
8.22	RT-PCR cuantitativa	40
8.23	Extracción de DNA	41
8.24	Cuantificación de daño al DNA y número de copias de DNA mitocondrial 41	41
8.25	Ensayos de respiración celular y de funcionalidad de la cadena de transporte de electrones	42
8.26	Aislamiento de nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP).....	42
8.27	Identificación de nucleótidos de adenina por HPLC.....	42
8.28	Determinación de la actividad enzimática de citrato sintasa y malato sintasa	42
8.29	Microscopia electrónica de transmisión	43
8.30	Medición de longitud y área de nematodos.....	43
8.31	Análisis estadísticos	43

8.31.1	Estadística descriptiva	43
8.31.2	Comparación de múltiples grupos y análisis a posteriori	43
8.31.3	Representación gráfica de datos	44
8.31.4	Análisis de longevidad/supervivencia	44
9	RESULTADOS	45
9.1	Cambios morfológicos y fisiológicos en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa	45
9.1.1	Los gusanos alimentados con glucosa, muestran alteraciones en la captación y asimilación de glucosa y en los niveles de triglicéridos.	45
9.1.2	Las dietas altas en glucosa alteran la morfología de <i>C. elegans</i>	46
9.1.3	La glucosa modifica el potencial reproductivo de <i>C. elegans</i>	47
9.2	Las dietas altas en glucosa incrementan la actividad de enzimas transaminasas, asociadas al envejecimiento en <i>C. elegans</i>	47
9.3	Inducción de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa.....	48
9.4	Evaluación de genotoxicidad inducida por dietas altas en glucosa en <i>C. elegans</i>	51
9.5	Los gusanos alimentados con glucosa presentan alteraciones estructurales a nivel celular	52
9.6	Alteraciones en la fisiología mitocondrial producidas por altas concentraciones de glucosa.....	55
9.6.1	Evaluación de la actividad de enzimas del ciclo de Krebs	55
9.6.2	Las dietas altas en glucosa alteran la función de la cadena de transporte de electrones	56
9.6.3	Cuantificación de nucleótidos de adenina en gusanos alimentados con glucosa	58
9.7	Las dietas altas en glucosa regulan la expresión de factores de transcripción claves en las respuestas a estrés en <i>C. elegans</i>	58
9.8	Dietas altas en glucosa regulan la esperanza de vida de <i>C. elegans</i> a través de una red de factores de transcripción de respuesta a estrés	60
10	DISCUSIÓN.....	63
10.1	Establecimiento de un modelo de glucotoxicidad en <i>C. elegans</i>	63
10.2	Alteraciones en la talla y fertilidad de gusanos alimentados con glucosa	64
10.3	Los gusanos alimentados con glucosa reducen su esperanza de vida	65
10.4	Los gusanos alimentados con glucosa experimentan estrés oxidante	66
10.5	Las dietas ricas en glucosa modulan la fisiología mitocondrial.....	67

10.6	<i>C. elegans</i> responde a las dietas altas en glucosa a través de una red de factores de transcripción de respuesta a estrés.....	68
10.6.1	SBP-1/SREBP protege a los gusanos de la glucotoxicidad.....	68
10.6.2	CRH-1/CREB reduce la esperanza de vida de gusanos alimentados con glucosa	69
10.6.3	Participación de hif-1/HIF-1 α en la glucotoxicidad de <i>C. elegans</i>	70
10.6.4	CEP-1/p53 podría ser perjudicial en gusanos alimentados con glucosa	71
10.6.5	DAF-16/FOXO regula positivamente la esperanza de vida	72
10.6.6	SKN-1/Nrf protege a los gusanos de la glucotoxicidad.....	72
10.7	Las dietas altas en glucosa regulan la actividad de AMPK.....	73
10.8	Modelo teórico de las respuestas celulares a la glucotoxicidad en <i>C. elegans</i>	74
10.9	Resumen de los principales hallazgos de este trabajo.....	76
11	LIMITANTES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS	76
12	CONCLUSIÓN	77
13	INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA	78
13.1	Métodos complementarios:	87
13.1.1	Extracción de proteínas totales de <i>C. elegans</i>	87
13.1.2	Protocolo para el aislamiento de mitocondrias y fracción nuclear de <i>C. elegans</i>	88
13.1.3	Ensayo colorimétrico de captación de glucosa con el análogo 2-Desoxiglucosa	90
13.1.4	Ensayo colorimétrico para la determinación de glutatión oxidado y reducido en <i>C. elegans</i>	92
13.1.5	Determinación de peroxidación lipídica en <i>C. elegans</i>	96
13.1.6	Actividad enzimática de complejos de la cadena respiratoria	98
14	REFERENCIAS	100

LISTADO DE FIGURAS

Fig. 1 Generación de especies reactivas de oxígeno a nivel celular	14
Fig. 2 Morfología de <i>Caenorhabditis elegans</i>	15
Fig. 3 Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> a 22 °C	17
Fig. 4 Principales rutas metabólicas conservadas en <i>C. elegans</i>	18
Fig. 5 Esquema de la vía de la insulina en <i>C. elegans</i>	20
Fig. 6 Mecanismos de regulación de la actividad de DAF-16	24
Fig. 7 Respuestas celulares que regulan la actividad de SKN-1	26
Fig. 8 Respuestas celulares que regulan la actividad de CEP-1	27
Fig. 9 Respuestas celulares que regulan la actividad de HIF-1 en <i>C. elegans</i>	30
Fig. 10 Respuestas celulares que regulan la actividad de SBP-1	31
Fig. 11 Respuestas celulares que regulan la actividad de CRH-1	33
Fig. 12 Contenido de glucosa, triglicéridos y consumo de glucosa en gusanos alimentados con glucosa	46
Fig. 13 Longitud y área de gusanos alimentados con glucosa	46
Fig. 14 Evaluación de la fertilidad y frecuencia de defectos en la puesta de huevecillos (bagging) en gusanos alimentados con glucosa	47
Fig. 15 Actividad de enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FAL) en gusanos alimentados con glucosa	48
Fig. 16 Inducción de enzimas del sistema antioxidante en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa	49
Fig. 17 La expresión del transgénico Psod-3::GFP después del choque térmico es mayor cuando los gusanos fueron alimentados con dietas altas en glucosa	50
Fig. 18 Daño al DNA nuclear y mitocondrial en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa	52
Fig. 19 Micrografías de células germinales de <i>Caenorhabditis elegans</i> alimentados con distintas concentraciones de glucosa	53
Fig. 20 Micrografías de células musculares de <i>Caenorhabditis elegans</i> alimentados con distintas concentraciones de glucosa	54
Fig. 21 Diámetro mitocondrial e integridad mitocondrial en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa	55
Fig. 22 Actividad de citrato sintasa y malato sintasa en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa	56
Fig. 23 Actividad de la cadena de transporte de electrones en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa	57
Fig. 24 Cuantificación de nucleótidos de adenina en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa	58
Fig. 25 Abundancia de mRNAs de factores de transcripción de respuesta al estrés en gusanos alimentados con distintas concentraciones de glucosa	59
Fig. 26 Curvas de Kaplan-Meier de longevidad de gusanos WT, mutantes y RNAi de factores de transcripción de respuesta a estrés alimentados con dietas altas en glucosa	62
Fig. 27 Ilustración donde se esquematizan los principales eventos celulares promovidos por la glucotoxicidad en <i>C. elegans</i> (<i>Elaboración propia</i>).	75

LISTADO DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Fig. S1 Efecto de diferentes dosis de Paraquat en los niveles de peroxidación lipídica de <i>C. elegans</i>	78
Fig. S2 Análisis de expresión relativa (fluorescencia) de la proteína reportera GFP en gusanos transgénicos psod-3::GFP alimentados con dietas altas en glucosa.....	78

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 Vías metabólicas deducidas del genoma de <i>C. elegans</i>	19
Tabla 2 Cuantificación de glutatión en gusanos alimentados con glucosa.....	51

LISTADO DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1 Lista de oligonucleótidos (primers) empleados en este trabajo	79
Tabla S2 Análisis estadístico de la longevidad de distintas cepas de <i>C. elegans</i> alimentadas con dietas altas en glucosa	80
Tabla S3 Resumen de estudios previos sobre los efectos de la glucosa en <i>C. elegans</i>	83
Tabla S4 Resumen de las condiciones de reacción para evaluar la actividad de la cadena de transporte de electrones	99

1 RESUMEN

En este estudio se analizaron los principales efectos fisiológicos, bioquímicos y genéticos que el consumo de altas cantidades de glucosa ejerce sobre el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*. Lo anterior se realizó a través de la suplementación de glucosa en concentraciones crecientes (0, 20, 40, 80 y 100 mM) al medio de crecimiento de nematodos (NGM) el cual se emplea de forma rutinaria para el mantenimiento de *C. elegans*. Esta suplementación se realizó en larvas sincronizadas a partir del estadio L1 al L4.

Se observó que la suplementación de glucosa en la alimentación incrementó el tamaño de los gusanos (longitud y talla), y redujo drásticamente su esperanza de vida, con una relación concentración-dependiente. Por otra parte, las altas concentraciones de glucosa afectaron la puesta de huevecillos en *C. elegans*, no obstante la fertilidad de los parentales (P0) no se vió afectada; sin embargo los descendientes (F1 y F2) sometidos a las mismas condiciones que sus progenitores, mostraron una reducción en su progenie.

Por otra parte, la suplementación de glucosa promovió incrementos significativos en el contenido de glucosa endógena y triglicéridos. Así mismo se observó un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno e inducción de sistemas antioxidantes enzimáticos (catalasa y superóxido dismutasa) y no enzimáticos (glutación). Al analizar la función mitocondrial de los gusanos alimentados con glucosa, se observaron alteraciones en la actividad de la cadena de transporte de electrones y una drástica reducción en el consumo de oxígeno, lo cual supondría una reducción en la síntesis de adenosín trifosfato (ATP).

Para corroborar lo anterior, se midió el contenido de nucleótidos de adenina (AMP, ADP y ATP) en gusanos alimentados con glucosa, sin embargo no se observaron cambios significativos en su contenido, por lo que es posible que algún mecanismo compensatorio mantenga el estado energético a nivel celular en *C. elegans*. Por otra parte, se inspeccionó por medio de microscopia electrónica de barrido la ultra-estructura en células musculares y germinales de gusanos alimentados con glucosa con el propósito de evaluar la presencia de alteraciones a nivel celular y estructural en estos gusanos. Se encontraron alteraciones en el tamaño y forma del retículo endoplásmico y de las mitocondrias, en las cuales se observaron rupturas en sus membranas y crestas, lo cual podría estar relacionado con las alteraciones observadas en la actividad de la cadena de transporte de electrones.

Finalmente se analizó la expresión de factores de transcripción relacionados con las respuestas a estrés en *C. elegans*. Se observó la sobreexpresión de *cep-1/p53*, *sbp-1/SREBP* y *crh-1/CREB*, y la represión de *skn-1/Nrf-2* y *daf-16/FOXO*. Además, también se midió la abundancia del mRNA de *hif-1/HIF-1*, sin embargo éste no se vio afectado por las condiciones probadas en este estudio. Cabe mencionar que estos factores de transcripción regulan la esperanza de vida en los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa.

Se observó que CRH-1 y HIF-1 tienen un efecto negativo sobre la esperanza de vida en *C. elegans*, por su parte SBP-1 y DAF-16 ejercen una acción positiva en la longevidad, por lo que su expresión confiere resistencia al estrés producido por la glucosa. Finalmente, CEP-1 y SKN-1 regulan de manera negativa y positiva, respectivamente, la esperanza de vida.

En conjunto los hallazgos de este trabajo permiten evidenciar algunos de los principales mecanismos patogénicos de las dietas altas en glucosa, empleando como modelo al gusano *C. elegans*. La identificación de factores de transcripción y su participación en la regulación de la esperanza de vida abre la posibilidad de evaluar su participación en otros eventos patogénicos promovidos por la glucosa, así como identificar nuevos blancos terapéuticos contra la diabetes.

2 ABSTRACT

In this work, we show the main physiological, biochemical and genetic effects that the consumption of high amounts of glucose exerts on the nematode worm *C. elegans*. The above through glucose supplementation in increasing concentrations (0, 20, 40, 80 and 100 mM) to the nematode growth medium (NGM) which is routinely used for the maintenance and propagation of *C. elegans*. This supplementation was performed on synchronized larvae from stage L1 to L4.

We found that the supplementation of glucose through feeding increased the size of the worms (length and size), and drastically reduced their life expectancy in a concentration-dependent relationship. On the other hand, high glucose amounts affected egg laying in *C. elegans*, although the fertility of the parental (*P0*) was not affected; however, *F1* and *F2* worms subjected to the same regimes as their parents, showed a reduction in their progeny. Moreover, glucose-fed worms increase endogenous glucose content and triglycerides. Likewise, there was an increase in the reactive oxygen species (ROS) that was evident by the induction of enzymatic antioxidant system (catalase and superoxide dismutase) and non-enzymatic antioxidant system (glutathione).

Mitochondrial function analysis of the glucose-fed worms shows impairment in the activity of the electron transport chain and a drastic reduction in oxygen consumption, which would suppose a reduction in the synthesis of adenosine triphosphate (ATP). Indeed, the AMP, ADP, and ATP content in glucose-fed worms was measured; however, we did not find significant changes, so it is possible that some compensatory mechanism is present to maintain the energy status at the cellular level in *C. elegans*. Moreover, the electron microscopy over muscle and germ cells of glucose-fed worms showed changes in the size and shape of the endoplasmic reticulum and mitochondria. The mitochondria showed breaks in their membranes and ridges, which could be related to the impairment in the activity of the electron transport chain.

Finally, the expression of stress-responsive transcription factors was analyzed. We found overexpression of *cep-1/p53*, *sbp-1/SREBP*, and *crh-1/CREB*, and repression of *skn-1/Nrf-2* and *daf-16/FOXO*. Also, we measured the abundance of *hif-1/HIF-1* mRNA; however, this was not affected by the conditions tested in this study. Moreover, these transcription factors regulate the lifespan of glucose-fed worms. We observed that CRH-1 and HIF-1 negatively regulate life expectancy in *C. elegans*, while SBP-1 and DAF-16 have a positive effect on longevity. Therefore, their expression confers resistance to stress produced by glucose. Finally, CEP-1 and SKN-1 regulate life expectancy negatively and positively respectively.

Overall, the findings of this work allow us to highlight some of the primary pathogenic mechanisms of high glucose diets, using the *C. elegans* worm as a model organism. The identification of transcription factors and their participation in the regulation of the life expectancy opens the possibility of evaluating their role in other pathogenic events promoted by glucose, as well as identifying new therapeutic targets against diabetes.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 La pandemia de la diabetes

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), “La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre)” (1). La diabetes está estrechamente relacionada con otras patologías tales como son: la insuficiencia renal, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas, ceguera, entre otras, lo cual conlleva a un incremento en la morbilidad y en muchos casos, a la muerte prematura de las personas que la padecen.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de su *Primer Informe Mundial sobre la Diabetes (2016)*, alerta sobre la crisis mundial de diabetes en el mundo. De acuerdo a éste informe, “1 de cada 12 personas vive con diabetes (62 millones) en el continente Americano”, la diabetes es la cuarta causa de mortalidad a nivel mundial. Las estimaciones de este organismo para el año 2040 son de 110 millones de personas con diabetes en todo el mundo (2). Uno de los principales factores asociados con la diabetes es la obesidad; la OMS reporta que en 2014; 33% de los niños y aproximadamente 70% de los adultos sufría de obesidad y sobrepeso; para el mismo año 14% de la población adulta tenía diabetes (2).

3.2 Epidemiología de la diabetes en México

En el caso particular de México, este se sitúa entre las 10 naciones con mayor número de personas que viven con esta enfermedad. Los datos de la Encuesta Nacional de Salud (Ensa, 2000), así como las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición (Ensanut, 2006 y 2012) evidenciaron un incremento en la prevalencia de diabetes diagnosticada clínicamente por un médico (excluyendo los casos donde las personas desconocían su condición) de 5.8% en el año 2000 a 7.0% en 2006 y 9.2% en 2012 (3).

De acuerdo con el informe del año 2017 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) “México tienen la segunda prevalencia más alta de obesidad en la OCDE (33% de los adultos), y la más alta proporción general de población con sobrepeso u obesidad (73%)”, las cuales están relacionadas con el desarrollo de la diabetes. En el caso de la diabetes, esta organización reporta una prevalencia de diabetes de 15.8% en adultos, la cual es el doble de la prevalencia promedio de los países que conforman la OCDE (4).

3.3 La diabetes y la glucotoxicidad

La diabetes y sus complicaciones son originadas por un metabolismo deficiente de la glucosa, lo cual implica el desarrollo de hiperglucemia persistente que da origen a la glucotoxicidad crónica (5). Dado que el metabolismo de la glucosa está estrechamente regulado por la insulina, el metabolismo aberrante de la glucosa también puede considerarse como un problema de resistencia a la insulina o deficiencia de insulina.

En la diabetes tipo 1, existe una deficiencia absoluta de insulina debido a la destrucción de las células β del páncreas, pero en la diabetes tipo 2, en las etapas tempranas de la misma se observa una resistencia a la insulina (6). La persistencia de la hiperglicemia induce una mayor secreción de insulina por parte de las células β para reducir los niveles de glucosa en la sangre (7). Este mecanismo compensatorio promueve un *agotamiento* de estas células debido a la demanda impuesta por la hiperglucemia crónica lo cual se traduce en una deficiencia de la insulina (ya que se compromete la función de las células β) y el establecimiento de la diabetes tipo II (8). Estas condiciones promueven el deterioro de la función celular y orgánica de distintos tejidos causado por la toxicidad de la hiperglucemia persistente (7, 9, 10). En general, la diabetes es un estado de estrés dentro de los que se encuentran el estrés oxidante y reductor (5). Este trabajo se centra principalmente en el estudio del estrés oxidante y las alteraciones asociadas al mismo en un modelo *in vivo*.

3.4 Glucotoxicidad, especies reactivas de oxígeno y disfunción mitocondrial

Las células poseen un sistema antioxidante para combatir la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Este sistema está compuesto por moléculas no enzimáticas (compuestos tiolados de bajo peso molecular como glutatión o vitaminas antioxidantes) y sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), entre otros). Algunas de las alteraciones celulares que se han observado en la glucotoxicidad incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno, que conllevan a estrés oxidante (11) y disfunción mitocondrial. Las ERO son un grupo de radicales libres y moléculas derivadas del oxígeno molecular que desempeñan un papel importante a nivel fisiológico y patológico. Bajo condiciones fisiológicas, son generadas continuamente por las mitocondrias como un producto de la fosforilación oxidativa (12), sin embargo las células activan varios sistemas antioxidantes para neutralizar rápidamente las ERO y mantener un entorno redox óptimo para la función biológica adecuada.

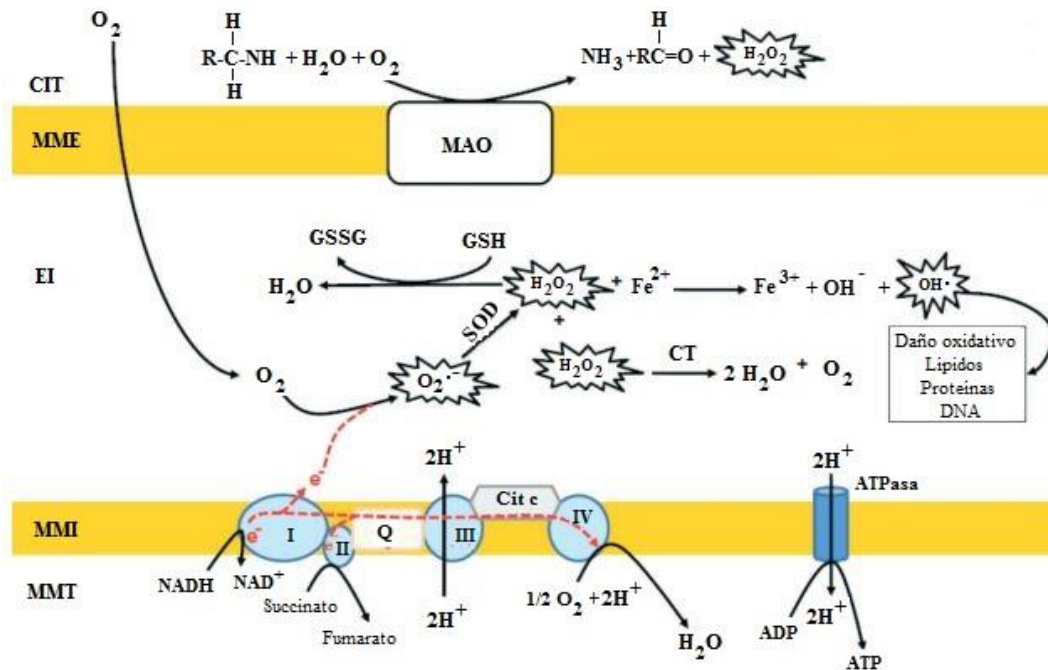


Fig. 1 Generación de especies reactivas de oxígeno a nivel celular

La mitocondria es el principal sitio de formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Durante la fosforilación oxidativa, los intermediarios donadores de electrones NADH y $FADH_2$ transfieren electrones a través de los complejos I y II de la cadena respiratoria en la membrana mitocondrial interna (MMI); estos electrones fluyen a través de los 4 complejos mitocondriales produciendo un gradiente de protones en el espacio intermembranal (EI) de la mitocondria, donde el oxígeno molecular es el último aceptor de electrones, dando como resultado la producción de agua y la obtención de energía en forma de ATP en la ATPasa. Durante este proceso, algunos electrones pueden escapar de los complejos de la cadena de transporte de electrones y reducir al oxígeno molecular, lo que da paso a la formación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); este es sustrato de la enzima superóxido dismutasa (SOD) la cual produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que también puede ser formado mediante la acción de la monoamina oxidasa (MAO), enzima que se encuentra en la membrana mitocondrial externa (MME). El H_2O_2 puede ser inactivado mediante la acción de la enzima catalasa (CT) o a través de la glutatión peroxidasa, o bien al encontrarse en presencia de metales de transición como el hierro, se genera el radical oxidrilo (OH^{\cdot}) como producto de la reacción de Fenton. Este radical es responsable de la mayoría de los daños celulares causados por las ERO, cuando éstos logran escapar del espacio intermembranal (EI) de la mitocondria al citosol (CIT) o a la matriz mitocondrial (MMT), reproducido de (13).

Sin embargo, este equilibrio se pierde en individuos diabéticos en los que aumenta la formación de ERO y/o disminuye la capacidad del sistema antioxidante generándose así estrés oxidante que conduce al daño celular. Lo anterior es crucial en el desarrollo de complicaciones relacionadas con la diabetes tales como: la resistencia a la insulina, la disfunción de las células β y los adipocitos y la apoptosis. Algunos estudios sugieren que la generación de ERO inducidas por la hiperglucemia dentro de las mitocondrias contribuye al desarrollo de complicaciones diabéticas, como la nefropatía diabética, por citar un ejemplo (14, 15). Además se ha observado un declive en la función mitocondrial así como en el contenido de este organelo en individuos obesos (16, 17)

Modelos animales (18-20), así como diversos ensayos *in vitro* han mostrado la producción de ERO y disfunción mitocondrial inducida por altos niveles de glucosa en adipocitos (21, 22), células β (23), neuronas (24), células retinianas (25, 26), células

endoteliales (27, 28) así como células renales (29). El efecto pleiotrópico de la glucosa en la fisiología mitocondrial comprende daño en el ADN (25, 26), cambio en la morfología (24, 26), potencial de membrana alterado (24, 26), particularmente promueve cambios metabólicos debido a una disminución en la síntesis de ATP y la respiración celular (24, 26, 29) y apoptosis (23, 24, 28).

3.5 Organismos modelo para el estudio de la glucotoxicidad

Distintos modelos animales se han desarrollado para el estudio del metabolismo y recientemente para el estudio de las bases fisiopatológicas de la diabetes, dentro de los que destacan los modelos en roedores (ratones, ratas y cobayos), e invertebrados como la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans* el cual presenta diversas ventajas respecto a otros organismos, las cuales se detallan a continuación.

3.5.1 *Caenorhabditis elegans*

Es un organismo eucarionte pluricelular del filo nematoda de la familia Rhabditidae, perteneciente al género *Caenorhabditis* (30). Este gusano posee estructuras orgánicas muy bien definidas tales como boca, faringe e intestino. Los primeros dos participan en el proceso de alimentación y el tercero es responsable tanto de la degradación, asimilación de nutrientes y el almacenamiento de energía en forma de lípidos; dichas funciones son similares al intestino e hígado de los mamíferos por lo que puede ser un buen modelo para estudiar aspectos relacionados con la lipogénesis hepática y del tejido adiposo (31).

Por otra parte *C. elegans* posee un sistema nervioso compuesto de 302 neuronas, las cuales forman aproximadamente 7,000 sinapsis químicas (32), además los adultos poseen un número constante de células (959 células). Por otro lado, esta especie presenta dos fenotipos sexuales: hermafroditas y machos, estos últimos los menos frecuentes en sus poblaciones (<0.2%) (30). Los hermafroditas producen ambos gametos, lo cual les permite auto fertilizarse y tener progenie en ausencia de un macho; no obstante, al fertilizarse con el esperma de un macho, se incrementa el número de embriones significativamente, comparado con la autofertilización del hermafrodita (30).

Además, *C. elegans* posee rutas metabólicas (glucólisis, α -reducción, β -oxidación, fosforilación oxidativa, etc.) y vías de señalización celular conservadas evolutivamente con otros organismos, entre estas destacan: la vía de señalización de la insulina y la vía de señalización del factor de crecimiento transformante (TGF- β), por lo cual es un modelo interesante para el estudio de la señalización celular y biología del desarrollo.

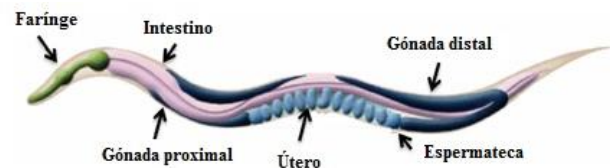


Fig. 2 Morfología de *Caenorhabditis elegans*

Ilustración de las principales estructuras anatómicas de un espécimen hermafrodita de *Caenorhabditis elegans* en su etapa adulta. Se muestra en la cabeza (en color verde) la faringe, a lo ancho en la parte superior se muestra el intestino y la región de la gónada distal. En la parte inferior se muestran la gónada proximal, la espermateca y el útero; junto a este último se ilustran los embriones en su etapa *in útero*. Figura modificada de WORMATLAS.

3.5.2 *Ciclo de vida de C. elegans*

El ciclo de vida de *C. elegans* comprende el estadio embrionario *ex útero*, cuatro estadios larvarios (L1-L4) y la etapa adulta. Además, bajo condiciones específicas de estrés (privación de alimento, choque térmico, hipoxia, hacinamiento, entre otros) que se presenten durante la etapa L1, inducen que el nematodo arreste su ciclo de vida mediante etapas alternativas (diapausa L1 y la fase Dauer), lo anterior se ilustra en la Figura 3.

Durante las etapas L2 y L3 el nematodo continúa su crecimiento, en la primera se observan pocas divisiones celulares, además ocurre una separación de células germinales en dos poblaciones, anterior y posterior, mientras que en L3 se establece el destino de las células que formarán parte de la vulva, espermateca y gónadas (33, 34). Finalmente, durante las etapas L3 y L4 se desarrolla la espermateca y el útero, guiados por las células de la punta distal, cada brazo gonadal crece y se alarga para formar una estructura en U (Fig. 2).

En la etapa L4 se completa el proceso de gonadogénesis, los brazos distales de la gónada continúan su migración a través de los músculos dorsales y completan su trayectoria cuando el gusano L4 cambia su cutícula y pasa a la etapa adulta. En esta etapa comienza la meiosis de la línea germinal en los brazos proximales de la gónada. También se concluye la morfogénesis de la vulva y útero para dar paso a la etapa adulta y de madurez sexual (Fig. 3).

3.5.3 *Etapas alternativas del desarrollo de C. elegans*

Diapausa L1

Cuando las larvas eclosionan en ausencia de alimento, ellas entran en la diapausa L1, (en esta etapa arrestan su desarrollo hasta que las condiciones alimenticias sean mejores) en la cual pueden sobrevivir por algunas semanas sin cambios morfológicos significativos (incremento de talla). Una vez que hay alimento disponible, las larvas L1 pueden continuar su desarrollo normalmente sin comprometer de alguna forma su capacidad reproductiva o su esperanza de vida (35).

Fase Dauer

Esta etapa se presenta durante el tránsito del estadio larvario L1 a L2. En esta etapa el gusano desarrolla una mayor resistencia a distintos agentes ambientales, e incrementa su esperanza de vida. El gusano se observa más delgado que una larva L3, manteniéndose inmóvil la mayor parte del tiempo, presentan una cutícula más gruesa, su cavidad bucal y anal se encuentran selladas por un bloque de cutícula y sus células intestinales son más oscuras que las de los animales normales, además el desarrollo de la gónada se suspende. En esta etapa alternativa el nematodo puede mantenerse viable por varios meses y cuando las condiciones son adecuadas, continua su ciclo y se incorpora al estadio L4 (sin pasar por L3) de forma normal sin comprometer su capacidad reproductiva y su longevidad (35, 36).

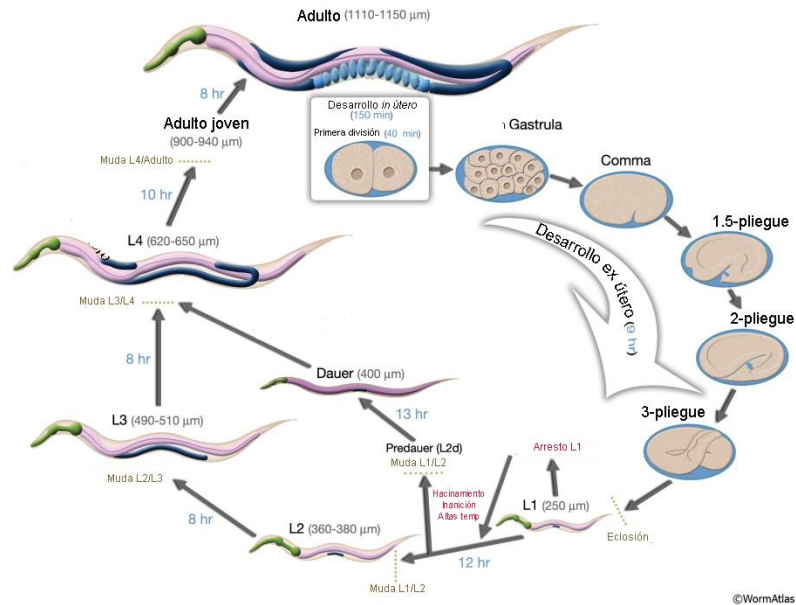


Fig. 3 Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans* a 22 °C

De lado derecho se ejemplifica las fases del desarrollo embrionario *ex útero*, así como la duración de esta etapa. En la parte inferior y del lado izquierdo se ejemplifican las fases larvianas, incluyendo las etapas alternativas a ciclo larvario. Se observa en color azul sobre cada flecha de flujo, el tiempo que transcurre en cada etapa y en color gris el tamaño del nematodo en cada uno de los estadios. Figura modificada de WormAtlas.

3.5.4 *Caenorhabditis elegans*, un organismo modelo de estudio en biomedicina

En 1965, el Dr. Sidney Brenner, propuso a *C. elegans* como un nuevo organismo modelo de investigación biológica, haciendo énfasis en su importancia para estudiar el sistema nervioso, y los mecanismos básicos de la genética en organismos pluricelulares (37). Cabe destacar que *C. elegans* fue el primer organismos pluricelular del cual se obtuvo la secuencia completa de su genoma (38). Algunas de las principales características por las cuales este nematodo es un organismo modelo adecuado para la investigación en biomedicina, se enuncian a continuación:

1. Es un organismo de vida libre no parásito, lo cual lo hace seguro para su manipulación en el laboratorio.
2. En laboratorio puede alimentarse con bacterias *E. coli* OP50 (cepa de crecimiento lento).
3. Su propagación y mantenimiento en laboratorio es simple y no requiere de instalaciones especiales tales como un bioterio.
4. Los adultos miden en promedio 1mm de longitud.
5. Son transparentes durante todo su ciclo de vida, lo que facilita su observación en el microscopio.
6. Alta tasa de descendencia (entre 250 a 300 huevecillos por gusano fecundado).
7. Posee un ciclo de vida corto (en 48 horas aproximadamente llega a la adultez).
8. Esperanza de vida promedio de 25 días (en condiciones estándar de laboratorio, 20 °C, alimentación *ad libitum*, etc.).
9. En esta especie se observan dos fenotipos sexuales, macho y hermafrodita, siendo este último idóneo para estudios genéticos.

10. Tiene aprox. 19,000 genes que codifican para proteínas, de los cuales el 60% de éstos tienen homólogos en humanos.
11. La inducción de mutaciones es relativamente sencilla de efectuar.
12. Existe una gran colección de cepas y mutantes las cuales son depositadas en el *Caenorhabditis Genetics Center*.
13. El silenciamiento génico por RNA de interferencia (RNAi) es sencillo y estable por 3 generaciones aproximadamente (39).

Actualmente se han adaptado las plataformas ómicas (transcriptómica, proteómica, genómica, análisis de interactoma, etc.) así como una amplia gama de herramientas moleculares, bioquímicas y celulares que se han generado para *C. elegans* dada la necesidad de comprender los mecanismos moleculares subyacentes a la diabetes, se requiere el desarrollo de nuevos modelos de investigación, para lo cual *Caenorhabditis elegans* es una opción adecuada para el estudio del metabolismo y en específico en este trabajo, para el estudio de las bases moleculares de la glucotoxicidad.

3.5.5 Un vistazo al metabolismo de *C. elegans*

En *C. elegans* se encuentran conservadas las principales vías metabólicas y de asimilación de carbohidratos y lípidos, entre las que se incluyen la glucólisis, α -reducción, β -oxidación mitocondrial y peroxisomal, gluconeogénesis, metabolismo de aminoácidos, entre otros (Fig. 4).

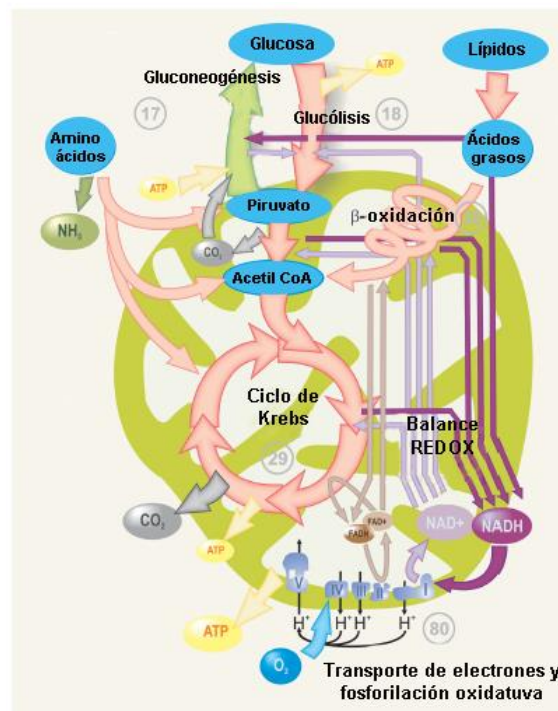


Fig. 4 Principales rutas metabólicas conservadas en *C. elegans*

En la figura se ilustran las principales rutas metabólicas (glucólisis, gluconeogénesis, β -oxidación, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa) presentes en células animales, las cuales se encuentran conservadas con *C. elegans*. Los números circunscritos en los círculos de color gris denotan el número de genes ortólogos que se han identificado en el genoma del nematodo: 18 en glucólisis, 17 en gluconeogénesis, 38 en β -oxidación, 29 en ciclo de Krebs y 80 en fosforilación oxidativa (41). Figura adaptada de (40)

Lo anterior se ha deducido a partir de las anotaciones de su genoma y por medio de análisis bioinformáticos (Tabla 1), no obstante también existe información bioquímica y genética sobre los componentes del metabolismo intermedio de *C.elegans* (42).

Tabla 1 Vías metabólicas deducidas del genoma de *C. elegans*

Metabolismo de carbohidratos	Metabolismo de lípidos
Glucólisis/Gluconeogénesis	Lipólisis
Síntesis y asimilación de glucógeno	Lanzadera de carnitina (transporte de lípidos a la mitocondria)
Síntesis y asimilación de Trehalosa	β -oxidación mitocondrial y peroxisomal
Metabolismo de galactosa	Catabolismo de glicerol
Metabolismo de Fructosa y manosa	Síntesis de ácidos grasos
Vía del glioxilato	Síntesis de triglicéridos
Ciclo de los ácidos tricarbóxicos	Elongación y desaturación de ácidos grasos
Metabolismo energético	Biosíntesis de fosfolípidos
Fosforilación oxidativa	Síntesis de ceramidas y esfingolípidos
Síntesis de ATP	Síntesis y utilización de cuerpos cetónicos

Tabla modificada de (42)

Cabe mencionar que *C. elegans* puede utilizar vías anapleróticas que no se encuentran conservadas con mamíferos, tal es el caso del ciclo de glioxilato, la cual es común en plantas (43).

3.6 Principales vías de señalización conservadas en *C. elegans*

3.6.1 Vía de señalización de la insulina

Está ampliamente documentada la participación de la vía de señalización de la insulina/IGF-1 (IIS) en distintos procesos fisiológicos tales como el metabolismo, el crecimiento celular, el desarrollo larvario, así como la regulación de la esperanza de vida de *C. elegans* (44-46). La caracterización de diversas mutantes y su impacto en la esperanza de vida del nematodo dio paso a la identificación de los ortólogos de esta vía en mamíferos (45, 47).

En *C. elegans*, al igual que en mamíferos, se encuentra presente un receptor con actividad de tirosina cinasa DAF-2/IGFR, el cual posee una identidad a nivel de residuos de aminoácidos de aproximadamente el 30% con el receptor de insulina humana (45), además el nematodo codifica en su genoma aproximadamente 40 péptidos similares a la insulina (ILPs) (48). Aunque la mayoría de los ILPs divergen en secuencia en varias regiones características de la insulina humana (49), conservan la funcionalidad de ligandos de receptores. Por ejemplo, el ILP INS-6 del que se predice que carece del péptido C, puede unirse y activar el receptor de insulina humana (50).

Otra característica que destaca de estos péptidos es la de actuar como antagonistas (INS-1, INS-18, INS-7) o agonistas (INS-7) del receptor de insulina DAF-2/ IGFR (49, 51).

Particularmente se ha observado que la sobreexpresión de INS-7 en el intestino reduce la esperanza de vida de *C. elegans*, así mismo suprime la expresión del reportero *psod-3::GFP* (fusión de la región promotora del gen *sod-3* y la proteína verde fluorescente) el cual es blanco de regulación por parte de DAF-16/FOXO (51).

La vía de la insulina funciona de forma similar en *C. elegans* que en mamíferos. Los péptidos tipo insulina se unen al receptor transmembranal de insulina (DAF-2), quien por medio de fosforilaciones controla la actividad de la cinasa fosfoinositol-3-cinasa AGE-1/PI3K, la cual permite la activación de la cinasa dependiente de fosfatidil inositol-3 fosfato PDK-1. Esta cinasa promueve la activación de las serina-treonina cinasas AKT-1, AKT-2 y la glucógeno sintasa cinasa (SGK-1/GSK-3) Finalmente, la cinasa AKT-1 a través de fosforilación regula la interacción de DAF-16/FoxO con las proteínas 14-3-3 PAR-5 y FFT-2 las cuales controlan la localización subcelular de DAF-16. (46, 52, 53).

Otro factor transcripcional regulado por la vía de la insulina es el factor de transcripción de choque térmico (HSF-1) el cual regula la expresión de genes de respuesta estrés (54). Esta proteína es regula por la vía de la insulina, la cual promueve la formación del complejo HSF-1 con las proteínas DDL-1, DDL-2 y HSB-1, las cuales evitan la translocación de HSF-1 al núcleo (55). Finalmente, el factor de transcripción SKN-1/Nrf también es regulado por la vía de la insulina a través de fosforilaciones que evitan su translocación al núcleo, SKN-1 es blanco de la cinasa AKT-1. Dentro de los reguladores negativos de esta vía se encuentran la fosfatasa lipídica DAF-18/PTEN y la serina/treonina fosfatasa PPTR-1/ PP2A las cuales contrarrestan las señales AGE-1/PI3K y AKT-1, respectivamente (46) Fig. 5.

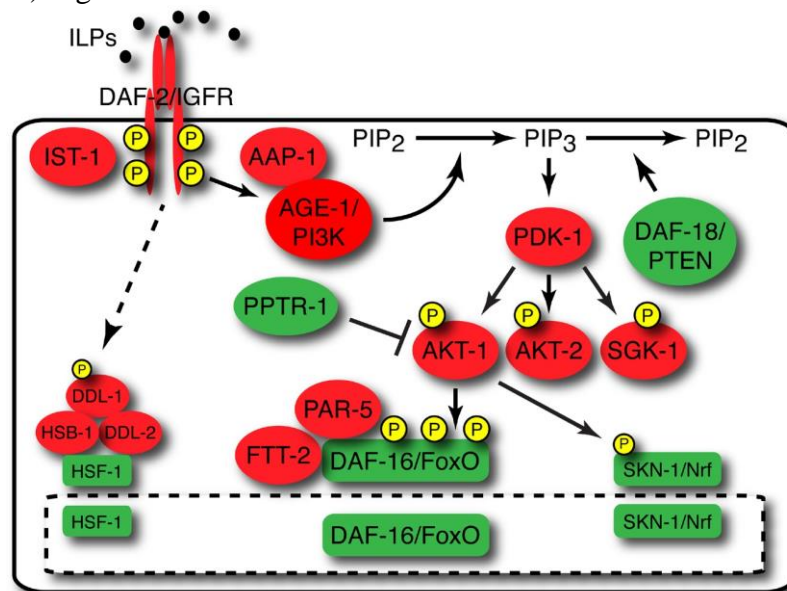


Fig. 5 Esquema de la vía de la insulina en *C. elegans*

Se muestra en color rojo los principales elementos que transducen la señal de la insulina, en color verde se indican aquellos componentes de la vía que antagonizan sus efectos. Ver el párrafo anterior para más detalles. Abreviaturas: ILPs, péptidos similares a la insulina; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinasa; PIP2, fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato; PIP3, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Figura tomada de (46).

3.6.2 *Vía de señalización de TOR*

Las cinasas TOR (Target Of Rapamycin, por sus siglas en inglés) forman parte de un complejo multiproteico el cual está altamente conservado entre organismos eucariontes y que participa en diversas respuestas celulares tales como la síntesis de proteínas, la regulación del ciclo celular, autofagia, entre otros, este complejo es sensible a estímulos asociados con la disponibilidad de nutrientes y el estado energético celular (56). En mamíferos mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) interactúa con la vía de la insulina a través de las cinasas PI3K y AKT, las cuales lo activan por medio de fosforilación (57).

En mamíferos existen dos complejos mTOR, ambos con funciones distintas. El complejo mTORC1 combina mTOR y la proteína reguladora asociada de mTOR (Raptor), mientras que en mTORC2, el complejo incorpora a una proteína insensible a la rapamicina (Rictor) (57). Dentro de las funciones principales de mTORC1 se encuentran la regulación de la traducción y síntesis de proteínas así como regulación del metabolismo celular a través de diversos blancos tales como la activación por fosforilación de la proteína cinasa p70-S6 (S6K) y la inhibición de la proteína de unión al factor de inicio de la traducción eIF-4E (4E-BP) promoviendo así la liberación del factor eIF4E lo cual facilita el inicio de la traducción de los mRNA y la síntesis de proteínas (57).

Mientras que mTORC2 regula el metabolismo de glucosa y la apoptosis a través de sus blancos SGK y AKT con la cual mantiene una regulación positiva por retroalimentación, ya que AKT a su vez activa a mTOR (57). Para mayor detalle sobre los mecanismos de regulación de esta vía, se recomienda la lectura de Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017) (58). En *C. elegans*, no es claro si ocurre y en qué forma interactúan la vía de la insulina y TOR. La familia TOR (ceTOR) se encuentra conservada así como algunos de sus blancos principales. La proteína LET-363 (TOR) forma parte de ambos complejos, mientras que el complejo TORC1 incluye a DAF-15 (Raptor), en TORC2 se encuentra RICT-1 (Rictor).

Esta cinasa al igual que en mamíferos responde a la disponibilidad de nutrientes y regula el desarrollo del nematodo. En presencia de nutrientes, LET-363 reprime a PHA-4/FoxA, promoviendo el ciclo de vida normal de *C. elegans* (59); sin embargo, la restricción dietética promueve un incremento de vida en *C. elegans* el cual es dependiente de PHA-4 y no de DAF-16 (60), mientras que los gusanos mutantes de *let-363* y *daf-15* arrestan su desarrollo en una etapa similar a dauer (61). Aunque no esté claro si TOR es regulado por la vía de la insulina en *C. elegans*, la expresión de *daf-15* es regulada por DAF-16 (61). Por su parte, TORC2 regula la acumulación de lípidos y la talla de *C. elegans* a través de SGK-1 (62); mientras que RICT-1/Rictor, no parece ser necesario para el desarrollo temprano del nematodo, tiene un papel en el desarrollo pre-dauer (62).

3.6.3 *El sensor energético AMPK*

La serina/treonina cinasa activada por AMP (AMPK) pertenece a una familia conservada de proteína cinasas que funcionan como sensores del estado energético de las células (63). Cuando los niveles de energía celular son bajos, AMPK se activa y regula diversos procesos fisiológicos que se traducen en un aumento en la producción de energía y una disminución coordinada en el uso de ATP. AMPK es un complejo heterotrimérico compuesto por una subunidad α catalítica con subunidades β y γ reguladoras (64). AMPK es activado por el AMP a través de un mecanismo alostérico (63), así mismo la fosforilación del residuo de treonina Thr172 de la subunidad α promueve su activación; este último residuo

puede ser fosforilado por las cinasas LKB1 y CaMKK β (65, 66). En *C. elegans* existe un homólogo de este complejo AAK-2/AMPK el cual también es activado vía fosforilación por PAR-4/LKB-1(67), además al igual que su homólogo AAK-2 es activado por concentraciones crecientes de AMP (68). Por lo que aquellas condiciones que incrementen el cociente AMP/ATP activan a AAK-2 tales como el ayuno (69-71) y estrés oxidante (67, 72, 73).

Por otra parte, AMPK está relacionado con efectos antienvjecimiento, por ejemplo, la activación de AAK-2 es suficiente para incrementar 13% la esperanza de vida de *C. elegans* (68), observaciones similares se obtuvieron en gusanos transgénicos que expresan una versión modificada de subunidad AMPK- γ (70) en la que el sitio de unión a AMP se mutó en residuos conservados análogos a las mutaciones que inducen la activación constitutiva de AMPK en mamíferos (74). Recientemente, se observó un aumento promedio del 38% en la esperanza de vida de *C. elegans* que expresaban una versión truncada de *aak-2* que contenía solo el dominio catalítico (71). El incremento en la longevidad mediada por AAK-2 requiere de la reducción de la actividad de la vía de la insulina y la translocación de DAF-16 al núcleo celular (70). Lo anterior apoya la idea de que AMPK no solo regula el estado energético celular, sino también la longevidad en *C. elegans*. En mamíferos, AMPK regula una amplia gama de respuestas celulares tales como la autofagia, el metabolismo de lípidos, la biogénesis mitocondrial, entre otros; una revisión más profunda de este tema puede consultarse en la publicación de Burkewitz et. al., 2014 (75)

3.7 Factores de transcripción de respuesta a estrés

3.7.1 Factor de transcripción DAF-16/FOXO

DAF-16 es un factor de transcripción que pertenece a la clase O de la familia de factores de transcripción “Forkhead”, los cuales se caracterizan por tener un dominio conservado de unión al DNA en el sitio o caja “Forkhead box” o FOX, del cual toman su nombre (52). Participa activamente en múltiples procesos celulares, dentro de los que destaca el metabolismo y la respuesta antioxidante. DAF-16 regula la expresión de una gran cantidad de genes dentro de los que destacan *sod-3* y *ctl-1*, que participan en la respuesta antioxidante, y *daf-15/raptor* y *rsk-1* que pertenecen a la vía de señalización de TOR (61).

3.7.1.1 La vía de la insulina y la vía TOR convergen en la regulación de la actividad de DAF-16

Uno de los principales blancos de la vía de la insulina es el factor de transcripción *daf-16*, el cual es fosforilado por AKT (76), esta señal promueve que las proteínas homólogas a 14-3-3 de mamíferos PAR-5 y FTT-2, se unan a DAF-16 evitando así su translocación al núcleo (53) y la activación de sus genes blanco entre los que se encuentran *skn-1* (77), *aak-2*, *aakb-1*, *aakg-4*, y *aakg-5* los cuales forman parte del complejo AAK-2/AMPK (70, 78); además también reprime a *daf-15/raptor* (61) que forma parte del complejo TORC1. Por otra parte, en mutantes de *daf-2*, se observa la translocación de DAF-16 al núcleo, promoviendo un incremento en la esperanza de vida junto con una mayor resistencia al estrés (79-81). En contraste, mutantes de *daf-16* reducen su esperanza de vida con respecto a la cepa silvestre y son sensibles a distintos tipos de estrés (79, 82).

Por su parte, TOR posee un papel dual en la regulación de la actividad de DAF-16. El complejo TORC1 regula negativamente a DAF-16 evitando su translocación al núcleo (83), sin embargo la inhibición de este complejo induce la transcripción de genes blanco de DAF-16, e inclusive la abundancia del mRNA de *daf-16* se incrementa, además se observa un incremento en la esperanza de vida producto de la translocación de DAF-16, en especial la isoforma (f) (83), la cual está ampliamente relacionada con la longevidad de *C. elegans* (84). Cabe destacar, que DAF-16 reprime la expresión de *daf-15/raptor* y *rsks-1* (61) por lo que la vía TOR y DAF-16 se regulan mutuamente.

Por otra parte, SGK-1, el principal efector de TORC2 (62), regula la esperanza de vida de *C. elegans* a través de DAF-16, esto de forma independiente a su localización subcelular (85). Sin embargo, el incremento de la esperanza de vida observado en el RNAi de *rict-1es* independiente de DAF-16 (83). Por otra parte la regulación de SGK-1 sobre DAF-16 antagoniza en algunos casos la represión mediada por AKT-1, ambas cinasas regulan diferencialmente la expresión de genes blanco incluidos *sod-3*, ya que AKT-1 inhibe su expresión, en tanto que SGK-1 la induce (85).

3.7.1.2 Regulación de la actividad de DAF-16 por AMPK

En condiciones de estrés energético tales como el ayuno, o incrementos en el cociente AMP/ATP, se promueve la activación del sensor energético AAK-2/AMPK, el cual activa a DAF-16 por medio de fosforilación en un residuo distinto al que emplea AKT, esto promueve la translocación de DAF-16 al núcleo (70). En condiciones de estrés oxidante AAK-2 confiere resistencia e incrementa la esperanza de vida de *C. elegans* a través de DAF-16 (70); por su parte este induce la transcripción de genes del complejo AAK, tales como *aak-2*, *aakb-1*, *aakg-4*, y *aakg-5* (70, 78).

Regulación de la actividad de DAF-16 por la vía de señalización JNK

La vía c-Jun N-terminal kinase (JNK) pertenece a la superfamilia de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MPAK) las cuales se activan ante distintas señales incluidas las radiaciones ionizantes, choque térmico y estrés oxidante. En *C. elegans*, JNK-1 regula la actividad de DAF-16 de forma paralela a la vía de la insulina a través de fosforilación, lo cual promueve la translocación de DAF-16 al núcleo e incrementa la resistencia al estrés y la esperanza de vida de *C. elegans* (86).

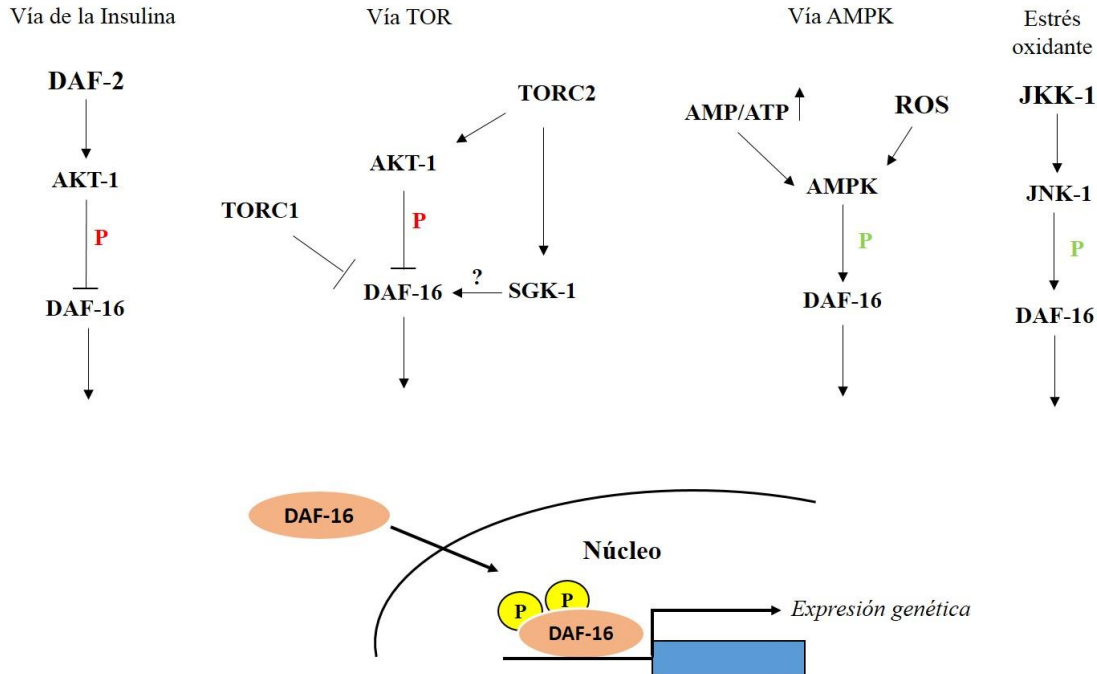


Fig. 6 Mecanismos de regulación de la actividad de DAF-16

DAF-16 es regulado vía fosforilación (P) por diversas cinasas de acuerdo con el contexto celular. En condiciones de disponibilidad de nutrientes, la vía de la insulina a través de AKT-1 fosforila a DAF-16 evitando su translocación al núcleo. Por su parte la vía TOR regula diferencialmente la actividad de DAF-16; por un lado el complejo TORC1 regula negativamente la actividad de DAF-16, en tanto TORC2 ejerce un efecto dual sobre la actividad de DAF-16, ya que lo inhibe través de AKT-1, mientras que lo activa por medio de SGK-1, presumiblemente por medio de fosforilación. En condiciones de ayuno, disminución del contenido de ATP o estrés oxidante, la cinasa AMPK promueve la translocación de DAF-16 vía fosforilación. Por otra parte, bajo condiciones de estrés oxidante, la vía de señalización de JNK, favorece la translocación de DAF-16 por medio de fosforilación dependientes de la cinasa JNK-1. Las letras en color rojo (P) representan la fosforilación que se traduce en represión de la actividad, en color verde se muestran aquellas que favorecen su actividad.

3.7.2 Factor de transcripción SKN-1/NRF-2

El factor de transcripción SKN-1 es necesario en las etapas tempranas de la embriogénesis, en especial para la especificación del blastómero, lo cual da lugar a los linajes mesendodérmicos en específico el desarrollo de la faringe y el intestino (87). Después de la etapa embrionaria, SKN-1 se expresa en distintos tejidos tales como el intestino en el cual controla la respuesta de fase II ante estrés oxidante y agentes xenobióticos (88). En condiciones de ayuno y privación de nutrientes, SKN-1 se transloca al núcleo en las neuronas ASI y regula la expresión de su genes blanco promoviendo tolerancia y resistencia al estrés que se traduce en un incremento en la longevidad de *C. elegans* (89). Por otra parte la abundancia de SKN-1, su actividad y translocación es regulado por medio de la proteína WDR-23, la cual interactúa con SKN-1 y la ubiquitin ligasa CUL-4 favoreciendo la degradación de SKN-1 vía proteosoma (90).

3.7.2.1 Regulación de la actividad de SKN-1

Este factor de transcripción responde a distintos estímulos celulares dentro de los cuales se encuentran el metabolismo de lípidos, crecimiento, síntesis de proteínas y respuesta antioxidante, entre otras; por lo anterior distintas vías de señalización regulan su actividad. A continuación se mostrarán de forma concisa aquellas que están relacionadas con este estudio.

3.7.2.2 Estrés oxidante y vía p38/MAPK

En condiciones normales, pocas proteínas de SKN-1 se encuentran presentes en el núcleo regulando la expresión de sus genes blanco, sin embargo la mayor parte de ellas permanecen en el citoplasma, esto debido a que la cinasa GSK-3 fosforila los residuos de serina Ser-393 y Ser-397 de SKN-1 evitando así su translocación al núcleo (91-93); sin embargo en condiciones de estrés oxidante, la vía de señalización de p38 MAPK a través de la cinasa PMK-1 promueve la translocación nuclear de SKN-1 al fosforilar los residuos de Serina Ser-74 y Ser-340 (93). Cabe mencionar que SKN-1 forma un complejo con MDT-15 (94) lo cual permite la activación transcripcional de genes de la fase II de desintoxicación tales como *gcs-1* (88, 93) y *gst-4* (90, 95).

3.7.2.3 Regulación de SKN-1 por las vías de señalización de la insulina y TOR

En condiciones de disponibilidad de nutrientes, la vía de la insulina regula la actividad de SKN-1 el cual es fosforilado por AKT y GSK-3, lo cual propicia su acumulación en el citoplasma (92). En condiciones de ayuno o restricción dietética, en las cuales DAF-2 está inactivo, SKN-1 se transloca al núcleo y activa sus genes blancos. Por otra parte, la vía TOR en específico el complejo TORC2 antagoniza los efectos de SKN-1 durante el desarrollo embrionario (96), así como en la regulación de la esperanza de vida (83), lo anterior a través de la cinasa SGK-1, la cual lo fosforila en residuos diferentes a los de AKT y GSK-3 (92, 97).

La inhibición de TORC1, induce la transcripción *skn-1*, además promueve su translocación al núcleo, lo cual permite la inducción de sus genes blanco e incrementa la esperanza de vida de *C. elegans* (83). La inhibición de TORC2 por rapamicina, así como los RNAi de *rict-1* y *let-363* promueven la translocación nuclear de SKN-1 e incrementan la esperanza de vida de *C. elegans* dependiente de éste (83). Lo anterior se ha observado también en mutantes de *rict-1* y *sgk-1* (98). Además, SKN-1 potencialmente podría regular transcripcionalmente genes del complejo TORC1, tales como *daf-15/raptor*, *rsk-1/s6k*, *raga-1* y *ragc-1* (99).

Es posible que TOR y SKN-1 regulen mutuamente su actividad, ya que en ausencia de TOR, se incrementa la tasa de translocación nuclear de SKN-1, regulando transcripcionalmente a sus genes blanco (incluidos genes de la vía TOR) e incrementando la longevidad de *C. elegans* (83). Por otra parte, la inhibición de la traducción (que es regulada por TOR) incrementa la longevidad de *C. elegans*, este efecto es dependiente de DAF-16 y SKN-1 (100). Lo anterior muestra que TOR regula la esperanza de vida de *C. elegans* a través de DAF-16 y SKN-1(83), además se ha reportado que *skn-1* es necesario para incrementar la esperanza de vida en mutantes de *ric-1* y *sgk-1* (98).

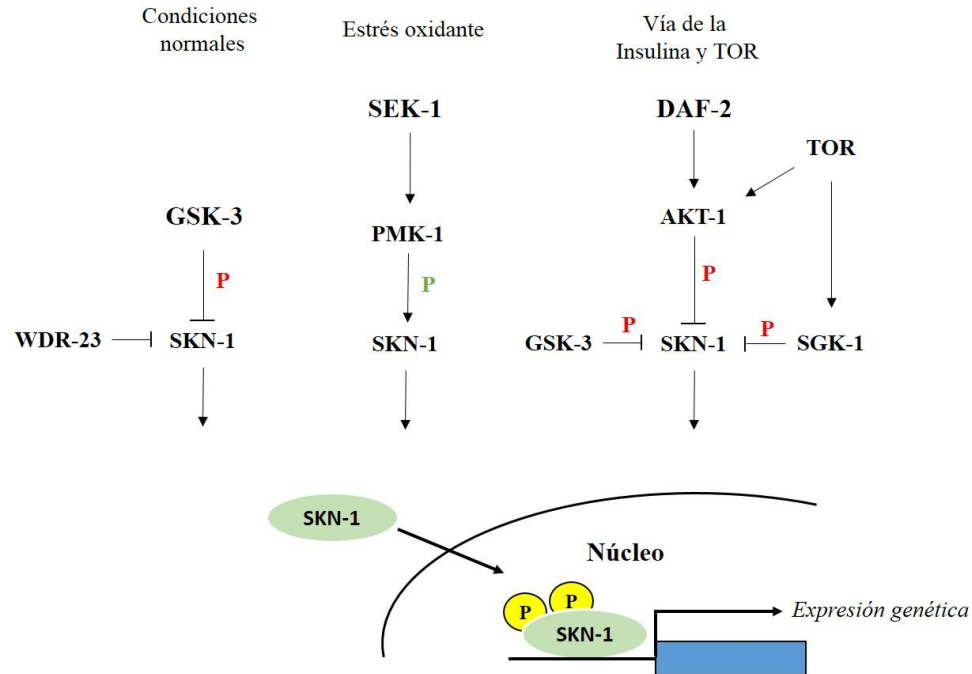


Fig. 7 Respuestas celulares que regulan la actividad de SKN-1

SKN-1 es regulado vía fosforilación (P) por diversas cinasas de acuerdo con el contexto celular. En condiciones normales GSK-3 fosforila a SKN-1 evitando su translocación al núcleo, por otra parte el represor WDR-23 facilita la degradación de SKN-1 vía ubiquitin-proteosoma. En condiciones de estrés oxidante, la vía p38 MAPK activa a SKN-1 el cual es fosforilado por PMK-1, lo cual facilita su translocación al núcleo. En condiciones *ad-libitum* la vía de la insulina junto con la vía TOR regulan negativamente la actividad de SKN-1 a través de varias cinasas. Las letras en color rojo (P) representan la fosforilación que se traduce en represión de la actividad de SKN-1, en color verde se muestran aquellas que favorecen su actividad.

3.7.3 Factor de transcripción CEP-1/p53

El factor de transcripción CEP-1 es el homólogo de p53 en *C. elegans* (101), sin embargo estudios de su estructura tridimensional sugieren que CEP-1 está más relacionado con p63 y p73 (102). A pesar de la baja similitud a nivel de secuencia, p53 y CEP-1 reconocen el mismo motivo de unión a DNA (103); además CEP-1 conserva los principales residuos de aminoácidos que son sujetos a mutaciones en más del 50% de los cánceres en humanos (101). De forma similar a su homólogo CEP-1 es indispensable para la activación de la apoptosis en la línea germinal en respuesta al daño al DNA, para mantener la estabilidad genómica y en el soma para la resistencia ante distintas condiciones de estrés como la hipoxia y la privación de alimento (101, 104).

Regulación de la actividad de CEP-1

La reparación del daño al DNA así como la apoptosis en la línea germinal, es regulada principalmente por CEP-1. Estas señales activan al complejo 9-1-1 que está codificado por los genes *hpr-9/rad9*, *mrt-2/rad1* y *hus-1/hus1* los cuales regulan positivamente a CEP-1 (105-107) a través de distintas cinasas, entre ellas destacan la cinasa ATM-1/ATM (108) y la cinasa ATL-1/ATR la cual es necesaria para activar a CLK-2/CLK2 y en conjunto promover la reparación del DNA y la apoptosis a través de CEP-1 (109). Por otro lado, la actividad de CEP-1 es regulada negativamente por distintos efectores, tal es el caso de AKT-

1/AKT que antagoniza la actividad apoptótica de CEP-1 en la línea germinal después del punto de control del complejo 9-1-1 (110), para ello AKT-1 no requiere de su activación canónica por la vía de la insulina (110). Por su parte APE-1/iASPP interactúa físicamente con CEP-1 e inhibe la apoptosis en la línea germinal (111).

En mamíferos p53 es regulado negativamente por la E3 ubiquitin ligasa Mdm2 la cual promueve su degradación vía proteosoma (112), sin embargo *C. elegans* no posee un homólogo de Mdm2 que regule los niveles de CEP-1 (110). No obstante otra E3 ubiquitin ligasa (SCF^{FNSN-1}) regula negativamente los niveles de la proteína fosforilada de CEP-1 por un mecanismo indirecto y desconocido hasta el momento (113). A nivel postranscripcional, la proteína de unión a RNA GLD-1 reprime la traducción de diversos transcritos en la línea germinal, incluido *cep-1* al unirse directamente a su región 3' UTR (114). Cabe mencionar que la activación de la cinasa MPK-1/ERK vía LET-60/Ras restringe los niveles de GLD-1 en la línea germinal, permitiendo la activación de CEP-1 e incrementando la apoptosis por daño al DNA (115). Finalmente, la actividad de CEP-1 es reprimida indirectamente por HIF-1/HIF- α (116), el cual induce la expresión de la tirosina cinasa TYR-2 la cual es secretada por las neuronas sensoriales de la cabeza de *C. elegans* y antagonizan la actividad de CEP-1 en la línea germinal (116).

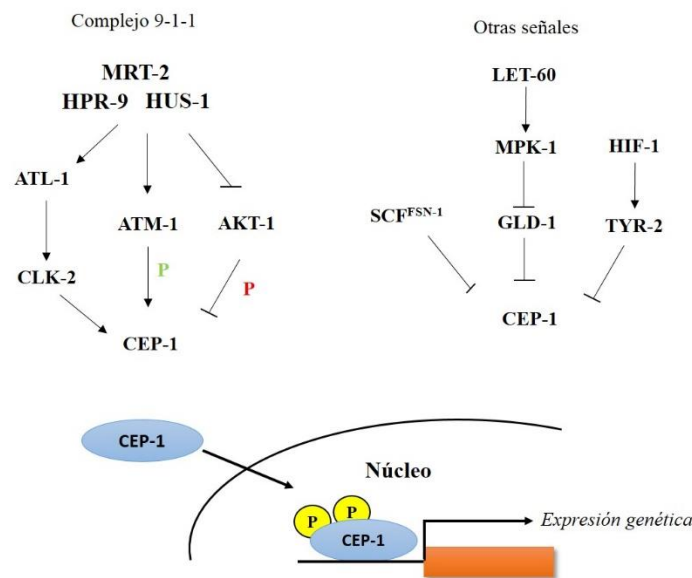


Fig. 8 Respuestas celulares que regulan la actividad de CEP-1

CEP-1 es regulado por distintas respuestas celulares asociadas a estrés; el daño al DNA es una de las respuestas ampliamente estudiadas y la cual se encuentra conservada con su homólogo p53. Tanto la apoptosis así como el daño al DNA activan al complejo 9-1-1 el cual activa a CEP-1 vía fosforilación (P) por las cinasas ATM-1 y ATL-1; esta última activa a CLK-2 promoviendo también la activación de CEP-1, mientras que AKT-1 antagoniza estos efectos. Otras señales antagonizan la actividad de CEP-1, tal es el caso de la vía de señalización de HIF-1, este último activa a TYR-2 el cual inhibe a CEP-1. Además la proteína de unión a RNA, GLD regula la abundancia de la proteína CEP-1, ya que es capaz de inhibir la traducción de su mensajero, no obstante ante condiciones pro-apoptóticas GLD-1 puede ser inhibido a través de la cinasa MPK-1, favoreciendo la síntesis de proteína de CEP-1 y el inicio de la apoptosis en la línea germinal. Las letras en color rojo (P) representan la fosforilación que se traduce en represión de la actividad de CEP-1, en color verde se muestran aquellas que favorecen su actividad.

3.7.4 *Factor de inducción por hipoxia, HIF-1*

El factor de transcripción HIF-1 es esencial para promover cambios en la expresión genética que permiten la adaptación y supervivencia celulares ante condiciones de hipoxia (117). El principal mecanismo de su regulación yace en la estabilidad de su proteína por medio de un mecanismo dependiente de la disponibilidad de oxígeno (117). La estabilidad de la proteína HIF-1 es regulada por la vía EGL-9/VHL la cual esta conservada con múltiples organismos incluyendo los mamíferos (117). En condiciones de normoxia, la prolin hidroxilasa (PHD) hidroxila los residuos de prolina del dominio de degradación altamente sensible al oxígeno (ODDD: Oxygen-dependent degradation domain, por sus siglas en inglés) de HIF-1, esta modificación favorece la unión de la ubiquitin ligasa VHL (von Hippel-Lindau) la cual ubiquitina a la proteína HIF-1, favoreciendo su degradación por el proteosoma (117).

En condiciones de hipoxia y baja disponibilidad de oxígeno, HIF-1 no es hidroxilado, lo cual permite su acumulación en el citoplasma y posterior translocación al núcleo de la célula donde dimeriza con la subunidad HIF-1 β y así puede reconocer su motivo de unión a DNA en sus genes blanco (117). En *C. elegans*, los homólogos de las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β son *hif-1* y *aha-1*, respectivamente (118, 119). El gen *egl-9* codifica para una oxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato, la cual cuando los niveles de oxígeno son lo suficientemente altos, hidroxila el residuo de prolina Pro-621 de HIF-1(120); esto favorece la unión de VHL-1/VHL el cual promueve la degradación de HIF-1(120). Cabe mencionar que EGL-9 regula la actividad transcripcional de HIF-1 de forma independiente de VHL-1 (121) e independiente de su actividad como hidroxilasa (122).

La proteína de membrana RHY-1 regula la expresión de genes blanco de HIF-1 (121), a su vez regula la estabilidad de HIF-1 a través de EGL-9, y presumiblemente de forma independiente de VHL-1 (121). En condiciones de hipoxia, HIF-1 promueve la expresión de distintos genes dentro de los que destacan *nhr-57*, *cysl-1*, *vhl-1*, *rhy-1* y *egl-9* (120, 121, 123), los cuales están asociados a la regulación de la actividad de HIF-1. Durante la hipoxia, se produce sulfuro de hidrógeno (H₂S) el cual funciona como un sensor de la disponibilidad de oxígeno (124); este gas se acumula en las células promoviendo la activación de HIF-1(124). En mamíferos, el sulfuro de hidrógeno se produce a partir de homocisteína y cisteína los cuales son metabolizados por las enzimas cistationina β -sintasa (CBS), cistationina γ -liasa (CSE), ambas enzimas forman parte de la vía de síntesis de cisteína.

En *C. elegans*, el H₂S activa a HIF-1 (125, 126) independiente de la actividad de VHL-1 (125), en este contexto, la cisteína sintasa CYSL-1, desempeña un papel importante ya que interactúa directamente con el extremo C-terminal de EGL-9 regulando su actividad sobre HIF-1 (127). Cabe mencionar que RHY-1 una proteína de membrana con actividad de acetil-transferasa, regula negativamente a CYSL-1 presumiblemente por medio de modificaciones post-traduccionales (127). Recientemente un estudio de transcriptómica ha evidenciado estas posibles interacciones al analizar la expresión genómica de las mutantes *egl-9(sa307)*, *rhy-1(ok1402)*, *vhl-1(ok161)* y *hif-1(ia4)* en condiciones de normoxia (128). Llama la atención la función reguladora de RHY-1, en condiciones normales SKN-1 promueve la expresión de *rhy-1* (129), no obstante la exposición a H₂S promueve la represión de la expresión *rhy-1*, el cual posee en su región promotora 9 sitios putativos de unión de SKN-1(126), además en estas condiciones se observó la sobreexpresión de diversos genes

de expresión embrionaria, los cuales son regulados por SKN-1 (126), por lo cual es probable la participación de este factor de transcripción en la activación de HIF-1.

Regulación de la actividad de HIF-1 por las ERO

Recientemente se ha descrito la participación de la vía p38 MAPK en la regulación de HIF-1 (130). Los gusanos mutantes de los genes *sek-1* y *pmk-1* indujeron la expresión del gen *nhr-57* (130), el cual es un blanco transcripcional de HIF-1 (123). Además la vía p38 MAPK en condiciones de normoxia regula la localización subcelular de la isoforma EGL-9E en las neuronas de *C. elegans* (130), por lo cual es posible que esta vía regule canónicamente la actividad de HIF-1 a través de EGL-9.

Por otra parte, reportes previos mostraron que las ROS activan a HIF-1 (72, 131) y a AAK-2/AMPK (72). Además ambas proteínas se regulan mutuamente, ya que en la cepa mutante *aak-2(ok524)* se observaron incrementos en los niveles de la proteína HIF-1, sin embargo la abundancia de su mRNA no cambió significativamente, lo cual sugiere que AAK-2 regula postranscripcionalmente los niveles de HIF-1 (72). Por su parte en la cepa mutante *hif-1(ia4)* los niveles del mRNA de *aak-2*, así como los niveles de su proteína fosforilada (pAAK-2) se incrementaron respecto a la cepa silvestre (72). Además se demostró por medio de un ensayo *in vitro* que AMPK fosforila el residuo de Serina Ser419 de HIF-1 (72) lo cual sugiere que AAK-2 podría regular los niveles de la proteína HIF-1 a nivel post-transcripcional.

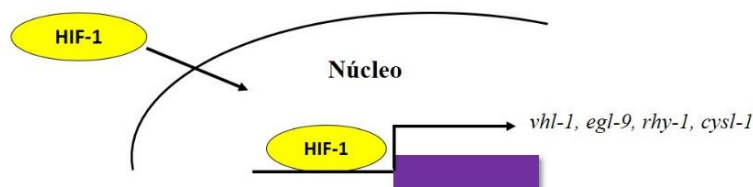
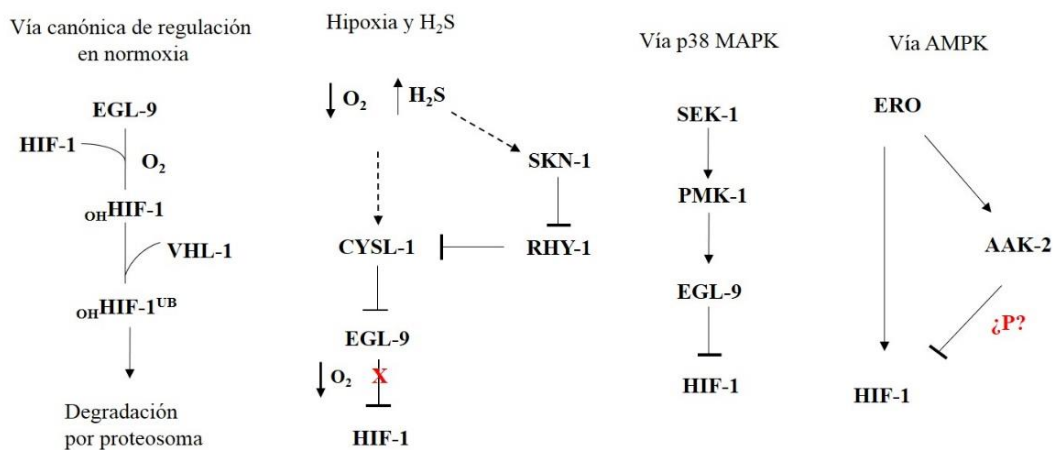


Fig. 9 Respuestas celulares que regulan la actividad de HIF-1 en *C. elegans*

HIF-1 es regulado por diversas señales de estrés, tales como la hipoxia, el estrés oxidante, las infecciones bacterianas, entre otras. De forma canónica, HIF-1 es regulado a nivel de proteína de acuerdo a la disponibilidad de oxígeno en la célula. En condiciones de normoxia, la proteína HIF-1 es hidroxilada por EGL-9, esta modificación permite que la proteína sea reconocida por la ubiquitin ligasa VHL-1, favoreciendo la degradación de HIF-1 vía proteosoma. En condiciones de hipoxia la cisteína sintasa CYSL-1 se une a EGL-9 regulando su actividad, además de que al disminuir los niveles de oxígeno, HIF-1 no puede ser hidroxilado, por lo que la estabilidad proteica no se ve comprometida, se acumula en citoplasma y puede translocarse al núcleo y regular sus genes blancos. En presencia de sulfuro de hidrógeno, se promueve la activación de SKN-1, el cual inhibe la acetil transferasa RHY-1, la cual inhibe a su vez a CYSL-1; la inhibición de RHY-1 facilita la acumulación de HIF-1 en el citoplasma celular y su posterior translocación al núcleo. El estrés oxidante, es otra de las señales que regula la actividad de HIF-1, dos mecanismos relacionados han sido identificados. El primero de ellos involucra a AAK-2/AMPK, el cual es activado por un incremento en los niveles de ERO, y que potencialmente a través de fosforilación podría inhibir a HIF-1. El segundo mecanismo, involucra a la vía p38/MAPK, a través de la cual se activa la cinasa PMK-1, quien regula positivamente a EGL-9, favoreciendo su interacción con HIF-1 y su subsecuente degradación vía proteosoma.

3.7.5 Factor de transcripción SBP-1/SREBP

El factor de transcripción SBP-1 es el homólogo en *C. elegans* de SREBP-1c; al igual que su homólogo participa en la homeostasis de lípidos (132, 133) al regular transcripcionalmente distintos genes que codifican para enzimas lipogénicas tales como *acc-1*, *fas-1*, *fat-6* y *fat-7* (133). SBP-1 se expresa en las células intestinales (133-135) y participa no sólo en la acumulación de lípidos, también en la definición de la talla y la puesta de huevecillos (133). SBP-1 interactúa con distintas proteínas co-activadoras que facilitan la regulación transcripcional de sus genes blanco. Entre estos co-activadores destacan MDT-15 el cual es necesario para que SBP-1 active sus genes blanco (132).

3.7.5.1 Regulación de la actividad de SBP-1

La actividad de SBP-1 es regulada negativamente por la desacetilasa SIR-2.1/SIRT-1 (135) en condiciones de ayuno, lo cual promueve una disminución en la expresión de genes lipogénicos para dar paso a la oxidación de lípidos (135). En mamíferos SREBP interactúa con el co-activador CBP/p300 (136-138) el cual lo acetila en residuos de lisina Lys324 y Lys333 localizados en su dominio de unión al DNA (135, 138), que a su vez incrementa su estabilidad y actividad transcripcional (135-138); mientras que SIRT-1 desacetila a SREBP, disminuyendo su actividad transcripcional y reduciendo su translocación al núcleo (135), este mecanismo como puede observarse se encuentra conservado con *C. elegans*.

Por otra parte, cambios en los niveles de lípidos de la membrana tales como ácido fosfatídico (AF), diacilglicerol (DAG) y fosfatidilcolina (FC), promueven la activación de SBP-1/SREBP tanto en *C. elegans* como en mamíferos (139, 140). Estudios de cribado genético identificaron que el silenciamiento de *lpin-1/Lipin1* (el cual es responsable de la conversión de AF a DAG) y *arf-1.2/ARF-1* (GTPasa con funciones reguladoras en el aparato de Golgi) promueven la activación de SBP-1/SREBP-1 y su translocación al núcleo (140). Un efecto similar se observó al inhibir a genes que participan en la síntesis de acetilcolina tales como *sams-1* (que codifica para la enzima S-adenilmetionina sintasa) (139) el cual produce S-adenosilmetionina que es un donador de metilo necesario para la síntesis de fosfatidilcolina (139).

Cabe mencionar que la FC y el DA son sustratos necesarios para su propia síntesis (141) lo cual explica porque la falta de alguno de ellos activa a SBP-1/SREBP-1 como mecanismo compensatorio para promover la síntesis de lípidos y restablecer sus niveles. Por su parte, el homólogo del receptor de adiponectina *parqr-2/AdipoR* regula indirectamente la actividad de *sbp-1* al modular los niveles de FC (142), el mecanismo por medio del cual PARQR-2 regula a SBP-1 no es claro hasta el momento. Por otra parte, la expresión de SBP-1 es regulada indirectamente por el microRNA *lin-4*; el reporte de Zhu mostró que los gusanos mutantes de *lin-4* redujeron sus niveles de lípidos y la expresión de *sbp-1* se redujo (143).

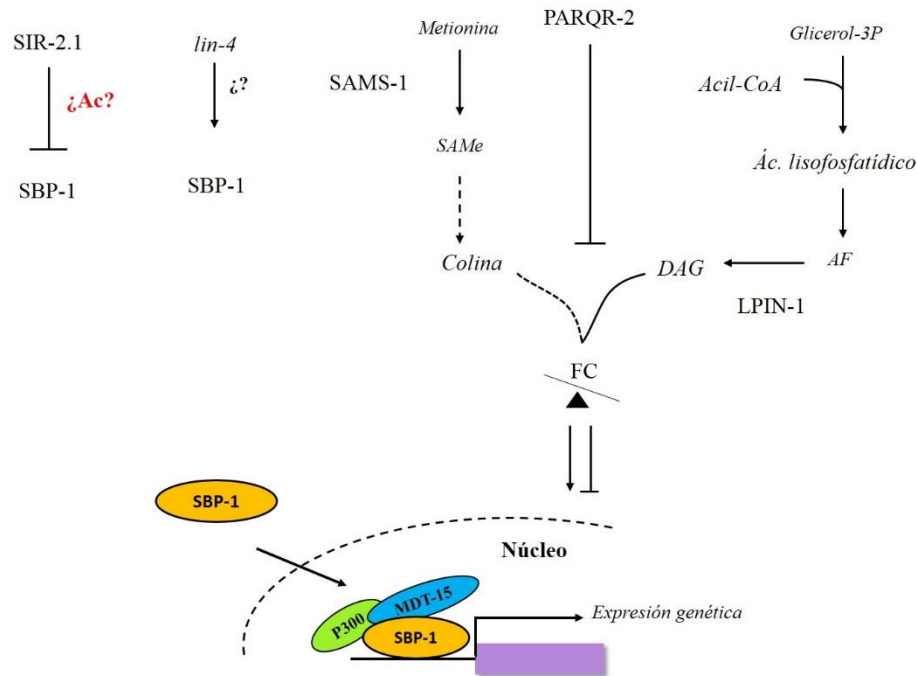


Fig. 10 Respuestas celulares que regulan la actividad de SBP-1

La actividad de SBP-1 es regulada por señales relacionadas con el metabolismo y la disponibilidad de nutrientes. En condiciones de ayuno, SBP-1 es regulado negativamente por la desacetilasa SIR-2.1/SIRT-1, reduciendo su translocación al núcleo y disminuyendo la expresión de sus genes blanco. Por otra parte, cambios en los niveles de ácido fosfatídico (AF), diacilglicerol (DAG) y fosfatidilcolina (FC) (los cuales forman parte de la membrana celular) así como de acetilcolina promueven la activación de SBP-1 como mecanismo compensatorio y promover la síntesis de lípidos y así restablecer sus niveles. Además el homólogo del receptor de adiponectina *parqr-2/AdipoR* regula indirectamente la actividad de SBP-1 al modular los niveles de FC. Finalmente, SBP-1 también es regulado positivamente y de forma indirecta por el el microRNA *lin-4*. Cabe mencionar que SPB-1 interactúa con distintas proteínas co-activadoras en el núcleo que facilitan la regulación transcripcional de sus genes blanco. Entre estos coactivadores destacan MDT-15.

3.7.6 **Factor de transcripción CRH-1/CREB**

El factor de transcripción CREB (cAMP-response element-binding protein, por sus siglas en inglés) participa en distintos procesos celulares tales como el establecimiento de la memoria de largo plazo, la supervivencia celular, apoptosis, diferenciación celular, control del metabolismo, actividad del sistema inmune entre otras (144). Se expresa en distintos tipos celulares y se activa mediante fosforilación en distintos residuos de serina, dentro de los cuales destaca el residuo Ser133 ubicado dentro del dominio de transactivación inducible por cinasa, o dominio KID. Este residuo puede ser fosforilado por parte de la cinasa dependiente de AMPc (PKA) (145) así como de cinasas calcio-calmodulina dependientes (CaMK) (146); otro residuo importante para la regulación de CREB es Ser129 la cual es fosforilada por la cinasa GSK-3 (147).

CREB desempeña un papel importante en la actividad neuronal, ya que es responsable de modular los cambios genéticos que se producen durante la plasticidad sináptica (148), dicha función se encuentra conservada evolutivamente en otros organismos (148). Uno de los principales activadores de CREB es el calcio (Ca^{2+}), el cual es responsable de su fosforilación posterior a la actividad sináptica (149). La internalización de Ca^{2+} desencadena la activación CaMK, las cuales fosforilan a CREB en su dominio de transactivación en los residuos de serina Ser133 y Ser142 (146), lo que permite reclutar al co-activador CBP (que posee actividad de histona acetil-transferasa) el cual se une al dominio de transactivación KID de CREB fosforilado y facilita la activación transcripcional de sus genes blancos (150).

3.7.6.1 Regulación de la actividad de CRH-1

CRH-1 Es el factor de transcripción homólogo en *C. elegans* de CREB el cual actúa principalmente en las neuronas y el intestino y participa en distintas respuestas conductuales y adaptativas tales como la memoria, la esperanza de vida, la termotaxis, entre otros (71, 151-153). Similar a lo observado en mamíferos, CRH-1 es regulado por la cinasa CMK-1/CaMK en *C. elegans* (152, 153), además conserva el mismo residuo de Ser133, el cual puede ser fosforilado por KIN-2, el homólogo PKA(154).

Por otra parte, CRH-1 puede autoregular su actividad a través del co-activador CRT-1 (71) el cual modula la translocación de CREB del citoplasma hacia el núcleo de la célula. Por su parte AMPK/AAK-2 y TAX-6 (calcineurina) regulan negativamente la actividad de CREB vía fosforilación de CRT-1, lo cual impide la translocación al núcleo del complejo CRT-1/CRH-1 (71).

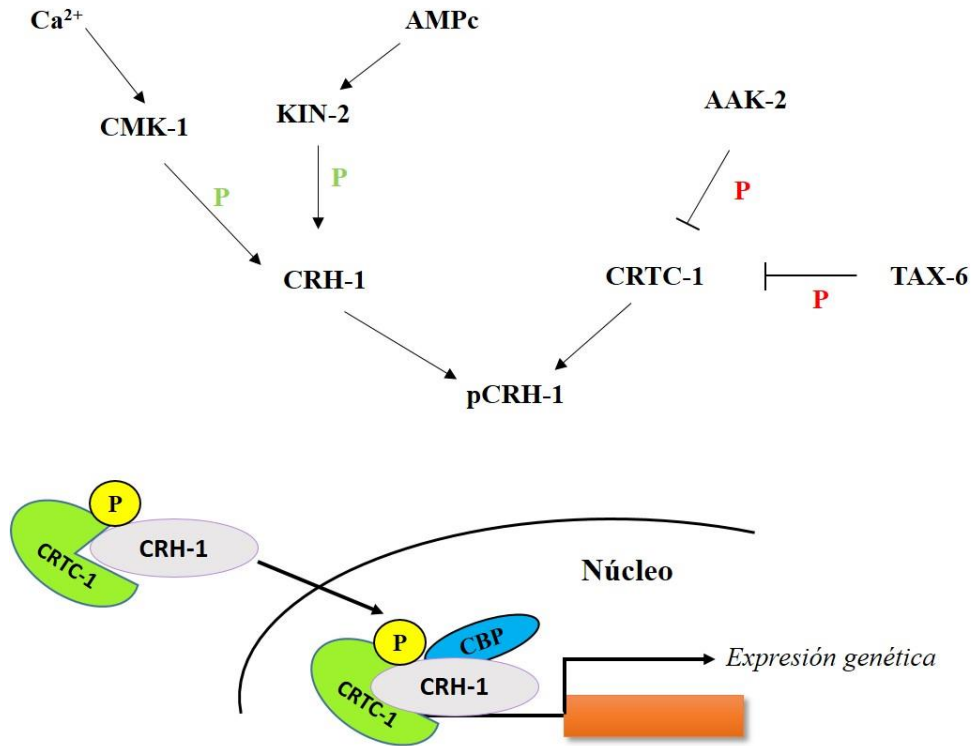


Fig. 11 Respuestas celulares que regulan la actividad de CRH-1

CRH-1 es regulado positivamente por dos cinasas; la cinasa dependiente de calcio CMK-1 y la cinasa dependiente de AMPc, KIN-2, ambas fosforilan a CRH-1 en el dominio de transactivación KID, lo que facilita su interacción con CRTC-1 promoviendo la translocación de CRH-1 al núcleo, donde reclutará a la desacetilasa CBP para regular la expresión de sus genes blanco. Por otra parte, las cinasas AAK-2 y TAX-6 fosforilan a CRTC-1 evitando así que este en conjunto a CRH-1 logre translocarse al núcleo celular.

4 JUSTIFICACIÓN

La diabetes es una patología creciente a nivel mundial que se caracteriza por una hiperglicemia crónica que conlleva al desarrollo de glucotoxicidad, la cual es responsable de la pérdida de función de distintos órganos y tejidos. Por lo anterior, se han desarrollado distintas estrategias clínicas y experimentales con el propósito de conocer los efectos fisiológicos de la glucotoxicidad, sin embargo no se cuenta con un modelo *in vivo* que permita caracterizar dichas respuestas. Este trabajo propone analizar los efectos que producen el consumo de concentraciones crecientes de glucosa a nivel fisiológico, bioquímico, metabólico, genético y de marcadores de toxicidad *in vivo* empleando a *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo basado en las semejanzas que este tiene con otros organismos incluidos los mamíferos.

5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿*Caenorhabditis elegans* puede ser un organismo modelo para el estudio de la glucotoxicidad en sus bases moleculares y bioquímicas?

6 HIPÓTESIS

Caenorhabditis elegans es un organismo modelo adecuado para el estudio de la glucotoxicidad *in vivo*, lo anterior con base en las homologías bioquímicas y moleculares que posee con los mamíferos.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Establecer un modelo de glucotoxicidad inducido por la adición de distintas concentraciones de glucosa al medio de cultivo de *Caenorhabditis elegans*.

7.2 Objetivos específicos

Analizar los efectos que producen en *C. elegans* el consumo continuo de distintas concentraciones de glucosa sobre:

- ✓ La morfología, potencial reproductivo y esperanza de vida de los sujetos.
- ✓ Contenido de glucosa, triglicéridos y asimilación de glucosa.
- ✓ Fisiología mitocondrial (actividad de cadena de transporte de electrones, síntesis de ATP y respiración celular) e integridad mitocondrial.
- ✓ Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y marcadores de estrés oxidante.
- ✓ La abundancia de transcritos (mRNA) de factores de transcripción de respuesta a estrés, así como genes relacionados con el metabolismo y sistema antioxidante.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cepas de *C. elegans* empleadas en este estudio

Para este trabajo se emplearon las siguientes cepas: cepa silvestre (WT) Bristol (N2), CF1553 *mul84* ((pAD76) *Psod-3::GFP+rol-6(su1006)*), GR1307 *daf-16(mgDf50)* I, CF1038 *daf-16(mu86)* I, TJ1 *cep-1(gk138)* I, EU84 *unc-5(e53) skn-1(zu67)* IV/nT1 (*let-?(m435)*) (IV;V). Las cepas fueron crecidas en placas de agar de crecimiento para nematodos (NGM, por sus siglas en inglés) inoculadas con la cepa de *E. coli* OP50-1 e incubadas a 18 °C tal como se describe en (37). Las cepas empleadas en este trabajo se obtuvieron del Centro de Genética de *Caenorhabditis* (CGC) de la Universidad de Minnesota, en Estados Unidos.

8.2 Mantenimiento de cepas y sincronización de cultivos de *C. elegans*

Los cultivos de gusanos fueron sincronizados empleando huevecillos, los cuales se obtienen de la lisis de gusanos adultos grávidos (1-2 días de adultos) con una solución alcalina de hipoclorito de sodio (155), ya que en estas condiciones solo los huevecillos pueden sobrevivir. Posteriormente los huevecillos fueron lavados con amortiguador M9 cinco veces hasta remover todos los residuos de hipoclorito. Los huevecillos se agitaron a 250 rpm por una noche para facilitar la eclosión de las larvas las cuales fueron sembradas en medios NGM inoculadas con la cepa de *E. coli* OP50-1 en las condiciones que cada procedimiento requería.

8.3 Establecimiento de condiciones de glucotoxicidad en *C. elegans*

Larvas L1 sincronizadas fueron crecidas en placas NGM estériles inoculadas con *E. coli* OP50-1 (condiciones estándar/control experimental), mientras que las condiciones de glucotoxicidad generadas por medio de dietas altas en glucosa se lograron al adicionar cantidades crecientes de D-glucosa a la mezcla de preparación de medios NGM para obtener concentraciones de 20, 40, 80 y 100 mM en el medio. Los gusanos fueron crecidos en placas de agar de cada una de las condiciones descritas anteriormente hasta llegar a la etapa larvaria L4, posteriormente fueron cosechados y procesados para cada experimento.

8.4 Cosecha de gusanos y almacenamiento de muestras

Los gusanos crecidos en las condiciones que cada experimento requería fueron cosechados en condiciones de esterilidad por medio de lavado en placa de agar empleando 2-3 mL de amortiguador M9; la solución con gusanos fue depositada en tubos cónicos de 5 mL y se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta que los gusanos sedimentaran por efecto de la gravedad. Se retiró la mayor cantidad de amortiguador M9 del tubo sin perturbar el botón de gusanos, y se agregaron nuevamente 2-3 mL de amortiguador M9 estéril, esta operación se repitió de 3-5 veces hasta que el sobrenadante de amortiguador M9 fuera cristalino. Lo anterior asegura la eliminación de bacterias presentes en los intestinos y la cutícula de los gusanos. Finalmente el botón de gusanos limpio fue resuspendido con 1-2 mL de amortiguador M9 y depositado en un tubo cónico de 2.5 mL, los gusanos fueron centrifugados a 3500 rpm por 1 minuto, se descartó el sobrenadante de M9 y el botón de gusanos fue sumergido en nitrógeno líquido para congelar la muestra, la cual posteriormente fue almacenada a -70 °C.

8.5 Preparación de homogenados de *C. elegans*

Larvas L4 de *C. elegans* fueron cosechadas y lavadas con solución amortiguadora M9 (42.26mM Na₂HPO₄; 22.04mM KH₂PO₄; 85.56mM NaCl; 0.87mM MgSO₄) en tres ocasiones, dejando que las larvas se sedimentaran por efecto de la gravedad; lo anterior con el propósito de remover las bacterias presentes en su intestino. Se removió la mayor cantidad de amortiguador M9 para poder resuspender a los gusanos con solución amortiguadora de lisis (50mM HEPES, 50mM KCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 5mM β-glicerol fosfato, 0.1% (v/v) Tritón X-100, 50mM Fluoruro de sodio, 1mM Ortovanadato de sodio, 5mM Pirofosfato de sodio, 0.2mM de Fluoruro de fenilmetanosulfonilo e inhibidor de proteasas (complete Roche™). La mezcla se congeló y descongeló con nitrógeno líquido e incubación a 37 °C, lo anterior se repitió en tres ocasiones. Posteriormente los gusanos fueron sonicados en hielo con el sonicador Ultrasonic Processor Unit (Sonics®) en tres ciclos de 30 seg. (Amplitud = 60, pulso = 3) por 1 minuto; los homogenados fueron centrifugados a 12000rpm @ 4 °C por 15 min. Los sobrenadantes se colectaron y almacenaron a -70 °C. Una alícuota se empleó para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (BioRad Protein Assay). Para el caso de aislamiento de la fracción mitocondrial

8.6 Medición del contenido de glucosa y triglicéridos

Para la medición de glucosa y triglicéridos se emplearon homogenados frescos de larvas L4 crecidas en las distintas condiciones estudiadas, se empleó la misma cantidad de proteína en cada una de las muestras analizadas. Para la cuantificación de glucosa se empleó el Sistema Reflotron plus sprint system (Roche); los triglicéridos se cuantificaron con el sistema comercial *Triglicéridos-LQ* (SPINREACT). Las determinaciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

8.7 Ensayo de asimilación/captación de glucosa

La asimilación de glucosa se evaluó empleando un análogo de glucosa (2 - desoxiglucosa; 2DG). Larvas L4 crecidas en las condiciones estudiadas, fueron incubadas en una solución 0.5 mM de 2DG (Merck D8375) durante 2 h. Posteriormente, los gusanos fueron lavados en tres ocasiones con amortiguador M9 frío y se dejaron sedimentar por efectos de la gravedad. Se removió la mayor cantidad de amortiguador M9 y se midió el peso del botón de gusanos, el cual se empleó para ajustar la medición. Los homogenados de las larvas L4 fueron preparados con solución de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.1) de acuerdo a lo reportado por (156). Se agregaron 80 µl de solución de lisis, para los homogenados se empleó la ruptura por choque térmico al congelar con nitrógeno líquido y descongelar por calentamiento a 37 °C; las muestras fueron calentadas a 85 °C por 40 min. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm at 4 °C por 20 min, el sobrenadante fue colectado en un tubo nuevo y almacenado a -20 °C. Como control positivo, se emplearon larvas L4 crecidas en condiciones estándar, se incubaron con una solución 0.5 mM de 2DG más insulina a una concentración de 80 mU/mL durante 2 h, estos gusanos fueron procesados de la misma forma que se describió líneas arriba; se empleó la insulina humana recombinante Humulin (100 UI/mL, Lilly). La concentración de insulina empleada se tomó con base al reporte de (157). La medición de la asimilación de glucosa se realizó con el sistema comercial 2-deoxyglucose (2DG) Uptake Measurement (Cosmo Bio, CSR-OKP-PMG-K01TE) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

8.8 Actividad de Superóxido dismutasa mitocondrial (mtSOD).

A partir de larvas L4 crecidas en las distintas condiciones estudiadas, se aisló la fracción mitocondrial de acuerdo al protocolo de (158). El contenido de proteínas fue cuantificado por el método de Bradford. Se empleó la misma cantidad de proteína (5 µg) de cada muestra para este ensayo. La actividad de mtSOD se midió con el sistema comercial SOD assay (Merck 19160-1KT-F) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

8.9 Actividad de Catalasa.

La actividad de esta enzima se determinó de acuerdo a lo reportado por (159) con ligeras modificaciones. A partir de larvas L4 crecidas en las distintas condiciones ensayadas, se prepararon homogenados de gusanos con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.0 e inhibidor de proteasas. El contenido de proteínas en los homogenados se cuantificó por el método de Bradford. Para cada ensayo, se emplearon 20 µg de proteína total las cuales fueron incubadas por medio minuto en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.0 y 12 mM de H₂O₂. La reacción se detuvo al agregar molibdato de amonio 32.4 mM. Se midió la absorbancia de las mezclas de reacción a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro de placas. La actividad enzimática fue ajustada con el contenido de proteína por reacción (20 µg).

8.10 Peroxidación de Lípidos.

La peroxidación de lípidos se cuantificó por medio de malondialdehído (MDA) empleando el método de ácido tiobarbitúrico (TBA) (160). Homogenados frescos de larvas L4 de cada una de las condiciones estudiadas fueron incubados con TBA (0.375%) en ácido tricloroacético (TCA) al 30%. Las muestras se hirvieron por 45 min y posteriormente se enfriaron en hielo por 15 min; las muestras se centrifugaron a 1000 ×g durante 10 min y se colectó el sobrenadante para la medición de su absorbancia a una longitud de onda de 532 nm en un espectrofotómetro UV-vis. Los valores de absorbancia fueron interpolados con respecto a una curva tipo de 1,1,3,3 - tetrametoxipropano (TMPO, Merck 108383-100) en distintas concentraciones y que tuvo el mismo procesamiento que las muestras a analizar. Los niveles de MDA fueron ajustados en cada muestra de acuerdo con el contenido de proteínas las cuales se cuantificaron por el método de Bradford.

8.11 Cuantificación de glutatión.

La medición de glutatión, así como la preparación de los homogenados se realizaron el mismo día. Homogenados frescos de larvas L4 de cada una de las condiciones estudiadas se prepararon de la siguiente forma: Los gusanos previamente lavados con amortiguador M9 se les retiró la mayor cantidad de amortiguador para poder procesarlos. El botón de gusanos fue resuspendido con una solución fría de ácido metafosfórico (5% g/v) (Merck, 1005460100), posteriormente los gusanos fueron sonicados en hielo con el sonicador Ultrasonic Processor Unit (Sonics®) en tres ciclos de 30 seg. (Amplitud = 60, pulso = 3) por 1 minuto y después la solución se centrifugó a 12000rpm @ 4 °C por 15 min. Se colectaron los sobrenadantes y almacenaron en hielo. La cuantificación de glutatión se realizó con el sistema comercial HT Glutathione assay sistema (Trevigen 7511-100-K) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

8.12 Control positivo de estrés oxidante

Como control positivo de inducción de estrés oxidante, se emplearon larvas L4 crecidas en condiciones estándar, las cuales fueron cosechadas y lavadas con amortiguador M9 para remover las bacterias presentes en sus intestinos, posteriormente, los gusanos fueron incubados en una solución de 0.2 mM de Paraquat (Sigma Aldrich 36541) por 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron procesadas de la misma forma como se describió anteriormente. La concentración de Paraquat empleada se obtuvo de una curva dosis-respuesta la cual se muestra en la figura S2 de la sección de *información complementaria*.

8.13 Evaluación de la puesta de huevecillos

Se crecieron larvas sincronizadas L1 hasta el estadio L4 (generación P0) en condiciones control o suplementadas con glucosa en concentraciones de 20, 40, 80 o 100 mM. Larvas L4 (en total 30), se transfirieron individualmente a placas de cultivo nuevas (3 cm) con la misma condición de la de origen y fueron cultivadas hasta completarse 3 días de la etapa adulta. Posteriormente se contabilizaron los huevecillos puestos en este lapso empleando un microscopio estereoscópico Nikon SMZ800. Este proceso se repitió nuevamente para las generaciones F1 y F2. Los experimentos anteriores se realizaron en tres ocasiones distintas.

8.14 Cuantificación de la frecuencia de retención de huevecillos o fenotipo "embolsado"

Se seleccionaron al azar 100 larvas L4 crecidas tanto en condiciones estándar como suplementadas con glucosa y se transfirieron a una nueva placa con la misma condición. Este subcultivo se observó durante 10 días (a partir del día 1 de adulto) usando un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800) y se cuantificó el número de gusanos adultos que desarrollaron el fenotipo “embolsado” tal y como se reportó anteriormente (161). Los adultos fueron cambiados de placa cada dos días para evitar la sobrepoblación e introducción de nuevos sujetos al experimento provenientes de los huevecillos puestos durante la etapa reproductiva; los gusanos “embolsados” fueron removidos del cultivo para evitar la adición de nuevos sujetos al experimento.

8.15 Determinación de las actividades enzimáticas de Aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FAL)

Las actividades enzimáticas de AST y FAL se analizaron en homogenados de larvas L4 crecidas en los distintos tratamientos. La medición de las actividades enzimáticas se realizó por métodos colorimétricos empleando los sistemas comerciales GOT (AST)-LQ para la AST y ALP-LQ para la fosfatasa alcalina, ambos sistemas de la casa comercial SPINREACT (Sant Esteve de Bas, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las actividades enzimáticas se ajustaron con el contenido de proteína presente en la muestra.

8.16 Expresión del gen reportero GFP en la cepa transgénica *Psod-3::GFP*

A partir de cultivos sincronizados, se sembraron aproximadamente 200 larvas L1 de la cepa transgénica *Psod-3::gfp* en placas de 60 mm de medio NGM suplementado con 0, 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa y se incubaron a 20 °C hasta que alcanzaron la etapa larvaria L4. En esta etapa las placas se transfirieron a una incubadora de aire a 31 °C durante 8 h,

como se indica (162). Después del choque térmico, los animales se anestesiaron con tetramisol 10 mM, se montaron en laminillas con cubiertas de agarosa al 2% y se observaron en un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara AxioCam MRc y el software Zeiss AxioVision. La cuantificación de la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) se realizó utilizando el software Image J tal como se indicó anteriormente (163).

8.17 Ensayos de longevidad

Larvas L1 sincronizadas previamente se cultivaron en medios NGM en condiciones control y suplementados con glucosa (20, 40, 80 o 100 mM) hasta que alcanzaron la etapa adulta, posteriormente, se sembraron de 100-110 gusanos de cada condición en una nueva placa Petri correspondiente a la misma condición que se utilizó anteriormente. Los gusanos fueron contados y transferidos diariamente (empleando un asa de platino) a nuevas placas de Petri con las mismas condiciones empleadas anteriormente para eliminar los embriones y las larvas L1. Los gusanos muertos se contaron diariamente (se consideró a un gusano muerto cuando no respondió o se movió al tacto del asa de platino). Los gusanos que mostraban defectos de la puesta de huevos (fenotipo “embolsado”) y los gusanos que se adhirieron a la pared de la placa de Petri, así como aquellos que se enterraron en el agar y no fue posible recuperarlos fueron contabilizados y censurados durante el análisis estadístico. Los ensayos de longevidad se realizaron en tres ocasiones distintas.

Se seleccionó el número de 100-110 gusanos a estudiar, ya que con este número tenemos una probabilidad de 82% para detectar un cambio en la esperanza de vida con un nivel de significancia estadística de 0.05 calculado a partir de un modelo paramétrico de supervivencia de *C. elegans* basado en el modelo de Gompertz (164).

8.18 Preparación de RNA de interferencia (RNAi) para silenciamiento de genes de *C. elegans*

Se obtuvieron clones bacterianos portadores de plásmidos de RNAi de *crh-1*, *hif-1* y *sbp-1* de la biblioteca de RNAi v1.1 de *C. elegans* (Open Biosystems, Huntsville, AL, USA.) (165). El vector vacío (pL4440) se usó como control de silenciamiento. Cada colonia de RNAi se cultivó durante una noche en caldo Luria con 100 µg/mL de ampicilina (Merck, A0166-5G) y 12.5µg/mL de tetraciclina (Merck, 87128-25G).

Al día siguiente, se inoculó caldo Luria fresco (con las mismas concentraciones de antibióticos) con el pre-cultivo de la noche anterior y se incubó a 37 °C con agitación constante hasta obtener una densidad óptica de cultivo (OD) de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm; una vez alcanzada la densidad óptica adecuada, se añadió 1 mM de isopropiltiogalactósido (IPTG, Invitrogen™, 15529019) al cultivo para inducir la expresión de RNA de doble cadena (dsRNA) durante 2 horas.

Finalizada la inducción, los cultivos se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min para recuperar las bacterias y se descartó el sobrenadante, el botón celular fue homogenizado con caldo Luria fresco (con las mismas concentraciones de antibióticos e inductor), se prepararon alícuotas de estas bacterias a las cuales se les agregó glicerol estéril (c.b.p. 20% v/v) y se almacenaron a -70 °C para su preservación hasta el momento de su uso.

Todos los clones de RNAi utilizados en este trabajo se verificaron mediante secuenciación de DNA empleando oligonucleótidos universales diseñados para hibridar en el plásmido pL4440 (Ver tabla S1). La identidad de las secuencias obtenidas se verificó por

medio de la herramienta bioinformática Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, por sus siglas en inglés) la cual puede ser consultada en la siguiente dirección electrónica <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

8.19 Silenciamiento génico con RNAi en *C. elegans*

El silenciamiento de genes realizado en este trabajo, se hizo por medio la alimentación de *C. elegans* con bacterias productoras de RNAi específicos de los genes de interés. Larvas L1 sincronizadas previamente se crecieron hasta la etapa de adultos en placas de agar NGM para RNAi (que contenían las mismas concentraciones de antibióticos e inductor descritos en el apartado anterior). Las placas fueron inoculadas previamente con bacterias portadoras del RNAi de interés. Posteriormente se sincronizaron para obtener la generación *F1* (que se empleará en los experimentos de interés), la cual se creció en placas nuevas con las mismas características empleadas para el mantenimiento de la generación parental (*P0*) e inoculadas con bacterias portadoras del mismo RNAi de interés.

8.20 Ensayos de longevidad en gusanos RNAi

Larvas sincronizadas L1 de la generación *F1* de RNAi fueron crecidas en medios NGM para RNAi con ausencia de glucosa (condición control) o con glucosa (100 mM), y se permitió desarrollar la etapa L4. Aproximadamente 120 gusanos L4 sometidos a tratamiento con RNAi se transfirieron a placas de agar RNAi frescas para experimentos longevidad. Para garantizar la eficacia continuada del silenciamiento inducido por RNAi, los gusanos fueron alimentados todos los días con bacterias inducidas para la producción del RNAi de interés. El resto de los gusanos *F1* se cosecharon para evaluar la eficiencia del silenciamiento mediante PCR cuantitativa. El experimento de longevidad se desarrolló de la misma forma como se detalló en el apartado “**Ensayos de longevidad**”.

8.21 Extracción de RNA

El ARN total se purificó a partir de gusanos cultivados en todas las condiciones probadas usando Trizol (Invitrogen™, 15596026), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se purificó adicionalmente usando el sistema comercial RNeasy mini kit (Qiagen); el RNA obtenido fue disuelto en agua libre de nucleasas. La integridad del RNA se verificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% en la cual se observó las bandas de rRNA 5S y 18S presentes en cada una de las muestras obtenidas, adicionalmente el RNA se cuantificó por medio de espectroscopia UV/vis en el equipo Nanodrop ND1000 y la pureza de RNA se midió por medio de la relación de absorbancia 260/230 y 260/280. Todas las muestras fueron preservadas a temperatura de -70 °C.

8.22 RT-PCR cuantitativa

El cDNA se generó a partir de una reacción de retrotranscripción (RT) con 1 µg de RNA total en una reacción de 10 µl usando la enzima Revert Aid (Thermo Scientific, EP0441). Las mezclas de reacción de PCR cuantitativa (qPCR) se prepararon con 10 ng de cDNA como templado, además se empleó la mezcla de reacción SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y los oligonucleótidos a las concentraciones estandarizadas previamente (Consultar Tabla S1). Los ensayos se realizaron en el equipo Step One (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizaron al menos cinco repeticiones biológicas para evaluar la expresión de los genes de interés, cada réplica biológica se analizó por triplicado (replica técnica). El programa de PCR fue: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg, Tm (ver Tabla S1 para cada par de oligonucleótidos) durante 30 seg, y 70 °C durante 30 seg. La especificidad de los cebadores se corroboró por electroforesis de los productos de PCR en un gel de poliacrilamida al 12% y por análisis de punto de fusión (Melting point). El gen Y45F10D.4 se usó como gen de referencia de acuerdo con el reporte previo de (166). La tasa de expresión relativa con respecto al gen de referencia Y45F10D.4 se calculó como se describió anteriormente (167).

8.23 Extracción de DNA

El DNA total se purificó a partir de gusanos cultivados en todas las condiciones probadas usando Trizol (Invitrogen™, 15596026) como reactivo de lisis, siguiendo las recomendaciones del fabricante; el material genético se purificó adicionalmente usando el sistema comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen); el DNA obtenido fue disuelto en agua libre de nucleasas. La integridad del DNA se verificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%, adicionalmente se cuantificó por medio de espectroscopia UV/vis en el equipo Nanodrop ND1000 midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Todas las muestras fueron preservadas a temperatura de -70 °C.

8.24 Cuantificación de daño al DNA y número de copias de DNA mitocondrial

Los gusanos se sincronizaron como se mencionó anteriormente y se expusieron de la etapa larvaria L1 a L4 a concentraciones crecientes de glucosa: 20, 40, 80 o 100 mM, luego se extrajo el DNA total como se mencionó anteriormente; su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel. El ensayo de daño al DNA nuclear y mitocondrial se realizó con apego al procedimiento reportado por Furda y colaboradores (168), los oligonucleótidos empleados así como las condiciones de las reacciones se enlistan en la tabla S1.

El número de copias de ADN mitocondrial (ADNmt) se determinó mediante el uso de un ensayo de PCR cuantitativa en el cual dos reacciones de PCR amplifican un gen nuclear y mitocondrial respectivamente, los cuales poseen un número de copias conocido y definido en los respectivos genomas en *C. elegans* (168). Una reacción produce un amplicón de 195 pb, la cual es parte del gen *nduo-5* que codifica la subunidad 5 del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa. La otra reacción amplifica parte del gen nuclear *flr-1* que codifica para un canal de sodio, esta reacción genera un fragmento de 225 pb que sirve como control de concentración interna. Para las reacciones de PCR se empleó la enzima AccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich D8045). Los productos de PCR así como el DNA inicial que se empleó en las reacciones de PCR se cuantificaron por fluorescencia usando el sistema comercial Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay (Invitrogen). Los valores de fluorescencia de los productos de PCR obtenidos se ajustaron restando la fluorescencia de una muestra que contiene solo mezcla de reacción (blanco). El número de copias de DNAmT se calculó como la relación de los valores de fluorescencia de los productos de PCR para el fragmento mitocondrial / fragmento nuclear.

8.25 Ensayos de respiración celular y de funcionalidad de la cadena de transporte de electrones

A partir de larvas L4 crecidas en las distintas condiciones de glucosa de este estudio, se obtuvieron fracciones mitocondriales de acuerdo a lo reportado por Li y cols. (158). Se evaluó la función de la cadena respiratoria por medio de reacciones colorimétricas de acuerdo con lo reportado por Spinazi and cols (169). Se emplearon 5 µg de muestra en cada una de las reacciones, las cuales se prepararon en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud, las absorbancias obtenidas de las cinéticas enzimáticas se midieron empleando el espectrofotómetro Spectronic Genesys 5. Las reacciones se midieron durante 3 minutos con mediciones cada 10 seg. La actividad específica se calculó como se muestra en la sección de información suplementaria.

8.26 Aislamiento de nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP)

Los niveles de ATP, ADP y AMP se cuantificaron por medio de HPLC, aproximadamente 100 mg de gusanos fueron colectados con amortiguador M9, se dejaron sedimentar para retirar lo más posible el volumen del amortiguador, posteriormente se adicionaron 800 µl de ácido perclórico al 8% y se homogenizó el pellet por medio de sonicación en hielo para evitar la degradación de los nucleótidos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se neutralizó con una solución 3 M de hidróxido de potasio (6% volumen final), se mezcló con vortex y centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C para sedimentar las sales y los restos de cutícula del gusano. El sobrenadante neutralizado (aprox. 720 µl) con los nucleótidos de adenina se colectaron en un nuevo tubo en el cual se ajustó el pH a 4.2 al agregar aproximadamente 80 µl de amortiguador de acetatos (5.3 mL de 1 M acetato de sodio + 14.7 mL de 1 M ácido acético).

8.27 Identificación de nucleótidos de adenina por HPLC

Una vez alcanzado el pH necesario, la solución de nucleótidos se analizó por medio del sistema de HPLC (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) serie 200 UV/VIS equipado con un detector de fluorescencia (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA; la detección por fluorescencia se realizó empleando las siguientes longitudes de onda: λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 420 nm. Las muestras se inyectaron en una columna ACE 5-µm C18 (150 Å~4.6 mm) (ACE HPLC Columns; Advanced Chromatography Technologies, Ltd., Aberdeen, UK). La fase móvil consistió en una solución 1 M KH_2PO_4 , 20% de metanol y 4 mM de Ion Pair cocktail Q6 (Fosfato de hexiltriethylamonio), el flujo empleado fue de 1 mL/min. La concentración de nucleótidos en las muestras se determinó por medio de la relación de las áreas de cada uno de los picos correspondientes a cada nucleótido, con respecto al área obtenida por un estándar del mismo nucleótido de concentración conocida.

8.28 Determinación de la actividad enzimática de citrato sintasa y malato sintasa

A partir de extractos crudos de mitocondrias, evaluamos la actividad de la enzima citrato sintasa empleando el sistema comercial Citrate Synthase Assay Sistema (CS0720-1KT, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por su parte la determinación de la actividad de malato sintasa se realizó por medio de la reacción de

conjugación de acetil-coA con el reactivo de Ellman (DTNB) tal y como se muestra en la nota técnica de Sigma-Aldrich (170).

8.29 Microscopia electrónica de transmisión

Para este ensayo, se analizaron 2 réplicas biológicas independientes. Larvas L4 de cada condición (glucosa 0, 20, 40, 80 o 100 mM) fueron sometidas a un proceso de fijación de tejidos empleando una solución de amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 7.4) con 2.5% de glutaraldehído y 4% de paraformaldehído. Posteriormente se fijaron con tetraóxido de osmio al 1% y se deshidrataron en una serie de soluciones en grados ascendentes de etanol, finalmente los nematodos fueron embebidos en epoxi resina EPON™. Los cortes de las secciones anatómicas de 1 µm de grosor, se obtuvieron con un ultramicrotomo Leica (EM UC6). Se realizó una tinción con azul de toluidina y se examinaron con un microscopio óptico para seleccionar e identificar las áreas de análisis para la microscopia electrónica. Se realizaron nuevos cortes para obtener secciones ultradelgadas (60–90 nm) las cuales se colectaron en mallas cubiertas con membrana Formvar (Agar Scientific, AGS162); las secciones se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cambios estructurales de 50 campos para cada muestra se registraron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 (Osaka, Japón).

8.30 Medición de longitud y área de nematodos

50 larvas L4 de cada condición (glucosa 0, 20, 40, 80 o 100 mM) fueron colectados al azar y fotografiados empleando el objetivo 20X del microscopio Nikon Optiphot-2. Los ensayos se realizaron en tres réplicas independientes. Todas las imágenes fueron tomadas con la misma distancia focal y abertura del obturador; las imágenes fueron analizadas con el software Image J (171) (<http://imagej.nih.gov/ij/>). La longitud se midió desde la punta de la cola hasta la punta de la cabeza, mientras que las áreas se obtuvieron al delinear todo el cuerpo, las mediciones se realizaron empleando un micrómetro calibrado marca Olympus (OBM1/100).

8.31 Análisis estadísticos

8.31.1 Estadística descriptiva

Cada conjunto de datos fue analizado por medio de estadística descriptiva para conocer su distribución, y forma. Para evaluar si la distribución de cada conjunto de datos se asemejaba a la distribución normal, se empleó la prueba de Shapiro – Wilk cuando el tamaño de muestra fue menor de 30 observaciones ($n < 30$); en tanto para muestras mayores a 30 observaciones ($n > 30$) se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

8.31.2 Comparación de múltiples grupos y análisis a posteriori

Para evaluar las diferencias entre los grupos analizados, se empleó la prueba de ANOVA cuando los conjuntos de datos siguieron una distribución normal y cumplieron el principio de homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas a través de todos los grupos) el cual se evaluó con la prueba de Bartlett. Cuando la distribución del conjunto de datos fue distinto a la distribución normal o el supuesto de homocedasticidad no se cumplió, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Para evaluar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, con respecto a la condición control, se empleó la prueba de Holm-Šidák en conjunto con la ANOVA como análisis *a posteriori* (*post hoc*); mientras que para la prueba de Kruskal-Wallis, se empleó la prueba de Dunn.

8.31.3 **Representación gráfica de datos**

Los datos se muestran como el valor de la media \pm error estándar de la media (SEM; por sus siglas en inglés) para muestras que cumplieron los supuestos de normalidad en su distribución, cuando esto no se cumplió, los datos se representaron como la mediana \pm rango intercuartil (IQR; por sus siglas en inglés). Valores $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.0.

8.31.4 **Análisis de longevidad/supervivencia**

Durante los ensayos de longevidad, los individuos que cumplieron con las características mencionadas a continuación fueron censurados en el análisis estadístico: fenotipo “embolsado” (bagging), aquellos que no fue posible recuperarlos del agar y los que se adhirieron a las paredes de las placas, ya que los decesos por estas causas no son atribuibles *per se* a los tratamientos con glucosa.

Los datos de longevidad fueron analizados por medio del estimador de Kaplan-Meier; para evaluar las diferencias en las curvas de supervivencia de los distintos tratamientos y cepas, se empleó la prueba de Mantel-Cox (log-rank) y la prueba de Bonferroni como análisis *a posteriori* (*post hoc*). Todos los análisis se realizaron con el programa en línea OASIS 2 (172).

9 RESULTADOS

9.1 Cambios morfológicos y fisiológicos en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa

Larvas de la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* fueron alimentados desde la etapa L1 hasta la etapa L4 con dietas altas en glucosa en concentraciones crecientes (20, 40, 80 y 100 mM) (para mayor detalle, véase materiales y métodos). Los cambios morfológicos y fisiológicos fueron evaluados en la etapa L4 (sólo para longevidad y fertilidad se estudiaron los gusanos en estado adulto).

9.1.1 *Los gusanos alimentados con glucosa, muestran alteraciones en la captación y asimilación de glucosa y en los niveles de triglicéridos.*

La alimentación de *C. elegans* suplementada con concentraciones crecientes de glucosa en el medio, incrementó los niveles endógenos de glucosa en el nematodo (Figura 12a). El contenido de glucosa se incrementó 2, 3, 14 y 11 veces en los gusanos alimentados con 20, 40, 80 y 100 mM de glucosa respectivamente comparado con la condición control (16.63 ± 1.82 mg/dL). Como puede observarse en la fig. 12a, la acumulación de glucosa observada es concentración dependiente, llegando a su meseta en la concentración de 80 mM. Dado el resultado anterior, se analizó si las dietas altas en glucosa tenían algún impacto en la asimilación de la misma; para ello realizamos el ensayo de captación de glucosa, por medio de un análogo, el 2-desoxi-glucosa (2DG) adaptado a *C. elegans* (anexo 1: Materiales y métodos).

Observamos que la asimilación de glucosa se incrementó en 2-, 4- y 7 veces en los gusanos alimentados con 40, 80 y 100 mM de glucosa respecto al control (control= 17.53 ± 2.29 nmol/mg gusanos), similar a como sucede con los mamíferos, los gusanos tratados durante dos horas con insulina exógena (80 mU/mL) incrementaron la asimilación del análogo de glucosa 2DG (Fig. 12b). Con este ensayo constatamos que las dietas altas en glucosa no alteran la asimilación de la misma en *C. elegans*. Por otra parte, evaluamos el contenido de lípidos (Fig. S1), así como los niveles de triglicéridos en los nematodos sometidos a los regímenes previamente descritos; observamos que los triglicéridos aumentaron 2 veces (condición: 40 mM de glucosa) y 3 veces (condiciones: 80 y 100 mM de glucosa) respecto a la condición control (control= 22.48 ± 0.24 mg/dL) (Fig. 12c).

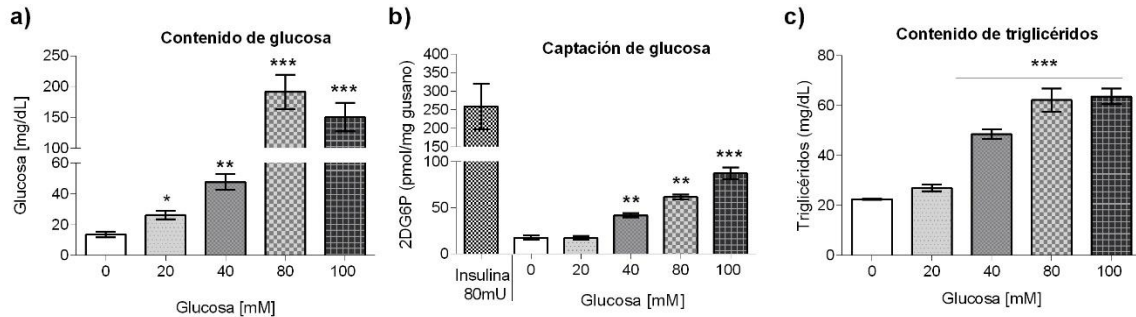


Fig. 12 Contenido de glucosa, triglicéridos y consumo de glucosa en gusanos alimentados con glucosa

Los gusanos se alimentaron desde la etapa larvaria L1 a L4 con concentraciones de 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa, posteriormente se determinó: **a)** contenido de glucosa, **b)** captación de glucosa y **c)** contenido de triglicéridos. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para evaluar las comparaciones múltiples; los resultados se presentan como la mediana \pm rango intercuartílico (IQR) ($n = 6$). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

9.1.2 Las dietas altas en glucosa alteran la morfología de *C. elegans*

Los gusanos alimentados con dietas suplementadas con glucosa (20, 40, 80 and 100 mM) incrementaron su longitud 2, 13, 16 and 17% con respecto a la condición control (0.67 ± 0.01 mm), además incrementaron su área con respecto al control (1.92 ± 0.04 mm²) en 13, 22, 36, and 44% en las condiciones 20, 40, 80 y 100 mM, respectivamente. Cabe destacar que los incrementos en la talla y el área siguieron un comportamiento dependiente de la concentración de glucosa en la dieta (Fig. 13).

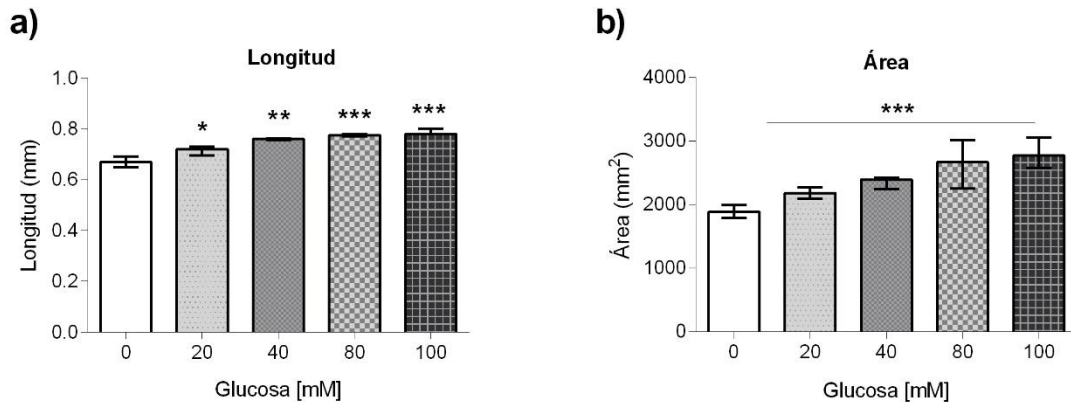


Fig. 13 Longitud y área de gusanos alimentados con glucosa

Los gusanos se alimentaron desde la etapa larvaria L1 a L4 con concentraciones de 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa, posteriormente se midió su longitud **(a)** y su área **(b)**; los experimentos se realizaron en tres repeticiones independientes. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones múltiples; los resultados se presentan como la media \pm SEM ($n=50$). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

9.1.3 La glucosa modifica el potencial reproductivo de *C. elegans*

Por otra parte, evaluamos si éstos regímenes alimenticios tendrían algún efecto en el potencial reproductivo de *C. elegans*; se observó que las dietas altas en glucosa no tuvieron un efecto adverso sobre la reproducción, no obstante al extender nuestras observaciones a generaciones subsecuentes, sometidas a las mismas condiciones que a los parentales (P0), observamos que la progenie disminuyó en un 25-39% en la generación F1 y 45-50% en la F2 respecto a la P0 (Fig. 14a).

Otro efecto fue el incremento de los defectos en la puesta de huevecillos. Observamos un incremento significativo del fenotipo “bagging” (*embolsado*) -el cual se presenta cuando el adulto hermafrodita no es capaz de expulsar los embriones fuera del útero y éstos eclosionan en su interior-. Como se observa en la figura 14b, las concentraciones de 40, 80 y 100 mM de glucosa incrementaron un 67-70% la frecuencia de éste fenotipo respecto a control (20 larvas embolsadas).

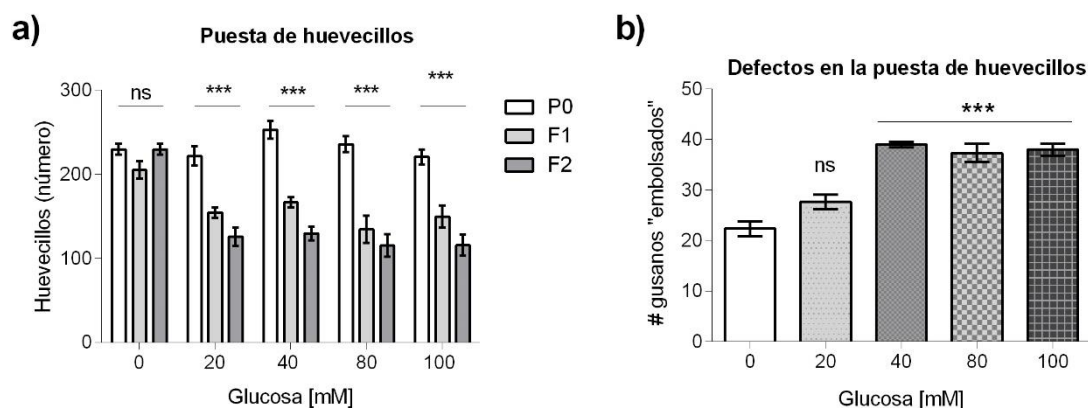


Fig. 14 Evaluación de la fertilidad y frecuencia de defectos en la puesta de huevecillos (bagging) en gusanos alimentados con glucosa

a) Los gusanos se alimentaron con concentraciones de 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa durante tres generaciones (P0, F1 y F2) y se determinó el número de huevecillos en cada generación. **b)** Los gusanos se alimentaron con concentraciones de 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa durante solo una generación (P0) y se determinó la frecuencia del fenotipo bagging. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA (de dos vías en el caso de la puesta de huevecillos) y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones múltiples; los resultados se presentan como la media \pm SEM (n=100). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

9.2 Las dietas altas en glucosa incrementan la actividad de enzimas transaminasas, asociadas al envejecimiento en *C. elegans*

Reportes previos han mostrado que la actividad de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FAL) incrementa conforme los gusanos envejecen (173, 174); en este trabajo se evaluó la actividad de dichas enzimas con el propósito de determinar en una primera aproximación si las dietas altas en glucosa, podrían promover un proceso de envejecimiento prematuro.

Se observó un incremento de 20-30% de la actividad de la enzima AST en las condiciones de 20, 40 y 80 mM, y una reducción del 10-15% en la condición de 100 mM con respecto al control (82.7 U/μg proteína) (Fig. 15a). Respecto a la fosfatasa alcalina, se observó un incremento de su actividad en un 20-30% respecto al control (25 U/μg proteína) en las condiciones de 20 y 40 mM, observándose el máximo incremento (45%) en la condición de 80 mM y una ligera reducción (5%) en 100 mM de glucosa (Fig. 15b).

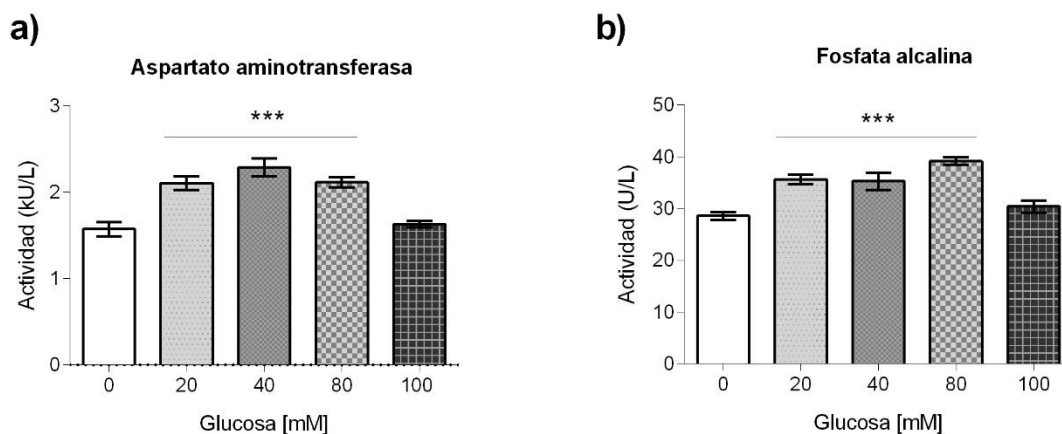


Fig. 15 Actividad de enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FAL) en gusanos alimentados con glucosa

Los gusanos se expusieron desde la etapa larvaria L1 a L4 a glucosa en concentraciones de 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa, posteriormente se midieron las actividades de la enzima **a)** AST y **b)** FAL. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones múltiples; los resultados se presentan como la media \pm SEM (n=12). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

9.3 Inducción de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa

Los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa incrementaron la actividad de las enzimas superóxido dismutasa mitocondrial (mtSOD) en un 57-100% en las condiciones probadas, lo anterior con respecto a la condición control (30.8% de actividad) (Fig. 16a). De manera similar, la enzima catalasa (CAT), incrementó su actividad en 98% respecto al control (3.74 kU/μg proteína) (Fig. 16b). Por otra parte, Se midieron los niveles de MDA (malondialdehído) como marcador de peroxidación de lípidos, se observó que todas las concentraciones de glucosa probadas incrementaron los niveles de MDA de 19-50% con respecto al control (0.72 nmol/mg proteína) (Fig. 16c). Para corroborar si las observaciones anteriores eran atribuibles a estrés oxidante, se expusieron gusanos crecidos en condiciones estándar a concentraciones subtóxicas de paraquat (0.2mM) para inducir estrés oxidante (Fig. S2). En estos gusanos se observaron incrementos en las actividades enzimáticas de mtSOD y CAT; además de un incremento en la peroxidación de lípidos. Los resultados anteriores, en conjunto, sugieren que los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa experimentan estrés oxidante.

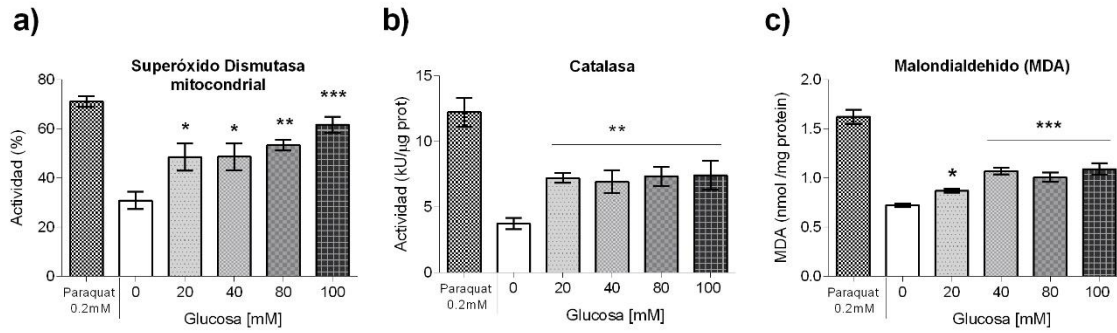


Fig. 16 Inducción de enzimas del sistema antioxidante en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa

Los gusanos se expusieron desde la etapa larvaria L1 a L4 a glucosa en concentraciones de 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa, posteriormente se midió la actividad enzimática de: **a)** superóxido dismutasa mitocondrial (mtSOD), **b)** catalasa (CAT) y **c)** malondialdehído. En el caso de mtSOD, los resultados se presentan como (%) referidos al porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima xantina oxidasa atribuida a SOD. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones múltiples; los resultados se presentan como la media \pm SEM (n=12). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

Por otra parte, como la actividad de mtSOD mostró un aumento en los gusanos tratados con glucosa, se evaluó la expresión de su gen codificante (*sod-3*), mediante el uso de la cepa transgénica CF1553 *muls84* la cual posee una construcción genética que expresa la proteína reportera verde fluorescente (GFP) la cual está fusionada al promotor y al gen *sod-3*. Para este ensayo, primero se crecieron los gusanos en medios suplementados con glucosa hasta que alcanzaron la etapa larvaria L4; posteriormente, se indujo la expresión de la construcción genética (*Psod-3::GFP*) por choque térmico (vea Materiales y Métodos). Se observó que la expresión del reportero se incrementó de una forma dependiente de la concentración de glucosa empleada, con un máximo a 80 mM de glucosa; por otra parte se observó una ligera disminución de la expresión del reportero en la condición de 100 mM de glucosa (Fig. 17).

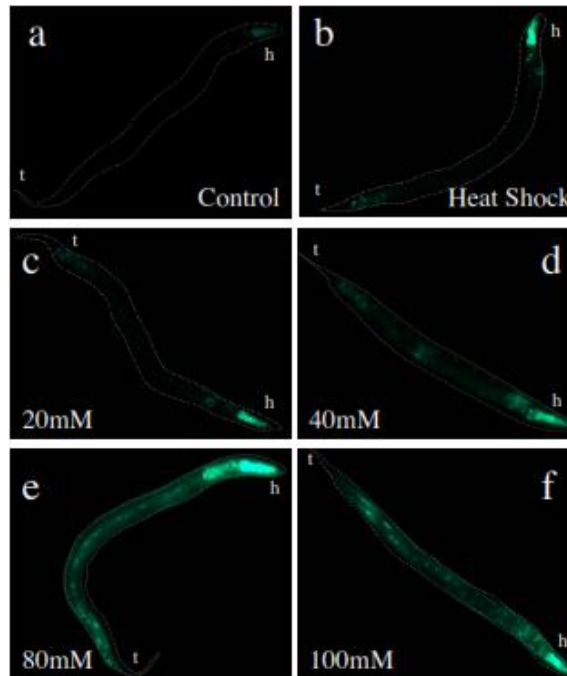


Fig. 17 La expresión del transgénico *Psod-3::GFP* después del choque térmico es mayor cuando los gusanos fueron alimentados con dietas altas en glucosa

Gusanos transgénicos *Psod-3::GFP* se expusieron desde el estadio larvario L1 a L4 a distintas concentraciones de glucosa. a) Control (sin choque térmico); (b) control (con choque térmico); c) 20, d) 40, e) 80 y f) 100 mM de glucosa. Para inducir la expresión del reportero, los animales se expusieron a un choque térmico de 31 °C durante 8 h. Después del choque térmico, los gusanos se observaron en un microscopio de fluorescencia para analizar la expresión de la proteína reportera GFP. Se muestran imágenes representativas para cada caso, las letras “h y t” indica la cabeza y cola de los gusanos, respectivamente. Se realizaron dos réplicas independientes del experimento observándose resultados similares. La figura S3 muestra el análisis de expresión relativa (fluorescencia) de la proteína reportera.

Finalmente, se evaluó el contenido de glutatión total, la forma reducida (GSH) y el disulfuro de glutatión (GSSG) en los gusanos alimentados con glucosa; se observó un incremento en los niveles de ambas formas (reducida y oxidada) de glutatión (Tabla 2), no obstante, el cociente GSH/GSSG no mostró cambios significativos en estas condiciones. El tratamiento con paraquat incrementó el contenido total de glutatión y el cociente (GSH/GSSG) decreció en un 20%.

Tabla 2 Cuantificación de glutatión en gusanos alimentados con glucosa

Glucosa (mM)	Glutatión total (nmol/mg gusano)	GSH (nmol/mg gusano)	GSSG (nmol/mg gusano)	Cociente GSH/GSSG
0	1.77±0.09	1.69±0.09	0.08±0.00	22.33±0.77
20	2.52±0.26 ^a (42.37)	2.39±0.22 ^a (41.42)	0.14±0.05 ^b (75)	22.64±1.64
40	2.85±0.61 ^a (61.02)	2.72±0.55 ^a (60.95)	0.16±0.05 ^b (100)	23.69±3.56
80	3.22±0.24 ^b (81.92)	3.08±0.25 ^b (82.25)	0.15±0.01 ^b (87.5)	22.54±1.29
100	3.19±0.22 ^b (80.23)	3.09±0.26 ^b (82.84)	0.12±0.03 ^b (50)	25.91±7.55
0.2mM Paraquat	3.22±0.33 (81.92)	2.81±0.31 (66.27)	0.16±0.02 (100)	17.90±0.32

Abreviaturas: GSH: Glutatión; GSSG: disulfuro de glutatión. Los datos se muestran en la tabla son la media ± la desviación estándar; Las cifras entre paréntesis representan el porcentaje de cambio respecto al control (0mM de glucosa); Los datos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para evaluar las comparaciones múltiples; (n=5) ^aP<0.05, ^bP<0.01, ^cP<0.001.

9.4 Evaluación de genotoxicidad inducida por dietas altas en glucosa en *C. elegans*

Se evaluó por medio de PCR cuantitativa, la presencia de daño al DNA nuclear y mitocondrial así como el número de copias de este último. Lo anterior con el propósito de investigar si las altas concentraciones de glucosa tienen efectos genotóxicos en los gusanos. Como se muestra en la figura 18, no se observaron cambios significativos en el número de lesiones en el DNA nuclear y mitocondrial (Fig. 18a-b); sin embargo, la abundancia de material genético mitocondrial se incrementó significativamente en la condición de 100 mM (Fig. 18c). Lo anterior sugiere que las dietas altas en glucosa no tienen efectos genotóxicos en *C. elegans*, no obstante, existe un efecto inductor de la síntesis del material genético mitocondrial.

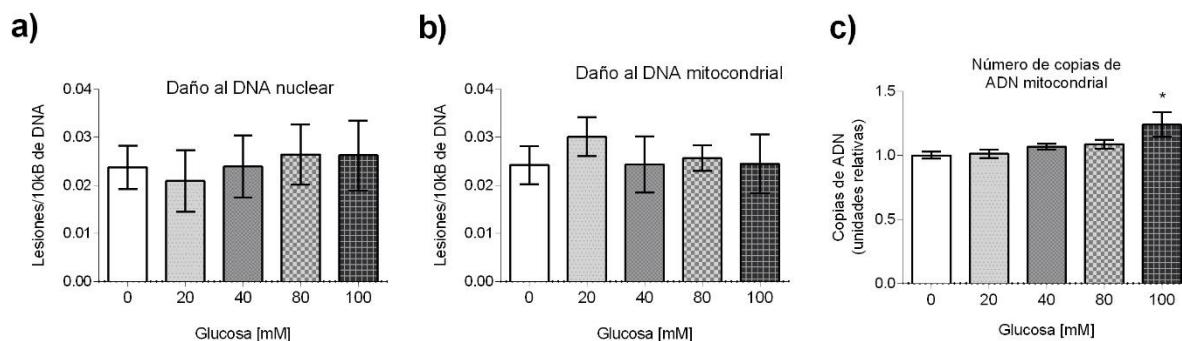


Fig. 18 Daño al DNA nuclear y mitocondrial en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa

Los gusanos se expusieron desde la etapa larvaria L1 a L4 a glucosa en concentraciones de 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa, posteriormente se purificó el DNA total y se cuantificó: **a)** el número de lesiones en el DNA nuclear, **b)** lesiones de DNA mitocondrial y **c)** número de copias de DNA mitocondrial. La medición se realizó por medio de PCR cuantitativa. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones múltiples; los resultados se presentan como la media \pm SEM (n=6). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

9.5 Los gusanos alimentados con glucosa presentan alteraciones estructurales a nivel celular

Se analizó por medio de microscopia electrónica células musculares y células germinales de los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa. En los gusanos control, observamos una morfología típica en las células germinales y musculares. En el caso de las células germinales, éstas tienen un núcleo central bien definido, citoplasma electro-denso por la abundancia de ribosomas y glucógeno, además de grandes vacuolas y mitocondrias; la membrana externa de las mitocondrias y las finas crestas son poco evidentes (Fig. 19a). Sin embargo, en los gusanos alimentados con glucosa las células germinales presentaron daños significativos en mitocondrias y cambios en su citoplasma.

En todas las condiciones de glucosa encontramos un “hinchamiento” de las mitocondrias y de sus cisternas (Fig. 19b, c, d, e). En los tratamientos de 40, 80 y 100 mM de glucosa, las mitocondrias son de mayor tamaño y presentaron ruptura de la membrana externa (Fig. 19c, d, e), disminución de la electrodensidad del citoplasma y ampliación de las cisternas de retículo endoplásmico. Particularmente en la condición de 100 mM el daño a las membranas de las mitocondrias es mayor y hay una mayor cantidad de retículo endoplásmico.

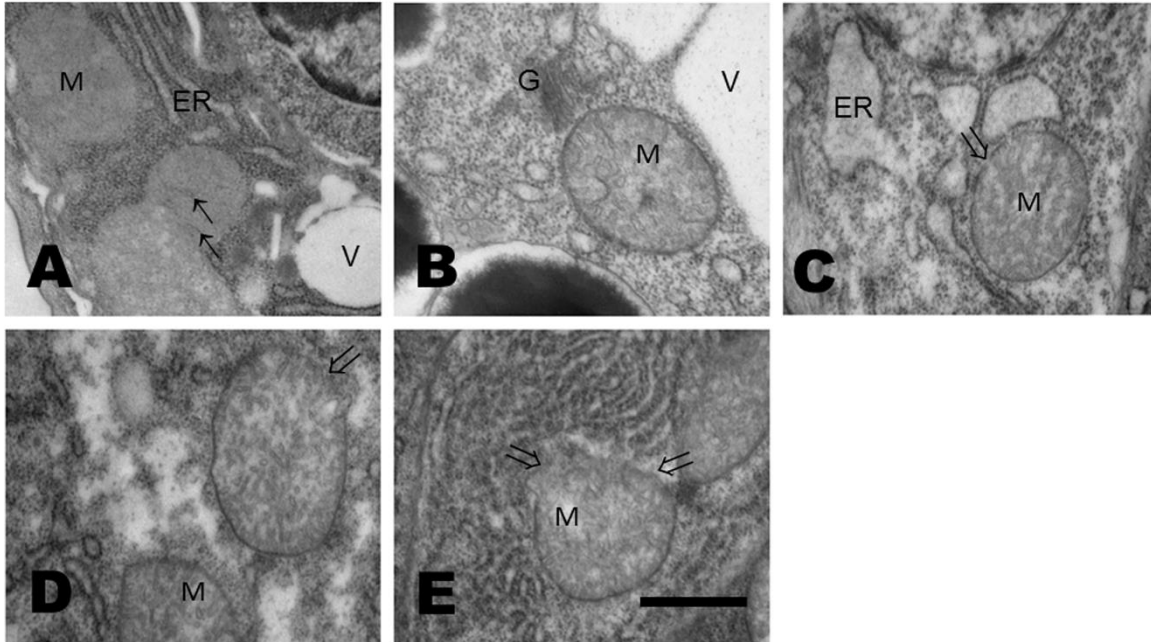


Fig. 19 Micrografías de células germinales de *Caenorhabditis elegans* alimentados con distintas concentraciones de glucosa

A) Control, B) 20, C) 40, D) 80 y E) 100 mM. En la condición control las membranas de las crestas de las mitocondrias (M) son finas y tenues (flechas pequeñas); en las condiciones de glucosa probadas, las crestas son más evidentes debido a un aparente “hinchamiento”. La ampliación de las cisternas del retículo endoplásmico (ER) en la condición de 40mM fue mayor que en 20 y 80 mM. En 100 mM se observó mayor cantidad de retículo, además la ruptura de la membrana externa (\Rightarrow) de las mitocondrias fue extensa. Abreviaturas: G, cisternas de Golgi; V: vacuolas; M: mitocondria; ER: Retículo endoplásmico. Las figuras se muestran a un aumento de 50000X; la barra representa 500 nm.

Por su parte, las células musculares en condiciones control mostraron mitocondrias con finas crestas, las miofibrillas tienen un aspecto organizado y compacto (Fig. 20a). En todas las concentraciones de glucosa probadas, se observaron daños en las mitocondrias similares a las observadas en células germinales (Fig. 20), además de desorganización de los miofilamentos y disminución del material electrodensito de la línea Z (Fig. 20 c, d, e).

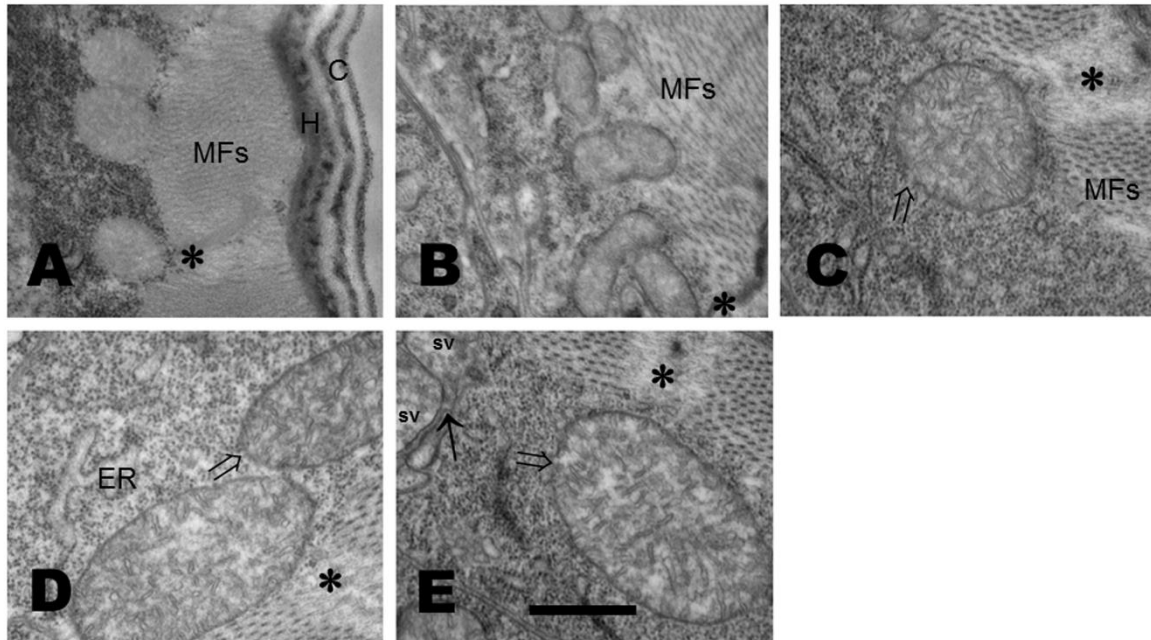


Fig. 20 Micrografías de células musculares de *Caenorhabditis elegans* alimentados con distintas concentraciones de glucosa

A) Control, B) 20, C) 40, D) 80 y E) 100 mM. En la condición control las mitocondrias y las miofibrillas tienen una estructura compacta. En los tratamientos de 40, 80 y 100 mM las mitocondrias están más “hinchadas” respecto a la condición de 20 mM; la membrana externa de las mitocondrias presenta zonas de ruptura (\Rightarrow), las miofibrillas están desorganizadas y la electrodensidad de la línea Z (***) está reducida en los tratamientos de 40, 80 y 100 mM. Abreviaturas: C, cutícula; H, hipodermis; MFs, miofibrillas; línea Z (**); sv: vesícula pequeña; la flecha delgada indica la sinapsis. Las figuras se muestran a un aumento de 50000X; la barra representa 500 nm.

Dados los hallazgos anteriores de alteraciones estructurales en las mitocondrias, se cuantificaron los cambios en el diámetro de las mitocondrias (Fig. 21a), a fin de inferir si existían cambios en sus dimensiones inducidos por la alimentación por glucosa. Además, se cuantificó la frecuencia de daño en las mitocondrias (Fig. 21b). Lo anterior, se realizó en mitocondrias de ambas estirpes celulares. No se observaron cambios significativos en el diámetro mitocondrial en los gusanos alimentados con glucosa en concentraciones de 20 y 40 mM, sin embargo se observó una reducción en los diámetros en la condición de 80 mM y un posterior incremento en los diámetros mitocondriales de los gusanos alimentados con 100 mM de glucosa (Fig. 21a). Respecto al daño mitocondrial, se observó en todas las condiciones de glucosa probada la presencia de mitocondrias dañadas (hinchazón, modificación de las crestas o ruptura de las membranas) siendo la concentración de 100 mM la que mostró daños en todas las mitocondrias analizadas (Fig. 21b).

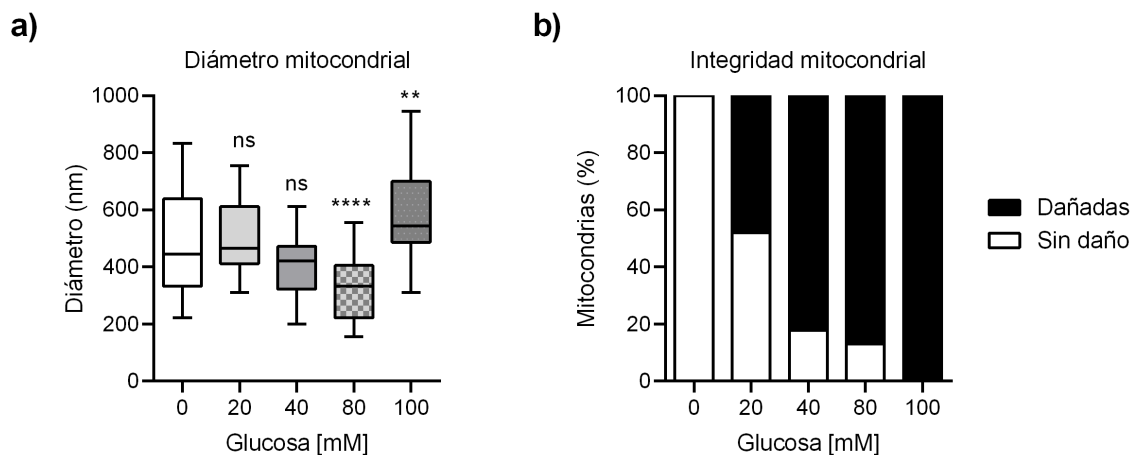


Fig. 21 Diámetro mitocondrial e integridad mitocondrial en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa.

Los gusanos se expusieron desde la etapa larvaria L1 a L4 a glucosa en concentraciones de 0, 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa. Posteriormente fueron fijados y procesados para microscopía electrónica de células musculares y células de la gónada de las cuales se analizó **a)** diámetro mitocondrial y **b)** la integridad mitocondrial. Los datos del diámetro mitocondrial fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones entre grupos (n=30-50 mitocondrias) a partir de dos réplicas biológicas. La integridad mitocondrial se muestra como la frecuencia de daño observada en 90-95 mitocondrias por cada grupo, las cuales fueron inspeccionadas visualmente a partir de imágenes de microscopía electrónica de transmisión. Cada mitocondria se examinó y marcó como dañada si se observaba hinchazón, modificación de las crestas o ruptura de las membranas mitocondriales. Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: ns=no significativo, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

9.6 Alteraciones en la fisiología mitocondrial producidas por altas concentraciones de glucosa

En esta sección se muestran los resultados de la evaluación de la funcionalidad de las mitocondrias de gusanos alimentados con glucosa, esto a través de la medición de la actividad de diversas enzimas relacionadas tanto con el metabolismo, como con la cadena de transporte de electrones, así como la medición de los niveles de nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP).

9.6.1 Evaluación de la actividad de enzimas del ciclo de Krebs

Se analizó la actividad de tres enzimas mitocondriales pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs): citrato sintasa, malato sintasa y succinato deshidrogenasa. La actividad de citrato sintasa mostró incrementos graduales en las distintas condiciones probadas, observándose el máximo de actividad en la concentración de 100 mM (Fig. 22a); por su parte la actividad de malato sintasa, disminuyó su actividad en todas las condiciones de glucosa probadas (Fig. 22b). Respecto a la actividad de succinato deshidrogenasa, ésta se evaluó como parte de la medición de la actividad del complejo II de la cadena de transporte de electrones, la cual se muestra en la figura 22.

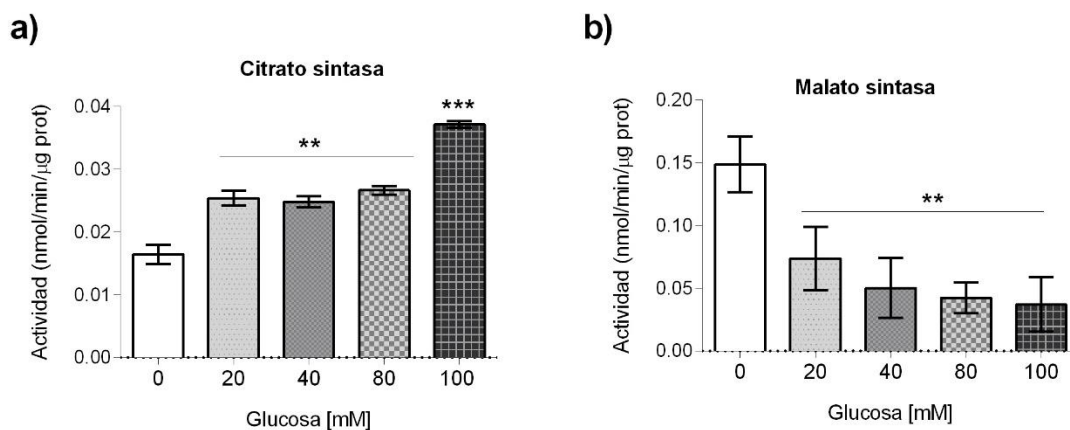


Fig. 22 Actividad de citrato sintasa y malato sintasa en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa

Los gusanos se expusieron desde la etapa larvaria L1 a L4 a glucosa en concentraciones de 0, 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa, posteriormente se obtuvieron extractos crudos de los cuales se cuantificó la actividad de las enzimas **a)** citrato sintasa y **b)** malato sintasa. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones múltiples, los resultados se presentan como la media \pm SEM (n=12). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

9.6.2 Las dietas altas en glucosa alteran la función de la cadena de transporte de electrones

A partir de extractos crudos de mitocondrias provenientes de gusanos alimentados con concentraciones crecientes de glucosa (20-100 mM), se analizó la función de los cinco complejos mitocondriales que forman parte del sistema de la fosforilación oxidativa. Como se observa en la fig. 23 la suplementación con glucosa altera la actividad de todos los complejos de la fosforilación oxidativa. En el complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa) no se observaron cambios significativos en su actividad respecto a la condición control y en las condiciones de 20 y 40 mM de glucosa, mientras que en las condiciones 80 y 100 mM de glucosa se observó una disminución de su actividad de aproximadamente 50% (Fig. 23a).

Por su parte en el complejo II (succinato deshidrogenasa) se observó que las condiciones de 20 y 40 mM de glucosa promovieron un incremento de su actividad con respecto a la observada en condiciones control; sin embargo en las condiciones de 80 y 100 mM los niveles de actividad fueron similares a los observados en condiciones normales (Fig. 23b). Respecto al complejo III (decilubiquinol citocromo c oxidoreductasa), no se observaron cambios significativos en su actividad en la condición de 20 mM de glucosa, no obstante en las condiciones de 40 y 80 mM de glucosa se observó un incremento de dos veces su actividad con respecto al control; mientras que en 100 mM la actividad de este complejo disminuyó a niveles por debajo de los registrados en el control (Fig. 23c). Por otra parte, en el complejo IV (citocromo c oxidasa) se observó una reducción de su actividad en prácticamente todas las condiciones analizadas, excepto en 20 mM de glucosa (Fig. 23d). Finalmente, en el complejo V (ATP sintasa) el consumo de oxígeno se incrementó de 2-3 veces respecto al control en las condiciones de 20 y 40 mM, sin embargo en 80 y 100 mM el consumo de oxígeno se redujo a niveles por debajo de los observados en los controles (Fig. 23e).

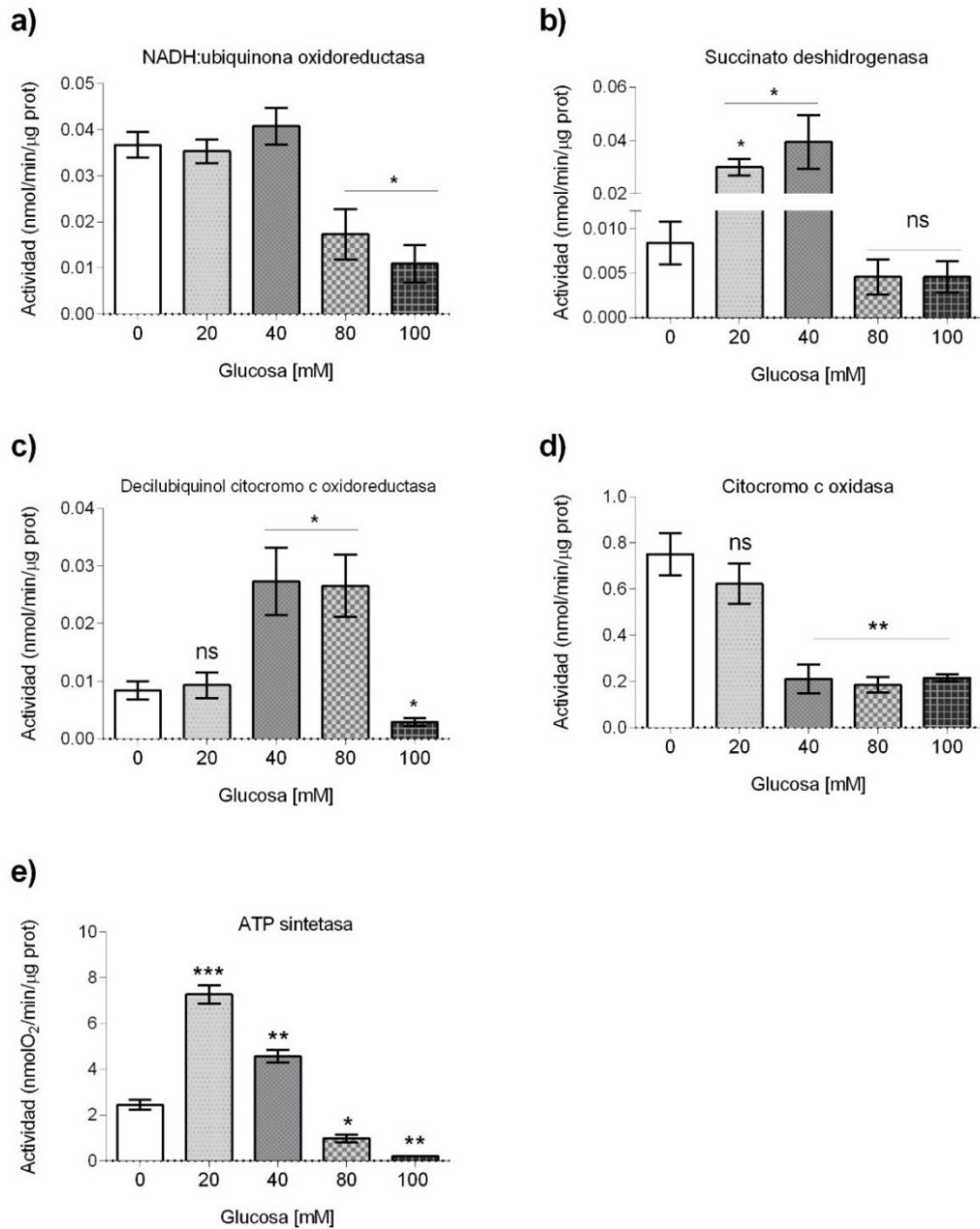


Fig. 23 Actividad de la cadena de transporte de electrones en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa

Los gusanos se expusieron desde la etapa larvaria L1 a L4 a glucosa en concentraciones de 0, 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa, posteriormente se aisló la fracción mitocondrial de la cual se midió la actividad de **a)** NADH ubiquinona oxidoreductasa, **b)** succinato deshidrogenasa, **c)** decilubiquinol citocromo c oxidoreductasa, **d)** citocromo c oxidasa y **e)** ATP sintetasa. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para evaluar las comparaciones múltiples; los resultados se presentan como la mediana \pm rango intercuartílico (IQR) (n = 7). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

9.6.3 Cuantificación de nucleótidos de adenina en gusanos alimentados con glucosa

Se evaluó el contenido de ATP, ADP y AMP en gusanos alimentados con glucosa en concentraciones de 20, 40, 80 y 100 mM. Como se muestra en la Fig. 24, la alimentación con glucosa no alteró el contenido de los nucleótidos de adenina (Fig. 24a-c). Adicionalmente se evaluaron los cocientes AMP/ATP, ADP/ATP y la carga energética (Fig. 24d, e, f), sin embargo no se observaron diferencias significativas en estos cocientes en las condiciones probadas.

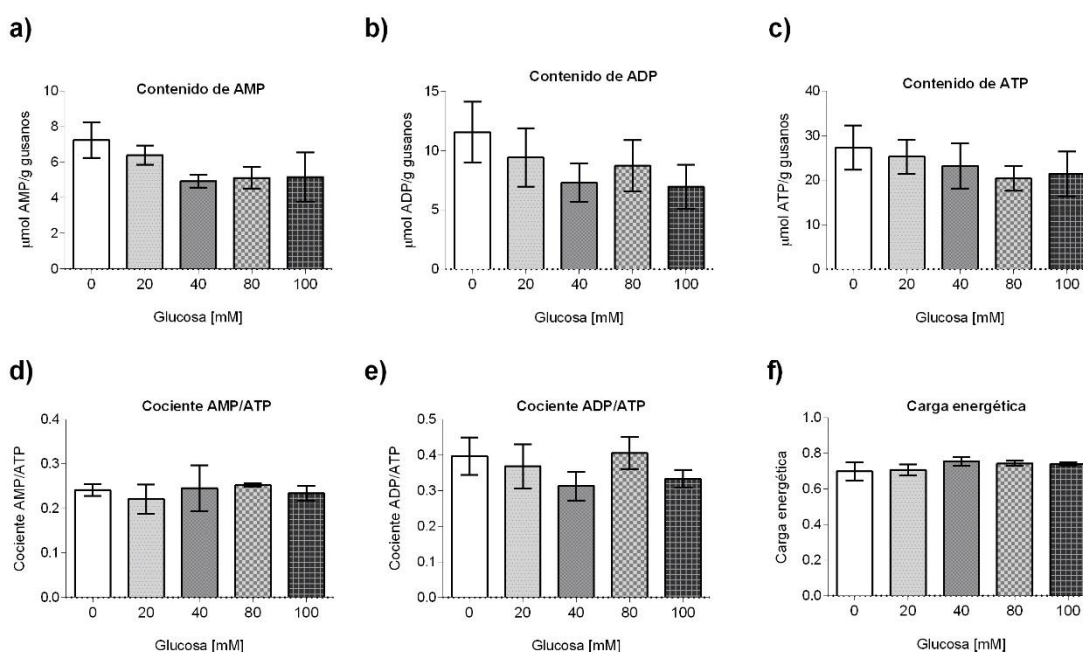


Fig. 24 Cuantificación de nucleótidos de adenina en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa

Los gusanos se expusieron desde la etapa larvaria L1 a L4 a glucosa en concentraciones de 0, 20, 40, 80 o 100 mM de glucosa, posteriormente se cuantificó el contenido de **a)** AMP, **b)** ADP y **c)** ATP, con los cuales se determinó **d)** el cociente AMP/ATP, **e)** cociente ADP/ATP y **f)** carga energética. La medición se realizó por medio de HPLC. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para evaluar las comparaciones múltiples; los resultados se presentan como la mediana \pm rango intercuartílico (IQR) ($n = 6$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control.

9.7 Las dietas altas en glucosa regulan la expresión de factores de transcripción claves en las respuestas a estrés en *C. elegans*

En esta sección se muestran los resultados de la evaluación de la abundancia de los transcritos (mRNA) de diversos factores de transcripción relacionados con distintas respuestas a estrés, así como la regulación del metabolismo de lípidos, entre otros. Los factores de transcripción estudiados son: *daf-16*/FOXO, *skn-1*/NRF, *sbp-1*/SREBP, *cep-1*/p53, *crh-1*/CREB y *hif-1*/HIF-1.

En el caso de *hif-1*, se observó una tendencia de incremento en la abundancia de su mRNA, no obstante las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 25a). Por su parte, la abundancia del transcrito de *crh-1* se incrementó significativamente en los gusanos alimentados con glucosa, siguiendo un comportamiento dependiente de la

concentración (Fig. 25b). Respecto a *cep-1*, se observó que las concentraciones de glucosa menores a 100 mM disminuyeron la abundancia de su mRNA, sin embargo en la condición de 100 mM se observó un incremento de este en 50% respecto a la condición control (Fig. 25c). Para *skn-1c* no se observó una disminución en la abundancia de su mRNA en concentraciones bajas de glucosa (20 mM); sin embargo, a partir de 40 mM se observó una reducción del 30% en la abundancia de su transcrito (Fig. 25d).

Los gusanos alimentados con glucosa redujeron los niveles del mRNA de *daf-16* con un comportamiento dependiente de la concentración; esta disminución fue estadísticamente significativa en todas las condiciones probadas (Fig. 25e). Finalmente el transcrito de *sbp-1* incrementó su abundancia en todas las concentraciones de glucosa probadas (Fig. 25f).

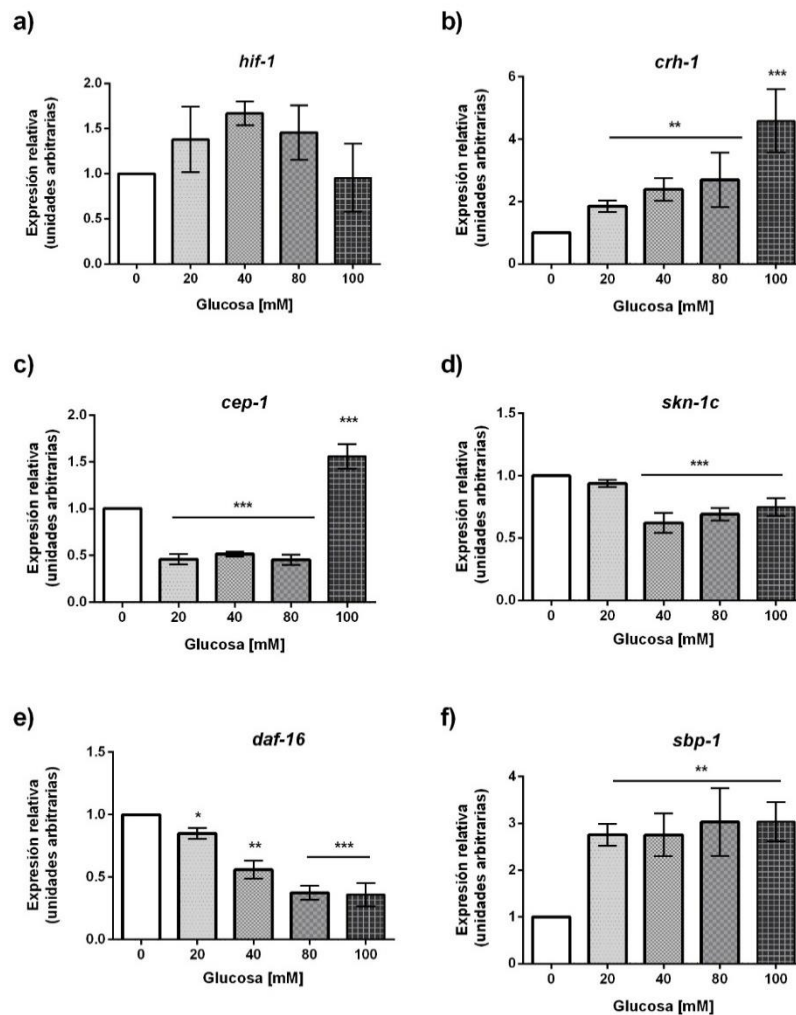


Fig. 25 Abundancia de mRNAs de factores de transcripción de respuesta al estrés en gusanos alimentados con distintas concentraciones de glucosa

Los gusanos se expusieron desde la etapa larvaria L1 a L4 a concentraciones crecientes de glucosa (20, 40, 80 o 100 mM). Posteriormente, se purificó RNA total, del cual se cuantificó la abundancia por RT-qPCR de los mRNA de: (a) *hif-1*; (b) *crh-1*; (c) *cep-1*; (d) *skn-1c*; (e) *daf-16*; (f) *sbp-1*. Los resultados se muestran como mediana \pm rango intercuartílico (IQR) ($n = 6$). Los datos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para evaluar las comparaciones múltiples; las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

9.8 Dietas altas en glucosa regulan la esperanza de vida de *C. elegans* a través de una red de factores de transcripción de respuesta a estrés

Por otra parte, se evaluó si las altas concentraciones de glucosa (20, 40, 80 y 100 mM) en la dieta tenían un impacto en la longevidad de los gusanos. Se observó que todas las condiciones de glucosa probadas disminuyeron la longevidad de los gusanos en 26, 35, 43 y 52% respectivamente, comparadas con la condición control (Fig. 26a y Tabla S2).

Adicionalmente, se evaluó la participación de los factores de transcripción *crh-1*/CRH-1, *sbp-1*/SREBP, *skn-1c*/Nrf-2, *hif-1*/HIF-1 α , *cep-1*/p53 y *daf-16*/FOXO en la modulación de la esperanza de vida de gusanos alimentados con dietas altas en glucosa. Para ello, se emplearon cepas mutantes para los factores de transcripción *cep-1(gk138)*, *skn-1(zu135)*, *daf-16(mgDf50)*, *daf-16(mu86)* y RNA de interferencia (RNAi, por sus siglas en inglés) para abatir la expresión de los genes *hif-1*, *crh-1* y *sbp-1*. Las cepas mutantes fueron comparadas con gusanos silvestres (WT) de la cepa N2, mientras que para los ensayos de RNAi, las comparaciones se realizaron con respecto a gusanos de la cepa N2, los cuales fueron tratados con el plásmido vacío (l4440), lo anterior para simular las mismas condiciones que los RNAi probados.

Para evaluar la participación de los factores antes mencionados en la regulación de la esperanza de vida de los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa, se seleccionó la condición de 100 mM como condición representativa de dietas altas en glucosa, ya que en esta se observó la mayor reducción de la esperanza de vida de la cepa silvestre (WT) de *C. elegans*.

Los gusanos tratados con el RNAi de *hif-1* incrementaron su esperanza de vida respecto a los gusanos tratados con un vector vacío en condiciones control ($p < 0.0001$). Sin embargo, las dietas altas en glucosa no redujeron significativamente la esperanza de vida los gusanos RNAi de *hif-1*, comparado con los pl4440 ($p < 0.053$). De forma similar no se observaron diferencias significativas en la esperanza de vida de los gusanos tratados con el RNAi de *hif-1* en ambas condiciones ($p = 0.746$) (Fig. 26b y Tabla S2).

En condiciones control, los gusanos RNAi de *crh-1* incrementaron su esperanza de vida con respecto a los pl4440 ($p < 0.0001$). Por su parte, al ser alimentados con glucosa redujeron modestamente su esperanza de vida ($p < 0.0001$), sin embargo no lo suficiente para revertir éste fenotipo. Cabe mencionar que no se observaron cambios estadísticamente significativos en la esperanza de vida del RNAi de *crh-1* en ambas condiciones ($p = 0.443$); lo anterior se muestra en detalle en las Fig. 26c y Tabla S2.

Para el caso de CEP-1, en condiciones control (0mM), se observó una reducción significativa en la esperanza de vida de la cepa mutante *cep-1(gk138)* con respecto los gusanos WT ($p < 0.0001$); sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la esperanza de vida de ésta cepa comparada con el WT en la condición de 100 mM de glucosa ($p = 0.053$). Al comparar la esperanza de vida de esta cepa en ambas condiciones, no se observaron diferencias significativas ($p = 0.086$) (Fig. 26d y Tabla S2).

Para SKN-1, se observó una disminución significativa en la esperanza de vida de la cepa *skn-1(zu135)*, con respecto a los gusanos WT en condiciones control ($p < 0.0001$). Al ser alimentada con dietas altas en glucosa, esta cepa redujo su esperanza de vida

significativamente comparada con el WT ($p=0.0001$), sin embargo no se observaron cambios significativos en las longevidades de la cepa al compararse ambas condiciones ($p=0.183$) (Fig. 26e y Tabla S2).

Por otra parte, no se observaron cambios significativos en la esperanza de vida en condiciones control entre de los gusanos RNAi de *sbp-1* y los p14440 ($p=0.199$); sin embargo, al ser alimentados con glucosa, redujeron significativamente su esperanza de vida ($p=0.004$) tal y como se observó en los WT en la mismas condiciones. Además no se observaron cambios estadísticamente significativos en la esperanza de vida de los gusanos RNAi de *sbp-1* en ambas condiciones probadas ($p=0.110$) (Fig. 26f y Tabla S2).

Con respecto a DAF-16, se analizó la esperanza de vida de dos cepas mutantes: *daf-16(mgDf50)* y *daf-16(mu86)*, lo anterior debido a que un reporte previo reportó una reducción en la esperanza de vida de la cepa *daf-16(mu86)* al ser alimentada con glucosa (82) lo cual se evaluó nuevamente en este trabajo. Para ambas cepas, se observó una reducción en su esperanza de vida en condiciones control comparadas con el WT ($p<0.0001$). En concentraciones altas de glucosa, ambas cepas redujeron su esperanza de vida ($p<0.0001$) de forma similar a lo observado con la cepa WT. Al comparar la esperanza de vida de ambas cepas en condiciones control y 100 mM de glucosa, se observó una reducción significativa en la esperanza de vida de éstas cepas en concentraciones altas de glucosa ($p=0.002$) (Fig. 26g, h y Tabla S2).

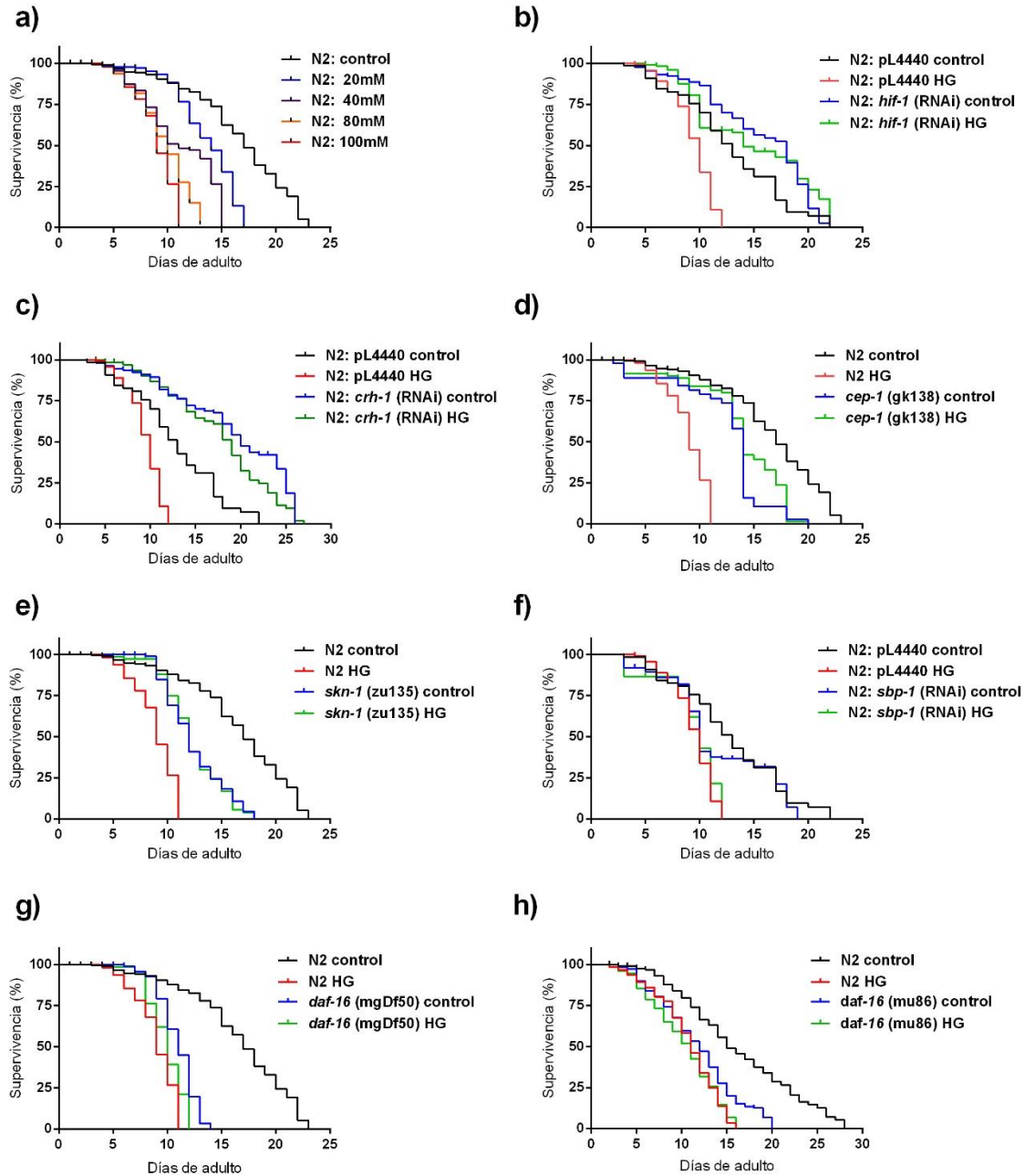


Fig. 26 Curvas de Kaplan-Meier de longevidad de gusanos WT, mutantes y RNAi de factores de transcripción de respuesta a estrés alimentados con dietas altas en glucosa

a) Curvas de supervivencia de gusanos WT alimentados con concentraciones crecientes de glucosa (20, 40, 80 y 100 mM). **(b-h)** Curvas de longevidad de mutantes o gusanos RNAi adultos que fueron alimentados con glucosa 100 mM desde el estadio larvario L1 hasta el final de su ciclo de vida; todos los ensayos fueron comparados con la misma cepa o RNAi en condiciones control (n = 110 gusanos por condición), **(b)** *hif-1* (RNAi); **(c)** *crh-1* (RNAi); **(d)** *cep-1* (*gk138*); **(e)** *skn-1* (*zu135*); **(f)** *sbp-1* (RNAi); **(g)** *daf-16* (*mgDf50*); **(h)** *daf-16* (*mu86*). Para los experimentos de RNAi, se usaron bacterias que contenían el vector vacío pL4400 como control. Las diferencias entre los grupos se calcularon usando la prueba de log-rank. Los análisis estadísticos de estos experimentos se muestran en la tabla complementaria S2.

10 DISCUSIÓN

10.1 Establecimiento de un modelo de glucotoxicidad en *C. elegans*

En este trabajo se evaluaron los cambios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos en gusanos alimentados con altas concentraciones de glucosa. Algunas interrogantes que surgen respecto a la adición de glucosa al medio de cultivo son las siguientes: ¿Los gusanos pueden ingerir la glucosa que se les provee en el medio? ¿La glucosa que ingieren proviene de las bacterias o del medio? Al respecto Schlotterer (20) creció larvas de *C. elegans* en medio NGM enriquecido con glucosa y como alimento empleó bacterias muertas (las cuales lisó por medio de sonicación) y bacterias vivas; se observó que los niveles endógenos de glucosa en *C. elegans* se incrementaban con respecto a aquellos gusanos crecidos en condiciones estándar (medios sin glucosa) sin importar si las bacterias estaban vivas o muertas, con lo cual se descartó la posibilidad de que las bacterias fueran el medio principal por el cual *C. elegans* asimilaba la glucosa del medio.

Respecto a la pertinencia de estudiar los efectos de la glucosa en la fisiología de *C. elegans* al adicionar dicho azúcar al medio de cultivo, revisamos otros estudios de los campos de farmacología y toxicología entre otros, en los cuales los gusanos han sido expuestos a diversos compuestos tales como arsenito de sodio, metilcisteína, ácido cítrico, etanol, entre otros; los cuales se han suministrado en el medio de cultivo. Se han observado cambios bioquímicos y fenotípicos en respuesta a dichos agentes (175, 176) lo cual sustenta que la adición de glucosa al medio de crecimiento podría ser una buena vía para exponer a *C. elegans* a diversas concentraciones de este azúcar con el propósito de inducir un estado similar a la glucotoxicidad observada en los mamíferos.

La siguiente interrogante que surge es la siguiente ¿cuál o cuáles concentraciones de glucosa son adecuadas para inducir glucotoxicidad? Trabajos anteriores emplearon distintas concentraciones de glucosa en *C. elegans* que han permitido delimitar un intervalo de concentraciones a probar. Se ha documentado que los gusanos que crecieron a una concentración de 50mM de glucosa alcanzaron un contenido de glucosa de 15mM, que se asemeja a la concentración de glucosa de paciente diabéticos no tratados (20). Otros encontraron que la glucosa a una concentración de 902mM es extremadamente tóxica para *C. elegans* (177), mientras que la glucosa a 111mM (2%) se ha implementado comúnmente para establecer una “dieta” rica en glucosa para *C. elegans* (82, 178, 179). Una comparación de los principales hallazgos reportados previamente en la literatura se puede consultar en la Tabla suplementaria 3. Con base en lo anterior, se establecieron las siguientes condiciones de estudio: concentraciones de glucosa: 20, 40, 80 y 100 mM, la exposición a glucosa se realizó en poblaciones de gusanos con crecimientos sincronizado, desde la etapa L1 a L4, los cuales crecieron en medios NGM suplementados con las distintas concentraciones de glucosa propuestas.

En este trabajo se evaluaron los efectos de la adición de glucosa en el medio sobre la homeostasis de glucosa y triglicéridos. Se observó que tanto los niveles endógenos de glucosa, así como el transporte de glucosa y las concentraciones de triglicéridos, se incrementaron con una tendencia dependiente de la concentración de glucosa en el medio. Observaciones similares para el caso de glucosa endógena fueron reportadas anteriormente

(20, 82). Para la acumulación de ácidos grasos se han empleado métodos cualitativos tales como la tinción con rojo oleoso o rojo Nilo en gusanos alimentados con altas concentraciones de glucosa y fructosa (133), no obstante, en este trabajo se evaluó de forma cuantitativa (ensayo colorimétrico) el contenido de triglicéridos en gusanos alimentados con distintas concentraciones de glucosa. Se observó que aquellos que se desarrollaron en la condición de 100 mM incrementaron sus niveles de triglicéridos 3 veces más respecto a los gusanos crecidos en condiciones control, lo cual es consistente con lo reportado previamente por Moreno-Arriola (180). Para el caso de la asimilación de glucosa por el ensayo de 2DG, se observó un comportamiento dependiente de la concentración en el medio de cultivo, sin que en apariencia el transporte dependiente de insulina se vea perturbado; para corroborarlo se empleó insulina (80 mU) y se evaluó la asimilación de 2DG. Como se esperaba, la asimilación del análogo fue aún mayor a la observada en las condiciones de mayor concentración de glucosa (80 y 100 mM), lo que implica que en las condiciones probadas (20-100 mM) en este estudio, el transporte de glucosa dependiente de insulina se encuentran aún activo.

Recientemente se han descrito transportadores de glucosa en *C. elegans*, los cuales son similares en función a los descritos en mamíferos (181-183), y que posiblemente puedan estar participando activamente en la asimilación e internalización de la glucosa en el medio de cultivo. En este trabajo no se evaluó su participación y actividad, ya que no forma parte de los objetivos de este trabajo el estudiar los mecanismos por medio de los cuales *C. elegans* asimila la glucosa del medio sólido. Este trabajo se enfoca en el desarrollo y validación de un modelo que recapitule bioquímicamente y molecularmente las principales características de la glucotoxicidad de los mamíferos; no obstante resulta interesante determinar la participación de los transportadores de glucosa en éste contexto, lo cual queda abierto como trabajo subsecuente de ésta línea de investigación.

10.2 Alteraciones en la talla y fertilidad de gusanos alimentados con glucosa

Otros de los efectos observados en los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa fue el incremento en su talla. Particularmente en *C. elegans* se ha documentado que la fuente de alimento es un factor importante que influye en su talla (184, 185). Además las vías de señalización de TGF- β y DAF-2/IGF regulan el tamaño de su cuerpo (185-188). En *C. elegans*, el factor de transcripción SBP-1/SREBP también está relacionado en el establecimiento del tamaño y proporciones del cuerpo, así como la regulación de la lipogénesis (133, 189). Los cambios observados en la morfología de los gusanos alimentados con glucosa podrían atribuirse a la actividad de las vías de señalización de TGF- β y DAF-2/IGF-1, junto con la actividad de SBP-1, el cual se ha reportado que se induce en gusanos alimentados con glucosa a 100-200mM (190, 191), lo que es consistente con los resultados mostrados en este estudio.

Por otra parte, se observó que los gusanos alimentados con glucosa mostraron alteraciones en su fertilidad, lo cual es similar a lo observado en reportes anteriores (192-194). Dos estudios reportaron una disminución en la progenie en la generación parental *P0* cuando los gusanos se cultivaron en concentraciones entre 5.5 y 555mM de glucosa (193, 194), mientras que en este estudio no se observó algo similar, lo cual puede atribuirse a

diferencias experimentales. Sin embargo, los resultados de este trabajo son consistentes con reportes previos en los cuales los gusanos que crecieron en concentraciones de glucosa menores de 250mM no mostraron una reducción significativa en su fertilidad (192, 195).

Al extender las observaciones a las generaciones *F1* y *F2* sometidas a las mismas condiciones que la *P0*, se observó que su fertilidad se redujo en aproximadamente 26% y 50%, respectivamente. Se ha documentado la disminución de la fertilidad en las generaciones *F1* y *F2*, aunque solo la generación *P0* haya estado expuesta a las altas concentraciones de glucosa, esto sugiere que los cambios producidos por la exposición a la glucosa podrían heredarse de otras generaciones (193). Hallazgos similares se han reportado en otros organismos y contextos metabólicos, lo que apoya la hipótesis del impacto transgeneracional de la alimentación en los individuos (193, 196-200).

La disminución de la fertilidad observada en los gusanos alimentados con glucosa podría explicarse por el aumento en la síntesis y la acumulación de lípidos, los cuales desempeñan un papel importante en la fertilidad (201) y la movilidad del esperma (202) en *C. elegans*. Por otra parte, también se observó que en los gusanos alimentados con glucosa se incrementó la frecuencia del fenotipo conocido como "embolsado o bagging", en el que los adultos hermafroditas tienen problemas en la puesta de huevecillos y por lo cual los huevecillos eclosionan dentro de los gusanos. Un reporte reciente mostró que los gusanos alimentados con glucosa a 100 mM mostraron alteraciones en la tasa de puesta de huevecillos, lo cual se asoció a un deterioro en la vía de señalización serotoninérgica que controla los músculos de la vulva (195).

Lo anterior podría explicar en parte el aumento de la frecuencia del fenotipo *bagging* en los gusanos alimentados con glucosa. Cabe mencionar que este fenotipo se ha identificado en otras condiciones tales como el envejecimiento (203) y la inanición (204). Además, el fenotipo *bagging* es dependiente del contenido nutricional, ya que se ha encontrado que este fenotipo está relacionado con la cepa de bacterias que se administra para alimentar a los gusanos (205). Es posible que la alimentación de los gusanos con glucosa produzca un estado de estrés que promueve el desarrollo de este fenotipo.

En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que la alimentación con altas concentraciones de glucosa produce alteraciones en el crecimiento, la fertilidad y la reproducción, siendo que estas últimas se han observado alteradas en pacientes diagnosticados con síndrome metabólico y diabetes (206, 207) en las cuales se han observado signos de glucotoxicidad.

10.3 Los gusanos alimentados con glucosa reducen su esperanza de vida

Finalmente, se observó que la esperanza de vida de los gusanos alimentados con glucosa se redujo conforme se incrementaban las concentraciones de glucosa, lo cual es consistente con reportes anteriores (20, 73, 82, 178, 190, 193, 194); sin embargo, se ha observado que este efecto es distinto en machos y hermafroditas, siendo así que en los machos no se observan cambios en su esperanza de vida (208). Algunos de los estudios anteriores utilizaron 5-fluoro-2-desoxiuridina (FUdR) para esterilizar químicamente a los gusanos en los ensayos de longevidad (20, 82, 194). Sin embargo, se ha reportado que el tratamiento con FUdR altera una gran variedad de procesos biológicos tales como las respuestas a diversos tipos de estrés, el metabolismo y la longevidad (209-213). El uso de

FUdR en los estudios anteriores que evaluaron la esperanza de vida en *C. elegans* podrían estar sujetos a este sesgo metodológico el cual podría confundir los resultados y efectos observados. Lo anterior podría explicar porque no se había reportado con anterioridad el incremento del fenotipo *bagging* en gusanos alimentados con glucosa. Cabe mencionar que en este trabajo, dicho agente no fue empleado en los ensayos de longevidad.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la reducción de la esperanza de vida de *C. elegans* al ser alimentado con dietas ricas en glucosa. Entre ellos se encuentran el aumento de los productos de glucosilación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés) (20), la represión de la expresión del gen de acuaporina-1 y el factor de transcripción DAF-16/FOXO el cual regula la expresión de genes de respuesta a estrés (82), la inducción de apoptosis (178) y el incremento en la proteotoxicidad (194); no obstante, se requieren más trabajos experimentales que permitan conocer todos los procesos relacionados a la reducción de la esperanza de vida promovida por la glucosa en *C. elegans*.

10.4 Los gusanos alimentados con glucosa experimentan estrés oxidante

Los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa, experimentan estrés oxidante y muestran signos de daño oxidante. En este estudio se observaron incrementos en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa mitocondrial (mtSOD) y catalasa (CAT). Las actividades elevadas de estas enzimas podrían ser un mecanismo de defensa contra el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Reportes anteriores mostraron que la adición de 5.5mM de glucosa en la alimentación de *C. elegans* incrementaba la generación del anión superóxido (20, 157), lo anterior se evidenció por medio de la tinción con dihidroetidio (el cual es oxidado por el anión superóxido).

Sin embargo, Mendler y colaboradores, reportaron que la actividad de la enzima superóxido dismutasa disminuye en los gusanos alimentados con glucosa, así como la abundancia de su mRNA (*sod-3*) (157). Las diferencias entre el reporte de Mendler y éste trabajo pueden atribuirse a los métodos empleados; en este trabajo, se midió la actividad de la fracción mitocondrial (mtSOD) de esta enzima, mientras que Mendler midió la actividad total de superóxido dismutasa (incluyendo las cinco enzimas reportadas para *C. elegans*). Es posible que las altas concentraciones de glucosa de forma indirecta regulen diferencialmente cada una de ellas, pudiendo opacar las variaciones reales de cada una de ellas lo cual no fue analizado por Mendler.

El glutatión (GSH), es el tiol no proteico más abundante en la célula. Niveles elevados de GSH se consideran un indicativo de un mecanismo de respuesta para contener el daño potencial inducido por el estrés oxidante. Estudios previos en *C. elegans* han demostrado que de forma similar a los mamíferos, el metabolismo del glutatión está modulado por el estrés oxidante, ya que los gusanos en los que las enzimas del metabolismo del glutatión fueron inhibidas, mostraron una baja tolerancia y supervivencia al estrés oxidante (214, 215). Además, los gusanos alimentados con glucosa mostraron un aumento de la expresión de glutatión-S-transferasa 4 (*gst-4*) (190), lo que sugiere que el sistema de glutatión podría ser inducido por la alimentación con glucosa.

En este trabajo se observaron incrementos en el contenido de glutatión y del disulfuro de glutatión, sin embargo su cociente (GSH/GSSG) se mantuvo constante en todas las

condiciones analizadas. Lo anterior indica que aunque se incrementó la generación de ERO, los gusanos alimentados con glucosa aún lograron inducir el sistema de glutatión como mecanismo compensatorio. Además se evaluó el contenido de MDA (malondialdehído) como un marcador de lipoperoxidación para evidenciar la presencia de daño oxidante. Se observaron incrementos significativos de éste en todas las concentraciones de glucosa probadas, siendo mayor en la condición de 100 mM, lo anterior evidencia la presencia de daño oxidante en lípidos en los gusanos alimentados con glucosa. El incremento de la peroxidación de lípidos es un indicativo de un posible daño en las membranas celulares.

Además se evaluó la actividad de dos enzimas transaminasas, la fosfatasa alcalina (FAL) y la aspartato amino transferasa (AST), las cuales en mamíferos se han asociado con daño en el hígado. Si bien es cierto que los gusanos carecen de un hígado, el intestino en *C. elegans* además de participar en la asimilación de nutrientes, cumple con otras funciones tales como el almacenamiento de lípidos y la regulación de la homeostasis de colesterol y sales biliares (216) como lo hace el tejido adiposo y el hígado en los mamíferos.

Se observó que la actividad de FAL y AST se incrementó en las concentraciones altas de glucosa y en el caso de AST su actividad se redujo drásticamente en la concentración de 100 mM. Lo anterior no sustenta la relación de estas enzimas como marcadores de daño tisular como ocurre en mamíferos, sin embargo, la actividad de la fosfatasa alcalina se ha asociado directamente con el envejecimiento en *C. elegans* (173, 174), de tal modo que es posible que las altas concentraciones de glucosa desregulan la actividad de diversas enzimas. Dichas enzimas podrían emplearse como futuros biomarcadores en modelos experimentales relacionados con el envejecimiento prematuro y su asociación con la glucotoxicidad.

10.5 Las dietas ricas en glucosa modulan la fisiología mitocondrial.

Los defectos en la cadena de transporte de electrones promueven la activación de mecanismos alternos para mantener la viabilidad y supervivencia de los organismos; lo anterior se ha explorado con mayor detalle en *C. elegans*. Reportes previos mostraron que los gusanos mutantes para genes de la cadena de transporte de electrones (*clk-1* e *isp-1*) emplean la vía de glioxilato como fuente alternativa de energía (217); de esta vía la principal enzima es la isocitratoliasa/malato sintasa. En este trabajo se observó que los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa incrementaron la actividad de la enzima malato sintasa, lo cual supondría la activación de vías alternativas en estas condiciones.

En esas mismas mutantes de enzimas mitocondriales, conocidas como mutantes “mit” se ha observado un incremento en la síntesis de DNA mitocondrial (mtDNA) (218), una observación similar se reportó recientemente para gusanos knock-down para la subunidad c de la ATP sintasa de *C. elegans* (219). Se ha postulado que este incremento en el material genético mitocondrial podría ser un mecanismo compensatorio a los defectos en la cadena de transporte de electrones. En este trabajo se observó que los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa incrementaron los niveles de la enzima citrato sintasa, la cual se emplea como un marcador de masa mitocondrial (220), lo anterior sugiere un incremento en el contenido de mitocondrias promovido por las dietas altas en glucosa; además en la condición de 100 mM, los gusanos incrementaron su contenido de mtDNA. Cabe mencionar que en esta condición se observaron las mayores alteraciones en la cadena respiratoria y un mayor número de rupturas en la membrana mitocondrial.

Por otra parte, en los reportes antes mencionados se ha observado que los gusanos con defectos en la cadena de transporte de electrones no muestran cambios significativos en los niveles de ATP, a pesar de que se reduzca la respiración celular (217-219). En este trabajo se observó que los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa presentaron defectos en la cadena de transporte de electrones así como una reducción de la respiración celular, sin embargo no mostraron cambios significativos en los niveles de ATP, ADP y AMP. Esto permitiría explicar los hallazgos de reportes anteriores en los cuales las dietas altas en glucosa reducen los niveles de la forma activa de AMPK/AAK-2 (73, 180). Cabe mencionar que un incremento en el cociente AMP/ATP es una de las señales que activan a AMPK/AAK-2, no obstante en este trabajo se encontró que los gusanos alimentados con glucosa no incrementaron significativamente este cociente. Es posible que los defectos en la mitocondria activen mecanismos alternos que incluyan la reprogramación metabólica e incremento de la masa mitocondrial, los cuales redundarían en compensar la disminución en la síntesis de ATP.

En este trabajo se documentó que los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa incrementaron la captación de la misma así como su activación por fosforilación. Lo anterior permite plantear que en este contexto se favorece la producción de ATP por medio de la fosforilación a nivel de sustrato. Cabe mencionar que el transporte de glucosa en *C. elegans* es mediado principalmente por el transportador FGT-1 (181-183) el cual es dependiente de la vía de la insulina (183), lo cual supondría que esta vía se encuentre activa en estas condiciones. De ser así, esto se sumaría a los mecanismos de regulación que expliquen la inactivación de AMPK/AAK-2 en los gusanos alimentados con glucosa, ya que esta vía regula negativamente la actividad de este complejo (68).

Finalmente por medio de microscopia electrónica se observaron alteraciones morfológicas en diversos organelos, incluidas las mitocondrias. En estas últimas se observaron incrementos en su tamaño, masa y ruptura de membranas externas. Estos hallazgos evidencian los efectos deletéreos de la alimentación con concentraciones altas de glucosa sobre la fisiología de las mitocondrias en *C. elegans*.

10.6 *C. elegans* responde a las dietas altas en glucosa a través de una red de factores de transcripción de respuesta a estrés

Como se ha descrito anteriormente, la suplementación de glucosa a la alimentación de *C. elegans* promueve la generación de ERO y en consecuencia estrés y daño oxidante, estas señales forman parte de una compleja red de señalización promovida por la glucosa. En este trabajo se analizó el efecto que las dietas altas en glucosa tienen sobre la expresión de diversos factores de transcripción, los cuales a su vez regulan la esperanza de vida de *C. elegans*.

10.6.1 *SBP-1/SREBP* protege a los gusanos de la glucotoxicidad

Los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa, incrementaron la abundancia del mRNA de *sbp-1*, lo cual está relacionado con la acumulación de lípidos y está regulada por este factor transcripcional (132, 133). Estos hallazgos son consistentes con los reportes previos en la literatura (133, 190), excepto por el reporte previo de Lee (221) en el cual se mostró que las altas concentraciones de glucosa (2%) incrementaron la expresión del

reportero GFP::SBP-1 en células intestinales, sin embargo no observó cambios en la abundancia del mRNA de *sbp-1*.

Respecto a la participación de SBP-1 en la regulación de la esperanza de vida, en este trabajo se empleó un RNAi de *spb-1*, ya que la delección de este gen es letal para los nemátodos (221). Los gusanos tratados con este RNAi no redujeron su esperanza de vida en condiciones estándar; sin embargo al alimentarlos con dietas altas en glucosa su esperanza de vida se redujo. Lo anterior sugiere que la sobreexpresión de *sbp-1* que se observa en los gusanos alimentados con glucosa tendría un efecto positivo en la esperanza de vida de *C. elegans*.

Una explicación al respecto ha sido documentada previamente por Lee y cols. Ellos reportaron que SBP-1 protege a los gusanos de la reducción de la esperanza de vida promovida por las altas concentraciones de glucosa al convertir las grasas saturadas en grasas insaturadas (221). Con base en lo anterior es plausible pensar que la sobreexpresión de *sbp-1* en este contexto contribuye a reducir la toxicidad de la glucosa al promover la síntesis de grasas insaturadas e inducir la expresión de genes lipogénicos que permitan el almacenamiento y transformación de glucosa en lípidos de reserva, por lo cual SBP-1 regularía positivamente la esperanza de vida en gusanos alimentados con glucosa.

10.6.2 ***CRH-1/CREB reduce la esperanza de vida de gusanos alimentados con glucosa***

En gusanos alimentados con glucosa, se incrementó la abundancia del mRNA de *crh-1*, lo cual sugiere que la glucosa ejerce algún efecto regulatorio sobre la expresión de este gen; en mamíferos se ha observado que la glucosa induce la expresión de CREB a través de TORC2 (222, 223), no obstante también se ha reportado que es inducido en condiciones de ayuno (224) lo cual lo ha relacionado con el censado y asimilación de nutrientes, efecto conservado evolutivamente (224, 225); además se ha documentado que *crh-1* autorregula su expresión con ayuda del co-activador CRTC-1/CRTCs (71), lo anterior muestra la compleja regulación sobre *crh-1* la cual esta está íntimamente relacionada con la disponibilidad de nutrientes.

Para evaluar su participación en la regulación de la esperanza de vida de *C. elegans*, en este trabajo se empleó un RNAi *crh-1*. Los gusanos tratados con este RNAi incrementaron su esperanza de vida respecto al WT, lo cual ha sido documentado anteriormente (71) sin embargo, ocurre lo contrario en las mutantes *crh-1(tz2)* y *crh-1(n3315)* las cuales reducen su esperanza de vida respecto a la cepa silvestre (152). Generalmente *crh-1* se expresa tanto en neuronas como en el intestino de los gusanos (71, 152); cabe destacar que las neuronas son insensibles a los RNAi que se administran por alimentación, los cuales se emplearon en este trabajo y en el reporte de Mair (71) y que funcionan eficientemente en el intestino. Esto sugiere que el silenciamiento de *crh-1* en el intestino (realizado en este trabajo y el reporte de Mair), es suficiente para extender la esperanza de vida de *C. elegans*.

Por su parte las dietas altas en glucosa redujeron modestamente la esperanza de vida del RNAi de *crh-1*, sin embargo no lo suficiente para revertir este fenotipo. Lo anterior, supone que la expresión de *crh-1* en el intestino juega un papel importante en la regulación de la esperanza de vida de *C. elegans*, en particular en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa, en los cuales la sobreexpresión de *crh-1* está relacionada con la reducción de la esperanza de vida. Es importante evaluar el efecto que tendría la supresión completa de la

expresión de *crh-1*, en los gusanos alimentados con glucosa, además se requieren más estudios que permitan entender cómo se incrementa la esperanza de vida de *C. elegans* en ausencia de *crh-1* en el intestino en condiciones de glucotoxicidad. En conjunto estas observaciones muestran que *crh-1* podría ser un blanco terapéutico potencial para revertir la glucotoxicidad, ya que en mamíferos, CREB está involucrado en distintos eventos patogénicos relacionados con la diabetes (226, 227).

10.6.3 *Participación de hif-1/HIF-1α en la glucotoxicidad de C. elegans*

Los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa no mostraron cambios significativos en la abundancia de su mRNA, lo cual es similar a lo reportado en mamíferos donde la expresión del gen *hif-1α* se mantiene constante, no obstante, su regulación se observa a nivel post-traduccional, por lo cual es importante cuantificar la abundancia de su producto proteico en este contexto. Estudios recientes han mostrado la participación de HIF-1 en la modulación de la esperanza de vida de *C. elegans* (131, 228-233); especialmente la hipoxia promueve un incremento de la esperanza de vida a través de HIF-1 (231). Sin embargo, también se ha observado un incremento en la esperanza de vida de gusanos mutantes de *hif-1* sometidos a hipoxia. En este contexto se ha observado la participación de otros factores de transcripción tales como DAF-16, el cual extiende la esperanza de vida de *C. elegans* en ausencia de *hif-1* (231), mientras que SKN-1 antagoniza este efecto (231).

Los reportes previos han mostrado resultados contradictorios entre sí, por un lado se ha observado un incremento en la esperanza de vida en mutantes y gusanos tratados con RNAi de *hif-1* (228, 229, 231); sin embargo también se ha reportado que la ausencia de *hif-1* no incrementa la esperanza de vida de *C. elegans* (131, 230, 232, 233). Existen diferencias metodológicas importantes entre estos estudios, los cuales incluyen el uso de FudR (131, 228, 230, 232), el cambio de temperatura (228, 231) y la inclusión de los gusanos *bagging* en los análisis de longevidad (231, 233); adicionalmente los contextos biológicos son distintos, ya que en la mayoría está involucrada un entorno pro-oxidante, (131, 229, 230, 232), lo anterior dificulta la comparación de estos resultados.

En este trabajo se observó que los gusanos tratados con el RNAi de *hif-1* incrementaron su esperanza de vida respecto a los gusanos tratados con un vector vacío en condiciones normales, lo cual es consistente con los reportes de Chen y Zhang (228, 229). Además, las dietas altas en glucosa no redujeron significativamente la esperanza de vida de estos gusanos. Lo anterior nos permite inferir que *hif-1* participa en la reducción de la esperanza de vida de gusanos alimentados con dietas altas en glucosa, lo cual implicaría que en las condiciones de este estudio HIF-1 podría ser activado.

Recientemente se ha descrito la activación de *hif-1* a través de las ERO (72, 131), llama la atención que uno de los mecanismos que incrementa su actividad es la inhibición de la respiración celular en la mitocondria (131). Cabe mencionar que en este trabajo se observó que los gusanos alimentados con glucosa incrementaron la generación de ERO, además se observó una disminución en su respiración celular, los cuales son mecanismos que podrían promover la activación de HIF-1 en las condiciones probadas en este trabajo, no obstante se requieren más estudios que permitan corroborarlo.

Los gusanos tratados con el RNAi de *hif-1*, incrementaron su esperanza de vida sin importar si fueron o no alimentados con dietas altas en glucosa. Anteriormente se reportó que

la mutante de *hif-1* incrementa los niveles de la forma activa de AMPK/AAK-2, además se incrementa la actividad transcripcional de *daf-16* (72), ambos relacionados con la extensión en la esperanza de vida de *C. elegans* (68, 231). Lo anterior podría explicar el incremento en la longevidad de los gusanos tratados con el RNAi de *hif-1*. Por otra parte, en gusanos WT, las dietas altas en glucosa reducen la actividad de AMPK/AAK-2 y DAF-16 por efecto de la vía de la insulina/DAF-2 (82, 180), sin embargo, los gusanos RNAi alimentados con glucosa, redujeron ligeramente su esperanza de vida, pese a que estas dietas activen la vía de DAF-2. Por lo anterior, es importante extender los estudios en los gusanos deficientes de *hif-1* ya que el o los mecanismos que participan en la extensión de su esperanza de vida, podrían antagonizar parte de los efectos deletéreos de la glucotoxicidad en *C. elegans* por lo que podrían ser nuevos blancos terapéuticos en el futuro.

10.6.4 *CEP-1/p53* podría ser perjudicial en gusanos alimentados con glucosa

La expresión de *cep-1* es modulada por las distintas concentraciones de glucosa probadas en este estudio; la abundancia de su mRNA disminuyó en las condiciones de 20-80 mM, no obstante en 100 mM se observó un incremento de 2-3 veces en los niveles de su mRNA. Esta represión de CEP-1 podría ser explicada en parte por el complejo CRTC-1/CREB el cual puede actuar como regulador negativo de CEP-1 (234). Es necesario ampliar estas investigaciones para poder conocer el o los mecanismos que regulan la expresión de *cep-1* en condiciones de glucotoxicidad.

Respecto a su participación en la regulación de la esperanza de vida, se han documentado resultados contradictorios en las mutantes de *cep-1*. Algunos trabajos han mostrado que la cepa *cep-1 (gk138)* tiene una esperanza de vida mayor que la cepa silvestre (235, 236), de igual forma los gusanos tratados con RNAi de *cep-1* incrementan su esperanza de vida respecto a la cepa silvestre (237). Sin embargo, otros reportes mostraron que la cepa *cep-1 (gk138)* no incrementa su esperanza de vida respecto a la cepa silvestre (238, 239). Las diferencias enunciadas anteriormente, puede atribuirse a variaciones metodológicas entre los distintos trabajos, tales como el uso de FudR (5-Fluoro-2'-desoxiuridina) (235, 237) el cual *per se* tiene efectos positivos sobre la longevidad de *C. elegans* (209); lo anterior dificulta la comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes reportes.

En este trabajo se observó que la esperanza de vida de la mutante de *cep-1 (gk138)* no fue mayor que la observada para la cepa silvestre (WT), lo cual es consistente con lo reportado por Torgovnick y Baruah (238, 239). Además no se observaron cambios significativos en la esperanza de vida de esta cepa al ser alimentada con altas concentraciones de glucosa, lo cual sugiere que los gusanos que carecen del gen de *cep-1* son resistentes a la reducción en la esperanza de vida promovida por la glucosa. Trabajos anteriores han destacado la participación de *cep-1* en la modulación del desarrollo de mutantes “mit” así como la regulación de su esperanza de vida (236, 238); estos trabajos han documentado una función dual de la regulación de la esperanza de vida mediada por CEP-1, el cual depende del grado de disfunción mitocondrial y la generación de ERO (236). Se observó que una supresión leve de proteínas de la cadena de transporte de electrones promovía un incremento en la longevidad, en tanto que una disfunción mayor en la mitocondria promovía una reducción de la esperanza de vida dependiente de CEP-1 (236).

De acuerdo a lo anterior, la disfunción mitocondrial y la subsecuente generación de ERO promovidas por las dietas altas en glucosa, podrían ser parte de los factores que

promuevan la disminución de la esperanza de vida mediada por CEP-1 en los gusanos silvestres (WT). No obstante, en la mutante *cep-1(gk138)* no se observó una reducción significativa de la esperanza de vida al ser alimentada con dietas altas en glucosa, lo cual podría sustentar la idea de que la sobreexpresión de CEP-1 está relacionada con los efectos deletéreos de la glucotoxicidad en *C. elegans*, a través de un mecanismo desconocido hasta el momento.

10.6.5 **DAF-16/FOXO regula positivamente la esperanza de vida**

En este trabajo se observó que una reducción en la abundancia del mRNA de *daf-16* en aquellos gusanos alimentados con dietas altas en glucosa; no hay reportes previos que hayan medido la expresión de este gen en condiciones similares a las de este estudio, por lo cual esta es la primer observación al respecto. Por otra parte, las mutantes *daf-16(mgDf50)* y *daf-16(mu86)* redujeron su longevidad con respecto a la cepa silvestre, lo cual corrobora lo descrito por Lee para la cepa *daf-16(mu86)* (82); además se observó una reducción en la esperanza de vida de éstas cepas al ser alimentadas con dietas altas en glucosa (100 mM de glucosa), sin embargo, Lee reportó que las dietas altas en glucosa (2%) no redujeron la esperanza de vida de la mutante de *daf-16(mu86)* respecto a la condición control (82).

Las diferencias podrían atribuirse al uso de FudR en los ensayos de longevidad por parte de Lee (82). Los hallazgos de este trabajo en conjunto con los reportes previos de la literatura muestran que *daf-16* es un regulador clave de la esperanza de vida de *C. elegans* y que las dietas altas en glucosa no solo regulan su actividad por parte de la vía de la insulina IGF-1/DAF-2 sino que también tienen un efecto represor de la expresión de su gen aunque esto no se traduce necesariamente en la reducción de los niveles de proteína o su localización celular. Anteriormente se ha reportado la regulación de DAF-16 por parte de HIF-1 (231, 233); es posible que en las condiciones empleadas en este trabajo la expresión de *daf-16* pudiera ser modulada por HIF-1. Se requieren más estudios que nos permitan entender los mecanismos que regulan la expresión del gen *daf-16* en altas concentraciones de glucosa.

10.6.6 **SKN-1/Nrf protege a los gusanos de la glucotoxicidad**

En este trabajo se evaluó la abundancia del mRNA de la isoforma *skn-1c*, la cual se expresa principalmente en el intestino y participa activamente en la respuesta antioxidante y la regulación de la expresión de genes de la fase II de desintoxicación tales como *gcs-1*, *gst-4*, entre otros (95). Los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa redujeron los niveles de mRNA de *skn-1c*, lo cual es consistente con un reporte previo (190); esto sugiere que la glucosa ejerce un efecto represor directo o indirecto sobre la expresión de *skn-1*. Recientemente se ha descrito que DAF-16 regula transcripcionalmente a *skn-1* (77) y en este trabajo se observó que la abundancia del mRNA de *daf-16* disminuye en gusanos alimentados con glucosa, además las dietas altas en glucosa promueven la activación de la vía de la insulina, la cual regula negativamente la actividad de DAF-16, lo cual podría explicar en parte la represión de la expresión de *skn-1*.

Respecto a la participación de SKN-1 en la regulación de la esperanza de vida de *C. elegans* se observó que la mutante *skn-1(zu135)* tiene una esperanza de vida menor comparado con los gusanos silvestres, lo cual ha sido reportado anteriormente (77, 240, 241). No obstante, las dietas altas en glucosa no tuvieron un efecto aditivo en la reducción de la esperanza de vida de esta mutante, lo cual supone que en estas condiciones SKN-1 no regula

directamente la esperanza de vida de gusanos alimentados con glucosa. Anteriormente se ha observado que SKN-1 no participa en la regulación de la esperanza de vida promovida por mecanismos asociados con la disfunción mitocondrial (92). Los gusanos alimentados con glucosa desarrollan disfunción mitocondrial, lo cual podría explicar porque en este contexto SKN-1 no tiene un efecto directo sobre la esperanza de vida en *C. elegans*.

Por otra parte, SKN-1 regula transcripcionalmente genes del metabolismo de lípidos, así como genes de la fase II de desintoxicación (*gst-4*, *gcs-1*) en condiciones de estrés oxidante (94). Para lo cual requiere de la actividad de MDT-15 (242), el cual se une a SKN-1 facilitando su actividad transcripcional (94). Por otra parte, la sobreexpresión de SKN-1 en gusanos alimentados con glucosa promueve la oxidación de ácidos grasos lo cual protege a estos de la toxicidad asociada a las dietas altas en glucosa (242). Lo anterior sugiere que la represión transcripcional de *skn-1* en gusanos alimentados con glucosa podría contribuir indirectamente a la reducción en la esperanza de vida de los gusanos al inhibir parte de los mecanismos que atenúan la glucotoxicidad en *C. elegans*.

10.7 Las dietas altas en glucosa regulan la actividad de AMPK

Como se ha revisado a lo largo de este trabajo, distintos procesos que suceden en la glucotoxicidad de *C. elegans*, podrían explicar la reducción de la forma activa de AMPK/AAK-2 en los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa (73, 180). Cabe mencionar que la activación de AMPK reduce los niveles de triglicéridos e incrementa la respiración celular en *C. elegans* (180), además de reducir los niveles de ERO (231) por lo cual su activación es un potencial blanco terapéutico contra los efectos deletéreos de la glucotoxicidad.

Como se observó en este trabajo, a pesar de la disminución de la respiración celular, el contenido de ATP no disminuyó ni se observaron cambios en el cociente AMP/ATP, las cuales son las principales señales de activación de AMPK. El incremento en los niveles endógenos de glucosa así como de su internalización supondrían un incremento de sustrato a la vía glucolítica favoreciéndose la fosforilación a nivel de sustrato (producción de ATP) lo cual compensaría los niveles de nucleótidos de adenina en *C. elegans*.

El transporte de glucosa (que se incrementa en los gusanos alimentados con dietas altas en este azúcar) depende principalmente de la actividad de la vía de señalización de insulina DAF-2/IGF-1, la cual se encuentra activa en este contexto (82) y regula negativamente a AAK-2/AMPK (68) y al factor de transcripción DAF-16 (76). Este último modula la expresión de diversos genes blanco entre los que se encuentran *aak-2*, *aakb-1*, *aakg-4*, y *aakg-5* los cuales forman parte del complejo AAK-2/AMPK (70, 78, 243). A su vez AAK-2 puede activar a DAF-16 por medio de fosforilación, promoviendo su translocación al núcleo (70) y la subsecuente modulación de sus genes blanco. Por lo que se establece una regulación positiva por retroalimentación entre AAK-2/AMPK y DAF-16.

La señalización vía especies reactivas de oxígeno (ERO), así como la reducción en la respiración celular en la mitocondria (las cuales se observaron en los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa) podrían explicar la represión de AMPK. Estas condiciones pueden activar a AAK-2 (67, 72, 73) y a HIF-1 (72, 131). Este último reduce los niveles de la forma activa de AAK-2/AMPK (72) y evita la translocación de DAF-16 hacia el núcleo de las células (231) donde controla transcripcionalmente genes de respuesta antioxidante (70).

La inhibición de AAK-2/AMPK, así como de DAF-16 intensifica la generación de ERO así como la activación de HIF-1(72).

Cabe mencionar que AMPK y HIF-1 establecen una regulación negativa por retroalimentación, en la cual AMPK regula postranscripcionalmente a HIF-1 por medio de fosforilación el residuo de Serina Ser419 de HIF-1 (72); lo cual potencialmente podría inhibir su función, mientras que la sobreexpresión de HIF-1 reduce los niveles de la forma activa de AMPK (72) por un mecanismo aún desconocido. Por otra parte, la vía TOR (activada por la vía de la insulina) regula negativamente a AMPK, a través de la cinasa RSKS-1/S6K la cual reduce los niveles de la forma activa de AAK-2/AMPK (243). Cabe destacar que esta cinasa también activa a HIF-1 (228), por lo que posible que el efecto represor de RSKS-1 sobre AMPK/AAK-2 sea mediado por HIF-1.

Lo anterior permite vislumbrar que la cinasa AMPK podría ser sujeta a regulación negativa por parte de distintas vías de señalización, así como del factor de transcripción HIF-1, lo cual también puede darse a través de la represión del factor de transcripción DAF-16. Se requieren de más estudios que permitan corroborar éstas hipótesis, así como para entender el papel de las ERO y los factores de transcripción en la regulación de la esperanza de vida de *C. elegans* alimentado con dietas altas en glucosa.

10.8 Modelo teórico de las respuestas celulares a la glucotoxicidad en *C. elegans*

Con base en la información obtenida en este trabajo, se propone el siguiente modelo teórico el cual tiene como propósito integrar los distintos eventos moleculares reportados en la literatura y los observado en este trabajo con el fin de explicar los principales efectos de la glucotoxicidad en *C. elegans*. La adición de glucosa al medio de cultivo de *C. elegans* promueve la activación de la vía de la insulina, la cual facilita la internalización de la glucosa al interior de las células a través del transportador de glucosa FGT-1. En el interior de la célula, la glucosa es catabolizada a través de distintas rutas metabólicas, culminando en la generación de energía en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Fig. 27).

Un incremento en el flujo de electrones dentro de la cadena de transporte de electrones, promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales son neutralizadas por los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Sin embargo, las altas concentraciones de glucosa promueven un mayor flujo de electrones en la mitocondria, lo que genera una mayor producción de ERO, lo que a su vez produce estrés oxidante y daño oxidante en lípidos (lipoperoxidación), así como alteraciones en otros organelos incluidas las propias mitocondrias (las cuales muestran alteraciones en la cadena respiratoria). Este incremento en las ERO, promueve la potencial activación de diversas proteínas entre las que se incluyen AMPK y los factores transcripcionales HIF-1, CEP-1, DAF-16 y SKN-1 (Fig. 27).

La activación de la vía de la insulina por el consumo de dietas altas en glucosa da como resultado la activación de diferentes cinasas, incluidas AKT-1, SGK-1 y GSK-3. Estas cinasas podrían impedir la translocación al núcleo de los factores de transcripción DAF-16, SKN-1 y CEP-1, además la cinasa AKT-1 en conjunto con GSK-3 pueden activar al complejo

TOR, el cual regula el crecimiento y síntesis de proteínas (TORC1) y la acumulación de lípidos (TORC2). Mientras que un incremento en la disponibilidad de glucosa intracelular, así como su conversión a lípidos sería mediada por el factor de transcripción SBP-1, el cual se induce en los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa (Fig. 27).

Por su parte, las ERO podrían promover la estabilización de HIF-1, el cual podría a su vez inhibir a AMPK pese a que las ERO potencialmente podrían activarla. La acumulación de HIF-1 en el citoplasma favorecería su translocación al núcleo y la potencial activación de sus genes blanco. El daño celular promovido por las ERO, así como un incremento en sus niveles, serían las señales que activarían a CEP-1 y promoverían su translocación al núcleo y la regulación de la expresión de sus genes blancos. También podría inducir respuestas apoptóticas que podrían estar relacionadas con la reducción en la esperanza de vida de *C. elegans* en condiciones de glucotoxicidad (178), entre otros mecanismos propuestos (Fig. 27).

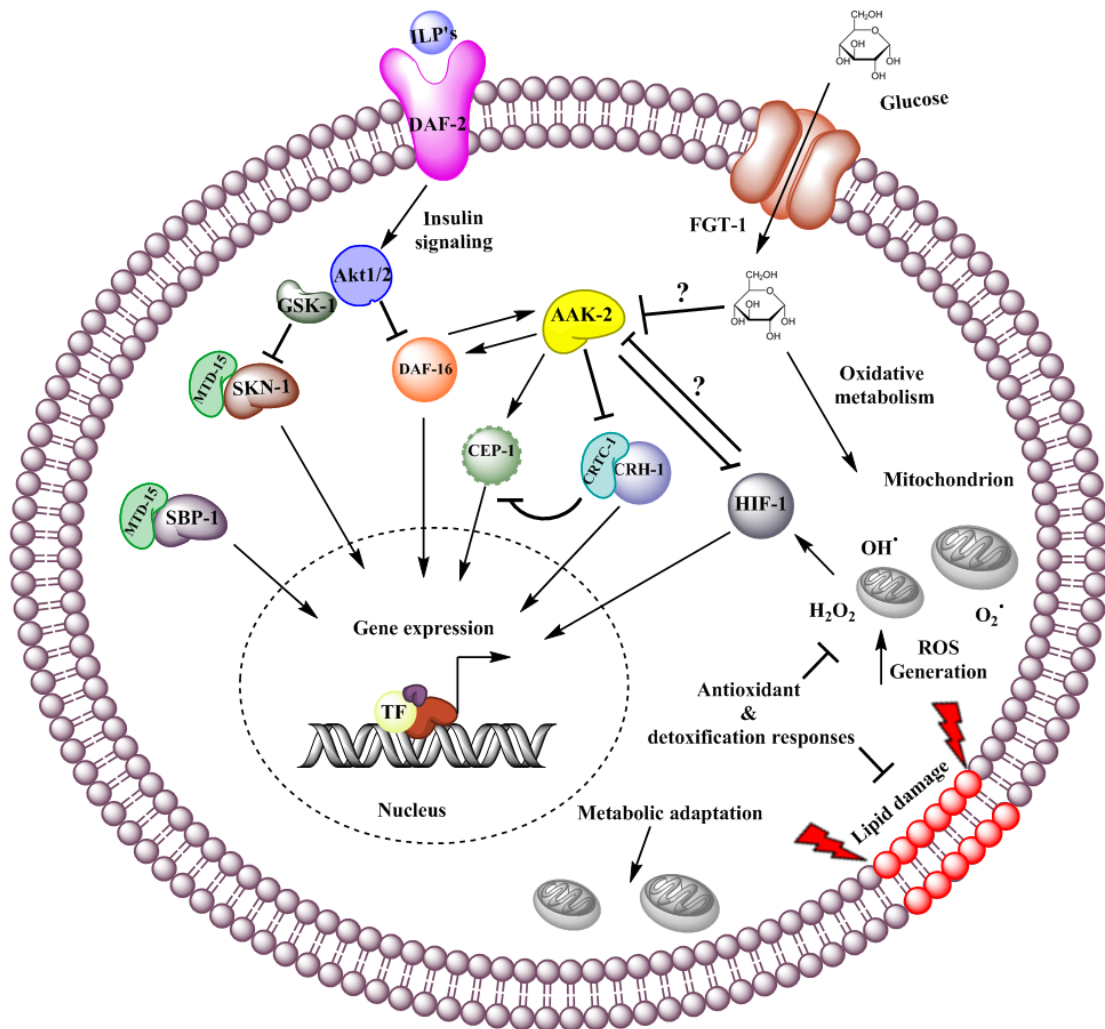


Fig. 27 Ilustración donde se esquematizan los principales eventos celulares promovidos por la glucotoxicidad en *C. elegans* (Elaboración propia).

10.9 Resumen de los principales hallazgos de este trabajo

1. Se logró implementar un modelo de toxicidad inducido por glucosa (glucotoxicidad) en *C. elegans* el cual logra recapitular a grandes rasgos algunos de los efectos fisiológicos observados en pacientes con obesidad y síndrome metabólico tales como alteraciones metabólicas, en el crecimiento y reducción del potencial reproductivo.
2. La adición de glucosa en el medio de cultivo es suficiente para inducir la glucotoxicidad en *C. elegans* y reducir su esperanza de vida.
3. Los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa experimentan estrés oxidante y en respuesta, se inducen los sistemas antioxidantes incluyendo al sistema del glutatión.
4. Dietas altas en glucosa, generan alteraciones celulares tales como ruptura de membranas, cambios en la morfología mitocondrial y alteraciones en la estructura del retículo endoplásmico, entre otras.
5. Las dietas altas en glucosa regulan la expresión de factores de transcripción de respuesta a distintos tipos de estrés, dichos factores son: cep-1/p53, daf-16/FoXO, skn-1c/Nrf, crh-1/CREB, hif-1/HIF-1a y spb-1/SRBP.
6. Los factores de transcripción: cep-1/p53, daf-16/FoXO, skn-1c/Nrf, crh-1/CREB, hif-1/HIF-1a y spb-1/SRBP forman parte de una compleja red de señalización que regula la esperanza de vida en gusanos alimentados con dietas altas en glucosa.

11 LIMITANTES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS

La principal limitante de este trabajo fue el no evaluar la localización subcelular de los factores de transcripción estudiados, lo anterior nos permitiría conocer si las múltiples señales promovidas por la glucotoxicidad modulan su translocación nuclear y la activación de sus genes blanco. En trabajos posteriores, esto podría evaluarse empleando cepas transgénicas de los factores de transcripción fusionados con proteínas reporteras, así como transgénicos con proteínas reporteras fusionadas a los promotores de genes blancos de regulación de estos factores de transcripción.

No obstante la actividad de estos factores de transcripción es tejido específico, así como los mecanismos que los regulan, por lo cual se plantean nuevas líneas de estudio como la participación del tejido somático y la línea germinal en la repuesta al estrés inducido por las dietas altas en glucosa, así como la participación y contribución de los distintos tejidos en la regulación esperanza de vida de *C. elegans* en condiciones de glucotoxicidad, así como la comunicación y las respuestas generadas por los distintos organelos. Finalmente un campo nuevo por explorar es el de los mecanismos transcripcionales que suceden en las mitocondrias así como conocer cuáles son los mecanismos por los cuales los niveles de ATP no se ven abatidos en los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa, pese a que la respiración celular disminuye.

12 CONCLUSIÓN

En este trabajo se logró desarrollar un modelo de glucotoxicidad empleando como organismo modelo al gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*. El modelo desarrollado recapitula los principales efectos fisiológicos observados en la glucotoxicidad de los mamíferos lo cual servirá como fundamento para el desarrollo de nuevas investigaciones que permitan comprender los mecanismos moleculares subyacentes a la glucotoxicidad.

Además este trabajo aporta evidencia inédita de los efectos deletéreos *in vivo* de la glucotoxicidad sobre la fisiología y estructura celular, tales como el daño a diversos organelos, así como de la regulación de la actividad de distintos factores de transcripción, los cuales son posibles candidatos terapéuticos para revertir la glucotoxicidad. Este modelo podrá servir como plataforma para el cribado e identificación de nuevos agentes farmacológicos contra la diabetes y la glucotoxicidad.

13 INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

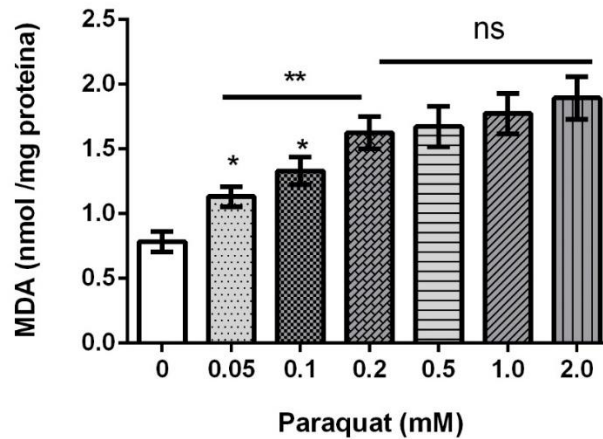


Fig. S1 Efecto de diferentes dosis de Paraquat en los niveles de peroxidación lipídica de *C. elegans*

Para inducir estrés oxidante, gusanos L4 cultivados en medio NGM en condiciones estándar se incubaron durante 1 hora a 20 °C en PBS 1X que contenía paraquat en concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 o 2.0 mM. Después de este tratamiento, los gusanos se lavaron 3 veces con PBS 1X para eliminar cualquier remanente de Paraquat, posteriormente se midió el contenido de MDA (ver Material y métodos). Se eligió la concentración de 0.2 mM de paraquat para inducir estrés oxidante, ya que en esta concentración observamos el nivel máximo de MDA. Los valores se expresan como media \pm SEM (n=6). Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones múltiples. Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y ns= no significativo.

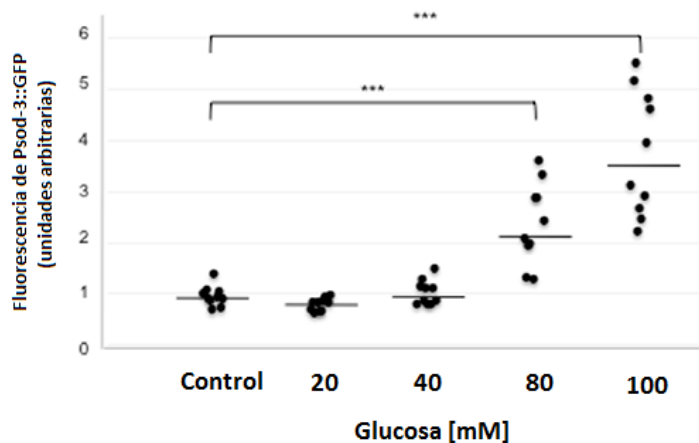


Fig. S2 Análisis de expresión relativa (fluorescencia) de la proteína reportera GFP en gusanos transgénicos psod-3::GFP alimentados con dietas altas en glucosa

Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones múltiples. Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

Tabla S1 Lista de oligonucleótidos (primers) empleados en este trabajo

Secuenciación de RNAi				
Templado/g en	Secuencia	Concentración (nM)	Tm (°C)	Amplicón (pb)
L4440	<i>Fw</i> GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT <i>Rev</i> TGG ATA ACC GTA TTA CCG CC	*	60	-
Retrotranscripción y PCR cuantitativa				
<i>Y45F10D.4</i>	<i>Fw</i> GCGAAAACACTCCTGCAC <i>Rev</i> TTTCGCGGGTTCTCGTAGTG	66	60	80
<i>sbp-1</i>	<i>Fw</i> CTT CTC AAT GCG ATT TTC CC <i>Rev</i> TCC AGA TAA TTG TTG GGT GG	66	55	60
<i>crh-1</i>	<i>Fw</i> ATG GAG TCA CTG GTT TTC AAT <i>Rev</i> TTG TGG TCC TCC TGG AAA TA	66	55	56
<i>hif-1</i>	<i>Fw</i> CGG AAA AGA AAC ATG GAA CG <i>Rev</i> CGA TTC TTT AGA CCG ACG AT	66	55	64
<i>cep-1</i>	<i>Fw</i> CCC AAG TTT GAG CGC AGA ATG <i>Rev</i> CCG ATG TCC TGC GAA TCG GG	66	60	58
<i>skn-1c</i>	<i>Fw</i> AAG GGC ACA CGA CAA GTG G <i>Rev</i> AGC ATT CTC TTC GGC AGT GAG	66	60	60
<i>daf-16</i>	<i>Fw</i> AAA GAG CTC GTG GTG GGT TA <i>Rev</i> TTC GAG TTG AGC CTT TGT AGT CG	66	63	67
Daño al DNA y número de copias de DNA mitocondrial				
<i>Pole</i>	<i>Fw</i> AGTCGTTGAACGCAGTGGTGTCAT <i>Rev</i> CAGTCTTCTTCGACGCATTCAACG	400	68	13.7 kb
<i>unc-2</i>	<i>Fw</i> TGGCTGGAACGAACCGAACCAT <i>Rev</i> GGCGGTTGTGGAGTGTGGGAAG	400	68	9.3 kb
<i>flr-1</i>	<i>Fw</i> TCCCGTCTATTGCAGGTCTTTCCA <i>Rev</i> GACGCGCACGATATCTCGATTTTC	400	63	225
<i>nduo-5</i>	<i>Fw</i> CACACCGGTGAGGTCTTTGGTTC <i>Rev</i> TGTCCTCAAGGCTACCACCTTCTTCA	400	63	195
<i>1528 (Fw)</i> <i>12442 (Rev)</i>	<i>Fw</i> CCATCAATTGCCCAAAGGGGAGT <i>Rev</i> TGTCCTCAAGGCTACCACCTTCTTCA	400	66	10.9 kb

Abreviaturas: Tm: temperatura de alineamiento; Fw: Oligonucleótido correspondiente a la cadena de DNA sentido (5'); Rev: Oligonucleótido correspondiente a la cadena de DNA antisentido (3'); *La concentración del oligo depende del protocolo de secuenciación del laboratorio responsable.

Tabla S2 Análisis estadístico de la longevidad de distintas cepas de *C. elegans* alimentadas con dietas altas en glucosa

Condición	cepa (n)	Longevidad media (días)	Cambio en longevidad media (%)	Longevidad Máxima (días)	Cambio en longevidad máxima (%)	χ^2	Valor <i>P</i>	Figura en el texto
Control	N2 Bristol (110)	14.48	-	23	-	-	-	Fig. 25a
	N2 Bristol (110)	16.18	-	26	-	-	-	
	N2 Bristol (110)	17.21	-	25	-	-	-	
20mM glucosa	N2 Bristol (110)	14.11	-2.56 ^a	17	-26.09 ^a	0.23 ^a	0.628 (ns)	Fig. 25a
	N2 Bristol (110)	16.21	0.19 ^a	19	-26.92 ^a	1.33 ^a	0.479 (ns)	
	N2 Bristol (110)	16.40	-4.71 ^a	20	-20.00 ^a	1.19 ^a	0.316 (ns)	
40mM glucosa	N2 Bristol (110)	10.03	-30.73 ^a	16	-30.43 ^a	48.72 ^a	<0.0001	Fig. 25a
	N2 Bristol (110)	11.22	-30.66 ^a	15	-42.31 ^a	52.65 ^a	<0.0001	
	N2 Bristol (110)	13.23	-23.13 ^a	15	-40.00 ^a	50.37 ^a	<0.0001	
80mM glucosa	N2 Bristol (110)	9.72	-32.87 ^a	13	-43.48 ^a	57.72 ^a	<0.0001	Fig. 25a
	N2 Bristol (110)	12.43	-23.18 ^a	13	-50.00 ^a	65.96 ^a	<0.0001	
	N2 Bristol (110)	11.80	-31.44 ^a	16	-36.00 ^a	47.60 ^a	<0.0001	
100 mM glucosa	N2 Bristol (110)	9.25	-36.12 ^a	11	-52.17 ^a	71.63 ^a	<0.0001	Fig. 25a
	N2 Bristol (110)	10.02	-38.07 ^a	13	-50.00 ^a	80.37 ^a	<0.0001	
	N2 Bristol (110)	11.49	-33.24 ^a	15	-40.00 ^a	60.47 ^a	<0.0001	
Control	N2 Bristol (100)	14.43	-	23	-	-	-	Fig. 25g
	N2 Bristol (120)	16.24	-	26	-	-	-	
	N2 Bristol (120)	17.21	-	27	-	-	-	
100 mM glucosa	N2 Bristol (110)	9.79	-32.15 ^a	11	-52.17 ^a	39.14 ^a	<0.0001	Fig. 25g
	N2 Bristol (120)	10.70	-34.11 ^a	16	-38.46 ^a	86.79 ^a	<0.0001	
	N2 Bristol (120)	10.02	-38.30 ^a	13	-51.85 ^a	56.69 ^a	<0.0001	
Control	<i>daf-16</i> (mgDf50) (110)	10.95	-24.11 ^a	14	-39.13 ^a	46.09 ^a	<0.0001	Fig. 25g
	<i>daf-16</i> (mgDf50) (110)	11.03	-32.08 ^a	16	-38.46 ^a	44.28 ^a	<0.0001	
	<i>daf-16</i> (mgDf50) (110)	11.45	-33.47 ^a	16	-40.74 ^a	53.27 ^a	<0.0001	
100 mM glucosa	<i>daf-16</i> (mgDf50) (110)	9.91	-31.32 ^a	12	-47.83 ^a	26.69 ^a 11.75 ^b	<0.0001 0.0018	Fig. 25g
	<i>daf-16</i> (mgDf50) (110)	8.62	-46.92 ^a	13	-50.00 ^a	30.18 ^a 13.27 ^b	<0.0001 0.0029	
	<i>daf-16</i> (mgDf50) (110)	10.2	-40.73 ^a	11	-59.26 ^a	37.64 ^a 16.50 ^b	<0.0001 0.0003	

Control		<i>daf-16</i> (120)	(mu86)	11.85	-17.88 ^a	20	-13.04 ^a	51.35 ^a	<0.0001	Fig. 25h
		<i>daf-16</i> (120)	(mu86)	11.26	-30.67 ^a	20	-23.08 ^a	54.63 ^a	<0.0001	
100 glucosa	mM	<i>daf-16</i> (120)	(mu86)	10.23	-29.11 ^a	16	-30.43 ^a	94.61 ^a 13.04 ^b	<0.0001 0.0003	Fig. 25h
		<i>daf-16</i> (120)	(mu86)	9.19	-43.41 ^a	15	-42.30 ^a	74.80 ^a 17.26 ^b	<0.0001 0.0005	
Control		<i>skn-1</i> (110)	(zu135)	12.41	-13.99 ^a	18	-21.74 ^a	18.59 ^a	<0.0001	Fig. 25e
		<i>skn-1</i> (110)	(zu135)	12.23	-24.69 ^a	18	-30.77 ^a	19.78 ^a	<0.0001	
		<i>skn-1</i> (110)	(zu135)	12.16	18.93 ^a	19	-20.83 ^a	16.54 ^a	0.0002	
100 glucosa	mM	<i>skn-1</i> (110)	(zu135)	12.35	-14.41 ^a	18	-21.74 ^a	15.99 ^a 0.01 ^b	0.0002 0.904 (ns)	Fig. 25e
		<i>skn-1</i> (110)	(zu135)	12.40	-23.65 ^a	18	-30.77 ^a	17.21 ^a 0.9 ^b	0.0001 0.183(ns)	
		<i>skn-1</i> (110)	(zu135)	11.70	-27.96 ^a	17	-29.16 ^a	16.47 ^a 0.18 ^b	0.0002 0.234(ns)	
Control		<i>cep-1</i> (110)	(gk138)	13.79	-4.44 ^a	20	-13.04 ^a	13.26 ^a	0.0008	Fig. 25d
		<i>cep-1</i> (110)	(gk138)	14.02	-13.67 ^a	22	-15.38 ^a	16.47 ^a	0.0003	
		<i>cep-1</i> (110)	(gk138)	14.22	-17.37 ^a	21	-22.22 ^a	18.97 ^a	0.0001	
100 glucosa	mM	<i>cep-1</i> (110)	(gk138)	12.49	-13.44 ^a	20	-13.04 ^a	3.54 ^a 4.97 ^b	0.179 (ns) 0.078 (ns)	Fig. 25d
		<i>cep-1</i> (110)	(gk138)	13.06	-19.58 ^a	19	-26.92 ^a	6.48 ^a 2.68 ^b	0.053(ns) 0.086(ns)	
		<i>cep-1</i> (110)	(gk138)	12.7	-26.21 ^a	21	-22.22 ^a	4.16 ^a 1.27 ^b	0.093 (ns) 0.296(ns)	
Control (RNAi)		N2; <i>pL4440</i> (110)	(110)	13.07	-	22	-	-	-	Fig. 25f
		N2; <i>pL4440</i> (110)	(110)	14.28	-	20	-	-	-	
		N2; <i>pL4440</i> (110)	(110)	13.29	-	20	-	-	-	
100 mM glucosa (RNAi)		N2; <i>pL4440</i> (110)	(110)	9.39	-28.16 ^c	12	-45.45 ^c	39.05 ^c	<0.0001	Fig. 25f
		N2; <i>pL4440</i> (110)	(110)	10.23	-28.36 ^c	13	-35.00 ^c	44.05 ^c	<0.0001	
		N2; <i>pL4440</i> (110)	(110)	9.01	-36.90 ^c	12	-40.00 ^c	38.27 ^c	<0.0001	
Control (RNAi)		N2; <i>sbp-1</i> (110)	(110)	11.72	-10.33 ^c	19	-13.64 ^c	1.65 ^c	0.199 (ns)	Fig. 25f
		N2; <i>sbp-1</i> (110)	(110)	12.01	-15.90 ^c	19	-5.00 ^c	0.34 ^c	0.478 (ns)	
		N2; <i>sbp-1</i> (110)	(110)	11.19	-21.64 ^c	18	-10.00 ^c	1.89 ^c	0.290 (ns)	
100 mM glucosa (RNAi)		N2; <i>sbp-1</i> (110)	(110)	9.42	-27.93 ^c	15	-31.82 ^c	10.31 ^c 0.38 ^d	0.004 0.900(ns)	Fig. 25f
		N2; <i>sbp-1</i> (110)	(110)	10.13	-29.06 ^c	13	-35.00 ^c	16.70 ^c 0.47 ^d	0.004 0.123 (ns)	
		N2; <i>sbp-1</i> (110)	(110)	10.46	-26.75 ^c	15	-35.00 ^c	18.27 ^c 0.44 ^d	0.002 0.110(ns)	
Control (RNAi)		N2; <i>hif-1</i> (110)	(110)	15.59	+19.28 ^c	22	0 ^c	95.16 ^c	<0.0001	Fig. 25b
		N2; <i>hif-1</i> (110)	(110)	18.20	+27.45 ^c	22	+10.00 ^c	98.23 ^c	<0.0001	

	N2; <i>hif-1</i> (110)	17.34	+21.43 ^c	20	0 ^c	89.60 ^c	<0.0001	
100 mM glucosa (RNAi)	N2; <i>hif-1</i> (110)	14.96	+14.46 ^c	22	0 ^c	4.6 ^c 0.79 ^d	0.065 (ns) 0.987 (ns)	Fig. 25b
	N2; <i>hif-1</i> (110)	16.2	+13.45 ^c	21	+5.00 ^c	6.41 ^c 0.620 ^d	0.045 0.746 (ns)	
	N2; <i>hif-1</i> (110)	15.87	+11.13 ^c	20	0 ^c	5.98 ^c 0.521 ^d	0.050 0.601 (ns)	
Control (RNAi)	N2; <i>crh-1</i> (110)	19.14	+46.44 ^c	28	+27.27 ^c	40.62 ^c	<0.0001	Fig. 25c
	N2; <i>crh-1</i> (110)	20.5	+43.56 ^c	29	+45.00 ^c	63.85 ^c	<0.0001	
	N2; <i>crh-1</i> (110)	21.2	+48.46 ^c	27	+35.00 ^c	52.14 ^c	<0.0001	
100 mM glucosa (RNAi)	N2; <i>crh-1</i> (110)	17.77	+35.96 ^c	26	+18.18 ^c	21.58 ^c 3.8 ^d	<0.0001 0.512 (ns)	Fig. 25c
	N2; <i>crh-1</i> (110)	19.33	+35.36 ^c	24	+20.00 ^c	19.76 ^c 3.22 ^d	<0.0001 0.443 (ns)	
	N2; <i>crh-1</i> (110)	18.27	+27.94 ^c	25	+25.00 ^c	26.44 ^c 2.61 ^d	<0.0001 0.347 (ns)	

Abreviaturas: n=número de gusanos, SD (Desviación estándar), ns=no significativo estadísticamente, χ^2 =ji-cuadrada.

Notas:

1. Todos los experimentos se realizaron en placas de cultivo NGM inoculadas con *E. coli* OP50 para los estudios con la cepa control y cepas mutantes; para los ensayos de RNAi, se empleó la cepa de *E. coli* HT115 (DE3) que contuviera el plásmido para RNAi de los genes de interés para hacer el silenciamiento del gen en estudio. Los ensayos de longevidad para cada cepa y condición se realizaron en tres réplicas independientes (ver materiales y métodos).
2. Las comparaciones entre los distintos grupos, se realizaron por medio de la prueba de Log-rank (Mantel-Cox), las diferencias entre los grupos se evaluaron por medio de la prueba *post hoc* de Bonferroni, el valor $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.
3. Los cambios en la longevidad media y máxima de las distintas cepas mutantes o RNAi fueron determinados con respecto a la cepa WT o el vector vacío pL4440 crecidos en condiciones control respectivamente.

Comparaciones

^a comparado con respecto a la cepa silvestre (WT) en condiciones control.

^b comparación de la misma cepa en condición control vs condición de estudio.

^c comparación con respecto a la cepa tratada con el vector vacío RNAi (pL4440) en condiciones control.

^d comparación de la misma cepa RNAi en condiciones control vs condición de estudio.

Tabla S3 Resumen de estudios previos sobre los efectos de la glucosa en *C. elegans*

Parámetro: Contenido de glucosa				
<i>Tratamiento</i>	<i>Etapa</i>	<i>Resultados</i>	<i>Comentarios</i>	<i>Referencias</i>
0, 10, 20, 30, 40 y 50mM	Adulta	El contenido de glucosa incrementó de acuerdo a la concentración en el medio.	150µl de una solución de glucosa a diferentes concentraciones se agregó al agar para alcanzar la concentración deseada.	(20)
50, 125, 250, 333 y 550mM	L4	El contenido de glucosa se incrementó en la condición de 250mM, sin embargo a 333mM se observó una disminución de sus niveles.	Sólo se probaron las condiciones de 250 y 333mM para esta medición, no hay información de las otras condiciones. No se declara el número de réplicas y experimentos.	(192)
100 mM	Adulto (1 día)	La glucosa en el medio incrementó en aproximadamente el 50% del contenido de glucosa con respecto a la condición control.	El contenido de glucosa se evaluó solo en adultos.	(82)
20, 40, 80 y 100 mM	L4	El contenido de glucosa incrementó de acuerdo con la glucosa en el medio.	El contenido de glucosa incrementó de acuerdo a la glucosa en el medio hasta alcanzar una meseta en 80mM.	Este trabajo
Parámetro: progenie				
<i>Tratamiento</i>	<i>Etapa</i>	<i>Resultados</i>	<i>Comentarios</i>	<i>Referencias</i>
100 mM	Adultos	La progenie no se afectó con el tratamiento de glucosa.	La medición de la cantidad de progenie se realizó hasta que los adultos no pusieron más huevecillos, el tamaño de muestra y el número de réplicas no se menciona.	(195)
0.1, 1, 2, 4 y 10%	L4 (n=10)	La progenie se redujo en todas las condiciones probadas	Los gusanos se crecieron en medios con glucosa y después de 2 días se evaluó la progenie en cada condición. No se menciona el número de réplicas.	(194)
2%	L4 (n=10)	La progenie se redujo en los gusanos alimentados con glucosa.	Los experimentos se realizaron con parentales (P0) y se extendió a las generaciones F1 y F2, pero estos gusanos no	(193)

			fueron alimentados con glucosa. No se menciona el número de réplicas.	
2%	L4 (n=36)	La progenie se redujo en los gusanos alimentados con glucosa.	Los experimentos se realizaron por triplicado.	(82)
50, 125, 250, 333 y 550mM	L4	La cantidad de progenie no se redujo en los gusanos crecidos en <250mM de glucosa, la reducción en la fertilidad se observó en concentraciones mayores de 250mM.	El número de gusanos analizados en cada condición no es el mismo, además no se menciona el número de réplicas.	(192)
20, 40, 80 y 100 mM	L4 (n=30)	La cantidad de progenie no se redujo en los gusanos alimentados con glucosa.	La cantidad de progenie no se redujo en los gusanos parentales (P0) crecidos en todas las condiciones de glucosa, sin embargo en las generaciones F1 y F2 (crecidas en las mismas condiciones de P0) si se redujo la progenie.	Este trabajo
Parámetro: Longevidad				
<i>Tratamiento</i>	<i>Etapa</i>	<i>Resultados</i>	<i>Comentarios</i>	<i>Referencias</i>
40mM	Gusanos adultos en etapa pre-fértil se consideró como el t=0.	Los gusanos alimentados con altas concentraciones de glucosa, redujeron su longevidad.	Se agregó sorbitol y FudR al medio para excluir los efectos osmóticos y prevenir la producción de huevecillos, respectivamente. Se emplearon 100 en este experimento.	(20)
No especificado	Adultos (n=50)	Los gusanos alimentados con altas concentraciones de glucosa, redujeron su longevidad.	Se agregó FudR al medio para prevenir la producción de huevecillos. Se analizó el efecto del tratamiento con insulina, sin embargo no se realizó la comparación de la condición control contra glucosa sin tratamiento de insulina.	(157)
0.1, 1, 2, 4 y 10%	Adultos (1 día)	No se observaron efectos negativos en la longevidad de los gusanos crecidos en concentraciones menores de 100 mM, sin embargo, la longevidad se	Se agregó FudR al medio para prevenir la producción de huevecillos, la concentración de FudR no se detalla en el trabajo. Se emplearon 20 gusanos por experimento.	(194)

		redujo significativamente en los gusanos alimentados con más de 100 mM de glucosa.		
100 mM	Adultos	La alimentación con glucosa en los adultos redujo la longevidad, sin embargo la alimentación con glucosa durante el desarrollo no tuvo efectos en la longevidad.	El número de gusanos analizados y las réplicas empleadas no se detallan en el trabajo.	(82)
4%	Adultos (n=20)	La glucosa redujo la longevidad en la generación P0; las generaciones F1 and F2 no redujeron significativamente su longevidad.	Se agregó FudR al medio para prevenir la producción de huevecillos; los experimentos se extendieron a las generaciones F1 y F2, las cuales fueron tratadas igual que la P0.	(193)
10mg/L	L4 (n=100)	Los gusanos alimentados con glucosa redujeron su longevidad.	Se probaron diversas concentraciones (1-20mg/L) y se observó una reducción concentración-dependiente en la longevidad de los gusanos.	(178)
100 y 200mM	L4 (n>30)	Los gusanos alimentados con ambas concentraciones de glucosa redujeron su longevidad.	Los ensayos se realizaron en medios líquidos.	(190)
20, 40, 80 y 100 mM	L4 (n=110)	La longevidad de los gusanos se redujo en todas las condiciones probadas con respecto al control.	La longevidad de los gusanos se redujo en todas las condiciones de glucosa con un comportamiento dependiente de la concentración.	Este trabajo
Parámetro: Estrés oxidante				
<i>Tratamiento</i>	<i>Etapa</i>	<i>Resultados</i>	<i>Comentarios</i>	<i>Referencias</i>
No especificado	Adultos	Los gusanos alimentados con glucosa incrementaron la producción de ERO.	La cuantificación de ERO se realizó por medio de la tinción de dihidroetidio, además se midió la actividad enzimática de SOD la cual se redujo en los gusanos alimentados con glucosa.	(157)

100 y 200mM	L4	Se observaron incrementos en la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidante.	Se observó un incremento en la expresión del gen reportero GFP (GST-4::GFP) en los gusanos alimentados con altas concentraciones de glucosa en medios líquidos de cultivo.	(190)
2%	Adultos	Los gusanos alimentados con glucosa no mostraron signos que evidenciaran estrés oxidante generalizado.	La cuantificación de ERO se realizó por medio de la tinción de dihidrofluoresceína.	(193)
0, 10, 20, 30, 40 y 50 mM	Adultos	La producción de ERO se incrementó en altas concentraciones de glucosa.	La cuantificación de ERO se realizó por medio análisis de imágenes obtenidas con microscopia confocal de gusanos teñidos con dihidroetidio.	(20)
20,40, 80 y 100 mM	L4	Los marcadores de estrés oxidante (CAT, mtSOD, GSH, MDA) se incrementaron en los gusanos alimentados con glucosa en todas las concentraciones probadas.	Los marcadores de estrés oxidante se midieron de forma cuantitativa por medio de espectrofotometría.	Este trabajo

13.1 Métodos complementarios:

13.1.1 *Extracción de proteínas totales de C. elegans*

Colecta y limpieza de la muestra

Colectar gusanos en la etapa requerida por el experimento, y lavarlos al menos tres veces con M9 o PBS 1X, dejar que por gravedad se asienten en el fondo y retirar la mayor cantidad de sobrenadante posible. Después de último lavado agregar M9 y dejar que se asienten por 30 min. Para eliminar las bacterias del intestino.

Extracción de proteínas

- 1.- Agregar buffer de lisis de acuerdo al peso húmedo de botón de gusanos:
<90mg peso húmedo agregar 150 μ L de buffer de lisis
>90mg peso húmedo agregar 100 μ L de buffer de lisis
- 2.- Congelar en nitrógeno líquido la mezcla (buffer + gusanos) y después descongelar a 37 °C con agitación en thermomixer.
- 3.- Homogenizar en porter o sonicador
Sonicar 3 ciclos de 30 seg por 1 minuto de intervalo (Amplitud 60-100, tiempo: 1 minuto, pulso: 3)
- 4.- Centrifugar a 12000 rpm por 10 min @ 4 °C
- 5.- Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo y rotulado y almacenar @ - 70 °C
- 6.- Cuantificar proteínas por el método de Bradford.

Nota: éste protocolo de extracción se aplica para purificación de proteínas totales para Western Blot, (incluyendo proteínas fosforiladas), ensayos de EMSA y para determinación de actividad enzimática, para éste último tener en cuenta que el buffer no tenga compuestos que inhiban la reacción enzimática a medir.

Buffer de lisis

50 mM HEPES
50 mM KCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
5 mM fosfato b glicerol
0.1% (v/V) triton X-100
Inhibidor de proteasas 1X
50 mM Fluoruro de Sodio
1 mM Ortovanadato de sodio
5 mM Pirofosfato de sodio
0.2 mM de PMSF

Preparar alícuotas de 500 μ L del buffer de lisis ya que se emplea muy poco. Congelar @ -20 °C.

Elaboró **Jonathan Alcántar Fernández**

13.1.2 *Protocolo para el aislamiento de mitocondrias y fracción nuclear de C. elegans*

Consideraciones:

Todos los pasos a 4 °C (hielo).
Todos los buffers deben estar fríos.

Procedimiento:

Colecta y limpieza de la muestra

Colectar gusanos en la etapa requerida por el experimento, y lavarlos al menos tres veces con M9 o PBS 1X, dejar que por gravedad se asienten en el fondo y retirar la mayor cantidad de sobrenadante posible. Después de último lavado agregar M9 y dejar que se asienten por 30 min. Para eliminar las bacterias del intestino.

- 1.- Agregar buffer de lisis de acuerdo al peso húmedo de botón de gusanos:
<90mg peso húmedo agregar 150 µL de buffer de lisis
>90mg peso húmedo agregar 100 µL de buffer de lisis
 - 2.- Congelar en nitrógeno líquido la mezcla (buffer + gusanos) y después descongelar a 37 °C con agitación en thermomixer.
 - 3.- Homogenizar en porter o sonicador
Sonicar 3 ciclos de 30 seg por 1 minuto de intervalo (Amplitud 60-100, tiempo: 1 minuto, pulso: 3)
 4. Centrifugar a 800 g, 25 min a 4 °C. Para eliminar el debris.
 5. Guardar el sobrenadante (SB1) en hielo.
 6. Volver a homogenizar el pellet en 150 µL de buffer de aislamiento (30 pases a 50 rpm).
 7. Centrifugar el nuevo homogenado y el SB1 a 800 g, 25 min a 4 °C. (SB1 corresponde a fracción citoplasmática)
 8. Guardar el nuevo sobrenadante (SB2) en hielo. (SB2 corresponde a fracciones subcelulares)
 9. Volver a homogenizar el pellet (30 pases a 50 rpm) en 150ul mL de buffer de aislamiento.
 10. Centrifugar SB2 y el tercer homogenado a 800 g por 25 min, 4 °C. **EL PELLETT QUE RESULTA DE ESTA TERCERA HOMOGENIZACIÓN CORRESPONDE A LA FRACCIÓN NUCLEAR** (no son núcleos puros, pero es una fracción enriquecida de núcleos, libres de mitocondrias).
 11. La fracción nuclear se puede lisar con buffer RIPA o buffer de lisis.
- NOTA: la fracción nuclear se ve muy viscosa.
- 12.- Recuperar los sobrenadantes en un tubo nuevo por cada fracción, rotularlos y almacenar @ - 70 °C
 - 13- Cuantificar proteínas por el método de Bradford.

Buffer de lisis

50 mM HEPES
50 mM KCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
5 mM fosfato b glicerol
0.1% (v/v) triton X-100
Inhibidor de proteasas 1X
50 mM Fluoruro de Sodio
1 mM Ortovanadato de sodio
5 mM Pirofosfato de sodio
0.2 mM de PMSF

Preparar alícuotas de 500 μ L del buffer de lisis ya que se emplea muy poco. Congelar @ -20 °C.

BUFFER DE AISLAMIENTO (pH 7.5)

210 mM manitol
70 mM sacarosa
1 mM EDTA
10 mM HEPES
0.5 mg/mL albúmina deslipidada
1 pastilla de inhibidores de proteasas (Roche) por cada 50 mL de buffer preparado.

Elaboró **Jonathan Alcántar Fernández**

13.1.3 *Ensayo colorimétrico de captación de glucosa con el análogo 2-desoxiglucosa*

Se empleará el sistema comercial 2-deoxyglucose (2DG) Uptake Measurement sistema, empresa Cosmo Bio. Catálogo No. CSR-OKP-PMG-K01E.

Colecta y limpieza de la muestra

Pesar el tubo donde se colectarán los gusanos, Colectar mg (peso húmedo) de gusanos en la etapa requerida por el experimento, y lavarlos al menos tres veces con M9 o PBS 1X, dejar que por gravedad se asienten en el fondo y retirar la mayor cantidad de sobrenadante posible. Después de último lavado agregar M9 y dejar que se asienten por 30 min. Para eliminar las bacterias del intestino

Incorporación de 2-Desoxiglucosa.

1. Preparar una solución 2 mM de desoxiglucosa (sigma) en amortiguador M9, y diluir a 0.5 mM
2. Suspender el botón de gusanos con 200 μ L de la solución de 2-desoxiglucosa 0.5mM e incubar por 2h a 20 °C.
3. Lavar tres veces los gusanos con amortiguador M9 frio, y remover lo más que se pueda del amortiguador, pesar el botón de gusanos, agregar 80 μ L de buffer de extracción y mezclar.
4. Congelar la mezcla anterior con nitrógeno líquido, calentar a 85 °C y repetir el tratamiento e incubar la muestra a 85 °C por 40 min, con agitación constante (500 rpm).
5. Centrifugar la muestra a 13,000 rpm por 20 min a 4 °C. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo previamente rotulado, tomar una alícuota para la determinación y el resto del sobrenadante almacenar a -20 °C, no se debe agregar a la muestra inhibidores de proteasas, o agentes reductores tales como DTT o β -mercaptoetanol.
6. Con la alícuota, hacer una dilución 1:4 con el amortiguador de dilución 1X (el cual se provee con el sistema).

Medición de la incorporación de 2-Desoxiglucosa.

La determinación se hará en placas de 96 pozos.

1. Agregar 60 μ L de Reaction mix A por cada pozo que se empleará.
2. Agregar 20 μ L de estándar de 2-desoxiglucosa 6P (2-DG6P) acorde a la curva estándar.
3. Agrega 20 μ L de muestra (dilución 1:4, paso 6 de la sección anterior) mezclar generosamente.
4. Incubar la placa a 20 °C por 20 horas.
5. Agregar a cada pozo 5 μ L de solución B, mezclar generosamente e incubar a 38 °C por 1 hora.
6. Agregar a cada pozo 5 μ L de solución C, mezclar generosamente, incubar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente. En este tiempo preparar el mix D.
7. Agregar a cada pozo 30 μ L de mix D, mezclar generosamente e incubar a 38 °C por 1 hora.
8. Agregar a cada pozo 5 μ L de solución E, mezclar generosamente e incubar a 60 °C por 1 hora. Enfriar inmediatamente a 4 °C por 5 minutos

9. Agregar a cada pozo 5 μL de solución F, mezclar generosamente, incubar la mezcla por 15 minutos a temperatura ambiente. En este tiempo preparar la solución “Enzyme cycling”.
10. Agregar 70 μL de solución “Enzyme cycling” a cada pozo. Mezclar generosamente y leer la O.D. 420 nm cada cinco minutos por 30 min.

Adaptado de *Saito et al, 2011* (156)

Elaboró **Jonathan Alcántar Fernández**

13.1.4 *Ensayo colorimétrico para la determinación de glutatión oxidado y reducido en C. elegans*

SISTEMA HT Glutathione Assay Sistema Cat. 7511-100-K TREVIGEN

NOTA: ésta determinación debe hacerse con la muestra fresca, ya que el glutatión se degrada con facilidad no obstante la congelación de la muestra, por lo cual al congelar la muestra y procesar posteriormente se alteran las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas y por consecuencia la determinación y posterior interpretación de los resultados.

Preparación de reactivos:

Mix de reacción:

1. Reconstituir una botella de “Reaction mix” con 8 mL de Agua desionizada.
2. Antes del ensayo, mezclar por vortex y posteriormente centrifugar a 8000 rpm @ 4 °C por 1 min el contenido del vial de glutatión reductasa, posteriormente añadir 10 µL a la botella “Reaction mix” preparada en el paso anterior.

Ácido metafosfórico (5%)

Preparar una solución al 5% (w/v) de ácido metafosfórico en agua desionizada, el volumen sugerido a preparar son 50 mL.

PRECAUCIÓN: el ácido metafosfórico es corrosivo, para su manipulación, emplear guantes, bata y usar campana para sustancias químicas.

4-vinil-piridina

Preparar una solución 2 M de 4-vinil-piridina mezclando 108 µL de 4-vinil-piridina con 392 µL de etanol (volumen final de 500 µL), usar ésta mezcla fresca para la determinación y descartar el resto.

Disulfuro de glutatión (GSSG) oxidado

La concentración del stock es de 4 µM, listo para usarse.

Buffer de ensayo 1X (buffer Assay 1X)

Hacer una dilución (1:10) con agua desionizada a partir del buffer Assay 10X.

Preparación de la muestra

Colecta y limpieza de Gusanos de *Caenorhabditis elegans*

Colectar gusanos en la etapa requerida por el experimento, y lavarlos al menos tres veces con M9 o PBS 1X, dejar que por gravedad se asienten en el fondo y retirar la mayor cantidad de sobrenadante posible. Después de último lavado agregar M9 y dejar que se asienten por 30 min. Para eliminar las bacterias del intestino. Medir el peso húmedo del botón de gusanos que se procesará, ya que el contenido de glutatión se normalizará con la masa de gusanos empleada.

Preparación de lisados

1. Añadir, para 50 mg de gusanos 350 μ L de una solución al 5% (w/v) de ácido metafosfórico relación (1:8), la cual previamente se ha enfriado con hielo.
2. Resuspender el pellet homogenizar en frío usando un sonicador
Sonicar 3 ciclos de 30 seg por 1 minuto de intervalo (Amplitud 60-100, tiempo: 1 minuto, pulso: 3)
3. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min @ 4 °C.
4. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo y rotulado y almacenar en hielo.
5. Tomar una alícuota para cuantificar proteínas.

Procesamiento de las muestras

Hacer una dilución 1:30 de cada muestra empleando como diluyente “Assay Buffer 1X”

La muestra se empleará para la determinación de glutatión total y oxidado, en ambas determinaciones se medirá por triplicado y se agrega por pozo 50 μ L de muestra diluida, por lo que por cada determinación se emplearán 150 μ L de muestra diluida, en total para ambas especies de glutatión serán 300 μ L, y para compensar errores de pipeteo, se sugiere preparar 400 μ L de muestra diluida.

El volumen anterior de muestra, (400 μ L) dividirlo en dos tubos (200 μ L cada uno), uno para la determinación de glutatión total (éste se mantendrá en hielo) y el segundo se empleará para la derivatización de la muestra con 4-vinilpiridina y posterior determinación de glutatión oxidado.

Tratamiento de la muestra (determinación de glutatión oxidado)

La muestra se tratará con una solución 2 M de 4-vinilpiridina (Sigma), para preparar ésta solución hacer el cálculo necesario de los volúmenes para preparar la solución, ya que los sobrantes se descartan.

108 μ L de 4-vinilpiridina + 392 μ L de Etanol puro = 500 μ L de solución 2 M 4-vinilpiridina

Se toma 1 μ L de ésta solución por cada 50 μ L de muestra, para un volumen de 200 μ L de muestra (que ya incluye los triplicados técnicos de cada muestra) se tomarán 4 μ L de la solución 2 M 4-vinilpiridina. Tener en cuenta que la curva estándar de glutatión oxidado también se derivatizara, por lo que se necesitarán 3 μ L de solución 2M **4-vinilpiridina**.

Como puede observarse se requiere muy poco reactivo por lo que se aconseja se hagan los cálculos adecuados para preparar el volumen necesario de 2 M 4-vinilpiridina para tratar las muestras y la curva estándar.

Tratamiento de la muestra.

50 μL de muestra diluida
1 μL 2 M 4-vinilpiridina
1 μL GSSG (4 μM) } Mezclar con vortex e incubar a temperatura ambiente por 1 h.

Mientras las muestras para la determinación de glutatión oxidado se derivatizan, se cuantificará el glutatión total.

Determinación de glutatión total

Curva estándar de glutatión

1. Agregar 50 μL de “1X Assay Buffer” en todos los pozos en las filas A –E y en las columnas 1, 2 y 3 de la placa de 96 pozos.
2. Agregar 50 μL de la solución 4 μM GSSG a los pozos A1, A2 y A3. Mezclar por pipeteo la solución al menos 10 veces. (auxiliarse de una pipeta multicanal)
3. Transferir 50 μL de los pozos A1, A2 y A3 a los pozos B1, B2 y B3. Mezclar por pipeteo la solución al menos 10 veces.
4. Repetir el paso tres hasta llegar a la fila “D” (Pozos D1-3), mezclar y remover 50 μL de los pozos de la fila D para tener el mismo volumen en todos los pozos.
5. Los pozos E1, 2 y 3 son los blancos (no llevan estándar de glutatión).

La concentración de estándar en los pozos es la siguiente:

Fila A= 100 pmoles/pozo

Fila B= 50 pmoles/pozo

Fila C= 25 pmoles/pozo

Fila D= 12.5 pmoles/pozo

Fila E= 0 pmoles/pozo

6. Agregar 50 μL de muestra provenientes de la dilución efectuada a los pozos a partir de la fila F
7. Agregar a todos los pozos 150 μL de “Reaction Mix”, mezclar.
8. Leer la absorbancia de las muestras (405 nm) en intervalos de 1 minuto hasta completar 20 min o hasta que ya no se observen cambios en la absorbancia.

Determinación de glutatión oxidado

Curva estándar de glutatión oxidado

1. Agregar 50 μL de “1X Assay Buffer” en todos los pozos en las filas A –E y en las columnas 1, 2 y 3 de la placa de 96 pozos.
2. Agregar 50 μL de la solución 4 μM GSSG tratado con 1 μL de **2 M 4-vinilpiridina** a los pozos A1, A2 y A3. Mezclar por pipeteo la solución al menos 10 veces. (auxiliarse de una pipeta multicanal).
3. Transferir 50 μL de los pozos A1, A2 y A3 a los pozos B1, B2 y B3. Mezclar por pipeteo la solución al menos 10 veces.
4. Repetir el paso tres hasta llegar a la fila “D” (Pozos D1-3), mezclar y remover 50 μL de los pozos de la fila D para tener el mismo volumen en todos los pozos.
5. Los pozos E1, 2 y 3 son los blancos (no llevan estándar de glutatión).

La concentración de estándar en los pozos es la siguiente:

Fila A= 100 pmoles/pozo

Fila B= 50 pmoles/pozo

Fila C= 25 pmoles/pozo

Fila D= 12.5 pmoles/pozo

Fila E= 0 pmoles/pozo

6. Agregar 50 μ L de muestra tratadas con **2 M 4-vinilpiridina** a los pozos a partir de la fila F
7. Agregar a todos los pozos 150 μ L de “Reaction Mix”, mezclar.
8. Leer la absorbancia de las muestras (405 nm) en intervalos de 1 minuto hasta completar 20 min o hasta que ya no se observen cambios en la absorbancia.

Cálculo de la concentración de glutatión total

1. Promediar las tres lecturas de absorbancia de los puntos de la curva estándar y las muestras por cada tiempo.
2. Graficar los promedios de las lecturas de absorbancia contra el tiempo para cada punto de la curva y cada muestra.
3. Calcular la pendiente en la región lineal de la cinética de la reacción.
4. Restar la pendiente del blanco a cada punto de la curva y las muestras, y graficar la concentración de glutatión en los estándares contra sus respectivas pendientes
5. Interpoliar los valores de las pendientes de las muestras contra la curva de regresión de la curva estándar para conocer la concentración de glutatión en las muestras.
6. Multiplicar por el factor de dilución para conocer el valor real de glutatión en la muestra.

Cálculo de la concentración de glutatión oxidado

Repetir el procedimiento que se empleó para el glutatión total.

Cálculo de la concentración de glutatión reducido

Restar para cada muestra el glutatión oxidado del glutatión total.

Normalización

Normalizar las cantidades de las especies de glutatión con respecto a los mg de peso húmedo de los gusanos empleados y reportar como pmoles de glutatión/mg de gusano.

Referencias auxiliares

Rahman I, Kode A, Biswas SK (2006) *Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method*. Nat Protoc 1:3159–3165

Owen W. Griffith (1980) *Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine*. Analytical Biochemistry 106,207-212

Elaboró **Jonathan Alcántar Fernández**

13.1.5 *Determinación de peroxidación lipídica en C. elegans*

Preparación de la muestra

1. Resuspender un botón de gusanos (100 µL) con 100 µL de buffer de fosfatos pH 7.4, 20 mM.
2. Congelar con nitrógeno líquido y después calentar a 37 °C, repetir ésta operación 3 veces.
3. Sonicar la muestra en hielo: amplitud 60-100, pulso: 3 tiempo: 1 minuto.
4. Centrifugar el homogenado a 3000g @ 4 °C por 10 min para remover restos celulares y cutículas.
5. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, estéril y rotulado, descartar el pellet.
6. Tomar 10ul del sobrenadante para cuantificar proteínas por el ensayo de Bradford.
7. Almacenar en hielo el homogenado hasta su posterior uso.

Curva estándar de Malondialdehído (MDA)

El malondialdehído es provisto en forma de acetal, porque en su forma de aldehído es muy inestable, se emplea tetrametoxipropano (TMPO) ya que al hidrolizarse en medio ácido y a temperaturas elevadas (90 °C), genera el MDA

1. Preparar 2 mL de una solución 10 mM de TMPO en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.4 (Stock A)
2. Diluir 1:500 el stock A con amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.4 (Solución de trabajo: 20 µM)
3. Preparar en tubos de ensaye de 5 mL la curva estándar y cada una de las muestras como se muestra a continuación

Concentración de MDA	Blanco	50 nM	100 nM	200 nM	500 nM	1000 nM	2000 nM
TMPO 20µM	-	2.5 µL	5 µL	10 µL	25 µL	50 µL	100 µL
TBA 0.375%	1 mL	997.5 µL	995 µL	990 µL	975 µL	950 µL	900 µL
Volumen final	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

Las muestras se prepararán agregando 200 µL de homogenado y 800 µL de solución TBA

Tratamiento de las muestras

1. Hervir las muestras por 30 min, recuperar la mezcla de reacción en un tubo eppendorf previamente rotulado, centrifugar y recuperar el sobrenadante, descartar el pellet.
2. Cargar por triplicado en una placa de 96 pozos 200 µL de cada muestra, incluyendo los estándares de la curva
3. Leer la absorbancia a 532 nm
4. Realizar una regresión lineal para la curva estándar de Abs (532nm) vs nM MDA
5. Interpolare las absorbancias de las muestras en la curva estándar.

Consideraciones:

- ✓ Ésta determinación debe efectuarse con la muestra fresca, por lo que se recomienda preparar un día antes los estándares y soluciones necesarias para el ensayo.
- ✓ Las muestras deben ser homogenizadas y procesadas en fresco el mismo día para prevenir una mayor oxidación, lo cual podría alterar el resultado del ensayo.
- ✓ La solución de TBA al 30% se debe preparar al momento de usarse y al abrigo de la luz, por lo cual ha de cubrirse el recipiente con papel aluminio.

Reactivos

Solución 10 mM TMPO

3.29 μ L de TMPO

1996.70 buffer de fosfatos pH 7.4

Buffer de fosfatos 100 mM pH 7.4 (100 mL)

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.842 \text{ g}$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 0.54 \text{ g}$

Disolver en 60 mL de agua desionizada, ajustar el pH con NaOH concentrado y aforar a 100 mL

Solución de TBA al 0.375% (**cantidad para una reacción**)

3.75 mg de TBA (MP biomedical)

20 μ L de HCl concentrado

830 μ L de agua desionizada

150 μ L de TCA (ácido tricloro acético) (100%)

Mezclar con barra magnética y al abrigo de la luz, no es necesario calentar para disolver el TBA

Elaboró **Jonathan Alcántar Fernández**

13.1.6 *Actividad enzimática de complejos de la cadena respiratoria*

Preparación de blanco de reacción

1. En una celda de cuarzo limpia, adicionar todos los elementos de reacción (incluido el sustrato), excepto por la muestra de mitocondrias, en su lugar agregar el mismo equivalente volumétrico de buffer de extracción de mitocondria.
2. Dar a la mezcla anterior el mismo tratamiento que se da a cada una de las muestras, medir la absorbancia del blanco y restarlo de la absorbancia de cada una de las muestras analizadas.
3. Lo anterior se repetirá para el blanco de reacción con inhibidores de cada uno de los complejos.

Procedimiento general para la determinación de la actividad enzimática

1. Representar mediante un gráfico de dispersión el cambio de absorbancia (Abs) contra el tiempo de cada una de las reacciones.
2. Identificar visualmente la fase lineal así como el intervalo de tiempo y absorbancia correspondiente con la región seleccionada.
3. Determinar la ecuación de la recta y su pendiente ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$), si el coeficiente de correlación de la ecuación es superior a 0.95, se considera aceptable dicha pendiente para la determinación de la actividad enzimática.

Determinación de la actividad enzimática basal

1. Medir el cambio en la absorbancia ($\Delta\text{abs}/\text{min}$) en la fase lineal, en la mezcla de reacción correspondiente (incluyendo la muestra de mitocondrias) sin la adición de sustrato.

Determinación de la actividad total

1. Adicionar la cantidad correspondiente de sustrato a la mezcla de reacción anterior, mezclar y medir el cambio en la absorbancia ($\Delta\text{abs}/\text{min}$) en la fase lineal. Calcular la actividad enzimática neta por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad neta} \left(\frac{\Delta\text{Abs}}{\text{min}} \right) = (\Delta\text{abs}/\text{min}_{\text{basal}}) - (\Delta\text{abs}/\text{min}_{\text{total}})$$

La actividad enzimática específica de cada complejo se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$U \text{ (nmoles/min /mg proteína)} = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times V(\text{mL})}{\epsilon \times L(\text{cm}) \times V_{\text{muestra}}(\text{ml}) \times \text{prot}(\text{mg/mL})}$$

$\Delta\text{Abs}/\text{min}$ (min^{-1}) = Actividad enzimática neta.

V (mL) = Volumen de reacción.

ϵ ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = Coeficiente de extinción molar del sustrato. Véase la tabla XX

L (cm) = Longitud de trayectoria en la celda o placa para la medición de absorbancia.

V_{muestra} (mL) = volumen de muestra que se adiciona a la mezcla.

Prot (mg/mL) = concentración de proteína en la muestra.

Tabla S4 Resumen de las condiciones de reacción para evaluar la actividad de la cadena de transporte de electrones

Característica	CI	CII	CIII	CIV	Citrato sintasa
Longitud de onda (nm)	340	600	550	550	412
ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	6.2	19.1	18.5	18.5	13.6
Sustrato/donador de electrones	NADH, Ub ₁	Succinato, DCPIP, Dub	DubH ₂ , Cit c	Cit cH ₂	DTNB, Acetil-CoA
Inhibidor	Rotenona	Malonato	Antimicina A	KCN	-

Modificada de (169)

Elaboró **Jonathan Alcántar Fernández**

14 REFERENCIAS

1. OMS. Diabetes. 2016 [cited 2019 15/11]; Available from: https://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/.
2. OMS. INFORME MUNDIAL SOBRE LA DIABETES. Geneva: OMS 2016.
3. Rojas-Martinez R, Basto-Abreu A, Aguilar-Salinas CA, Zarate-Rojas E, Villalpando S, Barrientos-Gutierrez T. Prevalence of previously diagnosed diabetes mellitus in Mexico. *Salud publica de Mexico*. 2018;60(3):224-32.
4. OECD. OECD Reviews of Health Systems: Mexico 2016. Paris: OECD, 2016.
5. Luo X, Wu J, Jing S, Yan L-J. Hyperglycemic Stress and Carbon Stress in Diabetic Glucotoxicity. *Aging and disease*. 2016;7(1):90-110.
6. Bacha F, Gungor N, Lee S, Arslanian SA. Progressive deterioration of beta-cell function in obese youth with type 2 diabetes. *Pediatric diabetes*. 2013;14(2):106-11.
7. Kaiser N, Leibowitz G, Neshet R. Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2003;16(1):5-22.
8. Weir GC, Marselli L, Marchetti P, Katsuta H, Jung MH, Bonner-Weir S. Towards better understanding of the contributions of overwork and glucotoxicity to the beta-cell inadequacy of type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2009;11 Suppl 4:82-90.
9. Del Prato S. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2009;26(12):1185-92.
10. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental*. 2016;65(8):1049-61.
11. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1840(9):2709-29.
12. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*. 2003;552(Pt 2):335-44.
13. Delgado Olivares L, Betanzos Cabrera G, Sumaya Martínez MT. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*. 2010;18(50):10-5.
14. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404(6779):787-90.
15. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(6):1446-54.
16. Chanseume E, Barquissau V, Salles J, Aucouturier J, Patrac V, Giraudet C. Muscle mitochondrial oxidative phosphorylation activity, but not content, is altered with abdominal obesity in sedentary men: synergism with changes in insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95.
17. Bharadwaj MS, Tyrrell DJ, Leng I, Demons JL, Lyles MF, Carr JJ, et al. Relationships between mitochondrial content and bioenergetics with obesity, body composition and fat distribution in healthy older adults. *BMC obesity*. 2015;2:40-.
18. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseume E, Chauvin MA, Morio B, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):789-800.
19. Du D, Shi YH, Le GW. Oxidative stress induced by high-glucose diet in liver of C57BL/6J mice and its underlying mechanism. *Molecular biology reports*. 2010;37(8):3833-9.
20. Schlotterer A, Kukudov G, Bozorgmehr F, Hutter H, Du X, Oikonomou D, et al. *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated lifespan reduction. *Diabetes*. 2009;58(11):2450-6.

21. Gao CL, Zhu C, Zhao YP, Chen XH, Ji CB, Zhang CM, et al. Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;320(1-2):25-33.
22. Chen XH, Zhao YP, Xue M, Ji CB, Gao CL, Zhu JG, et al. TNF-alpha induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;328(1-2):63-9.
23. Kim WH, Lee JW, Suh YH, Hong SH, Choi JS, Lim JH, et al. Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2005;54(9):2602-11.
24. Russell JW, Golovoy D, Vincent AM, Mahendru P, Olzmann JA, Mentzer A, et al. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB Journal*. 2002;16(13):1738-48.
25. Xie L, Zhu X, Hu Y, Li T, Gao Y, Shi Y, et al. Mitochondrial DNA oxidative damage triggering mitochondrial dysfunction and apoptosis in high glucose-induced HRECs. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(9):4203-9.
26. Trudeau K, Molina AJ, Roy S. High glucose induces mitochondrial morphology and metabolic changes in retinal pericytes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(12):8657-64.
27. Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation*. 2000;101(22):2618-24.
28. Ho FM, Lin WW, Chen BC, Chao CM, Yang CR, Lin LY, et al. High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cell Signal*. 2006;18(3):391-9.
29. Munusamy S, MacMillan-Crow LA. Mitochondrial superoxide plays a crucial role in the development of mitochondrial dysfunction during high glucose exposure in rat renal proximal tubular cells. *Free radical biology & medicine*. 2009;46(8):1149-57.
30. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2015:1-31.
31. Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, et al. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*. 2003;421(6920):268-72.
32. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1986;314(1165):1-340.
33. Markaki M, Tavernarakis N. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnology journal*. 2010;5(12):1261-76.
34. Blaxter M. *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science*. 1998;282(5396):2041-6.
35. Baugh LR. To grow or not to grow: nutritional control of development during *Caenorhabditis elegans* L1 arrest. *Genetics*. 2013;194(3):539-55.
36. Cassada RC, Russell RL. The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1975;46(2):326-42.
37. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;77.
38. Consortium CeS. Genome sequence of the nematode *C. elegans* : a platform for investigating biology. *Science*. 1998;282(5396):2012-8.
39. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
40. Braeckman BP, Houthoofd K, Vanfleteren JR. Intermediary metabolism. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2009:1-24.
41. McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Thornton J, Gems D. Diapause-associated metabolic traits reiterated in long-lived *daf-2* mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of ageing and development*. 2006;127(5):458-72.

42. Girard LR, Fiedler TJ, Harris TW, Carvalho F, Antoshechkin I, Han M, et al. WormBook: the online review of *Caenorhabditis elegans* biology. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:D472-5.
43. Braeckman BP, Houthoofd K, Vanfleteren JR. Assessing metabolic activity in aging *Caenorhabditis elegans*: concepts and controversies. *Aging Cell.* 2002;1(2):82-8; discussion 102-3.
44. Uno M, Nishida E. Lifespan-regulating genes in *C. elegans*. *Npj Aging And Mechanisms Of Disease.* 2016;2:16010.
45. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 1997;277(5328):942-6.
46. Murphy CT, Hu PJ. Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. WormBook : the online review of *C. elegans* biology. 2013:1-43.
47. Wolkow CA, Kimura KD, Lee MS, Ruvkun G. Regulation of *C. elegans* lifespan by insulin like signaling in the nervous system. *Science.* 2000;290(5489):147-50.
48. Ritter AD, Shen Y, Fuxman Bass J, Jeyaraj S, Deplancke B, Mukhopadhyay A, et al. Complex expression dynamics and robustness in *C. elegans* insulin networks. *Genome research.* 2013;23(6):954-65.
49. Pierce SB, Costa M, Wisotzkey R, Devadhar S, Homburger SA, Buchman AR, et al. Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes & development.* 2001;15(6):672-86.
50. Hua QX, Nakagawa SH, Wilken J, Ramos RR, Jia W, Bass J, et al. A divergent INS protein in *Caenorhabditis elegans* structurally resembles human insulin and activates the human insulin receptor. *Genes & development.* 2003;17(7):826-31.
51. Murphy CT, Lee SJ, Kenyon C. Tissue entrainment by feedback regulation of insulin gene expression in the endoderm of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(48):19046-50.
52. Mukhopadhyay A, Oh SW, Tissenbaum HA. Worming pathways to and from DAF-16/FOXO. *Exp Gerontol.* 2006;41(10):928-34.
53. Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR, Guarente L. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend lifespan. *Cell.* 2006;125(6):1165-77.
54. Morley JF, Morimoto RI. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell.* 2004;15(2):657-64.
55. Chiang WC, Ching TT, Lee HC, Mousigian C, Hsu AL. HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity. *Cell.* 2012;148(1-2):322-34.
56. Lant B, Storey KB. An overview of stress response and hypometabolic strategies in *Caenorhabditis elegans*: conserved and contrasting signals with the mammalian system. *International journal of biological sciences.* 2010;6(1):9-50.
57. Swiech L, Perycz M, Malik A, Jaworski J. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochimica et biophysica acta.* 2008;1784(1):116-32.
58. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017;168(6):960-76.
59. Sheaffer KL, Updike DL, Mango SE. The Target of Rapamycin pathway antagonizes pha-4/FoxA to control development and aging. *Curr Biol.* 2008;18(18):1355-64.
60. Panowski SH, Wolff S, Aguilaniu H, Durieux J, Dillin A. PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature.* 2007;447(7144):550-5.
61. Jia K, Chen D, Riddle DL. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and lifespan. *Development.* 2004;131(16):3897-906.
62. Jones KT, Greer ER, Pearce D, Ashrafi K. Rictor/TORC2 Regulates *Caenorhabditis elegans* Fat Storage, Body Size, and Development through *sgk-1*. *PLoS Biology.* 2009;7(3):e1000060.
63. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *Journal of cell science.* 2004;117(Pt 23):5479-87.

64. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*. 2011;472(7342):230-3.
65. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of biology*. 2003;2(4):28.
66. Birnbaum MJ. Activating AMP-activated protein kinase without AMP. *Molecular cell*. 2005;19(3):289-90.
67. Lee H, Cho JS, Lambacher N, Lee J, Lee SJ, Lee TH, et al. The *Caenorhabditis elegans* AMP-activated protein kinase AAK-2 is phosphorylated by LKB1 and is required for resistance to oxidative stress and for normal motility and foraging behavior. *J Biol Chem*. 2008;283(22):14988-93.
68. Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes & development*. 2004;18(24):3004-9.
69. Greer EL, Banko MR, Brunet A. AMP-activated Protein Kinase and FoxO Transcription Factors in Dietary Restriction-induced Longevity. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1170:688-92.
70. Greer EL, Dowlatshahi D, Banko MR, Villen J, Hoang K, Blanchard D, et al. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2007;17(19):1646-56.
71. Mair W, Morantte I, Rodrigues AP, Manning G, Montminy M, Shaw RJ, et al. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTCL-1 and CREB. *Nature*. 2011;470(7334):404-8.
72. Hwang AB, Ryu EA, Artan M, Chang HW, Kabir MH, Nam HJ, et al. Feedback regulation via AMPK and HIF-1 mediates ROS-dependent longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(42):6.
73. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell metabolism*. 2007;6(4):280-93.
74. Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, et al. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(3):357-62.
75. Burkewitz K, Zhang Y, Mair WB. AMPK at the nexus of energetics and aging. *Cell metabolism*. 2014;20(1):10-25.
76. Paradis S, Ruvkun G. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes & development*. 1998;12(16):2488-98.
77. Tullet JMA, Green JW, Au C, Benedetto A, Thompson MA, Clark E, et al. The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. *Aging Cell*. 2017;14(10):12627.
78. Tullet JM, Araiz C, Sanders MJ, Au C, Benedetto A, Papatheodorou I, et al. DAF-16/FoxO directly regulates an atypical AMP-activated protein kinase gamma isoform to mediate the effects of insulin/IGF-1 signaling on aging in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Genet*. 2014;10(2):e1004109.
79. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 1993;366(6454):461-4.
80. Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germLine signaling. *Nat Genet*. 2001;28(2):139-45.
81. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*. 1997;389(6654):994-9.

82. Lee SJ, Murphy CT, Kenyon C. Glucose shortens the lifespan of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell metabolism*. 2009;10(5):379-91.
83. Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, Mizunuma M, Narasimhan SD, Neumann-Haefelin E, et al. TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell metabolism*. 2012;15(5):713-24.
84. Kwon E-S, Narasimhan SD, Yen K, Tissenbaum HA. A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature*. 2010;466:498.
85. Chen AT-Y, Guo C, Dumas KJ, Ashrafi K, Hu PJ. Effects of *Caenorhabditis elegans* *sgk-1* mutations on lifespan, stress resistance, and DAF-16/FoxO regulation. *Aging Cell*. 2013;12(5):932-40.
86. Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(12):4494-9.
87. Bowerman B, Eaton BA, Priess JR. *skn-1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell*. 1992;68(6):1061-75.
88. An JH, Blackwell TK. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes & development*. 2003;17(15):1882-93.
89. Bishop NA, Guarente L. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature*. 2007;447(7144):545-9.
90. Choe KP, Przybysz AJ, Strange K. The WD40 repeat protein WDR-23 functions with the CUL4/DDB1 ubiquitin ligase to regulate nuclear abundance and activity of SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(10):2704-15.
91. An JH, Vranas K, Lucke M, Inoue H, Hisamoto N, Matsumoto K, et al. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(45):16275-80.
92. Tullet JM, Hertweck M, An JH, Baker J, Hwang JY, Liu S, et al. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell*. 2008;132(6):1025-38.
93. Inoue H, Hisamoto N, An JH, Oliveira RP, Nishida E, Blackwell TK, et al. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes & development*. 2005;19(19):2278-83.
94. Goh GY, Martelli KL, Parhar KS, Kwong AW, Wong MA, Mah A, et al. The conserved Mediator subunit MDT-15 is required for oxidative stress responses in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2014;13(1):70-9.
95. Kahn NW, Rea SL, Moyle S, Kell A, Johnson TE. Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*. *The Biochemical journal*. 2008;409(1):205-13.
96. Ruf V, Holzem C, Peyman T, Walz G, Blackwell TK, Neumann-Haefelin E. TORC2 signaling antagonizes SKN-1 to induce *C. elegans* mesendodermal embryonic development. *Developmental biology*. 2013;384(2):214-27.
97. Soukas AA, Kane EA, Carr CE, Melo JA, Ruvkun G. Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development*. 2009;23(4):496-511.
98. Mizunuma M, Neumann-Haefelin E, Moroz N, Li Y, Blackwell TK. mTORC2-SGK-1 acts in two environmentally responsive pathways with opposing effects on longevity. *Aging Cell*. 2014;13(5):869-78.

99. Niu W, Lu ZJ, Zhong M, Sarov M, Murray JI, Brdlik CM, et al. Diverse transcription factor binding features revealed by genome-wide ChIP-seq in *C. elegans*. *Genome research*. 2011;21(2):245-54.
100. Wang J, Robida-Stubbs S, Tullet JM, Rual JF, Vidal M, Blackwell TK. RNAi screening implicates a SKN-1-dependent transcriptional response in stress resistance and longevity deriving from translation inhibition. *Plos Genet*. 2010;6(8).
101. Schumacher B, Hofmann K, Boulton S, Gartner A. The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr Biol*. 2001;11(21):1722-7.
102. Ou HD, Löhr F, Vogel V, Mäntele W, Dötsch V. Structural evolution of C-terminal domains in the p53 family. *The EMBO journal*. 2007;26(14):3463-73.
103. Huyen Y, Jeffrey PD, Derry WB, Rothman JH, Pavletich NP, Stavridi ES, et al. Structural differences in the DNA binding domains of human p53 and its *C. elegans* ortholog Cep-1. *Structure (London, England : 1993)*. 2004;12(7):1237-43.
104. Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*. 2001;294(5542):591-5.
105. Ahmed S, Hodgkin J. MRT-2 checkpoint protein is required for germLine immortality and telomere replication in *C. elegans*. *Nature*. 2000;403(6766):159-64. Epub 2000/01/26.
106. Gartner A, Milstein S, Ahmed S, Hodgkin J, Hengartner MO. A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage--induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. *Molecular cell*. 2000;5(3):435-43.
107. Hofmann ER, Milstein S, Boulton SJ, Ye M, Hofmann JJ, Stergiou L, et al. *Caenorhabditis elegans* HUS-1 is a DNA damage checkpoint protein required for genome stability and EGL-1-mediated apoptosis. *Curr Biol*. 2002;12(22):1908-18.
108. Vermezovic J, Stergiou L, Hengartner MO, d'Adda di Fagagna F. Differential regulation of DNA damage response activation between somatic and germLine cells in *Caenorhabditis elegans*. *Cell death and differentiation*. 2012;19(11):1847-55.
109. Garcia-Muse T, Boulton SJ. Distinct modes of ATR activation after replication stress and DNA double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*. 2005;24(24):4345-55.
110. Quevedo C, Kaplan DR, Derry WB. AKT-1 regulates DNA-damage-induced germLine apoptosis in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2007;17(3):286-92.
111. Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, Trigiante G, Crook T, Hsieh JK, et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet*. 2003;33(2):162-7. Epub 2003/01/14.
112. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387(6630):296-9.
113. Gao MX, Liao EH, Yu B, Wang Y, Zhen M, Derry WB. The SCF FSN-1 ubiquitin ligase controls germLine apoptosis through CEP-1/p53 in *C. elegans*. *Cell death and differentiation*. 2008;15(6):1054-62.
114. Schumacher B, Hanazawa M, Lee MH, Nayak S, Volkmann K, Hofmann ER, et al. Translational repression of *C. elegans* p53 by GLD-1 regulates DNA damage-induced apoptosis. *Cell*. 2005;120(3):357-68.
115. Rutkowski R, Dickinson R, Stewart G, Craig A, Schimpl M, Keyse SM, et al. Regulation of *Caenorhabditis elegans* p53/CEP-1-dependent germ cell apoptosis by Ras/MAPK signaling. *Plos Genet*. 2011;7(8):e1002238.
116. Sandoel A, Kohler I, Fellmann C, Lowe SW, Hengartner MO. HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase. *Nature*. 2010;465(7298):577-83.
117. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*. 2010;40(2):294-309.
118. Powell-Coffman JA, Bradfield CA, Wood WB. *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear

- translocator. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998;95(6):2844-9.
119. Jiang H, Guo R, Powell-Coffman JA. The *Caenorhabditis elegans hif-1* gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98(14):7916-21.
 120. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell. 2001;107(1):43-54. Epub 2001/10/12.
 121. Shen C, Shao Z, Powell-Coffman JA. The *Caenorhabditis elegans rhy-1* gene inhibits HIF-1 hypoxia-inducible factor activity in a negative feedback loop that does not include *vhl-1*. Genetics. 2006;174(3):1205-14.
 122. Shao Z, Zhang Y, Powell-Coffman JA. Two distinct roles for EGL-9 in the regulation of HIF-1-mediated gene expression in *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 2009;183(3):821-9.
 123. Shen C, Nettleton D, Jiang M, Kim SK, Powell-Coffman JA. Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem. 2005;280(21):20580-8.
 124. Olson KR, Dombkowski RA, Russell MJ, Doellman MM, Head SK, Whitfield NL, et al. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor/transducer in vertebrate hypoxic vasoconstriction and hypoxic vasodilation. The Journal of experimental biology. 2006;209(Pt 20):4011-23.
 125. Budde MW, Roth MB. Hydrogen sulfide increases hypoxia-inducible factor-1 activity independently of von Hippel-Lindau tumor suppressor-1 in *C. elegans*. Molecular biology of the cell. 2010;21(1):212-7.
 126. Miller DL, Budde MW, Roth MB. HIF-1 and SKN-1 coordinate the transcriptional response to hydrogen sulfide in *Caenorhabditis elegans*. PloS one. 2011;6(9):e25476.
 127. Ma DK, Vozdek R, Bhatla N, Horvitz HR. CYSL-1 interacts with the O₂-sensing hydroxylase EGL-9 to promote H₂S-modulated hypoxia-induced behavioral plasticity in *C. elegans*. Neuron. 2012;73(5):925-40.
 128. Angeles-Albores D, Puckett Robinson C, Williams BA, Wold BJ, Sternberg PW. Reconstructing a metazoan genetic pathway with transcriptome-wide epistasis measurements. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018;115(13):E2930-E9. Epub 2018/03/14.
 129. Oliveira RP, Porter Abate J, Dilks K, Landis J, Ashraf J, Murphy CT, et al. Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. Aging Cell. 2009;8(5):524-41.
 130. Park EC, Rongo C. The p38 MAP kinase pathway modulates the hypoxia response and glutamate receptor trafficking in aging neurons. eLife. 2016;5(5):e12010.
 131. Lee SJ, Hwang AB, Kenyon C. Inhibition of respiration extends *C. elegans* lifespan via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. Curr Biol. 2010;20(23):2131-6.
 132. Yang FJ, Vought BW, Satterlee JS, Walker AK, Sun ZYJ, Watts JL, et al. An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. Nature. 2006;442(7103):700-4.
 133. Nomura T, Horikawa M, Shimamura S, Hashimoto T, Sakamoto K. Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* is mediated by SREBP homolog SBP-1. Genes Nutr. 2010;5(1):17-27.
 134. McKay RM, McKay JP, Avery L, Graff JM. *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. Developmental cell. 2003;4(1):131-42.
 135. Walker AK, Yang F, Jiang K, Ji JY, Watts JL, Purushotham A, et al. Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. Genes & development. 2010;24(13):1403-17.
 136. Oliner JD, Andresen JM, Hansen SK, Zhou S, Tjian R. SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. Genes & development. 1996;10(22):2903-11.

137. Ericsson J, Edwards PA. CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J Biol Chem*. 1998;273(28):17865-70. Epub 1998/07/04.
138. Giandomenico V, Simonsson M, Grönroos E, Ericsson J. Coactivator-Dependent Acetylation Stabilizes Members of the SREBP Family of Transcription Factors. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(7):2587-99.
139. Walker AK, Jacobs RL, Watts JL, Rottiers V, Jiang K, Finnegan DM, et al. A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans. *Cell*. 2011;147(4):840-52.
140. Smulan LJ, Ding W, Freinkman E, Gujja S, Edwards YJK, Walker AK. Cholesterol-Independent SREBP-1 Maturation Is Linked to ARF1 Inactivation. *Cell reports*. 2016;16(1):9-18.
141. Henneberry AL, Lagace TA, Ridgway ND, McMaster CR. Phosphatidylcholine synthesis influences the diacylglycerol homeostasis required for SEC14p-dependent Golgi function and cell growth. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(3):511-20.
142. Svensk E, Stahlman M, Andersson CH, Johansson M, Boren J, Pilon M. PAQR-2 regulates fatty acid desaturation during cold adaptation in *C. elegans*. *Plos Genet*. 2013;9(9):e1003801.
143. Zhu C, Ji CB, Zhang CM, Gao CL, Zhu JG, Qin DN, et al. The *lin-4* gene controls fat accumulation and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *International journal of molecular sciences*. 2010;11(12):4814-25.
144. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(8):599-609.
145. Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*. 1989;59(4):675-80.
146. Sun P, Enslin H, Myung PS, Maurer RA. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & development*. 1994;8(21):2527-39.
147. Fiol CJ, Williams JS, Chou CH, Wang QM, Roach PJ, Andrisani OM. A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J Biol Chem*. 1994;269(51):32187-93. Epub 1994/12/23.
148. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 2001;294(5544):1030-8.
149. Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron*. 1990;4(4):571-82.
150. Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*. 1993;365(6449):855-9.
151. Nishida Y, Sugi T, Nonomura M, Mori I. Identification of the AFD neuron as the site of action of the CREB protein in *Caenorhabditis elegans* thermotaxis. *EMBO Rep*. 2011;12(8):855-62.
152. Chen YC, Chen HJ, Tseng WC, Hsu JM, Huang TT, Chen CH, et al. A *C. elegans* Thermosensory Circuit Regulates Longevity through crh-1/CREB-Dependent flp-6 Neuropeptide Signaling. *Developmental cell*. 2016;39(2):209-23.
153. Kimura Y, Corcoran EE, Eto K, Gengyo-Ando K, Muramatsu M-A, Kobayashi R, et al. A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO reports*. 2002;3(10):962-6.
154. Rojo Romanos T, Petersen JG, Pocock R. Control of Neuropeptide Expression by Parallel Activity-dependent Pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific reports*. 2017;7:38734-.
155. Wood W. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1998;17:667.
156. Saito K, Lee S, Shiuchi T, Toda C, Kamijo M, Inagaki-Ohara K, et al. An enzymatic photometric assay for 2-deoxyglucose uptake in insulin-responsive tissues and 3T3-L1 adipocytes. *Analytical biochemistry*. 2011;412(1):9-17.

157. Mendler M, Schlotterer A, Ibrahim Y, Kukudov G, Fleming T, Bierhaus A, et al. *daf-16*/FOXO and *glod-4*/glyoxalase-1 are required for the life-prolonging effect of human insulin under high glucose conditions in *Caenorhabditis elegans*. *Diabetologia*. 2015;58(2):393-401.
158. Li J, Cai T, Wu P, Cui Z, Chen X, Hou J, et al. Proteomic analysis of mitochondria from *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics*. 2009;9(19):4539-53.
159. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991;196(2-3):143-51.
160. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186:421-31. Epub 1990/01/01.
161. Chen J, Caswell-Chen EP. Facultative Vivipary is a Life-History Trait in *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol*. 2004;36(2):107-13.
162. Villanueva-Chimal E, Salinas LS, Fernandez-Cardenas LP, Huelgas-Morales G, Cabrera-Wrooman A, Navarro RE. DPFF-1 transcription factor deficiency causes the aberrant activation of MPK-1 and meiotic defects in the *Caenorhabditis elegans* germLine. *Genesis*. 2017;55(11).
163. Huelgas-Morales G, Silva-Garcia CG, Salinas LS, Greenstein D, Navarro RE. The Stress Granule RNA-Binding Protein TIAR-1 Protects Female Germ Cells from Heat Shock in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)*. 2016;6(4):1031-47.
164. Petrascheck M, Miller DL. Computational Analysis of Lifespan Experiment Reproducibility. *Frontiers in genetics*. 2017;8:92.
165. Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*. 2003;421(6920):231-7.
166. Hoogewijs D, Houthoofd K, Matthijssens F, Vandesompele J, Vanfleteren JR. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Mol Biol*. 2008;9:9.
167. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9).
168. Furda AM, Bess AS, Meyer JN, Van Houten B. Analysis of DNA damage and repair in nuclear and mitochondrial DNA of animal cells using quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2012;920:111-32.
169. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc*. 2012;7(6):1235-46.
170. Sigma-Aldrich. Enzymatic assay of Malate synthase. 1996.
171. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.
172. Han SK, Lee D, Lee H, Kim D, Son HG, Yang JS, et al. OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget*. 2016;7(35):56147-52.
173. Vanfleteren JR, De Vreese A. The gerontogenes *age-1* and *daf-2* determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9(13):1355-61.
174. Vanfleteren JR, Braeckman BP, Roelens I, De Vreese A. Age-specific modulation of light production potential, and alkaline phosphatase and protein tyrosine kinase activities in various age mutants of *Caenorhabditis elegans*. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 1998;53(5):B380-90.
175. Leung MCK, Williams PL, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M, et al. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol Sci*. 2008;106(1):5-28.
176. Dhawan R, Dusenbery DB, Williams PL. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health A*. 1999;58(7):451-62.

177. Goetsch KM, Lu NC. Carbohydrate Requirement of *Caenorhabditis elegans* and the Final Development of a Chemically Defined Medium. 1993;39(1-4):303.
178. Choi SS. High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. Nutrition research and practice. 2011;5(3):214-8.
179. Lavigne JP, Audibert S, Molinari N, O'Callaghan D, Keriell A. Influence of a high-glucose diet on the sensitivity of *Caenorhabditis elegans* towards *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2013;15(8-9):540-9.
180. Moreno-Arriola E, El Hafidi M, Ortega-Cuellar D, Carvajal K. AMP-Activated Protein Kinase Regulates Oxidative Metabolism in *Caenorhabditis elegans* through the NHR-49 and MDT-15 Transcriptional Regulators. PloS one. 2016;11(1):e0148089.
181. Feng Y, Williams BG, Koumanov F, Wolstenholme AJ, Holman GD. FGT-1 is the major glucose transporter in *C. elegans* and is central to aging pathways. The Biochemical journal. 2013;456(2):219-29.
182. Sistemaaoka S, Morielli AD, Zhao FQ. FGT-1 is a mammalian GLUT2-like facilitative glucose transporter in *Caenorhabditis elegans* whose malfunction induces fat accumulation in intestinal cells. PloS one. 2013;8(6).
183. Sistemaaoka S, Morielli AD, Zhao FQ. FGT-1-mediated glucose uptake is defective in insulin/IGF-like signaling mutants in *Caenorhabditis elegans*. FEBS Open Bio. 2016;6(6):576-85.
184. So S, Garan Y, Miyahara K, Ohshima Y. Body size change in various nematodes depending on bacterial food, sex and growth temperature. Worm. 2012;1(2):93-7.
185. So S, Miyahara K, Ohshima Y. Control of body size in *C. elegans* dependent on food and insulin/IGF-1 signal. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms. 2011;16(6):639-51.
186. Morita K, Chow KL, Ueno N. Regulation of body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* by a member of TGF-beta family. Development. 1999;126.
187. Yoshida S, Morita K, Mochii M, Ueno N. Hypodermal expression of *Caenorhabditis elegans* TGF-beta type I receptor SMA-6 is essential for the growth and maintenance of body length. Dev Biol. 2001;240.
188. Dineen A, Gaudet J. TGF- β signaling can act from multiple tissues to regulate *C. elegans* body size. BMC Developmental Biology. 2014;14(1):1-13.
189. Taghibiglou C, Martin HGS, Rose JK, Ivanova N, Lin CHC, Lau HL, et al. Essential role of SBP-1 activation in oxygen deprivation induced lipid accumulation and increase in body width/length ratio in *Caenorhabditis elegans*. Febs Lett. 2009;583(4):831-4.
190. Zhu G, Yin F, Wang L, Wei W, Jiang L, Qin J. Modeling type 2 diabetes-like hyperglycemia in *C. elegans* on a microdevice. Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro. 2016;8(1):30-8.
191. Mejia-Martinez F, Franco-Juarez B, Moreno-Arriola E, Hernandez-Vazquez A, Martinez-Avila M, Gomez-Manzo S, et al. The MXL-3/SBP-1 Axis Is Responsible for Glucose-Dependent Fat Accumulation in *C. elegans*. Genes. 2017;8(11).
192. Mondoux MA, Love DC, Ghosh SK, Fukushige T, Bond M, Weerasinghe GR, et al. O-Linked-N-Acetylglucosamine Cycling and Insulin Signaling Are Required for the Glucose Stress Response in *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 2011;188(2):369-82.
193. Tauffenberger A, Parker JA. Heritable transmission of stress resistance by high dietary glucose in *Caenorhabditis elegans*. Plos Genet. 2014;10(5):e1004346.
194. Tauffenberger A, Vaccaro A, Aulas A, Vande Velde C, Parker JA. Glucose delays age-dependent proteotoxicity. Aging Cell. 2012;11(5):856-66.
195. Teshiba E, Miyahara K, Takeya H. Glucose-induced abnormal egg-laying rate in *Caenorhabditis elegans*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2016;80(7):1-4.
196. Matzkin LM, Johnson S, Paight C, Markow TA. Preadult parental diet affects offspring development and metabolism in *Drosophila melanogaster*. PloS one. 2013;8(3):e59530-e.

197. Rechavi O, Houry-Ze'evi L, Anava S, Goh WSS, Kerk SY, Hannon GJ, et al. Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. *Cell*. 2014;158(2):277-87.
198. Jimenez-Chillaron JC, Ramon-Krauel M, Ribo S, Diaz R. Transgenerational epigenetic inheritance of diabetes risk as a consequence of early nutritional imbalances. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2016;75(1):78-89.
199. Wei Y, Yang CR, Wei YP, Zhao ZA, Hou Y, Schatten H, et al. Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(5):1873-8.
200. Pavlinkova G, Margaryan H, Zatecka E, Valaskova E, Elzeinova F, Kubatova A, et al. Transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes-induced male subfertility. *Scientific reports*. 2017;7(1):4940.
201. Reisner K, Lehtonen M, Storvik M, Jantson T, Lakso M, Callaway JC, et al. Trans Fat Diet Causes Decreased Brood Size and Shortened Lifespan in *Caenorhabditis elegans* delta-6-desaturase Mutant fat-3. *J Biochem Mol Toxic*. 2011;25(5):269-79.
202. Kubagawa HM, Watts JL, Corrigan C, Edmonds JW, Sztul E, Browse J, et al. Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo. *Nat Cell Biol*. 2006;8(10):1143-U183.
203. Pickett CL, Kornfeld K. Age-related degeneration of the egg-laying system promotes matricidal hatching in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2013;12(4):544-53.
204. McCulloch D, Gems D. Evolution of male longevity bias in nematodes. *Aging Cell*. 2003;2(3):165-73.
205. Mosser T, Matic I, Leroy M. Bacterium-induced internal egg hatching frequency is predictive of life span in *Caenorhabditis elegans* populations. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(22):8189-92.
206. Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. The metabolic syndrome and male infertility. *Journal of andrology*. 2008;29(3):251-9.
207. Ehala-Aleksejev K, Punab M. The effect of metabolic syndrome on male reproductive health: A cross-sectional study in a group of fertile men and male partners of infertile couples. *PloS one*. 2018;13(3):e0194395-e.
208. Liggett MR, Hoy MJ, Mastroianni M, Mondoux MA. High-glucose diets have sex-specific effects on aging in *C. elegans*: toxic to hermaphrodites but beneficial to males. *Aging*. 2015;7(6):383-8.
209. Van Raamsdonk JM, Hekimi S. FUDR causes a twofold increase in the lifespan of the mitochondrial mutant *gas-1*. *Mechanisms of ageing and development*. 2011;132(10):519-21.
210. Davies SK, Leroi AM, Bundy JG. Fluorodeoxyuridine affects the identification of metabolic responses to *daf-2* status in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of ageing and development*. 2012;133(1):46-9.
211. Brunquell J, Bowers P, Westerheide SD. Fluorodeoxyuridine enhances the heat shock response and decreases polyglutamine aggregation in an HSF-1-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of ageing and development*. 2014;141-142:1-4.
212. Feldman N, Kosolapov L, Ben-Zvi A. Fluorodeoxyuridine improves *Caenorhabditis elegans* proteostasis independent of reproduction onset. *PloS one*. 2014;9(1):e85964.
213. Anderson EN, Corkins ME, Li JC, Singh K, Parsons S, Tukey TM, et al. *C. elegans* lifespan extension by osmotic stress requires FUDR, base excision repair, FOXO, and sirtuins. *Mechanisms of ageing and development*. 2016;154:30-42.
214. Burmeister C, Luersen K, Heinick A, Hussein A, Domagalski M, Walter RD, et al. Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of the Omega class glutathione transferase (GSTO-1). *Faseb Journal*. 2008;22(2):343-54.
215. Luersen K, Stegehake D, Daniel J, Drescher M, Ajonina I, Ajonina C, et al. The Glutathione Reductase GSR-1 Determines Stress Tolerance and Longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*. 2013;8(4).

216. Magner DB, Wollam J, Shen Y, Hoppe C, Li D, Latza C, et al. The NHR-8 nuclear receptor regulates cholesterol and bile acid homeostasis in *C. elegans*. *Cell metabolism*. 2013;18(2):212-24.
217. Gallo M, Park D, Riddle DL. Increased longevity of some *C. elegans* mitochondrial mutants explained by activation of an alternative energy-producing pathway. *Mechanisms of ageing and development*. 2011;132(10):515-8.
218. Cristina D, Cary M, Lunceford A, Clarke C, Kenyon C. A regulated response to impaired respiration slows behavioral rates and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Genet*. 2009;5(4):e1000450.
219. Xu C, Hwang W, Jeong DE, Ryu Y, Ha CM, Lee SV, et al. Genetic inhibition of an ATP synthase subunit extends lifespan in *C. elegans*. *Scientific reports*. 2018;8(1):14836.
220. Vigelsø A, Andersen NB, Dela F. The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. 2014;6(2):84-101.
221. Lee D, Jeong DE, Son HG, Yamaoka Y, Kim H, Seo K, et al. SREBP and MDT-15 protect *C. elegans* from glucose-induced accelerated aging by preventing accumulation of saturated fat. *Genes & development*. 2015;29(23):2490-503.
222. Jansson D, Ng AC, Fu A, Depatie C, Al Azzabi M, Sreaton RA. Glucose controls CREB activity in islet cells via regulated phosphorylation of TORC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(29):10161-6.
223. Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreaton RA, Jeffries S, et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*. 2005;437(7062):1109-11.
224. Suo S, Kimura Y, Van Tol HH. Starvation induces cAMP response element-binding protein-dependent gene expression through octopamine-Gq signaling in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(40):10082-90.
225. Lerner RG, Depatie C, Rutter GA, Sreaton RA, Balthasar N. A role for the CREB coactivator CRT2 in the hypothalamic mechanisms linking glucose sensing with gene regulation. *EMBO Rep*. 2009;10(10):1175-81.
226. Erion DM, Ignatova ID, Yonemitsu S, Nagai Y, Chatterjee P, Weismann D, et al. Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by knockdown of cAMP response element-binding protein. *Cell metabolism*. 2009;10(6):499-506.
227. Qi L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y, Altarejos J, Zhang X, et al. Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity. *Cell metabolism*. 2009;9(3):277-86.
228. Chen D, Thomas EL, Kapahi P. HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Genet*. 2009;5(5):22.
229. Zhang Y, Shao Z, Zhai Z, Shen C, Powell-Coffman JA. The HIF-1 hypoxia-inducible factor modulates lifespan in *C. elegans*. *PloS one*. 2009;4(7):0006348.
230. Mehta R, Steinkraus KA, Sutphin GL, Ramos FJ, Shamieh LS, Huh A, et al. Proteasomal regulation of the hypoxic response modulates aging in *C. elegans*. *Science*. 2009;324(5931):1196-8.
231. Leiser SF, Begun A, Kaeberlein M. HIF-1 modulates longevity and healthspan in a temperature-dependent manner. *Aging Cell*. 2011;10(2):318-26.
232. Hwang AB, Ryu EA, Artan M, Chang HW, Kabir MH, Nam HJ, et al. Feedback regulation via AMPK and HIF-1 mediates ROS-dependent longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(42):E4458-67. Epub 2014/10/08.
233. Leiser SF, Fletcher M, Begun A, Kaeberlein M. Lifespan extension from hypoxia in *Caenorhabditis elegans* requires both HIF-1 and DAF-16 and is antagonized by SKN-1. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2013;68(10):1135-44.
234. Chang HW, Pisano S, Chaturbedi A, Chen J, Gordon S, Baruah A, et al. Transcription factors CEP-1/p53 and CEH-23 collaborate with AAK-2/AMPK to modulate longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2017;16(4):814-24.

235. Arum O, Johnson TE. Reduced expression of the *Caenorhabditis elegans* p53 ortholog cep-1 results in increased longevity. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2007;62(9):951-9.
236. Ventura N, Rea SL, Schiavi A, Torgovnick A, Testi R, Johnson TE. p53/CEP-1 increases or decreases lifespan, depending on level of mitochondrial bioenergetic stress. *Aging Cell*. 2009;8(4):380-93.
237. Schlotterer A, Hamann A, Kukudov G, Ibrahim Y, Heckmann B, Bozorgmehr F, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1, p53, and thioredoxin are linked in control of aging in *C. elegans*. *Aging Cell*. 2010;9(3):420-32.
238. Torgovnick A, Schiavi A, Testi R, Ventura N. A role for p53 in mitochondrial stress response control of longevity in *C. elegans*. *Exp Gerontol*. 2010;45(7-8):550-7.
239. Baruah A, Chang H, Hall M, Yuan J, Gordon S, Johnson E, et al. CEP-1, the *Caenorhabditis elegans* p53 homolog, mediates opposing longevity outcomes in mitochondrial electron transport chain mutants. *Plos Genet*. 2014;10(2):e1004097.
240. Blackwell TK, Steinbaugh MJ, Hourihan JM, Ewald CY, Isik M. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free radical biology & medicine*. 2015;88(Pt B):290-301.
241. Park S-K, Tedesco PM, Johnson TE. Oxidative Stress and Longevity in *C.elegans* as Mediated by SKN-1. *Aging Cell*. 2009;8(3):258-69.
242. Pang S, Lynn DA, Lo JY, Paek J, Curran SP. SKN-1 and Nrf2 couples proline catabolism with lipid metabolism during nutrient deprivation. *Nature communications*. 2014;5(5048).
243. Chen D, Li PW, Goldstein BA, Cai W, Thomas EL, Chen F, et al. GermLine signaling mediates the synergistically prolonged longevity produced by double mutations in *daf-2* and *rsk-1* in *C. elegans*. *Cell reports*. 2013;5(6):1600-10.

Artículos originales con agradecimiento al:

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**

Research Article

Dietary Biotin Supplementation Modifies Hepatic Morphology without Changes in Liver Toxicity Markers

Leticia Riverón-Negrete,¹ Gloria Sicilia-Argumedo,¹ Carolina Álvarez-Delgado,^{1,2} Elvia Coballase-Urrutia,³ Jonathan Alcántar-Fernández,¹ and Cristina Fernandez-Mejia¹

¹Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Pediatría, Avenida del Imán 1, 4th Floor, Colonia Insurgentes Cuicuilco, 04530 Mexico City, Mexico

²Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Carretera Ensenada-Tijuana No. 3918, Zona Playitas, 22860, Ensenada, BC, Mexico

³Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Pediatría, Avenida del Imán 1, 3rd Floor, Colonia Insurgentes Cuicuilco, 04530 Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to Cristina Fernandez-Mejia; crisfern@biomedicas.unam.mx

Received 7 October 2016; Revised 28 November 2016; Accepted 30 November 2016

Academic Editor: Marija Mostarica-Stojković

Copyright © 2016 Leticia Riverón-Negrete et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Pharmacological concentrations of biotin have pleiotropic effects. Several reports have documented that biotin supplementation decreases hyperglycemia. We have shown that a biotin-supplemented diet increased insulin secretion and the mRNA abundance of proteins regulating insulin transcription and secretion. We also found enlarged pancreatic islets and modified islet morphology. Other studies have shown that pharmacological concentrations of biotin modify tissue structure. Although biotin administration is considered safe, little attention has been given to its effect on tissue structure. In this study, we investigated the effect of biotin supplementation on hepatic morphology and liver toxicity markers. Male BALB/cAnN Hsd mice were fed a control or a biotin-supplemented diet for 8 weeks. Versus the control mice, biotin-supplemented mice had an altered portal triad with dilated sinusoids, increased vascularity, and bile conducts. Furthermore, we observed an increased proportion of nucleomegaly and binucleated hepatocytes. In spite of the liver morphological changes, no differences were observed in the serum liver damage indicators, oxidative stress markers, or antioxidant enzymes. Our data demonstrate for the first time that biotin supplementation affects liver morphology in normal mice, and that these modifications are not paralleled with damage markers.

1. Introduction

The physiological role of the vitamin biotin (also named B7) is to participate as a coenzyme of carboxylases [1]. The adequate intake (AI) level of biotin is 30 $\mu\text{g}/\text{d}$ for adults [2]. It has been well documented that biotin affects gene expression and systemic functions at pharmacological levels, which are approximately 30 to 650 times its daily requirement [3].

Pharmacological doses of biotin have hypolipidemic [4–8] and hypoglycemic effects [7, 9–12] and reduce diabetes complications [11–13] in both animal models and humans. These effects are associated with changes in gene and protein expression [12, 14–18] in key metabolic organs, such as the liver and the pancreatic islets.

In previous studies in our laboratory, normal mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks demonstrated increased insulin secretion and higher levels of mRNAs involved in the control of insulin transcription and secretion compared with mice fed a biotin-sufficient diet [15]. Interestingly, biotin supplementation induced an increase in islet size and modified its typical architecture of alpha-cells at the periphery and beta-cells at the core [15].

Other studies have shown that pharmacological doses of biotin modify tissue morphology. Our research group previously demonstrated that treatment with pharmacological concentrations of biotin decreases the number of primary and Graafian follicles in female mice [19]. Consistent with this effect of biotin on reproductive structures, acute biotin

treatment induced atrophy in the corpora lutea of female rats [20]. In male rats, biotin supplementation for 6 weeks decreased total sperm counts as well as the diameter of the seminiferous tubes [21]. In animal models of diabetes, biotin supplementation ameliorated the histopathological morphology in the liver [12, 22], kidney [23], and pancreas [12].

Because of biotin's effects on glucose and lipid metabolism, supplements and medications containing pharmacological amounts of the vitamin are commercially available [8, 24]. Although biotin supplementation is considered safe [25], little attention has been paid to its effect on tissue structure. In this study we investigated the effects of biotin supplementation on hepatic morphology and liver toxicity markers.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Model and Experimental Design. All interventions were approved by the Ethical Committee for Experimentation of the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico. At weaning three-week-old male Balb/cAnN mice were fed one of the following diets: biotin-control (TD-01362) or biotin-supplemented diet (TD-02458) containing 1.76 mg and 97.70 mg of free biotin/kg diet, respectively (Harlan Teklad, Madison WI, USA) as described previously [15–18, 26]. A third group of mice received the control diet but were treated with a single dose of carbon tetrachloride (CCl_4 , 2 ml/kg body weight) to induce liver damage. Food consumption and body weight were measured through the experiment. After 8 weeks, the mice were deprived of food for 12 h and anesthetized as described in [15–18], and the blood and liver were extracted. The mice were killed via cervical dislocation.

2.2. Analysis of Serum Aspartate Aminotransferase, Alanine Aminotransferase, Gamma-Glutamyltransferase, Alkaline Phosphatase, Total and Direct Bilirubin, Albumin, and Urea. Blood samples were collected and centrifuged at $1600 \times g$ and 4°C for 10 min. Sera were stored at -20°C until used. Hemolyzed samples were discarded to avoid interference with the assays. The compounds were quantified by colorimetric assays (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain) according to the manufacturer's protocol and were expressed as U/L.

2.3. Lipid Peroxidation. Lipid peroxidation was quantified in liver homogenates by assaying malondialdehyde using the thiobarbituric acid by method [27]. Briefly, liver homogenates were incubated with thiobarbituric acid, heated by boiling for 45 min, and kept in ice for 15 min, followed by a centrifugation at $3000 \times g$ for 10 min, twice. The supernatant was read at 532 nm. The malondialdehyde levels were reported in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein.

2.4. Glutathione Content. Immediately after the mice were sacrificed, liver samples were washed in a saline isotonic solution to eliminate remnant blood, homogenized in 5%

ice-cold metaphosphoric acid (1/20 w/v) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), and centrifuged at 12000 rpm at 4°C for 15 min. The supernatant was collected and kept on ice. Glutathione was quantified spectrophotometrically at 405 nm with the HT Glutathione Assay Kit (Trevigen, St Louis, MO, USA) according to the manufacturer's recommendations. The concentration of reduced glutathione (GSH) was calculated using a GSH standard curve. Oxidized glutathione contents were determined by subtracting the amount of GSH from the level of total glutathione.

2.5. Superoxide Dismutase Activity. Approximately 100 mg of liver was homogenized with a glass potter homogenizer in an ice-cold saline isotonic solution. Tissue extracts were centrifuged at $12500 \times g$ for 30 min at 4°C to remove insoluble material, and the protein concentration was measured using a Bio-Rad protein assay following the manufacturer's instructions. Super oxide dismutase activity was quantified in liver homogenates with a commercial kit based on xanthine oxidase and a color agent according to the protocol provided by the manufacturer (Sigma Aldrich, San Louis, MO, USA).

2.6. Catalase Activity. Catalase activity was measured according to Góth, 1991 [28], with slight modifications. The liver was homogenized in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.00). Ten μg of total protein was incubated for 30 sec. in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0, and 12 mM of hydrogen peroxide). The reaction was stopped by addition of 32.4 mM ammonium molybdate. Reactions were read at 405 nm, and the specific activity was calculated.

2.7. Histological Analysis. The livers were dissected and fixed in 10% neutral formalin, dehydrated in ascending grades of alcohol, and embedded in paraffin wax. Consecutive $5 \mu\text{m}$ thick sections were cut, mounted on glass slides, and stained with hematoxylin and eosin.

Two slides were prepared for each mouse. These contained three sections of each liver. Ten field areas for each section were randomly selected and examined for histological changes (25x) under light microscope. The random field areas were scored as follows: normal appearance (—), minimal cellular disruption in less than 1% of field area, mild cellular disruption of 1%–30% of field area, moderate cellular disruption of 31%–60% of field area, severe cell disruption of 61%–90% of field area, and very severe cellular disruption of 91%–100% of field area [29].

To assess binucleated hepatocytes and nucleomegaly, three field areas of six sections were taken from 9 mice in each group. These were analyzed at 40x in an Olympus BX51 microscope. The analyses were performed simultaneously by two persons who were blinded to the group identity.

2.8. Nitric Oxide Concentration. Liver homogenates were prepared as described above and were treated with proteinase K [10 mg/ml] to remove interfering proteins. Quantification was performed with a commercial kit (*Thermo Scientific, Rockford, ILL, USA*) for the indirect determination of nitrites

TABLE 1: Effect of eight weeks of biotin supplementation on serum liver damage indicators.

Enzyme/metabolite	Units	Control	Biotin-supplemented
Aspartate aminotransferase	[U/L]	163 ± 11.0	196 ± 8.60*
Alanine aminotransferase	[U/L]	32.9 ± 3.29	30.2 ± 2.40
Gamma-glutamyltransferase	[U/L]	2.77 ± 0.38	2.48 ± 0.50
Alkaline phosphatase	[U/L]	164 ± 11.0	196 ± 8.63
Total bilirubin	[μmol/L]	0.30 ± 0.040	0.22 ± 0.029
Indirect bilirubin	[μmol/L]	0.29 ± 0.071	0.22 ± 0.020
Albumin	[mg/dL]	3.28 ± 0.26	2.57 ± 0.24
Urea	[mg/dL]	52.3 ± 1.21	50.7 ± 1.89

Values are mean ± SEM. $n = 7-10$. * $p < 0.050$.

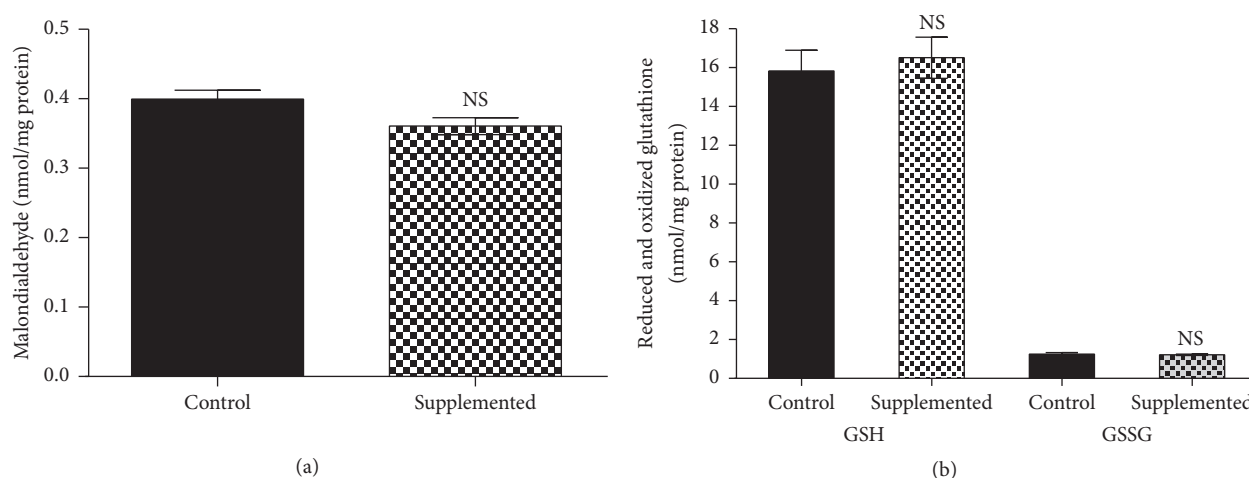


FIGURE 1: Effect of biotin supplementation on liver malondialdehyde and reduced and oxidized glutathione in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. (a) Malondialdehyde concentrations. Values represent the mean ± SEM of 5 mice from each group. (b) Reduced and oxidized glutathione. Black bars: control group; patterned bars: biotin-supplemented group. Values represent the mean ± SEM of 8 mice from each group. All measurements were performed in triplicate. ^{NS} $p > 0.050$.

and nitrates in biological samples using nitrate reductase and the Griess reagent that absorbs visible light at 540 nm.

2.9. Statistical Analysis. Statistical analyses were performed using the Statview statistical analysis program and GraphPad Prism 6.0 software (Berkeley, CA, USA). All data are presented as the mean ± SEM; n is the number of evaluated subjects. Statistical significance was assessed by Student's t -test or 1-way ANOVA. p values less than 0.050 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of Biotin Supplementation on Serum Liver Damage Indicators. We studied how biotin supplementation influenced liver enzyme tests (Table 1). The data show increased aspartate aminotransferase (AST) levels in the biotin-supplemented group ($p < 0.050$); however, the values were in the normal range (55.0–352 U/L) [30]. No differences were seen between the control and the supplemented group in gamma-glutamyltransferase (GGT), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total and direct

bilirubin, albumin, and urea. As expected, all parameters were significantly ($p < 0.050$) affected in the carbon tetrachloride group compared with both the control and supplemented groups: AST = 954 ± 23.6 U/L; GGT = 9.91 ± 0.78 , ALP = 223 ± 7.60 U/L; ALT = 833 ± 13.2 ; bilirubin 1.22 ± 0.28 [μmol/L]; indirect bilirubin 1.02 ± 0.18 [μmol/L]; albumin 4.86 ± 0.34 [g/dL]; urea 108 ± 8.33 [mg/dL].

3.2. Effects of Biotin Supplementation on Oxidative Stress Markers and Antioxidant Enzymes Activities. We also evaluated the effects of biotin supplementation on lipid peroxidation and oxidized and reduced glutathione. Eight weeks of biotin supplementation did not modify malondialdehyde concentrations versus the control group (Figure 1(a); control = 0.40 ± 0.016 ; supplemented = 0.36 ± 0.015 nmol/mg protein). In the carbon tetrachloride group, the levels were significantly increased ($p < 0.050$) compared with the control and supplemented groups (CCl_4 = 0.51 ± 0.020 nmol/mg protein).

Glutathione is a major antioxidant that protects tissues from free radical injury. The analysis of glutathione concentrations (Figure 1(b)) showed that the levels of the reduced

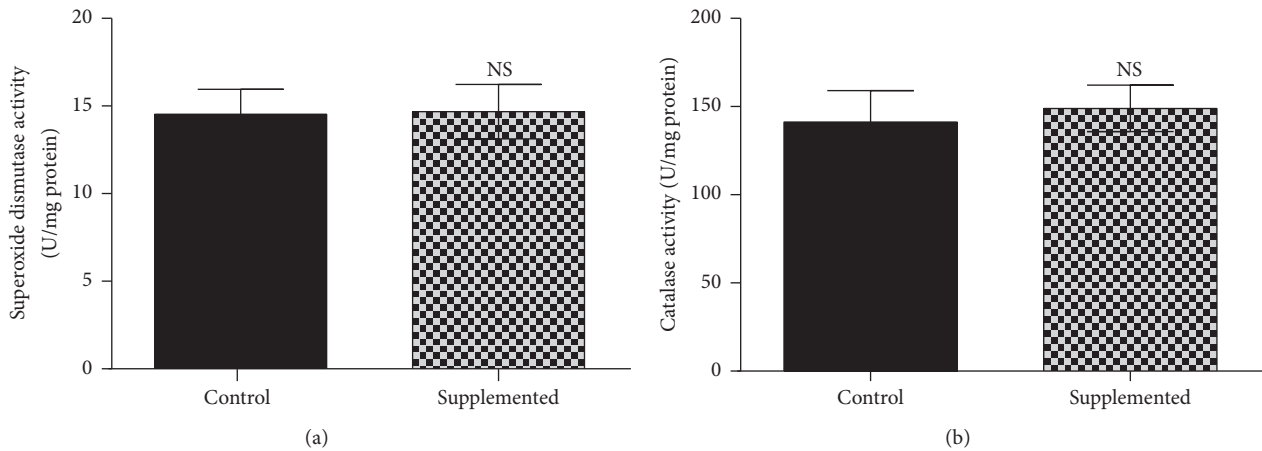


FIGURE 2: Effect of biotin supplementation on superoxide dismutase and catalase activity in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. (a) Liver superoxide dismutase activity. Values represent the mean \pm SEM of 5 mice from each group. (b) Liver catalase activity. Black bars: control group; patterned bars: biotin-supplemented group. Values represent the mean \pm SEM of 9 mice from each group. All measurements were performed in triplicate. ^{NS} $p > 0.050$.

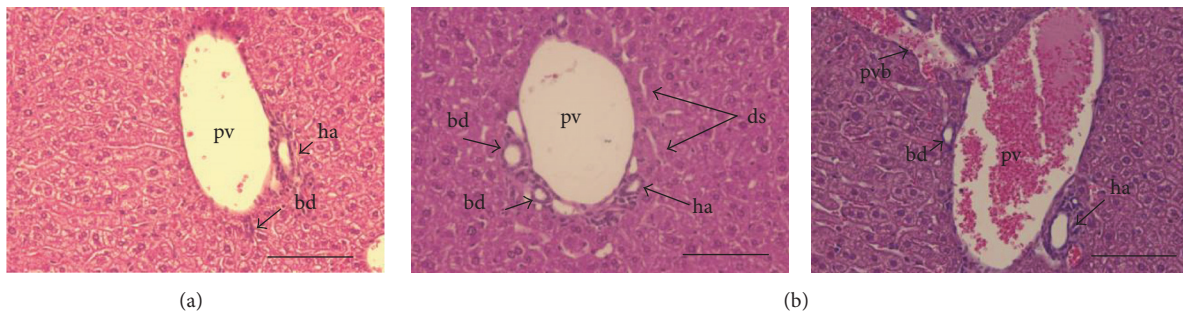


FIGURE 3: Effect of biotin supplementation on liver morphology in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. Paraffin sections stained by hematoxylin and eosin. (a) Control group's representative image showing a normal portal triad. (b) Supplemented group. Left panel: representative image, showing an altered triad with dilated sinusoids and increased number of bile ducts. Right panel: enlarged portal vein with adjacent portal vein branch. pv: portal vein; ha: hepatic artery; bd: bile duct; ds: dilated sinusoids; pvb: portal vein branch. Scale bar represents 100 μ m.

and the oxidized forms did not significantly differ between the control and supplemented group (reduced glutathione: control = 15.9 ± 1.06 ; supplemented = 16.6 ± 1.06 nmol/mg protein; oxidized glutathione, control = 1.25 ± 0.079 ; supplemented 1.22 ± 0.030 nmol/mg protein; in the carbon tetrachloride control group, values were increased ($p < 0.050$) compared with the control and supplemented groups (reduced glutathione = 10.0 ± 0.75 nmol/mg protein; oxidized glutathione = 7.52 ± 1.20 nmol/mg protein); the oxidative stress index was calculated using the ratio between reduced glutathione/oxidized glutathione). The oxidative stress index for both groups was indicative of no oxidative stress (12.7 ± 0.90 and 13.6 ± 0.90 , respectively; $p > 0.050$). In contrast, the stress index for the carbon tetrachloride was significantly different ($p < 0.050$) compared to the control and the supplemented groups (carbon tetrachloride = 1.33 ± 0.31).

Liver superoxide dismutase activity (Figure 2(a)) showed no significant differences between the biotin-supplemented group and the control group: control = 14.8 ± 1.45 ; supplemented = 15.0 ± 1.48 U/mg protein. Increased enzyme

activity was found in the carbon tetrachloride positive control values (25.4 ± 1.86 U/mg protein; $p < 0.050$ compared with the control and the supplemented groups). Catalase activity (Figure 2(b)) did not significantly differ between the control and supplemented group, control = 144 ± 18.1 ; supplemented = 151 ± 13.5 U/mg protein. The carbon tetrachloride positive control values showed increased catalase activity (286 ± 30.1 U/mg protein, $p < 0.050$ compared with the control and supplemented groups).

3.3. Effect of Biotin Supplementation on Liver Morphology.

Despite the fact that biotin supplementation had no effect on liver toxicity markers, histological analysis showed noticeable differences between groups. Light microscopy observations of livers from control mice showed a normal morphology with adjacent normal sized sinusoids radiating from the central veins toward the periphery of the liver lobules and a normal portal triad (Figure 3(a)). In the supplemented mice, we observed an altered portal triad. Morphological evaluation revealed moderate dilated sinusoids, moderate

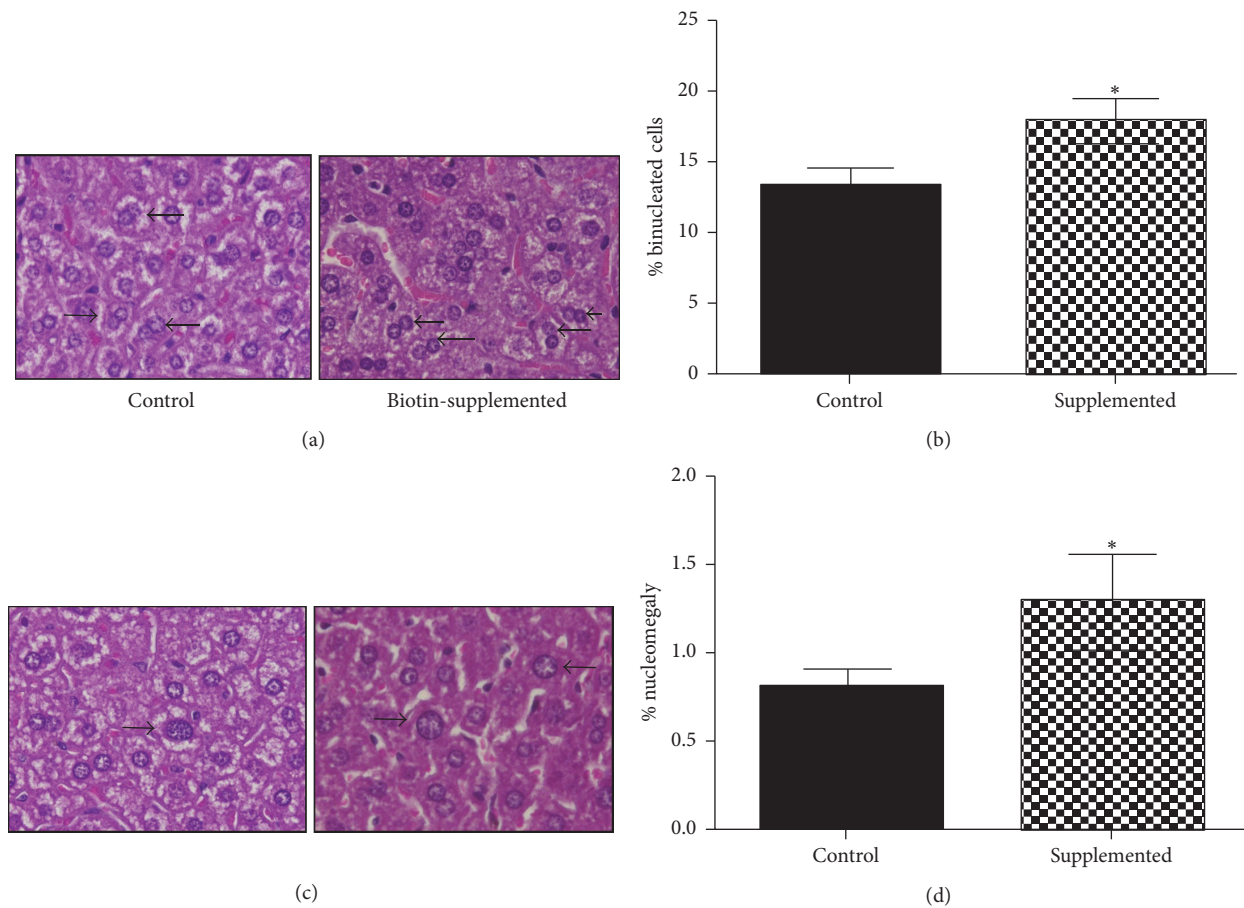


FIGURE 4: Effect of biotin supplementation on binucleated hepatocytes and nucleomegaly in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. (a) Hematoxylin and eosin representative image of hepatocytes from control and biotin-supplemented group (right) showing mono and binucleated hepatocytes. (b) Quantification of binucleated hepatocytes per field. (c) Hematoxylin and eosin images of hepatocytes from control and biotin-supplemented group (right) showing nuclei <12 and $>12 \mu\text{m}$. (d) Nuclei quantification $>12 \mu\text{m}$ per field. Black bars: control group; patterned bars: biotin-supplemented group. Values represent the mean \pm SEM of 9 mice per group. * $p < 0.050$ compared to the control group.

increased vascularity, and mild increased number of bile conducts (Figure 3(b)).

Changes were also observed in the hepatocyte nuclei. Compared to the mice fed a control diet, the biotin-supplemented group showed a 39% increase in the number of binucleated hepatocytes (control = 13.2 ± 1.29 ; supplemented = $18.7 \pm 1.50\%$) (Figures 4(a) and 4(b)). In addition, the number of hepatocytes with nucleomegaly (nuclei $> 12 \mu\text{m}$) was increased: control = 0.81 ± 0.11 ; supplemented = $1.30 \pm 0.28\%$ (Figures 4(c) and 4(d)).

3.4. Effects of Biotin Supplementation on Nitric Oxide Levels. The increased vascularization observed in histology prompted us to determine nitric oxide concentrations because nitric oxide has been proposed to participate in the biotin transduction signaling pathway cGMP/PKG [31]. However, no differences were found in nitric oxide concentration between the control and the supplemented group (Figure 5): control = 24.5 ± 0.55 ; supplemented = 25.6 ± 1.50 . Carbon tetrachloride levels were increased: $64.3 \pm$

$7.17 \mu\text{mol}/\text{mg}$ tissue; $p < 0.050$, compared with the control and supplemented groups.

4. Discussion

In this study, we found that eight weeks of dietary biotin supplementation induced noticeable changes in liver morphology in normal mice and that these modifications were not paralleled with liver damage markers. The biotin-supplemented mice had a higher percentage of dilated sinusoids, vascularity, and bile ducts compared with the controls. We also found an increased number of binucleated hepatocytes (about 39%) and hepatocytes with nucleomegaly (66%) in the biotin-supplemented mice compared with the controls. These results together with previous results in pancreatic islets [15] and ovaries [19] and the observations by other groups [12, 21–23] indicate that pharmacological concentrations of biotin modify tissue structure.

Binucleated hepatocytes and nucleomegaly are the result of polyploidy [32]. At present, the role of increased polyploidy

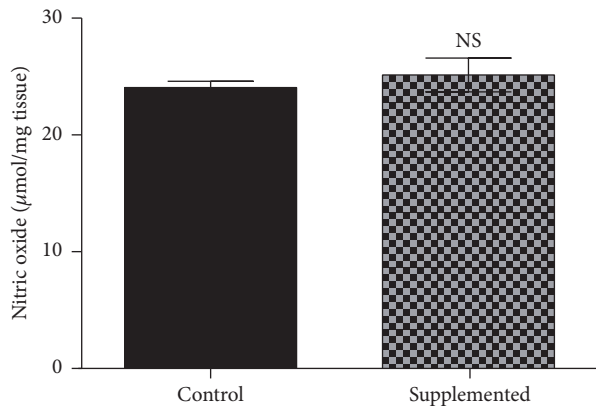


FIGURE 5: Effect of biotin supplementation on nitric oxide concentrations in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. Values represent the mean \pm SEM of 9 mice from each group. Measurements were performed in triplicate. Black bars: control group; patterned bars: biotin-supplemented group. ^{NS} $p > 0.050$.

in the liver is still under debate [33, 34]. Polyploid cells are generated in some types of cancer such as esophageal and colon cancers [32]; however, in the liver, most of the studies suggest that this mechanism renders the cells more resistant to injury and enhances the liver's functional capacity [32, 34]. Our findings show that, despite increased polyploidy, serum damage indicators, oxidative stress markers, and antioxidant enzymes were not affected by biotin supplementation, suggesting that the hepatocyte nuclear changes produced by the vitamin might be related to the positive effects associated with liver polyploidy. However, further studies will be required to test this hypothesis.

In previous studies, we observed that normal mice fed a biotin-supplemented diet (approximately 13.5 mg/kg body weight) showed increased pancreatic islet size as well as increased alpha-cells at the islet center compared with the controls [15]. However, these structural changes did not have adverse effects on islet function. Our prior studies [19] in the same mouse model showed changes in response to biotin in the female reproductive tract, with decreased Graafian and ovarian primary follicles. Neither our prior studies [15, 19] nor this work (data not shown) identified unfavorable effects of biotin supplementation on body weight, food consumption, external appearance, or behavior.

Changes on ovary histology were also observed by Paul et al. [20] in response to acute intraperitoneal treatment of 50 mg/kg body weight of biotin [20]. Consistent with our experiments, they found that biotin did not affect normal body weight gain [20]; however, in contrast with our observations [19], they found estrus cycle irregularities. Sawamura et al. [21], found that rats fed a diet containing 10 g biotin/kg diet for 6 weeks (990 mg/kg body weight) presented diminished total sperm counts and seminiferous tubule diameters compared to pair-fed rats. However, the biotin-supplemented group showed reduced food intake, impaired body weight gain, and decreased kidney and liver weights. It is possible that the histological modifications might result from biotin toxic effects because the magnitude

of biotin intake is above the reported tolerable upper intake level found by the same investigators [35].

Other investigations found that biotin supplementation modified the histopathological features produced in the diabetic state [12, 22, 23]. In rats with diabetes induced by 2 weeks of high-fat diet (HFD) and a single dose of streptozotocin that were then fed a HFD supplemented with biotin (300 µg/kg body weight per d) over 10 weeks, studies by Sahin et al. [12] noted that the histopathological changes in the liver, kidney, and pancreas of diabetic rats were reverted with biotin supplementation. Male Swiss albino mice with streptozotocin-induced diabetes treated daily by oral gavage with 15 mg/kg of biotin for 12 successive days had improved kidney and liver damage associated with the diabetic state [22, 23]. In the kidney, biotin supplementation decreased the number of distorted glomeruli, inflammatory cells, and giant macrophages [23]. In the liver, biotin caused reductions in dilated portal vein, leukocytic infiltration, and fatty degeneration [22]. It is interesting to note that while in diabetic models the effect of biotin reverses altered tissue structure produced by the pathological diabetic state, in normal animals the changes are observed on the typical morphology. None of the previous works showed the liver histology changes shown in the present report.

Despite the effects of biotin on liver morphology, our data did not find changes on liver damage indicators such as albumin, total and direct bilirubin, gamma-glutamyltransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, or urea. These results agree with studies in normal rats showing that diets containing up to 1,000 mg/kg diet did not affect these parameters [21]. These data indicate that pharmacological concentrations of biotin do not affect classic liver damage tests. However, we cannot rule out the possibility that the histological changes observed here might affect liver physiology in other ways.

The reversion of altered tissue structure induced by biotin in diabetic animal models is associated with reduced oxidative stress [12, 22, 23]. In rats with diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin, serum, liver, and kidney malondialdehyde levels were decreased in biotin-treated animals [12]. Additionally, the protein expression of the active form of NF- κ B—a transcription factor involved in cellular responses to diverse inflammation stimuli including free radicals—diminished in both, liver and kidney [12]. In Swiss albino diabetic mice, biotin treatment decreased the immune-reaction response toward acrolein immunohistochemical-signal—an indicator of oxidative damage [22, 23]. However, in our study, biotin supplementation had no effect on liver malondialdehyde levels or other oxidative stress markers such as reduced and oxidized glutathione. In agreement with this, no statistical significant differences were observed on the antioxidant activity of superoxide dismutase and catalase. The difference in biotin effects between normal and pathological states has also been observed in gene expression [12, 14, 17, 36, 37] and insulin and glucose tolerance [15, 38], indicating that the pharmacological effects of biotin can vary depending on the metabolic status.

Nitric oxide has an important role in vasodilatation [39]. Studies in Jurkat cells have found that the effects of biotin

are dependent of nitric oxide concentrations [31]. However, other studies in rats receiving eight weeks of biotin in water (approximately 1.2 mg/kg body weight) indicate that biotin effects are independent of nitric oxide [40]. Our data did not find changes in the concentration of nitric oxide suggesting that other mechanisms are involved in the vasodilatation changes observed here.

The mechanisms involved in biotin-induced histological changes are largely unknown. In pancreatic islets, we found that the changes produced by biotin supplementation on islet architecture might be related to diminished expression of the neural cell adhesion protein *Ncam1*, whose decreased expression produces changes in islet morphology and generates an increased number of alpha-cells at the interior of the islet [41]. Current studies in our laboratory are focused on the molecular mechanisms responsible for the morphological changes observed in the liver in response to biotin supplementation.

Biotin products with pharmacological concentrations of biotin are commercially available. Biotin administration is considered harmless in humans and rodents [25]. Toxicity tests such as the Ames test [42–44] in bacteria found that biotin was neither toxic nor mutagenic. Nonetheless, a *Tradescantia*-micronucleus bioassay showed mutagenic effects with a minimum effective dose of approximately 250 mg/ml [45]. In humans, no adverse effects were found with administration of 0.25 to 100 mg biotin. A lack of adverse effects has been reported in patients with inborn errors of biotin metabolism [46], normal individuals [24], diabetic patients [10, 13], and patients undergoing hemodialysis [11]. Rats fed diets containing up to 1,000 mg/kg diet did not show liver damage [21]. Although pharmacological concentrations of biotin are considered safe, further investigations are required to determine the effects of the tissue structure changes observed in this study.

5. Conclusion

Our data shows for the first time that biotin supplementation affects liver morphology in normal mice and that these modifications are not paralleled with changes in classical liver damage indicators and oxidative stress markers. These results indicate that biotin toxicity studies need to be addressed with different tools because the pharmacological concentrations of biotin affect tissue morphology and have nuclei effects.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

Dr. Rodolfo Rodríguez-Jurado, Dr. Rosa María Viguera-Villaseñor of Laboratorio Biología de la Reproducción, and M en C Gerardo Barragán-Mejía of Laboratorio Neurociencias acknowledge Instituto Nacional de Pediatría Departamento de Patología, for histology facilities. The authors are grateful to Dr. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte,

Dr. José Pedraza Chaverri, and Dr. Javier Espinosa Aguirre for valuable discussions throughout these studies, and to M. en C. Betzabé Linares Ferrer for computer assistance. This work is supported by research grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 219787-M and 99294-M, and Fondos Federales 074/2013. M. en C. Leticia Riverón-Negrete is a doctoral student from the Doctorado en Ciencias Biológicas at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Jonathan Alcántar-Fernández is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and was the recipient of Fellowship 384151 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

References

- [1] P. S. Harper, "C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (eds.), B. Childs, K.W. Kinzler, B. Vogelstein (associate eds.): molecular and metabolic bases of inherited disease, 8th edition," *Human Genetics*, vol. 110, no. 2, pp. 205–206, 2002.
- [2] A. A. Yates, S. A. Schlicker, and C. W. Sutor, "Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline," *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 98, no. 6, pp. 699–706, 1998.
- [3] C. Fernandez-Mejia and M.-L. Lazo-de-la-Vega-Monroy, "Biological effects of pharmacological concentrations of biotin," *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 16, no. 1, pp. 40–48, 2011.
- [4] C. Revilla-Monsalve, I. Zendejas-Ruiz, S. Islas-Andrade et al., "Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 60, no. 4, pp. 182–185, 2006.
- [5] O. K. Dokusova and I. V. Krivoruchenko, "The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia," *Kardiologiya*, vol. 12, no. 12, p. 113, 1972.
- [6] M. W. Marshall, P. G. Kliman, V. A. Washington, J. F. Mackin, and B. T. Weinland, "Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women," *Artery*, vol. 7, no. 4, pp. 330–351, 1980.
- [7] M. Hemmati, H. Babaei, and M. Abdolsalehei, "Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in Kermanshah in Iran (2008-2009)," *Oman Medical Journal*, vol. 28, no. 3, pp. 195–198, 2013.
- [8] C. Albarracin, B. Fuqua, J. Geohas, M. Finch, and J. Komorowski, "Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 54, article A428, 2005.
- [9] J. C. Coggeshall, J. P. Heggers, M. C. Robson, and H. Baker, "Biotin status and plasma glucose in diabetics," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 447, pp. 389–392, 1985.
- [10] M. Maebashi, Y. Makino, Y. Furukawa, K. Ohinata, S. Kimura, and T. Sato, "Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus," *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 14, no. 3, pp. 211–218, 1993.
- [11] D. Koutsikos, C. Fourtounas, A. Kapetanaki et al., "Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in

- normoglycemic hemodialysis patients,” *Renal Failure*, vol. 18, no. 1, pp. 131–137, 1996.
- [12] K. Sahin, M. Tuzcu, C. Orhan et al., “Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin,” *British Journal of Nutrition*, vol. 110, no. 2, pp. 197–205, 2013.
- [13] D. Koutsikos, B. Agroyannis, and H. Tzanatos-Exarchou, “Biotin for diabetic peripheral neuropathy,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 44, no. 10, pp. 511–514, 1990.
- [14] Y. Sugita, H. Shirakawa, R. Sugimoto, Y. Furukawa, and M. Komai, “Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats,” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 72, no. 5, pp. 1290–1298, 2008.
- [15] M. L. Lazo de la Vega-Monroy, E. Larrieta, M. S. German, A. Baez-Saldana, and C. Fernandez-Mejia, “Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion,” *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 24, no. 1, pp. 169–177, 2013.
- [16] A. Aguilera-Méndez and C. Fernández-Mejía, “The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation,” *BioFactors*, vol. 38, no. 5, pp. 387–394, 2012.
- [17] E. Larrieta, F. Velasco, P. Vital et al., “Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 644, no. 1-3, pp. 263–268, 2010.
- [18] D. Boone-Villa, A. Aguilera-Méndez, A. Miranda-Cervantes, and C. Fernandez-Mejia, “Effects of biotin supplementation in the diet on adipose tissue cGMP concentrations, AMPK activation, lipolysis, and serum-free fatty acid levels,” *Journal of Medicinal Food*, vol. 18, no. 10, pp. 1150–1156, 2015.
- [19] A. Báez-Saldaña, I. Camacho-Arroyo, J. J. Espinosa-Aguirre et al., “Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system,” *Steroids*, vol. 74, no. 10-11, pp. 863–869, 2009.
- [20] P. K. Paul, P. N. Duttagupta, and H. C. Agarwal, “Effects of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat,” *Current Science*, vol. 42, no. 6, pp. 206–208, 1973.
- [21] H. Sawamura, C. Ikeda, R. Shimada, Y. Yoshii, and T. Watanabe, “Dietary intake of high-dose biotin inhibits spermatogenesis in young rats,” *Congenital Anomalies*, vol. 55, no. 1, pp. 31–36, 2015.
- [22] B. A. Aldahmash, D. M. El-Nagar, and K. E. Ibrahim, “Attenuation of hepatotoxicity and oxidative stress in diabetes STZ-induced type 1 by biotin in Swiss albino mice,” *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 23, no. 2, pp. 311–317, 2016.
- [23] B. A. Aldahmash, D. M. El-Nagar, K. E. Ibrahim, and M. S. Metwaly, “Biotin amelioration of nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic mice,” *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 22, no. 5, pp. 564–569, 2015.
- [24] G. M. Singer and J. Geohas, “The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial,” *Diabetes Technology and Therapeutics*, vol. 8, no. 6, pp. 636–643, 2006.
- [25] M. Z. Fiume, “Final report on the safety assessment of Biotin,” *International Journal of Toxicology*, vol. 20, supplement 4, pp. 1–12, 2001.
- [26] A. Báez-Saldaña and E. Ortega, “Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice,” *Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 8, pp. 1970–1977, 2004.
- [27] H. H. Draper and M. Hadley, “Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation,” *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp. 421–431, 1990.
- [28] L. Góth, “A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 196, no. 2-3, pp. 143–151, 1991.
- [29] S. A. Mansour and A. H. Mossa, “Adverse effects of lactational exposure to chlorpyrifos in suckling rats,” *Human and Experimental Toxicology*, vol. 29, no. 2, pp. 77–92, 2010.
- [30] C. R. Laboratories, BALB/c Nude Mouse Biochemistry, 2012, http://www.criver.com/files/pdfs/rms/balbc-nude/rm_rm_r_balb-c_nude_mouse_clinical_pathology_data.aspx.
- [31] R. Rodriguez-Melendez and J. Zempleni, “Nitric oxide signaling depends on biotin in Jurkat human lymphoma cells,” *Journal of Nutrition*, vol. 139, no. 3, pp. 429–433, 2009.
- [32] G. Gentric and C. Desdouets, “Polyploidization in liver tissue,” *The American Journal of Pathology*, vol. 184, no. 2, pp. 322–331, 2014.
- [33] G. Gentric and C. Desdouets, “Liver polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hide?” *Oncotarget*, vol. 6, no. 11, pp. 8430–8431, 2015.
- [34] A. W. Duncan, “Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 24, no. 4, pp. 347–356, 2013.
- [35] H. Sawamura, T. Fukuwatari, and K. Shibata, “Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats,” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 71, no. 12, pp. 2977–2984, 2007.
- [36] G. Ferreira and W. P. Weiss, “Effect of biotin on activity and gene expression of biotin-dependent carboxylases in the liver of dairy cows,” *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 3, pp. 1460–1466, 2007.
- [37] K. Dakshinamurti and W. Li, “Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats,” *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 132, no. 2, pp. 127–132, 1994.
- [38] A. Reddi, B. DeAngelis, O. Frank, N. Lasker, and H. Baker, “Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice,” *Life Sciences*, vol. 42, no. 13, pp. 1323–1330, 1988.
- [39] V. Bhandari, R. Choo-Wing, S. P. Chapoval et al., “Essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, inflammatory, mucus, and physiologic responses in the lung,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 29, pp. 11021–11026, 2006.
- [40] M. Watanabe-Kamiyama, S. Kamiyama, K. Horiuchi et al., “Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats,” *British Journal of Nutrition*, vol. 99, no. 4, pp. 756–763, 2008.
- [41] F. Esni, I.-B. Täljedal, A.-K. Perl, H. Cremer, G. Christofori, and H. Semb, “Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell: type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets,” *Journal of Cell Biology*, vol. 144, no. 2, pp. 325–337, 1999.
- [42] S. Hayes, A. Gordon, I. Sadowski, and C. Hayes, “RK bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: Short-term forward selection assay,” *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, vol. 130, no. 2, pp. 97–106, 1984.
- [43] SRI-International, “Microbial mutagenesis testing of substances compound report: F76-041, D-Biotin,” NTIS Report PB89-169072, 1979.

- [44] M. D. Ronquillo-Sánchez, R. Camacho-Carranza, C. Fernandez-Mejia, S. Hernández-Ojeda, M. Elinos-Baez, and J. J. Espinosa-Aguirre, "Modulation of the rat hepatic cytochrome P4501A subfamily using biotin supplementation," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 627907, 9 pages, 2013.
- [45] T.-H. Ma, M. M. Harris, V. A. Anderson et al., "Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents," *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 138, no. 2-3, pp. 157–167, 1984.
- [46] E. R. Baumgartner and T. Suormala, "Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism," *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, vol. 67, no. 5, pp. 377–384, 1997.

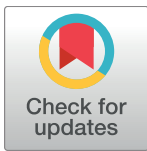
RESEARCH ARTICLE

Caenorhabditis elegans respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors

Jonathan Alcántar-Fernández^{1,2}, Rosa E. Navarro³, Ana María Salazar-Martínez⁴, Martha Elva Pérez-Andrade², Juan Miranda-Ríos^{2*}

1 Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, Ciudad de México, México, **2** Unidad de Genética de la Nutrición, Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e Instituto Nacional de Pediatría, México, Ciudad de México, México, **3** Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, **4** Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

* riosjuanm@biomedicas.unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Alcántar-Fernández J, Navarro RE, Salazar-Martínez AM, Pérez-Andrade ME, Miranda-Ríos J (2018) *Caenorhabditis elegans* respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors. PLoS ONE 13(7): e0199888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888>

Editor: Denis Dupuy, INSERM U869, FRANCE

Received: September 29, 2017

Accepted: June 15, 2018

Published: July 10, 2018

Copyright: © 2018 Alcántar-Fernández et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (IN205818) and Fondos Federales Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Pediatría (036/2015) to J.M.-R. J. A.-F. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad

Abstract

High-glycemic-index diets, as well as a sedentary lifestyle are considered as determinant factors for the development of obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases in humans. These diets have been shown to shorten the life span of *C. elegans* in a manner that is dependent on insulin signaling, but the participation of other signaling pathways have not been addressed. In this study, we have determined that worms fed with high-glucose diets show alterations in glucose content and uptake, triglyceride content, body size, number of eggs laid, egg-laying defects, and signs of oxidative stress and accelerated aging. Additionally, we analyzed the participation of different key regulators of carbohydrate and lipid metabolism, oxidative stress and longevity such as SKN-1/NRF2, HIF-1/HIF1 α , SBP-1/SREBP, CRH-1/CREB, CEP-1/p53, and DAF-16/FOXO, in the reduction of lifespan in glucose-fed worms.

Introduction

Obesity is predicted to impact the health of more than 1 billion people by the year 2030 [1]. High-glycemic-index diets in industrialized and emerging countries include a large proportion of processed carbohydrates or sugars, which are readily metabolized to glucose, causing a fast increase in blood glucose level, and altering glucose homeostasis, influencing in a negative way the development, fertility, and lifespan in organisms as diverse as yeasts, worms, and mammals [2]. In particular, high-glucose diets (HGD) are known to generate reactive oxygen species (ROS), that include radical and non-radical oxygen species such as hydroxyl radical (HO \cdot), superoxide anion (O $_2^-$), and hydrogen peroxide (H $_2$ O $_2$), which can damage lipids, proteins and nucleic acids and could lead to cell death [3]. In this context, oxidative stress has been suggested as a factor related to the development of several diseases, including obesity and diabetes [4, 5].

Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowships from CONACyT and PAPIIT-UNAM. Some strains were provided by CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

The worm *Caenorhabditis elegans* has been used as a model organism in many areas of biomedical research [6, 7]. For example, as there is a high homology between human and *C. elegans* genes, this worm has been used as a model of human diseases [8, 9]. Furthermore, *C. elegans* has been used in studies of glucose-induced toxicity [2, 10–12]. These reports have documented that HGD affect growth, fertility, aging and lifespan. Nonetheless, these studies have been performed under a wide range of experimental conditions, i.e. different glucose concentrations used, diverse administration regimes, and varied times of exposure, making it difficult to compare the results obtained.

It has been established that a shortened lifespan in glucose-fed worms is in part due to the activation of the insulin/IGF-1 signaling (IIS) pathway [11]. The IIS network can be summarized as follows (reviewed in [13]): insulin like-peptides bind to their receptor (DAF-2), recruiting an insulin receptor substrate. This activates the phosphatidylinositol-3-OH kinase AGE-1/PI3K, increasing the level of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3), which in turn activates a kinase cascade, formed by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1), protein kinase B (AKT-1/-2), and serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1 (SGK-1). This cascade inactivates by phosphorylation the transcription factor DAF-16/FOXO, resulting in the translocation of DAF-16/FOXO from the nucleus to the cytosol. AMP-activated protein kinase (AMPK/AAK-2) is also able to phosphorylate DAF-16/FOXO. AKT-1/-2 is also involved in the sequestration in the cytosol of the oxidative stress-responsive NRF transcription factor SKN-1. Although much is known about the activation of the IIS pathway in response to HGD, the involvement of other signaling pathways has not been thoroughly considered.

In the present study, we evaluated biochemical (glucose uptake, glucose and triglyceride content), as well as physiological (body size, lifespan, number of eggs laid, and egg-laying defects) changes experienced by worms exposed from the L1 to the L4 larval stage to increasing concentrations of glucose in the growth medium. We present evidence that worms fed a HGD face oxidative stress and induce enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems so that the organism can cope with the imposed stress. Additionally, we assessed the participation of transcriptional regulators that are known to be involved in longevity, lipid accumulation and oxidative stress, such as SKN-1/NRF2, HIF-1/HIF1 α , SBP-1/SREBP, CRH-1/CREB, CEP-1/p53, and DAF-16/FOXO [14–19], that could be involved in the genetic mechanisms by which glucose reduces lifespan, by studying the effect that mutants or RNAi knock-downs have on the lifespan of glucose-fed worms, and the changes that dietary glucose induce in the mRNA accumulation of the above mentioned transcription factors.

Materials and methods

Strains and culture conditions

The wild-type Bristol (N2), CF1553 *mul84* [(pAD76) *Psod-3::GFP+rol-6(su1006)*], GR1307 *daf-16(mgDf50)* I, CF1038 *daf-16(mu86)* I, TJ1 *cep-1(gk138)* I, EU84 *unc-5(e53) skn-1(zu67) IV/nT1 [let-?(m435)]* (IV;V) strains were cultured using NGM plates seeded with *E. coli* OP50-1 and raised at 18°C, as previously described [20]. The worms were synchronized with alkaline hypochlorite solution [21], a condition in which only eggs can survive, and eggs were washed with M9 buffer solution. After synchronization, worms were seeded on a NGM plate (control condition) and in glucose-supplemented plates, and fed with *E. coli* OP50-1 until they reached L4 larval stage. Glucose (Sigma) was added to the mix of agar and salts of the NGM medium in order to obtain 20, 40, 80, or 100 mM glucose concentration. The *E. coli* HT115(DE3) strain was used for the feeding RNAi experiments.

Preparation of worm lysates

L4 stage worms were harvested and washed three times with M9 buffer (42.26 mM Na₂HPO₄, 22.04 mM KH₂PO₄, 85.56 mM NaCl, and 0.87 mM MgSO₄) in order to remove all bacteria. After removing as much as possible of M9 buffer, worms were resuspended in lysis buffer: 50 mM HEPES, 50 mM KCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 5 mM phosphate β-glycerol, 0.1% (v/v) Triton X-100, 50 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.2 mM phenylmethanesulfonylfluoride and protease inhibitor (Complete, Roche). Worms were frozen in liquid nitrogen and thawed at 37°C for three times, then worms were sonicated in ice with an ultrasonic processor unit (Sonics®) in three cycles of 30 sec. (Amplitude = 60, pulse = 3) for 1 min, and centrifuged at 12000 rpm at 4°C for 15 min. The supernatant was collected and stored at -70°C. An aliquot was used for protein quantification by Bradford assay (BioRad Protein Assay).

Glucose and triglyceride content measurement

Freshly-made lysates of worms from the different growth conditions were prepared, and internal glucose and triglyceride content was determined by applying the same protein amount for each test. For glucose quantification, the Reflotron Plus/Sprint System (Roche) was used, which is based in the enzymatic oxidation of glucose to give δ-D-gluconolactona plus hydrogen peroxide; the hydrogen peroxide then changes the color of a chromogen which is quantitated by reflectance photometry (<http://www.cobas.com/home/product/point-of-care-testing/reflotron-plus-sprint-system.html>). For triglyceride quantification, we used a colorimetric assay in which the glycerol from the triglycerides is enzymatically converted first to glycerol-3-phosphate and then to dihydroxyacetone phosphate plus hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide then enzymatically reacts with 4-aminofenazone and p-clorofenol to give quinone, which is spectrophotometrically determined at 505 nm using the SPINREACT system (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain; www.spinreact.com).

Glucose uptake assay

Glucose uptake was determined by using the 2-deoxy-D-glucose (2DG) Uptake Measurement kit (Cosmo Bio CSR-OKP-PMG-K01E), according to the manufacturer's recommendations. In short, L4 stage larvae were incubated in 0.5 mM 2-DG (Sigma D8375) for 2 h. Then, larvae were washed three times with cold M9 buffer, and larvae were weighted as a way to normalize the quantification. Larvae were lysed with extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.1), according to [22]. Then, 80 µl of extraction buffer was added to each sample, frozen with liquid nitrogen and thawed at 37°C, then samples were heated at 85°C for 40 min. Samples were centrifuged at 13000 rpm at 4°C for 20 min, the supernatant was collected in a new tube and stored at -20°C. As a positive control, larvae grown in the absence of glucose were incubated in 0.5 mM of 2DG plus insulin at 80 mU/mL for 2 h, and processed in the same way as described above. Recombinant human insulin was administered (Humulin, 100 UI/mL, Lilly). Insulin concentration used was taken from a previous report [23].

Body length and area measurement

Fifty L4 larvae from each condition (glucose 0, 20, 40, 80 or 100 mM) were picked randomly from unlabeled plates. Experiments were performed in triplicate. Worms were photographed under a 20X objective in the Nikon Optiphot-2 microscope. Images were analyzed using the Image J software [24] (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Lengths were traced from the tip of the head

to the tip of the tail and areas were obtained by delineating all of the body. Calibration measurement was made with a stage micrometer (OBM1/100).

Determination of the number of eggs laid

To determine the number of eggs laid, 30 L4 worms were grown on NGM or NGM supplemented with 20, 40, 80 or 100 mM glucose. In the next three days worms were transferred to new plates (either control or glucose-supplemented as specified) and L1 larvae were scored for each plate. Then, 30 L4 larvae from the P0 were transferred to new NGM plates (either control or glucose-supplemented as specified) for the F1 generation. This process was replicated for the F2 generations.

Determination of egg retention with internal hatching or “bagging”

One hundred L4 stage control or glucose-fed worms were seeded in NGM plus 20, 40, 80 or 100 mM glucose in triplicates, and the occurrence of “bagging” was monitored for 10 days using a stereoscopic microscope (Nikon SMZ800), as reported previously [25].

Determination of Aspartate transaminase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) enzyme activities

AST and ALP enzyme activities were assayed in L4 larvae homogenates by colorimetric assays (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain; www.spinreact.com), following manufacturer’s instructions. Enzyme activities were adjusted by the protein content in the sample.

Lipid peroxidation assessment

Lipid peroxidation was quantified on L4 larvae by assaying malondialdehyde (MDA), which was determined by the thiobarbituric acid (TBA) method [26]. Briefly, freshly-made lysates of L4 larvae were incubated in TBA (0.375%) dissolved in TCA (30%), heated by boiling for 45 min, kept in ice for 15 min, followed by a centrifugation at 1000×g for 10 min. Supernatants were read at 532 nm on a spectrophotometer. MDA content was calculated against a standard curve of tetramethoxypropane (TMPO) (Sigma 108383–100). The MDA content was adjusted by the protein content in the sample. As a positive control for lipid peroxidation induction, normally fed worms were incubated in 0.2 mM paraquat (Sigma Aldrich 36541) for 1 h at room temperature, samples were processed in the same way for every determination.

Measurement of mitochondrial superoxide dismutase and catalase enzyme activities

For quantification of mitochondrial SOD activity, the mitochondrial fraction was isolated from L4 larvae grown at the appropriate glucose concentration. Mitochondrial isolation was done as reported by [27]. mtSOD activity was measured using a commercial SOD determination kit (Sigma Aldrich, 19160), according to the manufacturer’s recommendations. Catalase activity was measured according to [28] with slight modifications as follows: worms were homogenized in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), then protease inhibitor (Complete, Roche) was added. After protein was quantified by the Bradford method, 20 µg of total protein were incubated for 30 s in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0, 12 mM H₂O₂). Reaction was stopped by addition of ammonium molybdate solution at 32.4 mM. Reactions were read at 405 nm, and the specific activity was calculated. As a positive control for mtSOD and catalase activities induction, control worms were incubated in 0.2 mM paraquat for 1 h at room temperature, samples were processed in the same way for every determination.

***Psod-3::GFP* reporter strain expression and heat shock experiments**

Approximately 200 L1 larvae from *Psod-3::gfp* synchronized animals were seeded on 60 mm plates of NGM media supplemented with 0, 20, 40, 80 or 100 mM glucose and incubated at 20°C until they reached L4 larval stage. At this stage plates were transferred to an air incubator at 31°C for 8 h as indicated [29]. After heat shock, animals were anesthetized with 10 mM tetramisole, mounted on agarose pads at 2% and observed on a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with an AxioCam MRc camera and Zeiss AxioVision software. Quantification of GFP fluorescence was performed using Image J software as previously indicated [30].

Determination of total glutathione, GSH and GSSG

For glutathione quantification, lysates and determination were made the same day. Glucose-fed and control L4 larvae were harvested and washed with M9 buffer three times. After removing as much as possible of M9 buffer, worms were resuspended in ice-cold metaphosphoric acid (5% w/v) (Sigma), then worms were sonicated in ice with an ultrasonic processor unit (Sonics) in three cycles of 30 s (Amplitude = 60, pulse = 3) for one minute and centrifuged at 12000 rpm at 4°C for 15 min. The supernatant was collected and kept on ice. Glutathione was quantified with HT Glutathione assay kit (Cat. 7511-100-K, Trevigen) according to the manufacturer's recommendations. As a positive control for induction of oxidative stress, control worms were incubated in 0.2 mM paraquat for 1 h at room temperature, samples were processed in the same way for every determination.

Lifespan assessment

Synchronized L1 worms were grown to young adults in NGM supplemented with 0 (control), 20, 40, 80 or 100 mM glucose until they reached the adult stage, then 100 worms from each condition were seeded on a new Petri dish containing the same amount of glucose that was previously used. We chose the number of 100 worms to be studied as with this number we have a probability of 0.82 to detect a change in lifespan at a significance level of 0.05, as calculated by a parametric survival-time model of *C. elegans* based on the Gompertz equation [31]. The experiment was conducted blind with the experimenter not knowing the identity of the treatment. Worms were counted and transferred daily to get rid of embryos and L1 larvae. Dead worms were counted on a daily basis. Worms showing egg-laying defects and worms fixed to the wall of the Petri dish were censored from counting. Lifespan assays were performed in triplicate.

Feeding RNAi

Bacterial clones carrying RNAi feeder plasmids of *crh-1*, *hif-1* and *sbp-1* were obtained from the *C. elegans* RNAi v1.1 Feeding Library (Open Biosystems, Huntsville, AL, USA) [32]. Empty vector (pL4440) was used as a control. Each RNAi colony was grown overnight in Luria broth with 100 µg/ml ampicillin (Sigma-Aldrich) and 12.5 µg/ml tetracycline (Sigma-Aldrich). The next day, fresh Luria broth was seeded with these overnight cultures and grown at 37°C with constant shaking; 1 mM isopropylthiogalactoside (IPTG, Fermentas) was added to the culture to induce dsRNA expression for 2 hours. All of the RNAi clones used in this work were verified by DNA sequencing and subsequent BLAST analysis to confirm their identity.

Lifespan determination on RNAi knock-down strains

L1 larvae were seeded on plates containing RNAi bacteria, then 0.4 mM IPTG was added, and larvae were allowed to develop to adults, and then they were synchronized. The F1 worms

were seeded on new plates containing RNAi bacteria in the absence of glucose (control condition) or in 100 mM glucose, and allowed to develop to L4 stage. Approximately 120 L4 worms undergoing RNAi treatment were transferred to fresh RNAi agar plates for lifespan experiments. To ensure the continued efficacy of RNAi knock-down, animals were fed everyday with freshly induced RNAi bacteria. The rest of F1 worms were harvested to assess RNAi knockdown efficiency determination by real time PCR. Worms were counted and transferred daily to get rid of embryos and L1 larvae. Dead worms were scored on a daily basis, counting worms that do not respond to a gentle touch with a sterilized platinum wire. Worms that died of protruding/bursting vulva, bagging, or crawling off the agar were censored.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was purified from worms grown in all of the conditions tested using Trizol (Invitrogen), according to the manufacturer recommendations and further purified using RNase kit (Qiagen). cDNA was generated with 1 µg of total RNA in a 10 µl reaction using Revert Aid enzyme (Fermentas). Then, 10ng of cDNA was used as a template in qRT-PCR analysis, that was performed on a Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. Primers used are listed in [S1 Table](#). Each qPCR reaction was performed using five biological replicates in triplicate each. PCR program was: 10 min at 95°C, 40 cycles of 95°C for 15 s, T_m (see [S1 Table](#) for each oligonucleotide pair) for 30 s and 70°C for 30 s. Specificity of primers was corroborated by electrophoresis in a polyacrylamide gel and by melting point analysis. Y45F10D.4 gene was used as a reference accordingly to [33]. The relative expression ratio of the mRNA relative to Y45F10D.4 mRNA expression was calculated as previously described [34].

Statistical analysis

Descriptive statistics was performed in all data set. If normality failed, data were analyzed using a non-parametric test. Differences between groups were tested using one-way ANOVA (parametric test), followed either by a Newman-Keuls for multiple comparison or Kruskal Wallis (non-parametric test) followed by Dunn's method. Lifespan assays were analyzed using the log-rank (Mantel-Cox) test followed by the Bonferroni method with the OASIS software. Number of eggs laid assays were analyzed using a two-way ANOVA. *P* values of less than 0.05 were regarded as statistically significant. Experimental data are shown as mean values for at least four independent assays, and SEM are indicated by error bars. Analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software.

Results

Glucose-fed worms showed an increased glucose content, glucose uptake, and triglyceride accumulation

We determined the accumulation of glucose in the body of worms that were grown in control medium or glucose-supplemented medium, and observed an increase of 2-, 3-, 14- or 11-fold in glucose content in worms grown at 20, 40, 80 or 100 mM glucose with respect to control (16.63 ± 1.82 mg/dL) ([Fig 1A](#)). Next, we determined glucose uptake using a 2-deoxy-D-glucose (2-DG) incorporation assay. We found that glucose uptake was increased by 2-, 4- or 7-fold compared to control (17.53 ± 2.29 nmol/mg worm) in worms exposed to 40, 80 or 100 mM glucose, respectively ([Fig 1B](#)). As a positive control, larvae that were grown in the absence of glucose was incubated for 2 h with insulin (80 mU/ml). Glucose uptake in insulin-treated

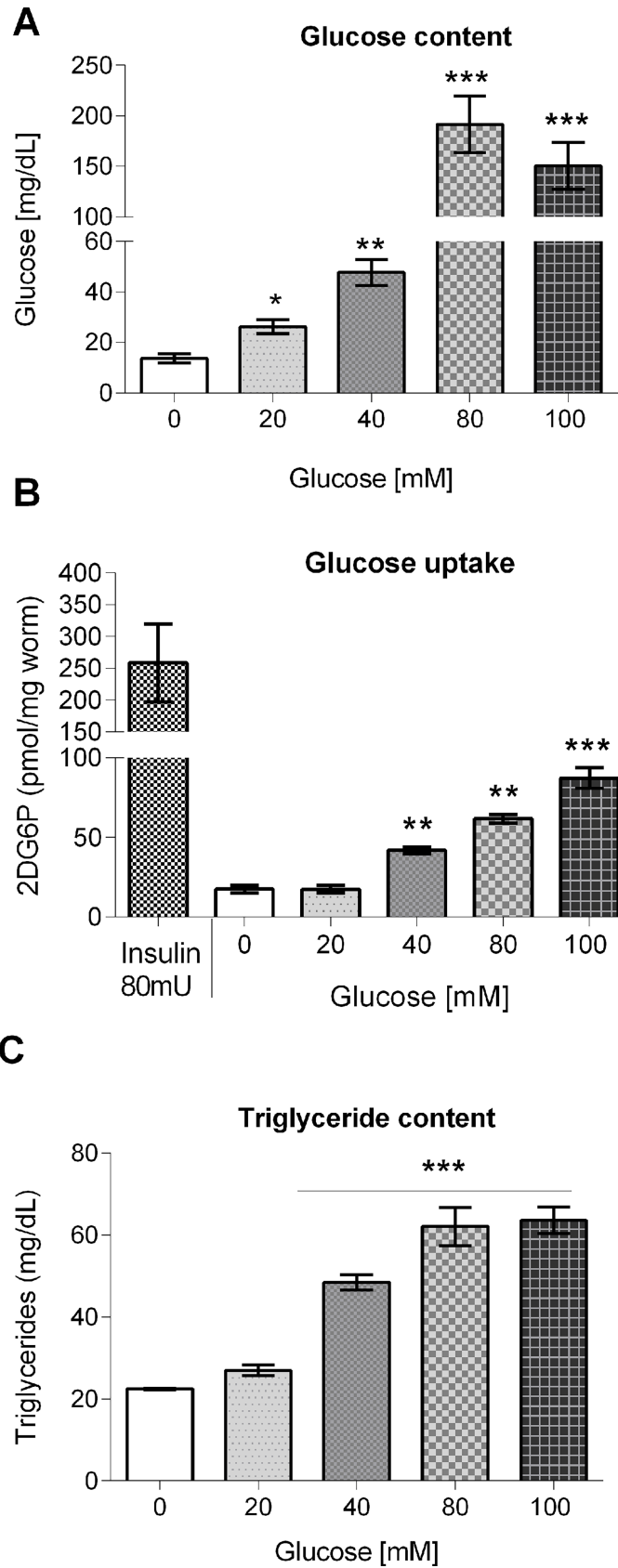


Fig 1. Glucose content, glucose uptake, and triglyceride content in glucose-fed worms. Worms were exposed from L1 to L4 larval stage to 20, 40, 80 or 100 mM glucose, and (A) glucose content, (B) glucose uptake, or (C) triglyceride content was determined. Values are expressed as median \pm interquartile range (IQR) ($n = 6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$ for the indicated comparison (calculated using the Kruskal-Wallis test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888.g001>

larvae was increased as expected (Fig 1B). Furthermore, as glucose is a known precursor of triglycerides, we measured triglyceride accumulation in worms fed a HGD. We found that triglyceride content was augmented by 2-fold at 40 mM glucose, and 3-fold at 80 or 100 mM glucose (control = 22.48 ± 0.24 mg/dL) (Fig 1C). Together, these findings suggest that glucose supplemented into the growth medium is ingested by the worms, modulates its own uptake and is metabolized into triglycerides.

Glucose-fed worms are thicker and longer than control worms

As it has been reported that food limitation results in a reduced body size in *C. elegans* [35], we aimed to determine if growth in a HGD caused a change in body length and area. We found that worms grown at glucose 20, 40, 80 or 100 mM were 2, 13, 16 or 17% larger than control worms (0.67 ± 0.01 mm) (Fig 2A). As well, glucose-fed worms were thicker than control (1.92 ± 0.04 mm²), showing an increase in area of 13, 22, 36 or 44% at 20, 40, 80 or 100 mM glucose, respectively (Fig 2B). These data suggest that glucose consumption gives rise to worms that are longer and thicker than worms fed a diet without glucose added.

Glucose exposure decreased the number of eggs laid and increased egg retention with internal hatching events (bagging)

As we have previously reported that starvation results in a reduced brood size [36], we asked if a HGD would have any impact in the progeny of glucose-fed worms. For this, we determined the number of eggs laid in the first three days post-L4 stage by worms that were grown from the L1 larval stage to adults for three generations (P0, F1, and F2) in a HGD. We found that worms from the P0 generation did not show any changes in the number of eggs laid (220 worms), but worms from the F1 and F2 generations showed a decrease of 25–39% or 45–50%, respectively (Fig 3A). As the number of eggs laid was decreased in glucose-fed worms, we

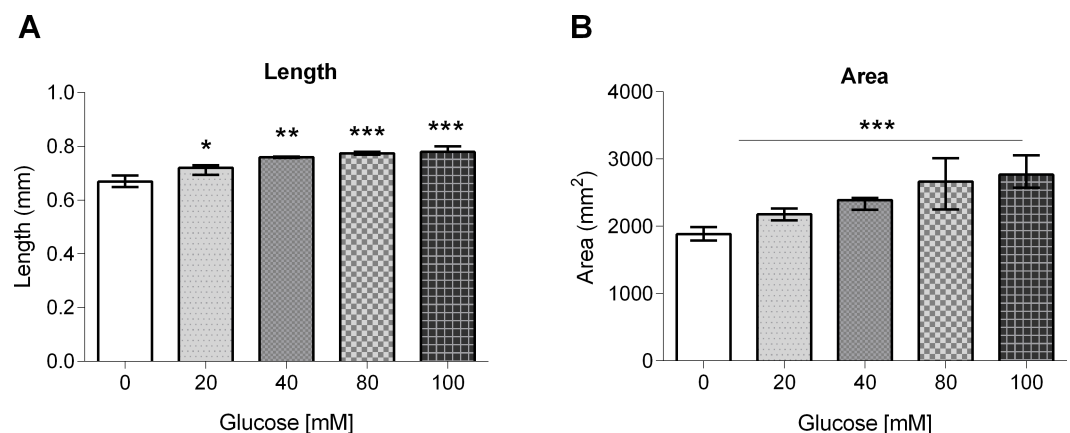


Fig 2. Body length and area of glucose-fed worms. Worms were exposed from L1 to L4 larval stage to 20, 40, 80 or 100 mM glucose, and their (A) length, or (B) area, was measured. Experiments were performed in triplicate. Values are expressed as mean \pm SEM ($n = 50$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$ for the indicated comparison (calculated using a one-way ANOVA test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888.g002>

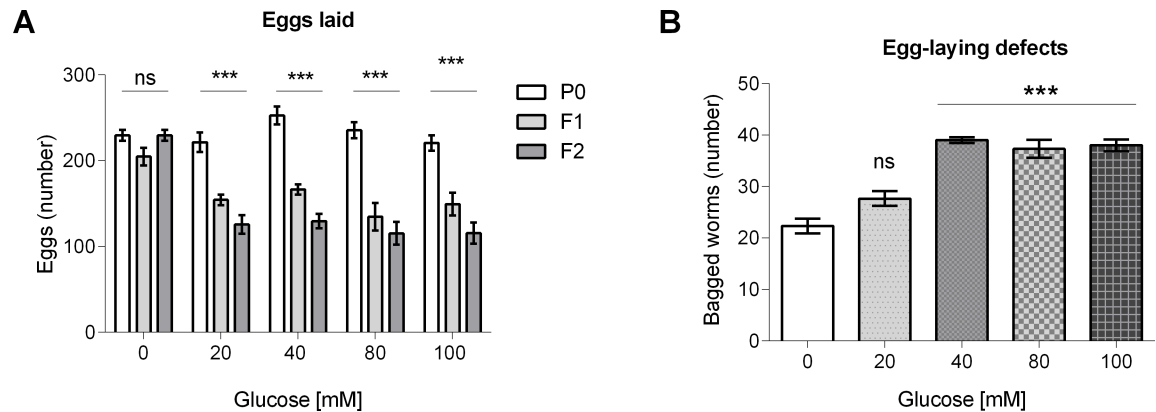


Fig 3. Number of eggs laid and egg retention with internal hatching frequency in glucose-fed worms. (A) Worms were exposed to 20, 40, 80 or 100 mM glucose for three generations (P0, F1 and F2) and the number of eggs laid in each generation was determined. (B) Worms were exposed to 20, 40, 80 or 100 mM glucose for only one generation and the frequency of egg retention with internal hatching or “bagging” was determined. Values are expressed as mean ± SEM (n = 100). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 or ****P* < 0.001 for the indicated comparison (the number of eggs laid was analyzed using a two-way ANOVA test, while egg retention with internal hatching frequency was analyzed using a one-way ANOVA test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888.g003>

hypothesized that this was probably due to defects in egg-laying capability. We determined the egg retention with internal hatching or “bagging” frequency at generation P0 of glucose-fed animals, as it has been reported that worms grown under stressful conditions showed problems in egg-laying as embryos hatch inside the worms and kill the mothers [25]. We observed an increase of 67–70% in “bagging” in worms fed a HGD with respect to control (20 worms showed “bagging”) (Fig 3B). Taken together, these data suggest that glucose altered the worm’s reproductive fitness, as glucose-fed worms showed a reduction in the number of eggs laid, partially as a consequence of an increase in “bagging”.

Glucose exposure induced Aspartate Aminotransferase and Alkaline Phosphatase enzyme activities

As it has been documented that the levels of Aspartate Aminotransferase (AST) and Alkaline Phosphatase (ALP) are modified in a *daf-2* mutant background [37, 38, 39], we aimed to determine any changes in ALP and AST activities in worms fed a HGD. We found that AST activity increased by 20–30% in worms grown at 20, 40 or 80 mM glucose, but showed a decrease of 10% at 100 mM glucose with respect to control (82.7 U/μg protein) (Fig 4A). In the case of ALP, it showed an increase of 20–30% at 20 and 40 mM glucose as compared to control (25 U/μg protein), showing a maximum increase of 45% at 80 mM glucose, and a small increase of 5% at 100 mM glucose (Fig 4B). These results suggest that worms exposed to glucose show increased levels of enzymes associated to an impaired IIS pathway.

Glucose exposure increased lipid peroxidation

As HGD are known to generate oxidative stress [3], and oxidative stress is known to cause lipid peroxidation that leads to the formation of malondialdehyde (MDA), we evaluated the MDA equivalents in worms fed a HGD. Fig 5A shows the increase in lipid peroxidation in treated worms with respect to the control (0.72 nmol/mg protein), expressed as percentages. A glucose concentration of 100 mM in the growth media produced the greatest percentage of lipid peroxidation at all the doses assayed (from 19 to 50%). To corroborate that oxidative stress is able to elicit lipid peroxidation, worms were incubated for 1 h in 0.2 mM paraquat, a

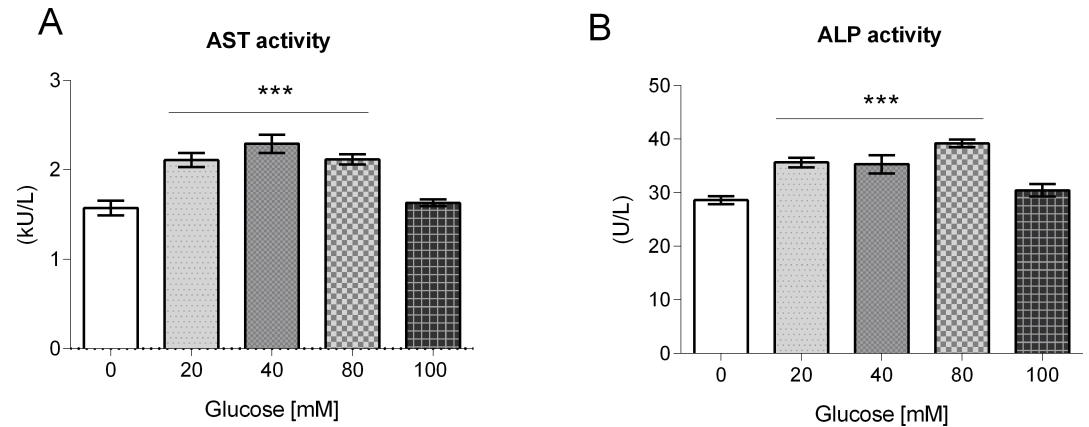


Fig 4. Aspartate Aminotransferase (AST) and Alkaline Phosphatase (ALP) enzyme activities in glucose-fed worms. Worms were exposed from L1 to L4 larval stage to 20, 40, 80 or 100 mM glucose, then (A) AST and (B) ALP enzyme activities were measured. Values expressed as mean \pm SEM (n = 12). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$ for the indicated comparison (calculated using a one-way ANOVA test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888.g004>

subtoxic dose that was chosen from a dose-response curve (S1 Fig). We found that control worms treated with paraquat showed an increase in lipid peroxidation as expected (Fig 5A).

Glucose exposure induced antioxidant enzyme activity, the expression of a *Psod-3::GFP* reporter protein, and increased the glutathione pool

Next, we determined the activities of mtSOD (mitochondrial Superoxide dismutase) and CAT (Catalase), antioxidant enzymes that are normally induced under conditions of oxidative stress. The enzyme activity of mtSOD of larvae treated with 20, 40, 80 or 100 mM glucose was significantly higher (from 57–100%) than that of the control (30.8% of activity). Additionally, CAT activity also increased by 98% with respect to control (3.74 kU/ μ g protein) at all the glucose concentrations tested (Fig 5C). Paraquat-treated worms showed an increase in both mtSOD and CAT enzyme activities as expected (Fig 5C).

As the mtSOD enzyme activity showed an increase in glucose-treated worms, we determined the expression of the *sod-3* gene, as it encodes the mtSOD protein [40], by using a *Psod-3::GFP* fusion protein [41]. For this experiment, we first grew the worms in glucose-added

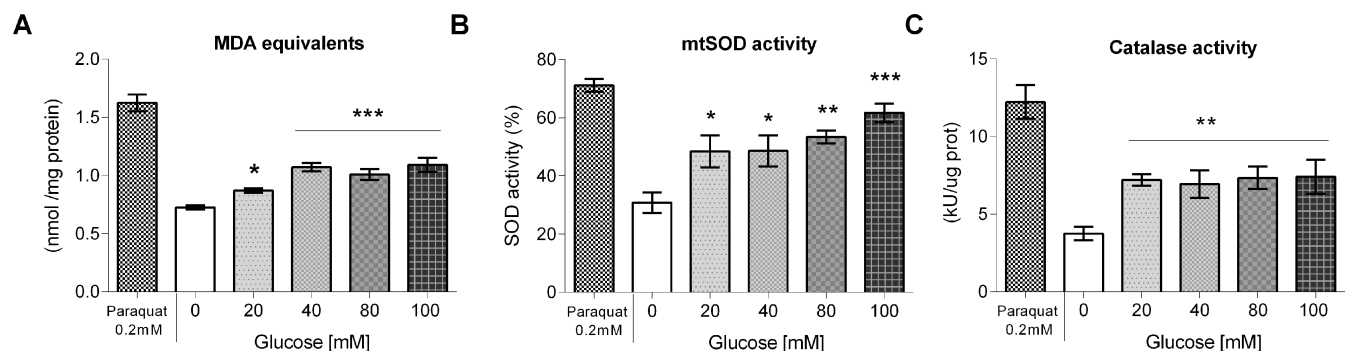


Fig 5. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in glucose-fed worms. Worms were exposed from L1 to L4 larval stage to 20, 40, 80 or 100 mM glucose, then (A) lipid peroxidation, (B) mitochondrial superoxide dismutase (mtSOD), and (C) catalase (CAT) activities were measured. Results are presented as mean \pm SEM. In the case of mtSOD, results are presented as %, with controls set to 100%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$ for the indicated comparison (calculated using a one-way ANOVA test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888.g005>

media until they reached the L4 larval stage. Then, we induced the expression of *Psod-3::GFP* by heat shock as described in Materials and Methods. We observed that the expression of *Psod-3::GFP* was induced by the heat shock treatment (Fig 6A and 6B). Interestingly, the expression of the *Psod-3::GFP* reporter augmented in a dose-dependent manner as the concentration of glucose in the growth medium, with a maximum at 80 mM glucose, then at 100 mM glucose a small decrease was observed (Fig 6C–6F).

We found that total glutathione, GSH and GSSG levels were significantly increased in worms grown in all of the glucose concentrations tested (Table 1). Interestingly, no changes in the GSH/GSSG ratio were observed under these conditions. As a positive control, worms that were treated with paraquat showed an increase in total glutathione, GSH and GSSG, and a decrease of 20% in the GSH/GSSG ratio, as expected. In conclusion, the observed increase in lipid peroxidation, in mtSOD and CAT enzyme activities, in *sod-3* gene expression, as well as the augmented levels of the glutathione pool, provide evidence that worms fed a HGD show signs of oxidative damage.

Glucose exposure affected the lifespan of wild-type, mutants or RNAi knock-downs of stress-responsive transcription factors

As lifespan is known to be affected by HGD [11,12], we determined how the lifespan of the wild-type strain was altered by growing worms in media added with different

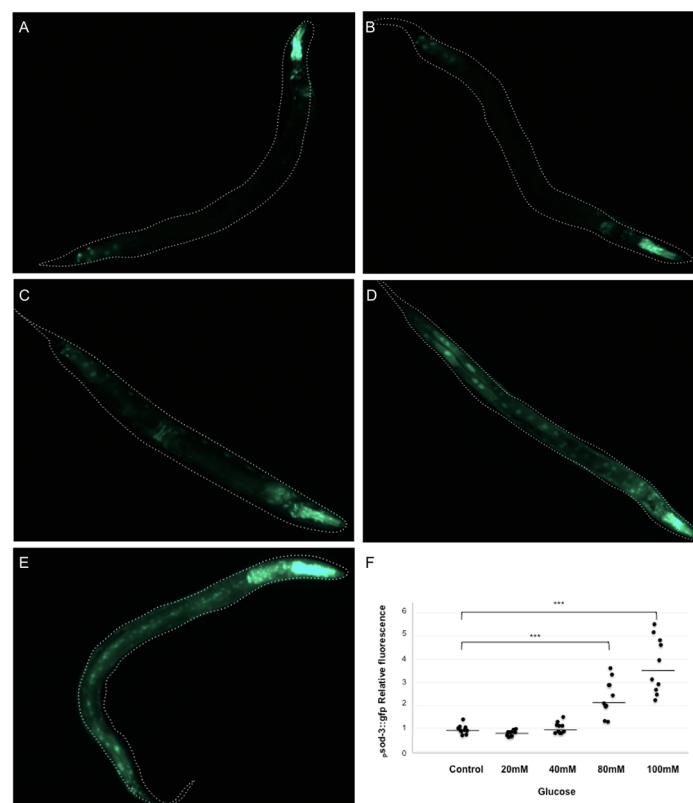


Fig 6. *Psod-3::GFP* expression after heat shock is higher when animals were grown in a HGD. (A–E) *Psod-3::GFP* transgen animals were exposed from L1 larvae to L4 larval stage to a diet of 0 (A), 20 (B), 40 (C), 80 (D) or 100 (E) mM glucose. To induce the expression of the reporter, animals were exposed to a heat shock of 31 °C for 8 h. After heat shock, animals were mounted and observed for fluorescence. Representative pictures are shown for each case. The data of one of two independent replicates with similar results are shown. (F) Graph shows the relative expression level of each experimental condition. *** $P < 0.001$ (calculated using a one-way ANOVA test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888.g006>

Table 1. Total glutathione, GSH and GSSG, and GSSG/GSH ratio in glucose-fed worms.

Glucose (mM)	Total glutathione nmol/mg worm	GSH nmol/mg worm	GSSG nmol/mg worm	GSH/GSSG ratio
0	1.77±0.09	1.69±0.09	0.08±0.00	22.33±0.77
20	2.52±0.26 ^a (42)	2.39±0.22 ^a (41)	0.14±0.05 ^b (75)	22.64±1.64
40	2.85±0.61 ^a (61)	2.72±0.55 ^a (61)	0.16±0.05 ^b (100)	23.69±3.56
80	3.22±0.24 ^b (82)	3.08±0.25 ^b (82)	0.15±0.01 ^b (87)	22.54±1.29
100	3.19±0.22 ^b (80)	3.09±0.26 ^b (83)	0.12±0.03 ^b (50)	25.91±7.55
0.2mM paraquat	3.22±0.33 (82)	2.81±0.31(66)	0.16±0.02 (100)	17.90±0.32

Effect of increasing concentrations of glucose in the growth medium of *C. elegans* on total glutathione, GSH, GSSG, and GSSG/GSH ratio. Data shown in table are mean ± SD; numbers in parentheses represent % of change relative to control (glucose 0 mM)

^a*P* < 0.05

^b*P* < 0.01

^c*P* < 0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888.t001>

concentrations of glucose. We found a reduction of 26, 35, 43, and 52% at 20, 40, 80 or 100 mM glucose, respectively, as compared to control (23 days) (Fig 7A and S2 Table).

As a way to find out if transcription factors (TFs) known to be key regulators of carbohydrate and lipid metabolism, oxidative stress and longevity, such as HIF-1/HIF1α, CRH-1/CREB, CEP-1/p53, SKN-1/NRF2, SBP-1/SREBP, and DAF-16/FOXO, were involved in the glucose-dependent reduction in lifespan observed in the wild-type strain, we assessed the longevity of mutants or RNAi knock-downs of the previously mentioned TFs in worms grown at 100 mM glucose (Fig 7B–7H and S2 Table). We found that the lifespan for *hif-1*(RNAi) and *crh-1*(RNAi) grown in glucose was longer than the lifespan of the wild-type strain grown in the absence of glucose (Fig 7B and 7C, respectively; S2 Table), while the lifespan of *cep-1(gk138)* and *skn-1(zu135)* glucose-fed worms was similar to that shown by the wild-type strain grown in the absence of glucose (Fig 7D and Fig 7E, respectively; S2 Table). The lifespan of *sbp-1* (RNAi) and two different mutants in *daf-16*, *daf-16(mgDf50)* and *daf-16(mu86)* grown in glucose-rich media was similar to the lifespan of the wild-type strain in the presence of glucose (Fig 7F, 7G and 7H, respectively; S2 Table). These findings support the hypothesis that the shortening of lifespan is mediated by convergent signaling pathways.

Glucose exposure affected the accumulation of several mRNAs that code for stress-responsive transcription factors

Taking into consideration the longevity results of the mutants and RNAi knock-downs of the stress-responsive TFs studied, we aimed to explore if some of the observed changes in glucose-fed worms could be related to changes in the expression of *skn-1* (isoform c), *hif-1*, *sbp-1*, *crh-1*, *cep-1*, and *daf-16* (isoforms a, b, d, and f), which are involved in the regulation of metabolism, longevity, lipid accumulation, and oxidative stress (Fig 8 and S2 Table). We found that mRNA accumulation showed no change for *hif-1*/HIF1α (Fig 8A), while it was increased for *crh-1*/CREB (Fig 8B), as glucose concentration in the growth media was increased. For *cep-1*/p53, mRNA accumulation was around 50% less than in the control at 20, 40 or 80 mM glucose, but was 50% more than the control at 100 mM glucose (Fig 8C). For *skn-1*/NRF2 and *daf-16*/FOXO, mRNA accumulation was decreased in glucose-fed worms in a dose-dependent manner (Fig 8D and 8E, respectively). In the case of *sbp-1*/SREBP, mRNA accumulation was 176% or 200% higher than the control if worms are grown at 20–40 mM glucose, or 80–100 mM glucose, respectively (Fig 8F). Taken together, except for *hif-1* mRNA, mRNA accumulation of the stress-responsive transcription factors analyzed was modulated by glucose treatment: it

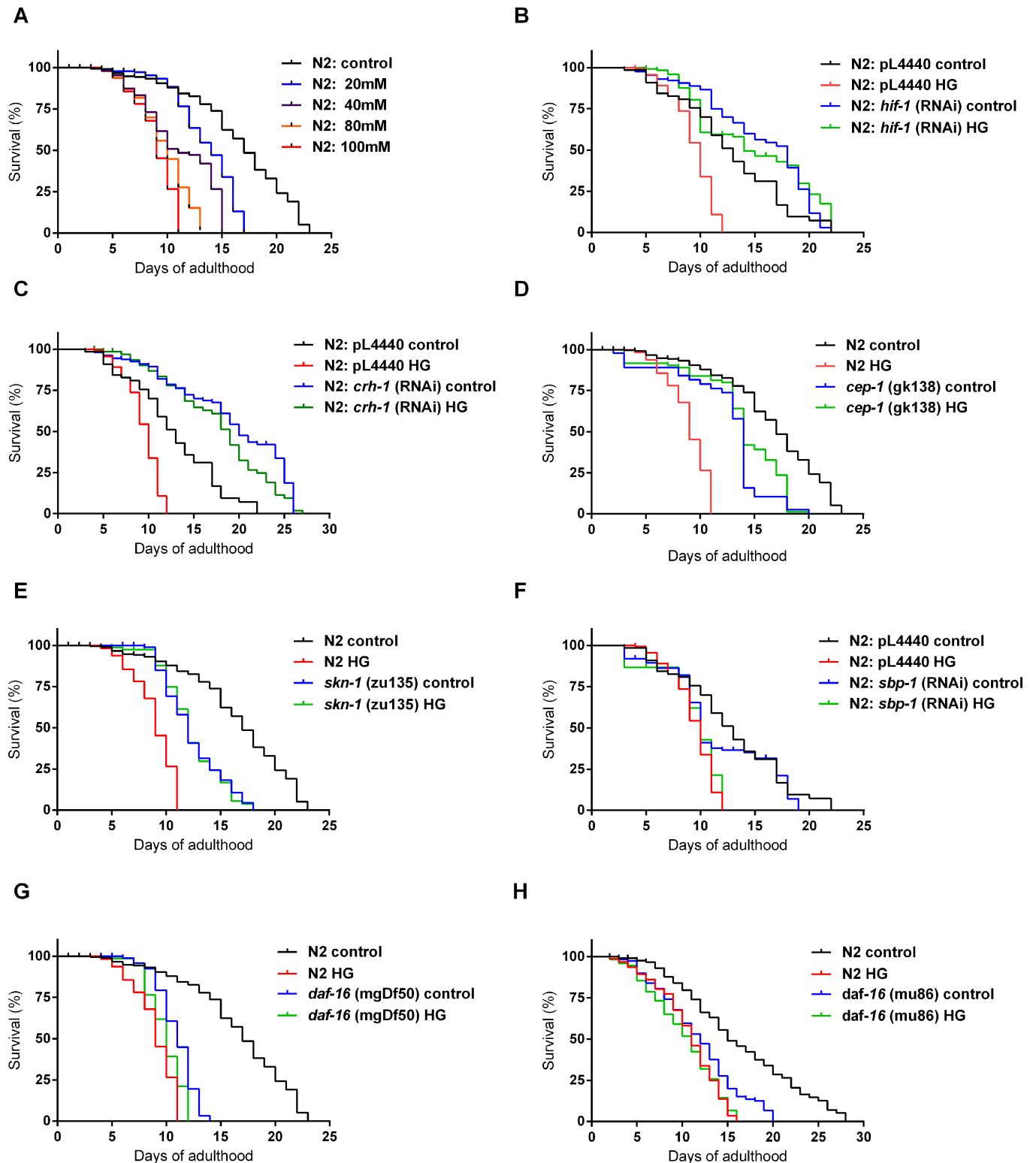


Fig 7. Lifespan of wild-type, mutants or RNAi knock-downs of stress-responsive transcriptional regulators worms upon feeding a HGD. (A) Lifespan curves for adult worms that were exposed from L1 larval stage to the end of their life cycle to 20, 40, 80 or 100 mM glucose (n = 110). (B-H) Lifespan curves for mutants or RNAi knock-downs of adult worms that were exposed from L1 larval stage to the end of their life cycle to 100 mM glucose and compared to controls (n = 110 worms per condition), (B) *hif-1*(RNAi); (C) *crh-1*(RNAi); (D) *cep-1(gk138)*; (E) *skn-1(zu135)*; (F) *sbp-1*(RNAi); (G) *daf-16(mgDf50)*; (H) *daf-16(mu86)*. For RNAi experiments, bacteria containing empty vector pL4400 was used as a control. Differences between groups were calculated using the log-rank test. See Supplemental S2 Table for statistical analysis of lifespan data shown in this figure.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888.g007>

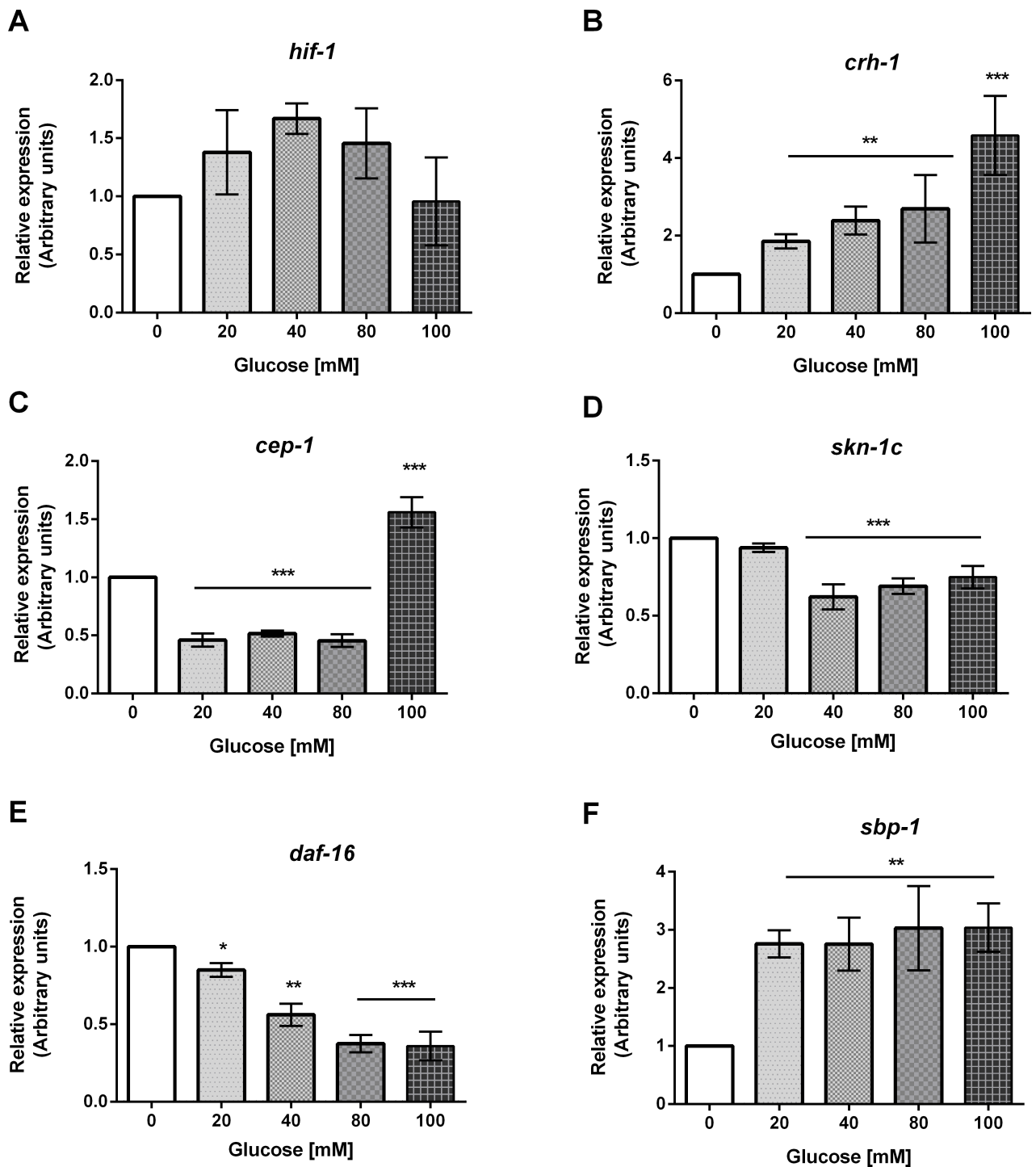


Fig 8. mRNA abundance of stress-responsive transcription factors of worms grown at different concentrations of glucose. Worms were exposed from L1 to L4 larval stage to 20, 40, 80 or 100 mM glucose. Panels show quantitative RT-qPCR analysis of: (A) *hif-1*; (B) *crh-1*; (C) *cep-1*; (D) *skn-1c*; (E) *daf-16*; (F) *sbp-1* mRNA level in wild-type worms grown at the specified glucose concentration. Values expressed as median \pm IQR (n = 6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$ for the indicated comparison (calculated using the Kruskal-Wallis test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888.g008>

was increased for *crh-1* and *sbp-1*, and was decreased for *cep-1*, *skn-1*, and *daf-16*, probably as part of a mechanism in which several signaling pathways participate to regain homeostasis in worms fed a HGD.

Discussion

In our study, worms were grown from L1 to L4 larval stages in glucose-supplemented growth media (20, 40, 80 or 100 mM). Glucose-fed worms showed biochemical and physiological alterations as compared to worms grown without added glucose. First, we confirmed that glucose-fed worms accumulated glucose into their bodies in a concentration-dependent way, from 20 to 80 mM glucose, showing a ten-fold increase as compared to control. Interestingly, glucose accumulation was the same in worms grown in 80 or 100 mM glucose. We can exclude differences in glucose uptake at 80 and 100 mM glucose as a possible explanation, as glucose uptake was linearly dependent on glucose concentration in the growth media. To our knowledge, this is the first time that glucose uptake has been determined in experiments with worms fed a HGD. Also, we observed that glucose uptake increased 14-fold if worms were treated with 80 mU of insulin for 2 h, suggesting that glucose uptake is regulated by the IIS pathway. This result is consistent with previous reports in which the expression of FGT-1, the primary glucose transporter of *C. elegans*, was shown to be under the control of the insulin/IGF-like signaling pathway [42].

Additionally, as glucose is a known precursor of triglycerides, we determined the triglyceride content in glucose-fed worms. We found that the triglyceride content increased in a concentration-dependent manner from 20 to 80 mM glucose. Like glucose accumulation, the triglyceride content was similar at 80 and 100 mM glucose, maybe as a consequence of the fact that glucose accumulation is similar at 80 or 100 mM glucose. Our results suggest that high levels of accumulation of glucose promote lipogenesis by increasing the triglyceride pool, similar to what has been found in mammals [43].

As food limitation is known to result in a reduced body size [35], we determined if a HGD produced alterations in body size. We found that worms fed a HGD were larger and thicker compared to worms grown in the absence of glucose (see Fig 2). This is in line with previous reports that show the influence of nutrient content on body size [44].

Glucose exposure also had effects on the amount of eggs laid. When we exposed worms of the P0 generation to glucose, we did not find any change in the number of eggs laid. However, when we exposed to glucose worms at the P0 generation and then raised the F1 and F2 generations in glucose-supplemented growth medium, the amount of eggs laid in the F1 and F2 generations was decreased, suggesting that changes produced by glucose exposure can be inherited to other generations. A similar situation as has been reported recently, in which worms grown in 2% glucose (approximately 111 mM) in the P0 generation showed adverse effects in fecundity [45]. Taking into account that glucose-fed worms showed an increased triglyceride content, it is possible that the reduced number of eggs laid is a reflection of the increased synthesis and accumulation of fat, as it has been shown in *C. elegans* that fatty acids play important roles in fertility [46] and sperm motility [47].

We then attempted to explain the reduction in the amount of eggs laid in glucose-fed worms, so we documented the presence of egg-laying defects in the form of egg retention with internal hatching or “bagging”, in which embryos hatch inside the worms, killing them. We observed a small increase in “bagging” in glucose 40, 80 or 100 mM. This phenotype is similar to what has been observed in worms fed with glucose 100 mM, when alterations in egg-laying were associated with an impairment in the serotonergic signaling pathway that control vulval muscles [48].

As the effects of added glucose on glucose content, brood size, lifespan, and oxidative stress have been studied in different labs under diverse experimental conditions, we provide here a table that compares our results with the results obtained in other studies (Table 2).

Table 2. Comparison of our findings with existing studies on glucose content, brood size, lifespan and oxidative stress on worms fed different concentrations of glucose.

GLUCOSE CONTENT				
Glucose concentration in growth media	Treatment	Results	Comments	References
10, 20, 30, 40, or 50 mM	Worms were cultured for 5 days on agar plates containing various concentrations of glucose (n = 100)	Total body glucose concentrations in the range of 7 to 15 mM were obtained.	High glucose conditions resulted in total body glucose concentrations similar to the ones observed in diabetic patients under poor glucose control.	[1]
2% (111 mM)	Adults (1 day)	Total body glucose increased by 50%.	Glucose content was evaluated in adult worms. High glucose diet increased total body glucose.	[3]
2% (111 mM)	Worms were grown on glucose from hatching to young adults.	Internal glucose levels were increased fourfold (from 132 to 737 nmol glucose/mg protein).	High glucose diet increases internal glucose level.	[5]
100 or 200 mM	Worms were fed with glucose from the L1 stage, then L4 worms were loaded into a microdevice (n > 30)	Total body glucose concentrations of 6.7 or 12 mM when worms fed glucose 100 or 200 mM, respectively.	Glucose feeding produced total body glucose concentrations similar to the ones observed in poorly controlled diabetic patients.	[9]
Not specified.	Worms were cultured under high glucose conditions.	Total body glucose concentrations of 13 mM.	Glucose feeding produced total body glucose concentrations similar to the ones observed in poorly controlled diabetic patients.	[7]
20, 40, 80, or 100 mM	Worms were fed with glucose from the L1 stage until the L4 stage.	Glucose content increased 2-, 3-, 14- or 11-fold as compared to control (16.63 mg/dL = 0.9 mM)	Internal glucose increased as glucose augmented in growth media, reaching a plateau at 80 mM.	This work.
BROOD SIZE				
100 mM	L4 larvae.	Brood size was similar to control.	Reductions in egg-laying rate and number of eggs in utero.	[4]
0.1, 1, 2, 4, or 10% (5.5, 55, 111, 222, or 555 mM)	L4 larvae (n = 10)	Brood size was reduced by 34%, 52%, or 74% on glucose 5.5 mM, 55–111 mM, or 222–555 mM	Worms were grown on NGM plus each glucose condition and 2 next days progeny was scored for each experiment. Replicates are not declared.	[5]
2% (111 mM)	L4 larvae (P0) exposed to glucose, then F1, F2 and F3 generations were grown in the absence of glucose (n = 10)	Brood size was reduced in glucose-fed worms in the P0, F1 and F2 generations, although only the P0 generation was exposed to glucose.	Glucose induced a transgenerational reduction in brood size from a single exposure to glucose at the P0 generation.	[6]
2% (0.111 mM)	L4 larvae (n = 36)	Brood size was reduced by 26%.	They used FUDR to pre-fertile young adults to prevent their progeny from developing.	[3]
50, 125, 250, 333, or 550 mM	Worms were grown from L1 to L4 stage in high-glucose diets.	Brood size was not reduced in worms grown in <250 mM glucose; a reduction in fertility by 25% or 60% was observed in glucose concentrations of 333mM or 500 mM glucose, respectively.	O-linked-N-acetylglucosamine cycling and insulin signaling are required for an adequate response to high glucose diets.	[2]
20, 40, 80, or 100 mM	Worms were fed with glucose from the L1 stage until the L4 stage for each generation (n = 30).	Brood size was not reduced in the P0 generation, but showed a decrease in the F1 generation and a further decrease in the F2 generation.	Brood size was reduced in part as an effect of an increase in “bagging”.	This work.
LIFESPAN				
40 mM	Adults (day 1) until death (n = 100).	Mean lifespan and maximum lifespan were reduced by 11% and 10%, respectively.	FudR was added to media to prevent progeny production respectively. Growth in a high glucose diet reduced lifespan.	[1]
Not specified.	Adults (1 day) until death (n = 50)	Mean and maximum lifespan was reduced by 13% or 14%, respectively.	FudR were added to media to prevent eggs from hatching. Human insulin treatment increased shortened mean and maximum lifespan in worms fed high glucose diets.	[7]

(Continued)

Table 2. (Continued)

0.1, 1, 2, 4, or 10% (5.5, 55, 111, 222, or 555 mM)	Adults (day 1) until death (n = 20).	No negative effects were observed in lifespan of worms grown in up to 111 mM glucose; however, significant reduction was observed in worms fed with 222 or 555 mM of glucose.	FudR were added to media to prevent hatching.	[5]
2% (111 mM)	Adults (1 day) until death	Lifespan reduction of 20%.	Lifespan reduction only observed when glucose was administered during adulthood, not when feeding during development.	[3]
4% (222 mM)	Worms were grown in glucose to L4 and then transferred to glucose-free media (n = 20)	Mean and maximum lifespan was reduced by 17% and 22%, respectively.	FudR was added to the media. Glucose exposure reduced the lifespan in the P0 generation, but this trait was not passed to F1 or F2 generations.	[6]
1, 10 or 20 mg/L (0.005, 0.055, or 0.111 mM)	Adults were fed with glucose from day 1 until death (n = 100)	Lifespan reduction of 23% or 49.5% at glucose 0.055 or 0.111 mM, respectively.	Dose-dependent reduction in lifespan was associated with ectopic apoptosis in the body.	[8]
100 or 200 mM	Worms were fed with glucose from the L1 stage, then L4 worms were loaded into microdevice until death (n>30)	Lifespan reduction of 29% or 31% at glucose 100 or 200 mM, respectively.	Reduction in lifespan in high-glucose conditions was associated with increased expression of oxidative stress response proteins and fat metabolism genes.	[9]
20, 40, 80, or 100 mM	Worms were fed with glucose from the L1 stage until the L4 stage for each generation (n = 110).	Lifespan was reduced by 26%, 35%, 43%, or 52% at 20, 40, 80 or 100 mM glucose, respectively	Lifespan was reduced in all glucose conditions in a concentration-dependent manner.	This work.
OXIDATIVE STRESS				
Not specified	Adults (1 day)	<i>sod-3</i> mRNA and SOD activity were reduced by 69% and 28%, respectively; ROS was augmented by 71%.	Quantification of ROS was performed with hydroethidine staining. High glucose diets increase ROS.	[7]
100 or 200 mM	Worms were fed with glucose from the L1 stage, then L4 worms were loaded into microdevice (n>30)	Dose-dependent increased expression of <i>gst-4::GFP</i>	Growth in a high glucose diet produced an increase in oxidative stress.	[9]
2% (111 mM)	Adults	Glucose did not induce a generalized oxidative stress.	Quantification of ROS was performed with dihydrofluorescein staining. Glucose induced resistance against oxidative stress on progeny from a unique exposure event on the P0 generation.	[6]
40 mM	Adults cultured for 15 days under high glucose conditions.	ROS was increased by 95%.	Quantification of ROS was performed with dihydroethidium staining. Growth in a high glucose diet increased ROS levels.	[1]
20, 40, 80, or 100 mM	Worms were fed with glucose from the L1 stage until the L4 stage.	Glucose exposure augmented lipid peroxidation, as well as CAT and mtSOD enzymatic activities, total GSH, and <i>Psod-3::GFP</i> expression.	Oxidative stress markers were increased in all conditions.	This work.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888.t002>

HGD induced alterations associated with an impaired insulin/insulin-like growth factor (IGF) signaling (IIS) pathway

As it has been reported that AST and ALP activities are dramatically changed in IIS pathway mutants [37, 38, 39], we determined if glucose exposure caused alterations in these enzyme activities. We found that AST and ALP activities were increased in worms grown in glucose, a known modulator of the IIS pathway. To our knowledge, this is the first report that shows that AST and ALP enzyme activities are induced in glucose-fed worms. The increase in activity of AST and ALP in glucose fed-worms could be interpreted as a sign of aging, as a similar increase is observed in aged worms [38, 39], and could indicate that glucose exposure is accelerating aging in worms, as has been hypothesized previously [11, 49]. More experiments should be performed to get a firmer argument on this topic.

HGD induced oxidative stress

Additionally, it has been documented that a HGD can increase the generation of ROS [50], but these studies have not characterized in detail the presence of oxidative stress nor the induction of components of the antioxidant system. We found evidence that glucose-fed worms are experiencing oxidative stress based on the following considerations: first, we showed that glucose-fed worms are facing some sort of molecular damage, as lipid peroxidation was increased. Such an increase in lipid peroxidation has been observed in worm's homogenates exposed to copper, where it was used for quantification of oxidative damage in the worm [51]. Second, glucose-fed worms showed increased activities of mtSOD and CAT, enzymes that have an important participation in the antioxidant system. Furthermore, we found that the expression of *sod-3*, the gene that codes for mtSOD, was induced in a dose-dependent manner in worms fed a HGD. Although our results are contrary to those reported by Mendler et al. [23], who observed no changes in SOD activity in glucose-fed worms, the difference could be attributable to the fact that we measured mitochondrial SOD activity, while Mendler et al. [23] determined total SOD activity. Third, previous studies in *C. elegans* have shown that, similar to mammals, glutathione metabolism is modulated by oxidative stress [52, 53]. In our study, we found that total glutathione, GSH and GSSG levels were increased in worms fed a HGD, suggesting that glucose-fed worms are experiencing oxidative stress. Interestingly, the ratio of GSH/GSSG remained unchanged under all the conditions analyzed, indicating that worms exposed up to 100 mM glucose were still able to induce the glutathione system as a defense mechanism against oxidative stress. Taken together, these data suggest that a HGD induced oxidative stress, and that different antioxidant systems are activated to mount a response.

Convergent pathways modulate the lifespan of worms fed a HGD

We also observed that glucose-fed worms showed a decreased lifespan. Most of the lifespan assays in *C. elegans* have been routinely performed using the compound 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR) to prevent eggs from hatching, but recent reports have shown that FUdR treatment alter stress responses and metabolism, causing misleading results on lifespan determination [54–56]. Here we assayed lifespan without using FUdR and found that wild-type glucose-fed worms showed a pronounced decrease in a dose-dependent manner. Maximal reduction was 52% at 100 mM glucose. A similar decrease in lifespan has been previously described [57].

Next, we aimed to document the participation of stress-responsive transcription factors such as SKN-1/NRF2, HIF-1/HIF1 α , SBP-1/SREBP, CRH-1/CREB, CEP-1/p53, and DAF-16/FOXO, in the decrease of lifespan induced by glucose 100 mM. To our knowledge, this is the first time that the effect of glucose on mutants or RNAi knock-downs of *hif-1*, *crh-1*, *cep-1* or *skn-1* genes is reported. It is interesting to note that, some mutants or RNAi strains when grown in glucose, have a longer (*hif-1*(RNAi) and *crh-1*(RNAi)) or similar lifespan (*cep-1* (*gk138*) and *skn-1*(*zu135*)) than the wild-type strain grown in the absence of glucose. We interpret these results as a sign that inactivation of *hif-1*, *crh-1*, *cep-1* and *skn-1* have a protective effect on the lifespan of glucose-fed worms. Our results suggest that the pharmacological inactivation of HIF-1 α , CREB, p53 or NRF2 could be beneficial for the treatment of obesity and type 2 diabetes in humans.

In the case of *sbp-1*(RNAi) and *daf-16*(*mgDf50*), their lifespan when grown in glucose was similar to the lifespan of the wild-type strain grown in glucose, so in this case, glucose did not further decrease the lifespan of *sbp-1*(RNAi) and *daf-16*(*mgDf50*) when grown in the absence of glucose. The lifespan of *sbp-1*(RNAi) grown in the presence of glucose was similar to that reported by Lee et al. [41]. For the *daf-16*(*mgDf50*) mutant, the observed result is similar to

what has been reported elsewhere [58, 59]. We also observed that when grown at glucose 100 mM, the *daf-16(mgDf50)* mutant showed a slight decrease in both the mean and maximum lifespan compared to the condition without added glucose. This is in contrast to what has been reported, as Lee et al. did not find a further shortening of the lifespan of a *daf-16* mutant by growing the worms in a HGD [11]. The difference observed could be related to the fact that Lee et al. used a different mutant strain, e.g. *daf-16(mu86)* [11]. In order to elucidate this matter, we also assessed the lifespan of the *daf-16(mu86)* mutant and observed that, in our hands, both mean and maximum lifespan were reduced when this mutant strain was grown in 100 mM glucose, in a similar percentage as the decrease that we found in the *daf-16(mgDf50)* mutant strain. Taken together, the above results suggest that several convergent pathways participate in the modulation of lifespan in worms fed a HGD.

mRNA accumulation of several stress-responsive transcription factors was modulated by a HGD

We then wanted to gain insight into the changes in the mRNA accumulation of the stress-responsive transcription factors analyzed in the lifespan studies. For most of them, this is the first time that the mRNA accumulation has been studied, as some of the previous expression studies have relied mainly on GFP-reporter gene expression assays. We observed no change in the case of *hif-1* mRNA. Maybe this result could be explained by the fact that the main way to regulate the activity of HIF-1 is through phosphorylation and ubiquitin-dependent degradation [60].

For the other transcription factors, we found that the mRNA abundance was increased for *crh-1* and *sbp-1*, while it was decreased for *skn-1*, *daf-16* and *cep-1* when worms were fed a HGD. The result that *daf-16* and *skn-1* mRNA levels are downregulated is interesting as a recent paper shows that DAF-16/FOXO can directly activate the expression of *skn-1* [61]. Furthermore, it has been reported that 10-day adult worms are unable to mount an adaptive response to oxidative stress, as old worms showed a reduced expression of DAF-16 and SKN-1 regulated genes [62]. This is also in line with the idea that worms fed a HGD show something reminiscent of an accelerated aging.

Additionally, we observed that *crh-1* expression augmented in a linear fashion with the concentration of glucose in the growth medium. It has been documented that CRH-1 autoregulates its own expression, with the help of the coactivator CRTC-1/CRTCs [63]. In our experiments, we also observed that the mRNA abundance of *cep-1* was downregulated in glucose-fed worms. Interestingly, this downregulation could be explained as it has been reported that CRTC-1/CRTCs acts also as a negative regulator of *cep-1* expression [64]. Also, we observed an increase in mRNA abundance of *sbp-1* in worms exposed to glucose. This finding is consistent with an observed increase in the abundance of an SBP-1::GFP fusion protein in glucose-fed worms [49]. Clearly, more profound studies are needed in order to link the changes in mRNA abundance of the stress-responsive transcription factors analyzed with some of the many effects that dietary glucose has on several processes, such as membrane fluidity [65], glycogen accumulation [66], accumulation of unsaturated fatty acids and dihydroxyacetone phosphate [49], and accumulation of advanced glycation end products (AGEs) [12].

Conclusions

We have shown that glucose-fed worms show altered growth, development, aging and reproduction, when grown in increasing concentrations of glucose from L1 to L4 stages. Additionally, we present evidence that glucose-fed worms show signs of accelerated aging, a rise in lipoperoxidation, an increase in the activity of some enzymes of the antioxidant system

(mtSOD and CAT), and an increase in the glutathione pool content, and an induced expression of *sod-3*, which suggests that glucose-fed worms are experiencing oxidative stress. Furthermore, we show evidence of the participation of several stress-responsive transcriptional regulators in lifespan reduction in glucose-fed worms. Our results suggest that the response to glucose is orchestrated by a regulatory network in which several signaling pathways participate, in addition to the well known IIS pathway. As the stress-responsive transcription factors analyzed are involved in pathways that are conserved from worms to humans, this knowledge could be used in the design of therapies for obesity and type 2 diabetes in humans.

Supporting information

S1 Fig. Effect of different doses of paraquat on lipid peroxidation levels. To induce oxidative stress, L4 worms grown in NGM were incubated for 1 hour at 20°C in PBS 1X containing 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, or 2.0 mM paraquat. After this treatment, worms were washed 3 times with PBS 1X to remove any traces of paraquat, and then MDA content was measured (see [Material and Methods](#)). We chose 0.2 mM paraquat to induce oxidative stress, as in this concentration we observed the maximum level of MDA. Experiments were performed six times. Values are expressed as mean \pm SEM. Significant differences with respect to control group are marked as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, or ns = non-significant, for the indicated comparison. Data was analyzed by one-way ANOVA test.

(TIF)

S1 Table. List of primers. Pairs of primers used in qRT-PCR analysis.

(DOCX)

S2 Table. Survival data and statistics for lifespan experiments. The effects of glucose-supplemented diets on the lifespan of wild-type, mutant or RNAi-treated animals. Lifespan was evaluated in triplicates for each condition and strain (see [Material and Methods](#)). For each analysis, 110 worms were used. Statistical evaluation of lifespan assays were made using the Log-rank (Mantel-Cox) test, differences between groups were evaluated with the Bonferroni *post hoc* test. $P < 0.05$ was regarded as statistically significant.

(PDF)

Acknowledgments

We are grateful to Antonio Velázquez for his generous support and helpful discussions. We thank Laura Silvia Salinas Velazquez for her technical assistance. We also thank the referees for their thorough review, comments and suggestions, which improved the quality of this manuscript. This paper presents part of the PhD thesis of J. A-F., who is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. In addition, Juan Miranda-Ríos wants to thank, in particular, the inspiration provided by Mónica and Mariana Miranda, and Angela Ríos.

Author Contributions

Conceptualization: Jonathan Alcántar-Fernández, Rosa E. Navarro, Ana María Salazar-Martínez, Juan Miranda-Ríos.

Formal analysis: Juan Miranda-Ríos.

Funding acquisition: Juan Miranda-Ríos.

Investigation: Jonathan Alcántar-Fernández, Ana María Salazar-Martínez, Martha Elva Pérez-Andrade, Juan Miranda-Ríos.

Methodology: Jonathan Alcántar-Fernández, Rosa E. Navarro, Ana María Salazar-Martínez, Martha Elva Pérez-Andrade, Juan Miranda-Ríos.

Project administration: Juan Miranda-Ríos.

Resources: Rosa E. Navarro, Juan Miranda-Ríos.

Writing – original draft: Jonathan Alcántar-Fernández, Juan Miranda-Ríos.

Writing – review & editing: Rosa E. Navarro, Ana María Salazar-Martínez, Juan Miranda-Ríos.

References

1. Lempradl A, Pospisilik JA, Penninger JM. Exploring the emerging complexity in transcriptional regulation of energy homeostasis. *Nat Rev Genet.* 2015; 16(11):665–681. Epub 2015/10/16. <https://doi.org/10.1038/nrg3941> PMID: 26460345
2. Mondoux MA, Love DC, Ghosh SK, Fukushige T, Bond M, Weerasinghe GR, et al. O-linked-N-acetylglucosamine cycling and insulin signaling are required for the glucose stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 2011; 188(2):369–382. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.126490> PMID: 21441213
3. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012; 24(5):981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008> PMID: 22286106
4. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis.* 2015; 6(2):109–120. Epub 2015/03/31. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0305> PMID: 25821639
5. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(8):2653–2658. Epub 2006/02/16. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511154103> PMID: 16477035
6. Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(5):387–398. <https://doi.org/10.1038/nrd2031> PMID: 16672925
7. Leung MCK, Williams PL, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M, et al. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol Sci.* 2008; 106(1):5–28. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn121> PMID: 18566021
8. Cox-Paulson EA, Grana TM, Harris MA, Batzli JM. Studying human disease genes in *Caenorhabditis elegans*: a molecular genetics laboratory project. *CBE Life Sci Educ.* 2012; 11(2):165–179. Epub 2012/06/06. <https://doi.org/10.1187/cbe-11-06-0045> PMID: 22665589
9. Markaki M, Tavernarakis N. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnol J.* 2010; 5(12):1261–1276. Epub 2010/12/15. <https://doi.org/10.1002/biot.201000183> PMID: 21154667
10. Choi SS. High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. *Nutr Res Pract.* 2011; 5(3):214–218. Epub 2011/07/23. <https://doi.org/10.4162/nrp.2011.5.3.214> PMID: 21779524
11. Lee SJ, Murphy CT, Kenyon C. Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metab.* 2009; 10(5):379–391. Epub 2009/11/04. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.003> PMID: 19883616
12. Schlotterer A, Kukudov G, Bozorgmehr F, Hutter H, Du X, Oikonomou D, et al. *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction. *Diabetes.* 2009; 58(11):2450–2456. Epub 2009/08/14. <https://doi.org/10.2337/db09-0567> PMID: 19675139
13. Altintas O, Park S, Lee S-J V. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Reports.* 2016; 49(2):81–92. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.2.261> PMID: 26698870
14. Inoue H, Hisamoto N, An JH, Oliveira RP, Nishida E, Blackwell TK, et al. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev.* 2005; 19(19):2278–2283. <https://doi.org/10.1101/gad.1324805> PMID: 16166371

15. Jiang H, Guo R, Powell-Coffman JA. The *Caenorhabditis elegans hif-1* gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(14):7916–7921. <https://doi.org/10.1073/pnas.141234698> PMID: 11427734
16. McKay RM, McKay JP, Avery L, Graff JM. *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Dev Cell*. 2003; 4(1):131–142. Epub 2003/01/18. PMID: 12530969
17. Kimura Y, Corcoran EE, Eto K, Gengyo-Ando K, Muramatsu MA, Kobayashi R, et al. A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Rep*. 2002; 3(10):962–966. Epub 2002/09/17. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf191> PMID: 12231504
18. Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*. 2001; 294(5542):591–595. <https://doi.org/10.1126/science.1065486> PMID: 11557844
19. Riddle DL, Swanson MM, Albert PS. Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature*. 1981; 290(5808):668–671. PMID: 7219552
20. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;71–94. PMID: 4366476
21. Wood W. The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1998; 17:667.
22. Saito K, Lee S, Shiuchi T, Toda C, Kamijo M, Inagaki-Ohara K, et al. An enzymatic photometric assay for 2-deoxyglucose uptake in insulin-responsive tissues and 3T3-L1 adipocytes. *Anal Biochem*. 2011; 412(1):9–17. Epub 2011/01/26. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.022> PMID: 21262191
23. Mandler M, Schlotterer A, Ibrahim Y, Kukudov G, Fleming T, Bierhaus A, et al. *daf-16/FOXO* and *glod-4/glyoxalase-1* are required for the life-prolonging effect of human insulin under high-glucose conditions in *Caenorhabditis elegans*. *Diabetologia*. 2015; 58(2):393–401. Epub 2014/10/18. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3415-5> PMID: 25322843
24. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9(7):671–675. PMID: 22930834
25. Chen J, Caswell-Chen EP. Facultative vivipary is a life-history trait in *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol*. 2004; 36(2):107–113. PMID: 19262794
26. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid-peroxidation. *Method Enzymol*. 1990; 186:421–431.
27. Li J, Cai T, Wu P, Cui Z, Chen X, Hou J, et al. Proteomic analysis of mitochondria from *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics*. 2009; 9(19):4539–4553. Epub 2009/08/12. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900101> PMID: 19670372
28. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991; 196(2–3):143–151. PMID: 2029780
29. Villanueva-Chimal E, Salinas LS, Fernández-Cardenas LP, Huelgas-Morales G, Cabrera-Wrooman A, Navarro RE. DPFF-1 transcription factor deficiency causes the aberrant activation of MPK-1 and meiotic defects in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Genesis*. 2017; 55:e23072.
30. Huelgas-Morales G, Silva-García CG, Salinas LS, Greenstein D, Navarro RE. The stress granule RNA-binding protein TIAR-1 protects female germ cells from heat shock in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)*. 2016; 6(4):1031–1047.
31. Petrascheck M, Miller DL. Computational analysis of lifespan experiment reproducibility. *Front Genet*. 2017; 8:92. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00092> PMID: 28713422
32. Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*. 2003; 421(6920):231–237. <https://doi.org/10.1038/nature01278> PMID: 12529635
33. Hoogewijs D, Houthoofd K, Matthijssens F, Vandesompele J, Vanfleteren JR. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative *sod* gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Mol Biol*. 2008; 9:9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-9> PMID: 18211699
34. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9):e45. PMID: 11328886
35. Tain LS, Lozano E, Saez AG, Leroi AM. Dietary regulation of hypodermal polyploidization in *C. elegans*. *BMC Dev Biol*. 2008; 8:28. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-28> PMID: 18366811
36. Garcia-Segura L, Abreu-Goodger C, Hernandez-Mendoza A, Dimitrova Dinkova TD, Padilla-Noriega L, Perez-Andrade ME, Miranda-Rios J. High-throughput profiling of *Caenorhabditis elegans* starvation-responsive microRNAs. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0142262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142262> PMID: 26554708
37. Depuydt G, Xie F, Petyuk VA, Smolders A, Brewer HM, Camp DG, Smith RD, Braeckman BP. LC-MS proteomics analysis of the Insulin/IGF-1-deficient *Caenorhabditis elegans daf-2(e1370)* mutant reveals extensive restructuring of intermediary metabolism. *J Proteome*. 2014; 13:1938–1956.

38. Vanfleteren JR, De Vreese A. The gerontogenes *age-1* and *daf-2* determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*. 1995; 9(13):1355–1361. PMID: [7557026](#)
39. Vanfleteren JR, Braeckman BP, Roelens I, De Vreese A. Age-specific modulation of light production potential, and alkaline phosphatase and protein tyrosine kinase activities in various *age* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1998; 53(5):B380–390. PMID: [9754136](#)
40. Hunter T, Banister WH, Hunter GH. Cloning, expression, and characterization of two manganese superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2003; 272:28652–28659.
41. Libina N, Berman JR, Kenyon C. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell*. 2003; 115:489–502. PMID: [14622602](#)
42. Kitaoka S, Morielli AD, Zhao FQ. FGT-1-mediated glucose uptake is defective in insulin/IGF-like signaling mutants in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Open Bio*. 2016; 6(6):576–585. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12068> PMID: [27419060](#)
43. Truswell AS. Food carbohydrates and plasma lipids—an update. *Am J Clin Nutr*. 1994; 59(3 Suppl):710S–718S.
44. So S, Garan Y, Miyahara K, Ohshima Y. Body size change in various nematodes depending on bacterial food, sex and growth temperature. *Worm*. 2012; 1(2):93–97. <https://doi.org/10.4161/worm.20175> PMID: [24058830](#)
45. Tauffenberger A, Parker JA. Heritable transmission of stress resistance by high dietary glucose in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*. 2014; 10(5):e1004346. Epub 2014/05/03. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004346> PMID: [24785260](#)
46. Reisner K, Lehtonen M, Storvik M, Jantson T, Lakso M, Callaway JC, et al. Trans fat diet causes decreased brood size and shortened lifespan in *Caenorhabditis elegans* delta-6-desaturase mutant *fat-3*. *J Biochem Mol Toxic*. 2011; 25(5):269–279.
47. Kubagawa HM, Watts JL, Corrigan C, Edmonds JW, Sztul E, Browse J, et al. Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo. *Nat Cell Biol*. 2006; 8(10):1143–1148. <https://doi.org/10.1038/ncb1476> PMID: [16998478](#)
48. Teshiba E, Miyahara K, Takeya H. Glucose-induced abnormal egg-laying rate in *Caenorhabditis elegans*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016:1–4. Epub 2016/03/12.
49. Lee D, Jeong DE, Son HG, Yamaoka Y, Kim H, Seo K, et al. SREBP and MDT-15 protect *C. elegans* from glucose-induced accelerated aging by preventing accumulation of saturated fat. *Genes Dev*. 2015; 29(23):2490–2503. <https://doi.org/10.1101/gad.266304.115> PMID: [26637528](#)
50. Mandler M, Schlotterer A, Morcos M, Nawroth PP. Understanding diabetic polyneuropathy and longevity: what can we learn from the nematode *Caenorhabditis elegans*? *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012; 120(4):182–183. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1304570> PMID: [22402951](#)
51. Labuschagne CF, Stigter EC, Hendriks MM, Berger R, Rokach J, Korswagen HC, et al. Quantification of in vivo oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* during aging by endogenous F3-isoprostane measurement. *Aging Cell*. 2013; 12(2):214–223. <https://doi.org/10.1111/accel.12043> PMID: [23279719](#)
52. Burmeister C, Luersen K, Heinick A, Hussein A, Domagalski M, Walter RD, et al. Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of the omega class glutathione transferase (GSTO-1). *FASEB J*. 2008; 22(2):343–354. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7426com> PMID: [17901115](#)
53. Luersen K, Stegehake D, Daniel J, Drescher M, Ajonina I, Ajonina C, et al. The glutathione reductase GSR-1 determines stress tolerance and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2013; 8(4):e60731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060731> PMID: [23593298](#)
54. Van Raamsdonk JM, Hekimi S. FUDR causes a twofold increase in the lifespan of the mitochondrial mutant *gas-1*. *Mech Ageing Dev*. 2011; 132(10):519–521. Epub 2011/09/07. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.08.006> PMID: [21893079](#)
55. Davies SK, Leroi AM, Bundy JG. Fluorodeoxyuridine affects the identification of metabolic responses to *daf-2* status in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*. 2012; 133(1):46–49. Epub 2011/11/26. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.11.002> PMID: [22116032](#)
56. Feldman N, Kosolapov L, Ben-Zvi A. Fluorodeoxyuridine improves *Caenorhabditis elegans* proteostasis independent of reproduction onset. *PLoS One*. 2014; 9(1):e85964. Epub 2014/01/28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085964> PMID: [24465816](#)
57. Tauffenberger A, Vaccaro A, Aulas A, Vande Velde C, Parker JA. Glucose delays age-dependent proteotoxicity. *Aging Cell*. 2012; 11(5):856–866. Epub 2012/06/28. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00855.x> PMID: [22734670](#)
58. Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet*. 2001; 28(2):139–145. <https://doi.org/10.1038/88850> PMID: [11381260](#)

59. Garigan D, Hsu A-L, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics*. 2002; 161(3):1101–1112. PMID: [12136014](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12136014/)
60. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 1999; 274(10):6519–6525. PMID: [10037745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10037745/)
61. Tullet JMA, Green JW, Au C, Benedetto A, Thompson MA, Clark E, et al. The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. *Aging Cell*. 2017; <https://doi.org/10.1111/accel.12627> PMID: [28612944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28612944/)
62. Przybysz AJ, Choe KP, Jackson Roberts L, Strange K. Increased age reduces DAF-16 and SKN-1 signaling and the hormetic response of *Caenorhabditis elegans* to the xenobiotic juglone. *Mech Ageing Dev*. 2009; 130:357–369. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.02.004> PMID: [19428455](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19428455/)
63. Mair W, Morantte I, Rodrigues AP, Manning G, Montminy M, Shaw RJ, et al. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRT-1 and CREB. *Nature*. 2011; 470(7334):404–408. Epub 2011/02/19. <https://doi.org/10.1038/nature09706> PMID: [21331044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21331044/)
64. Chang HW, Pisano S, Chaturbedi A, Chen J, Gordon S, Baruah A, et al. Transcription factors CEP-1/p53 and CEH-23 collaborate with AAK-2/AMPK to modulate longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2017; 16(4):814–824. <https://doi.org/10.1111/accel.12619> PMID: [28560849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28560849/)
65. Svensk E, Devkota R, Ståhlman M, Ranji P, Rauthan M, Magnusson, et al. *Caenorhabditis elegans* PAQR-2 and IGLR-2 protect against glucose toxicity by modulating membrane lipid composition. *PLoS Genet*. 2016; 12(4):e1005982. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005982> PMID: [27082444](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27082444/)
66. Gusarov I, Pani B, Gautier L, Smolentseva O, Eremina S, Shamovsky I, et al. Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress. *Nat Commun*. 2017; 8:15868. <https://doi.org/10.1038/ncomms15868> PMID: [28627510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28627510/)

RESEARCH ARTICLE

High-glucose diets induce mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*Jonathan Alcántar-Fernández^{1,2}, Angélica González-Maciel³, Rafael Reynoso-Robles³, Martha Elva Pérez Andrade², Alain de J. Hernández-Vázquez², Antonio Velázquez-Arellano², Juan Miranda-Ríos^{2*}

1 Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México, **2** Unidad de Genética de la Nutrición, Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México, **3** Laboratorio de Morfología Celular y Tisular, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México

* riosjuanm@biomedicas.unam.mx

OPEN ACCESS

Citation: Alcántar-Fernández J, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Pérez Andrade ME, Hernández-Vázquez AdJ, Velázquez-Arellano A, et al. (2019) High-glucose diets induce mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. PLoS ONE 14(12): e0226652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652>

Editor: Nobuyuki Takahashi, Tokyo University of Agriculture, JAPAN

Received: August 23, 2019

Accepted: November 29, 2019

Published: December 17, 2019

Copyright: © 2019 Alcántar-Fernández et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (IN205818) and Fondos Federales Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Pediatría (036/2015) to JM-R. This work was also partially supported by Program 22, Instituto Nacional de Pediatría to

Abstract

Glucose is an important nutrient that dictates the development, fertility and lifespan of all organisms. In humans, a deficit in its homeostatic control might lead to hyperglucemia and the development of obesity and type 2 diabetes, which show a decreased ability to respond to and metabolize glucose. Previously, we have reported that high-glucose diets (HGD) induce alterations in triglyceride content, body size, progeny, and the mRNA accumulation of key regulators of carbohydrate and lipid metabolism, and longevity in *Caenorhabditis elegans* (PLOS ONE 13(7): e0199888). Herein, we show that increasing amounts of glucose in the diet induce the swelling of both mitochondria in germ and muscle cells. Additionally, HGD alter the enzymatic activities of the different respiratory complexes in an intricate pattern. Finally, we observed a downregulation of ceramide synthases (*hyl-1* and *hyl-2*) and antioxidant genes (*gcs-1* and *gst-4*), while mitophagy genes (*pink-1* and *dct-1*) were upregulated, probably as part of a mitohormetic mechanism in response to glucose toxicity.

Introduction

Mitochondria are essential eukaryotic organelles that participate not only in the production of energy (by means of the tricarboxylic acid cycle, beta-oxidation, the electron transport chain (ETC)), but also in diverse cellular events such as Ca^{2+} and redox homeostasis, apoptosis, the biosynthesis of heme, amino acids, and phospholipids [1,2]. Mitochondria are composed of a double membrane structure, consisting of the inner and outer mitochondrial membranes (IM and OM, respectively), which differ in function and shape. While the OM is relatively smooth, the IM is highly folded on the inside to form the crista structures that maximize the surface area, which contributes to an efficient oxidative phosphorylation [1].

It is not surprising then that mitochondrial defects or dysregulation have emerged as having key roles in aging and in the cytopathological mechanisms underlying cancer, neurodegenerative, metabolic and other diseases. Deterioration of mitochondrial function and dynamics is a

AGM. JA-F is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowships from CONACyT and PAPIIT-UNAM. Some strains were provided by GGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

hallmark of obesity and all of the illnesses associated to it [3,4]. The cellular mitochondrial network is highly dynamic and subjected to a continuous reorganization [5,6]. Mitochondrial dysfunction gives rise to changes in cristae morphology [7]. For example, nutrient deprivation induces an increase in mitochondrial elongation showing an increased number of cristae, which might increase the efficiency of adenosine-5'-triphosphate (ATP) synthesis and in this way protect mitochondria from autophagosomal degradation, augmenting cellular survival during starvation [8,9].

Dietary glucose impacts physiological and molecular processes in *C. elegans*, which makes it a good model for understanding hyperglycemia and obesity. It has been reported that high-glucose diets (HGD) lead to lipid accumulation, alters membrane fluidity, impacts lifespan, progeny, and increases cellular ROS levels and protein glycosylation [10,11,12,13,14,15,16]. Furthermore, the participation of diverse key transcriptional regulators of carbohydrate and lipid metabolism such as SKN-1/NRF2, HIF-1/HIF1 α , SBP-1/SREBP, CRH-1/CREB, CEP-1/p53, and DAF-16/FOXO, has been previously described [17].

In the current study, we aimed to determine the effects that HGD have on mitochondrial morphology and function. Herein, we provide direct evidence that HGD leads to swelling of mitochondria and endoplasmic reticulum in germ and muscle cells, and an increase in mitochondrial mass. Furthermore, HGD affects mitochondrial respiration without altering adenine nucleotide levels. Additionally, HGD decreases ceramide synthases and antioxidant genes mRNA accumulation, while upregulating mitophagy genes.

Materials and methods

Strains and culture conditions

The wild-type Bristol (N2) strain was cultured using NGM plates seeded with *E. coli* OP50 and raised at 18 °C, as previously described [18]. The worms were synchronized with alkaline hypochlorite solution [19], a condition in which only eggs can survive, and eggs were washed with M9 buffer solution. After synchronization, worms were seeded on a NGM plate (control condition) or in glucose-supplemented plates, and fed with *E. coli* OP50 until they reached L4 larval stage. Glucose (Sigma) was added to the mix of agar and salts of the NGM medium in order to obtain 20, 40, 80, or 100 mM glucose concentration, as previously reported [17].

Observation of mitochondrial and endoplasmic reticulum ultrastructure by transmission electron microscopy

Synchronized L4 stage worms from two independent experiments were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in sodium phosphate buffer (0.1M, pH 7.4), post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in EPON (epoxy resin). Semithin sections (1 μ m) were cut using an ultramicrotome (Leica EM UC6), stained with toluidine blue to select areas in light microscopy examination. Ultrathin sections of 60–90 nm were cut and collected on slot grids previously covered with formvar membrane. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. The structural changes from 50 fields for each sample were recorded using a JEM-1011 transmission electron microscope (Japan). Images were taken with PhotoImpact 10 and mitochondrial diameter measurements were made with Zen 2.3 (Carl Zeiss).

Total DNA extraction

Total DNA was purified from synchronized L4 stage worms grown at the different concentrations of glucose using Trizol (Invitrogen). DNA was further cleaned using the QIAamp DNA

mini kit (Qiagen) and dissolved in nuclease-free water. DNA integrity was verified by means of agarose gel electrophoresis and was quantified by spectroscopy in a Nanodrop ND1000 equipment. All of the DNA samples were stored at -70°C .

Mitochondrial copy number assay

Worms were synchronized as in [19] and exposed from L1 to L4 larval stage to 20, 40, 80, or 100 mM glucose, then total DNA was extracted as mentioned before. DNA integrity was assessed by gel electrophoresis. The mitochondrial DNA (mtDNA) copy number was determined by use of a quantitative PCR assay as reported [20], in which total DNA was used as a template for two qPCR reactions. One produces an amplicon of 195 bp, part of the *nduo-5* gene that codes for the mitochondrial gene NADH dehydrogenase subunit 5. The other amplifies part of the nuclear gene *flr-1* that codes for a sodium channel and leads to a fragment of 225 bp that serves as an internal concentration control. Comparison of the mitochondrial fragment amplicon (sample) to the nuclear fragment amplicon (internal concentration control) allows accurate mtDNA quantification. AccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich D8045) was used for PCR reactions. The primers and conditions for the PCR reactions used are listed in Table 1. Total DNA and PCR products were quantitated by fluorescence using Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen). The fluorescence values of the PCR products obtained were adjusted by subtracting the fluorescence of a sample containing just buffer. mtDNA copy number was calculated as the ratio of fluorescence values of PCR products for mitochondrial fragment/nuclear fragment.

Citrate synthase activity assay

Citrate synthase activity was determined on proteins extracted from mitochondrial fractions, using the Citrate synthase Assay Kit (CS0720-1KT, Sigma-Aldrich).

Enzymatic activity determination of the mitochondrial respiratory chain complexes

Mitochondrial fractions from L4 larvae grown in the different concentrations of glucose were obtained as reported [21]. Mitochondrial protein content was determined using the Bradford method [22]. Mitochondrial respiratory chain complexes enzymatic activities were determined by spectrophotometric methods [23]. For the reactions, samples of 5 μg of protein were added to a quartz cell of 1 cm length and absorbances were recorded in a Spectronic Genesys 5 spectrophotometer. Absorbance was measured every 10 s for a total of 3 min.

Adenine nucleotide pools (ATP, ADP y AMP) determination by HPLC

ATP, ADP y AMP levels were determined by HPLC. In short, approximately 100 mg of L4 worms were collected in M9 buffer and were left at room temperature to sediment. Then, 800 μl of perchloric acid 8% were added and sonicated in ice to minimize nucleotide degradation. The mix was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 4°C . The supernatant was neutralized with potassium hydroxide 3 M (6% final volume), vortexed and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4°C to sediment salts and worm's cuticle. Approximately 720 μl of the supernatant was transferred to a new tube and pH was adjusted to 4.2 by adding 80 μl of acetate buffer (5.3 ml of sodium acetate 1 M + 14.7 ml of acetic acid 1M). Nucleotide concentration was determined using an HPLC system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) serie 200 UV/VIS equipped with a fluorescence detector (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA). Fluorescence detection was performed using the following wavelengths: $\lambda_{\text{ex}} = 340\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} =$

Table 1. Primers used for mtDNA copy number determination.

Gene	Sequence	Tm (°C)	Cycles	Product length
<i>flr-1</i> (nuclear)	Fw TCCCGTCTATTGCAGGTCTTTCCA Rev GACGCGCACGATATCTCGATTTTC	63	20	225 bp
<i>nduo-5</i> (mitochondrial)	Fw CACACCGGTGAGGTCTTTGGTTC Rev TGTCCCTCAAGGCTACCACCTTCTTCA	63	20	195 bp

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.t001>

420nm. Samples were injected in an ACE 5- μ m C18 column(150 Å ~ 4.6 mm) (ACE HPLC Columns; Advanced Chromatography Technologies, Ltd., Aberdeen, UK). Mobile phase consisted of a solution of 1M KH₂PO₄, methanol 20% and Ion Pair cocktail Q6 4M (Hexyltrimethylammonium phosphate) with a flux of 1ml/min. Nucleotide concentrations was determined by the area under the curve of the peaks corresponding to each nucleotide, compared to the area obtained using a standard of the same nucleotide in a solution of known concentration.

Malate synthase activity assay

Malate synthase activity was determined on proteins extracted from mitochondrial fractions, by reacting Acetyl CoA with the Ellman's reagent (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid; DTNB) following the procedure described in the technical note of Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich). Enzymatic assay of Malate synthase; https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/malatesynthase.pdf.

Quantitative RT-PCR determination of *hyl-1*, *hyl-2*, *gcs-1*, *gst-4*, *pink-1*, and *dct-1* mRNA accumulation

Total RNA was purified from synchronized L4 stage worms grown at the different concentrations of glucose by using Trizol (Invitrogen) according to manufacturer recommendations and further purified using RNeasy mini kit (Qiagen). cDNA was generate with 1 μ g of total RNA in a 10 μ l reaction using Revert Aid enzyme (Fermentas). 10ng of cDNA was used as a template. qRT-PCR was performed on a Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Each qPCR reaction was performed using six biological replicates in triplicate each. PCR program was: 10 min at 95°C, 40 cycles of 95°C, 15 sec, Tm (Table 2) for 30 sec. and 70°C for 30 sec. Primer's specificity was confirmed by electrophoresis in polyacrylamide gels and by melting point analysis. Y45F10D.4 gene was used as an reference gene [24]. The relative expression ratio of the mRNA relative to Y45F10D.4 gene mRNA expression was calculated as previously described [25].

Statistical analysis

Each data ensemble was first analyzed using descriptive statistics to determine its distribution. To determine if the distribution of each data ensemble was a normal distribution, the Shapiro-Wilk test was used for small datasets (n<50) and Kolmogorov-Smirnov-Liliefors test for medium to large datasets (n<50). The number of replicas for each experiment is shown in the respective figure legend. To evaluate the differences between the analyzed groups, the ANOVA test was used if the data showed a normal distribution and comply with the homoscedasticity principle, which was evaluated with the Bartlett test. If neither of this conditions was met, the Kruskal-Wallis non-parametric test was used. To evaluate if there were statistically significant differences between the experimental treatments and the control condition, the Bonferroni

Table 2. Primers used for determination of mRNA accumulation by qRT-PCR assays.

Gene	Sequence	Concentration (nM)	Tm (°C)
<i>Y45F10D.4</i>	Fw GCGAAAACACTCCTGCAC Rev TTTCGCGGGTTCTCGTAGTG	66	60
<i>hyl-1</i>	Fw CAT TCC ATC CTG TTC CAG AC Rev GCC GAT AAG AAG TGA ATA GTA G	66	60
<i>hyl-2</i>	Fw TGG GCT TAC ATT CTG TTC Rev TGC TTG GCT TTT TCA CG	66	60
<i>gst-4</i>	Fw CTC TTG CTG AGC CAA TCC GT Rev CTG GCC AAA TGG AGT CGT TG	66	60
<i>gcs-1</i>	Fw GGA ATG CCT TAC GGA GGT C Rev CGA TAG ACA TGT TTC ATC CTT C	66	60
<i>pink-1</i>	Fw GCATATCGAATCGCAAATGAG Rev CCTAAATTATAAGTGGCGGG	66	60
<i>dct-1</i>	Fw ACGGATGAGTCTGTGCAACC Rev TTCCACCCACGATTTCAGGTG	66	60

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.t002>

test was used with a *post-hoc* ANOVA analysis. For the Kruskal-Wallis analysis, the Dunn test was used. Statistical analysis was performed with Prism GraphPad v.6 (GraphPad Software Inc., California, USA).

Results

Glucose affects the morphology of mitochondrial and endoplasmic reticulum in germ and muscle cells

To determine if glucose affects the morphology of mitochondria, worms were grown in media supplemented with glucose 20, 40, 80 or 100 mM, and the morphology of germ cells and muscle cells was observed through a transmission electron microscope. Both germ and muscle cells showed a typical morphology in control worms. Germ cells have a nucleus centrally located, an electro-dense cytoplasm due to the abundance of ribosomes and glycogen, big vacuoles and mitochondria, while the external membrane and fine cristae of mitochondria are not so evident (Fig 1A). On the contrary, germ cells of glucose-treated worms showed a decrease in the electron-density of the cytoplasm and a widening of the endoplasmic reticulum cisternae (Fig 1C, 1D and 1E). Additionally, subtle changes in mitochondrial morphology were observed at glucose 40 mM, which became more prominent at 80 mM (Fig 1C and 1D). Swelling of mitochondria and its cristae, ruptures in the external membrane and enlargement of the endoplasmic reticulum were noticed at glucose 100 mM (Fig 1E).

In the case of muscle cells from control worms, mitochondria showed fine cristae and their myofibrils had a well organized and compact aspect (Fig 2A). In opposition, damaged mitochondria is observed in the muscle cells of glucose-exposed worms (Fig 2B, 2C, 2D and 2E). Additionally, a disorganization of the myofilaments and a decrease in electrodense material at the Z-line was observed in muscle cells from glucose-treated worms (Fig 2B, 2C, 2D and 2E). Together these data show that glucose produces a swelling of mitochondria, as well as an enlargement of the endoplasmic reticulum in both germ cells and muscle cells, and disorganization of myofilaments, myofibrils and the Z-line in muscle cells.

In order to uncover the molecular causes of mitochondrial impairment and the accumulation of damaged mitochondria in worms exposed to glucose, we examined the mitochondrial diameter and determined the number of damaged mitochondria in electron microscopy images. We observed that mitochondria from glucose-treated worms displayed a slight reduction in mitochondrial diameter at glucose 80 mM ($p < 0.0001$), and a marginal enlargement at

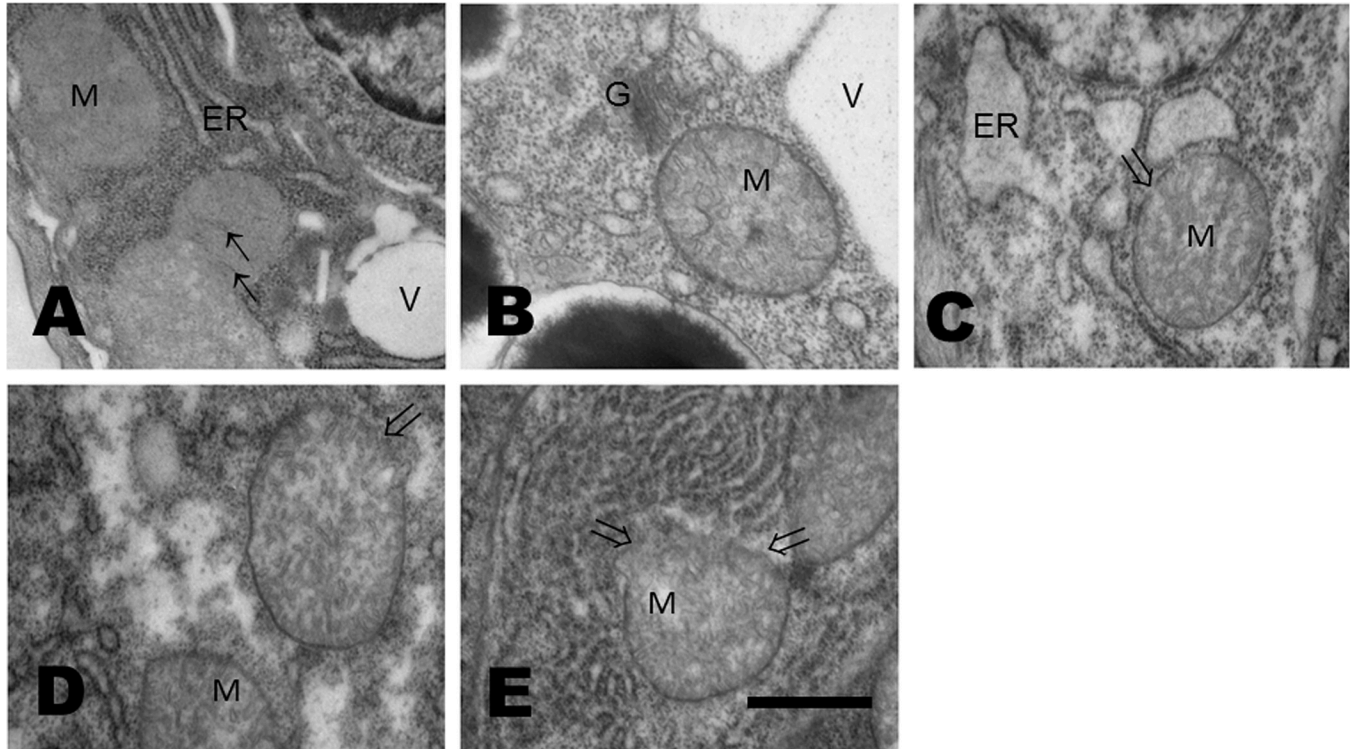


Fig 1. Glucose affects the morphology of mitochondria and endoplasmic reticulum of germ cells. (A-E). Electron micrographs of germ cells of worms that were exposed from L1 to L4 larval stages to glucose 20, 40, 80 or 100 mM that show damaged mitochondria. (A) In control worms, mitochondrial cristae membranes are fine and dim (faint) (small arrows). (B) A widening of the endoplasmic reticulum cisternae was observed at glucose 20 mM, (C) larger at 40 mM and then (D) diminished at 80 mM. Mitochondrial external membrane showed extensive rupture, and a higher amount of endoplasmic reticulum was observed in worms grown at glucose 100 mM (E). G, Golgi cisternae; V: vacuoles. 50000X magnification; scale bar represents 500 nm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.g001>

glucose 100 mM ($P < 0.01$) (Fig 3A). We also observed that the percentage of damaged mitochondria was 48, 82, 87, or 100% for worms grown at glucose 20, 40, 80, or 100 mM, respectively, while we did not find any damaged mitochondria in worms grown in the control condition (glucose 0 mM) (Fig 3B). These findings show that exposure to glucose leads to changes in the diameter of mitochondria and accumulation of damaged mitochondria.

Glucose affects mitochondrial mass

As it is well established that the number of mitochondria is regulated during differentiation and in response to environmental conditions in *C. elegans* [26], we aimed to determine if glucose was able to alter the mtDNA copy number. For this, the mtDNA and nDNA contents of worms grown in the absence (control) or presence of glucose were determined by qPCR [20]. The ratio of mtDNA to nDNA was computed; the ratio in control worms was 0.9. Worms grown in media supplemented with glucose 20, 40, or 80 mM showed a ratio between 0.9 and 1.0, but worms grown in glucose 100 mM presented a ratio of 1.15, indicating a mild increase in mitochondrial mass at this glucose concentration ($P < 0.05$, Fig 4A). To further investigate if glucose affects mitochondrial content, we performed enzymatic measurements of citrate synthase (CS). CS is a key enzyme of the Krebs cycle and has been used as an accurate marker of mitochondrial mass in tissue [27]. Experiments revealed that CS enzymatic activity was increased at glucose 20, 40 or 80 mM ($P < 0.01$; Fig 4B), showing a further increase at glucose

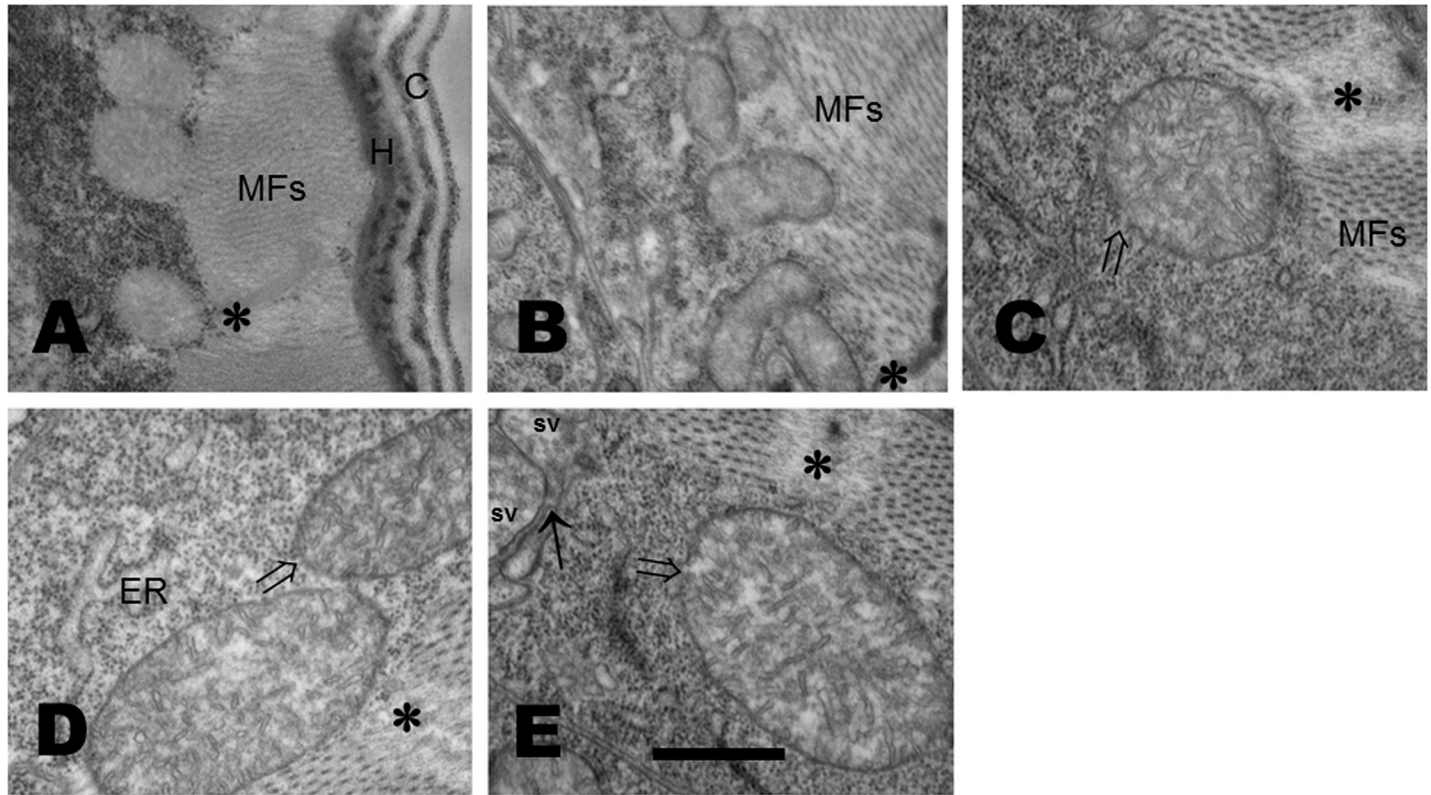


Fig 2. Glucose affects the morphology of mitochondria and myofibrils of muscular cells. (A-E). Electron micrographs of muscular cells of worms that were exposed from L1 to L4 larval stages to glucose 20, 40, 80 or 100 mM that show damaged mitochondria. (A) Mitochondria and myofibrils show a compact structure in control worms. (B) Worms treated with glucose 20 mM showed a swelling of the mitochondria, such swelling was bigger in worms exposed to 40, 80, or 100 mM; (B, C, D, and E, respectively). Mitochondrial external membrane showed zones of rupture (\Rightarrow), myofibrils are disorganized and the electron density of the Z-line (**) is highly diminished. C, cuticle; H, hypoderm; MFs, myofibrils; Z-line (**); sv, small vesicle; synapse (arrow). 50000X magnification; scale bar represents 500 nm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.g002>

100 mM ($P < 0.001$, Fig 4B). These results indicate that glucose-fed worms show an increase in mitochondrial content to respond to the high-glucose conditions.

Glucose affects mitochondrial respiration without altering adenine nucleotide levels

It has been reported that mutants in mitochondrial enzymes, known as Mit mutants, show an increase in the synthesis of mtDNA as a compensatory mechanisms to the defects in the ETC [28]. A similar observation has been found in knock-down worms of ATP synthase subunit c [29]. In order to ascertain if HGDs affect mitochondrial function, the activities of the individual complexes of the mitochondrial respiratory chain (MRC) were determined in worms exposed to glucose. We showed that 80 and 100 mM glucose reduced by 50% complex I (rotenone-sensitive NADH ubiquinone oxidoreductase) activity, while no significant changes were observed at glucose 20 or 40 mM ($P < 0.05$, Fig 5A). We found that complex II (succinate dehydrogenase) activity of glucose-treated worms was augmented 3x or 5x in worms grown in 20 or 40 mM glucose, respectively ($P < 0.05$, Fig 5B), while no changes were observed at glucose 80 or 100 mM (Fig 5B). We showed that activity of complex III (antimycin A-sensitive decylubiquinol cytochrome c oxidoreductase) was no changed at glucose 20 mM, but was significantly increased at glucose 40 and 80 mM, and reduced at glucose 100 mM ($P < 0.05$, Fig 5C). We determined that complex IV (cytochrome c oxidase) activity was decreased 3x in

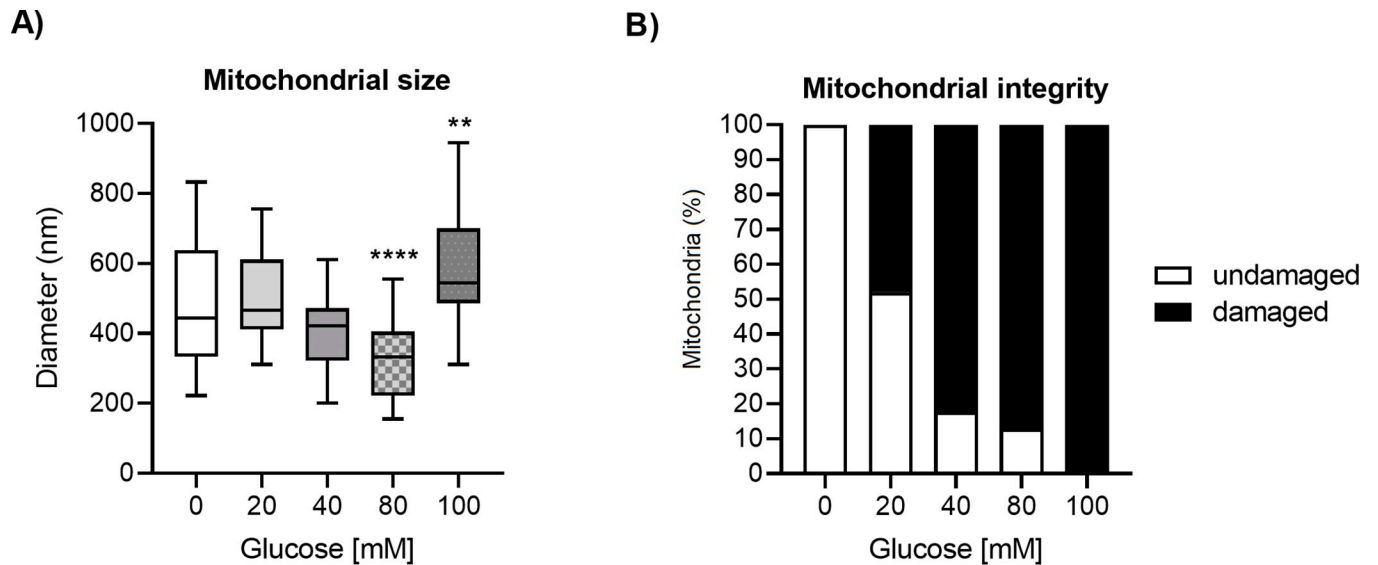


Fig 3. Glucose affects mitochondrial diameter and integrity. Worms were exposed from L1 to L4 larval stage to 20, 40, 80, or 100 mM glucose. (A) Boxplot illustrating mitochondrial diameter from glucose-treated worms. Measurements were made from electron microscopy images; n = 30–50 mitochondria from two biological replicates. Differences between groups were analyzed with a one-way ANOVA test. Significant differences to the control group are marked as follows: ns = not significant, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. (B) Mitochondrial integrity in worms exposed to glucose. Measurements were done by visually inspecting mitochondria in electron microscopy images. Each mitochondria was examined and marked as damaged if swelling, cristae modification, or rupture of mitochondrial membranes was observed; n = 90–95 mitochondria from each treatment from two biological replicates.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.g003>

worms exposed to glucose 40, 80 and 100 mM, while no change was observed at glucose 20 mM ($P < 0.01$, Fig 5D). Finally, complex V (ATP synthase) activity showed a mixed behavior as it was increased at glucose 20 and 40 mM ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively), while it was decreased at glucose 80 and 100 mM ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively)(Fig 5E).

To determine the effects of glucose in animal physiology, we quantified AMP, ADP and ATP levels. Notably, we did not find any changes in AMP, ADP or ATP levels or the AMP/

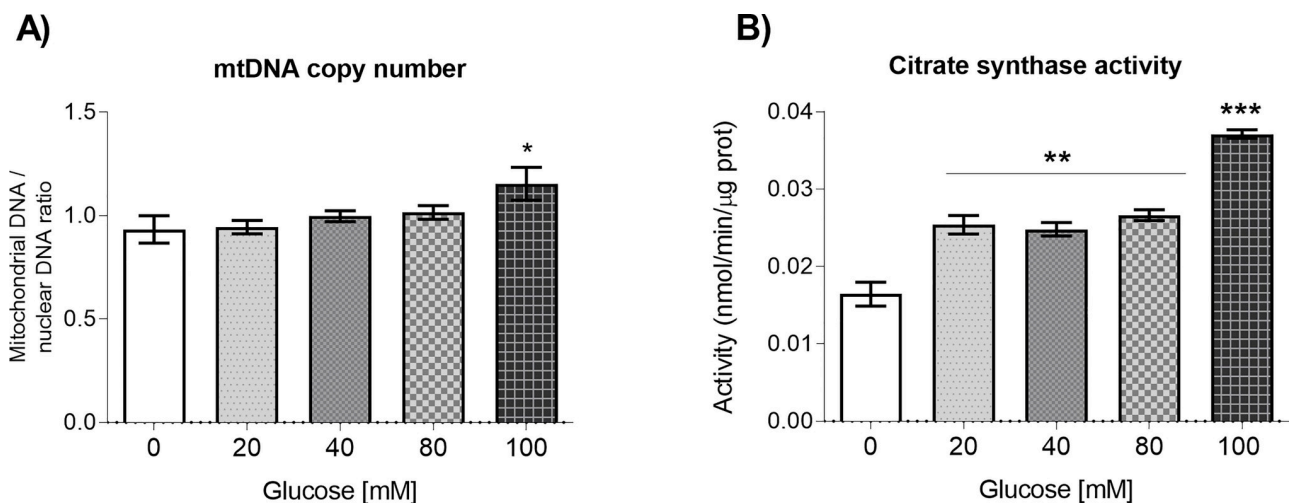


Fig 4. Mitochondrial DNA copy number and Citrate Synthase enzymatic activity. Synchronized worms were exposed to glucose 20, 40, 80, or 100 mM from L1 to L4 larval stage. Panels show (A) quantitative PCR analysis of mtDNA copy number (n = 6), or (B) Citrate Synthase (CS) enzymatic activity (n = 12). Values are expressed as mean ± SEM. Data was analyzed with the one-way ANOVA test. Significant differences with respect to the control group are marked as follows: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.g004>

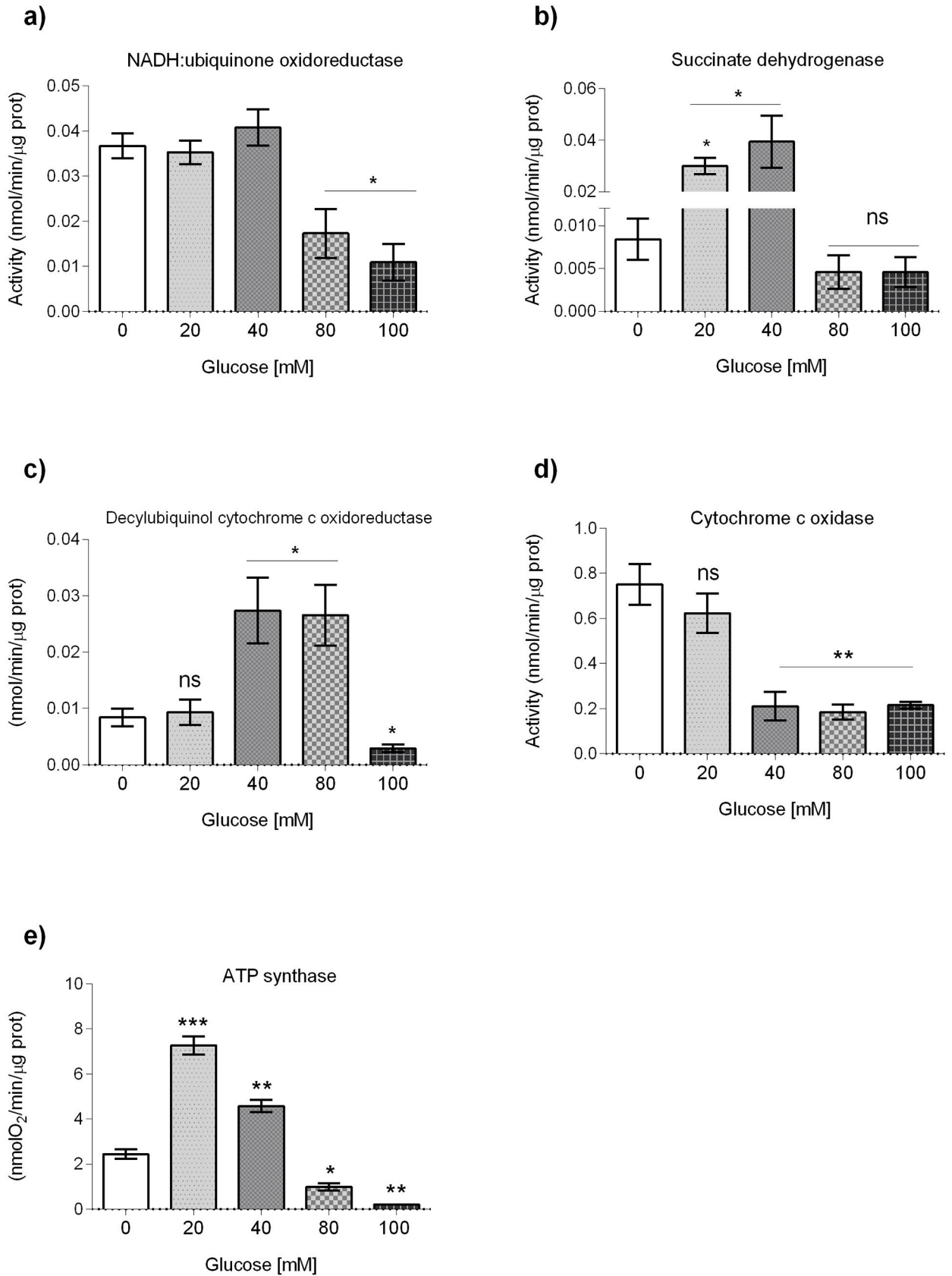


Fig 5. Effects of glucose on mitochondrial function. Effects of glucose on mitochondrial respiratory chain (MRC) enzymatic activities: (A) rotenone-sensitive NADH-decylubiquinol oxidoreductase (CI); (B) succinate dehydrogenase (CII); (C) antimycin A-sensitive decylubiquinol cytochrome c oxidoreductase (CIII); (D) cytochrome c oxidase (CIV), and (E) ATP synthase (CV). MRC enzymatic activities were determined spectrophotometrically with isolated mitochondria of worms that were exposed from L1 to L4 larval stages to glucose 20, 40, 80 or 100 mM. Data are presented from seven independent biological replicates and shown as median \pm interquartile range (IQR) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Kruskal-Wallis and Dunn tests for multiple comparisons).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.g005>

ATP, ADP/ATP quotients, nor in the energetic charge of the cells (Fig 6A–6F). These data suggest that although glucose affects mitochondrial respiration activities, a response mechanism compensates for the changing levels of ATP production caused by exposing worms to different glucose concentrations. Together, these data suggest that glucose affects the activities of the individual components of the MRC in an intricate manner. Although glucose affects mitochondrial respiration activities, a response mechanism probably compensates for the changing levels of ATP production caused by exposing worms to different glucose concentrations.

Glucose decreases malate synthase enzymatic activity

As we did not find dramatic changes in adenine nucleotide levels in glucose-treated animals, we aimed to determine the enzymatic activity of malate synthase, involved in an alternative energy producing pathway. One single protein contains the isocitrate lyase and malate synthase enzymatic activities that are part of the glyoxylate shunt, that converts isocitrate and

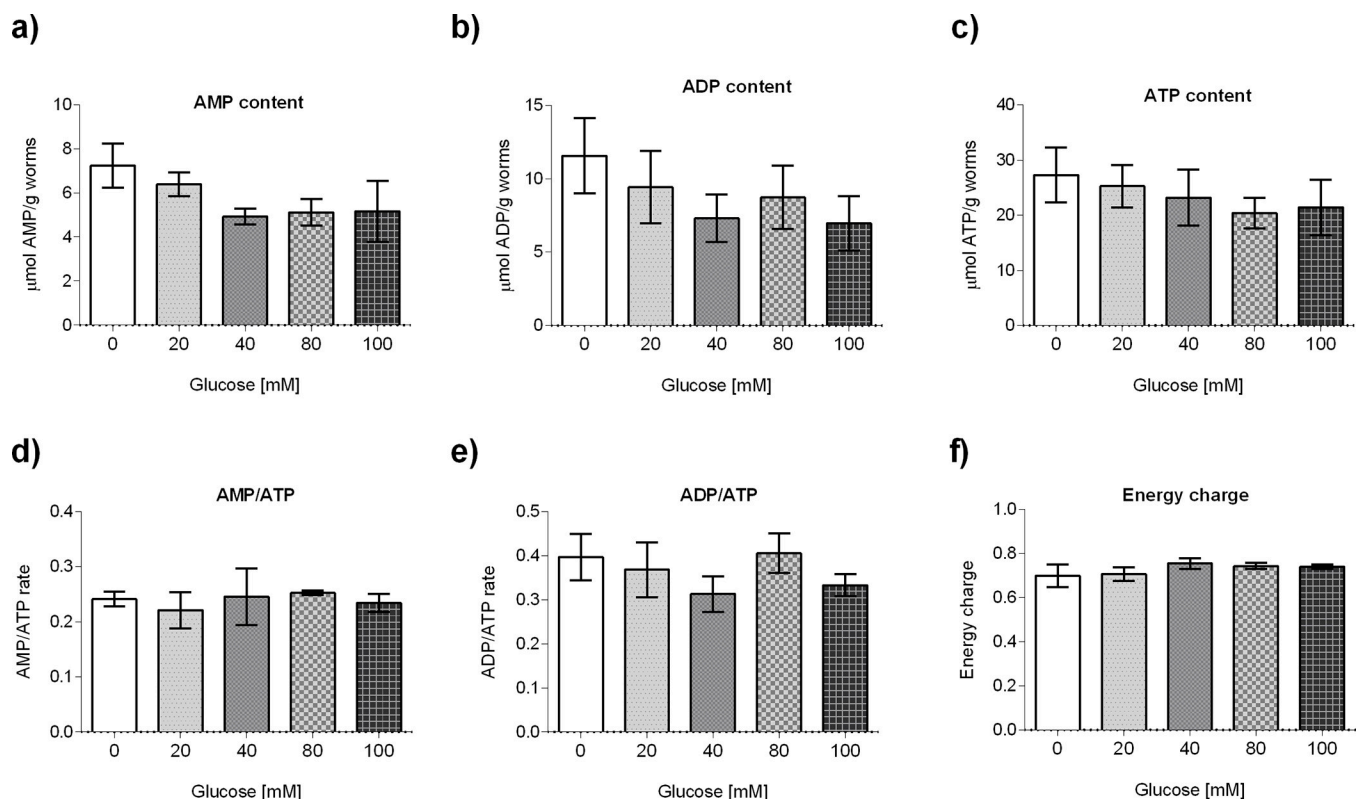


Fig 6. Glucose did not affect adenine nucleotide pools. Adenine nucleotide level quantification in glucose-treated worms (20, 40, 80 or 100 mM) or control using an HPLC-based assay: (A) AMP, (B) ADP, (C) ATP, used to calculate the (D) AMP/ATP quotient, (E) ADP/ATP quotient, and (F) energetic charge. Values were normalized to total weight of worms used. Data are presented from six independent biological replicates and shown as median \pm interquartile range (IQR). No statistically significant differences were observed with respect to the control group. Data were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn tests for multiple comparisons.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.g006>

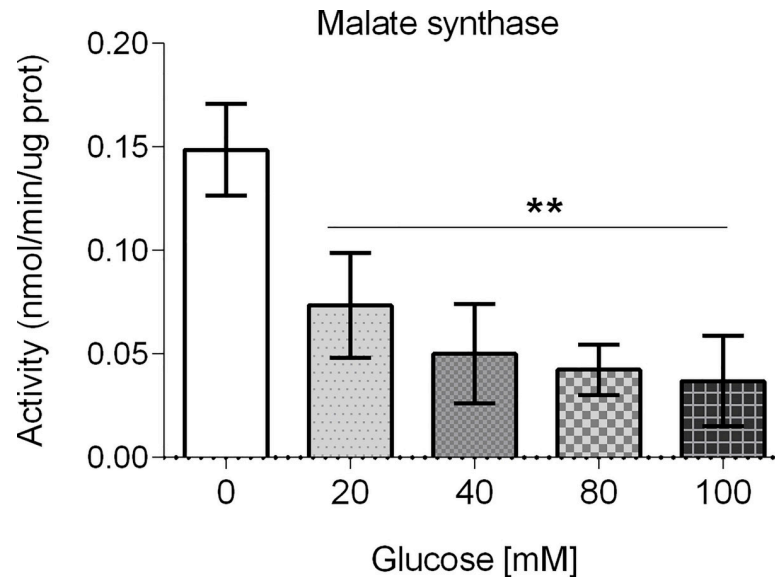


Fig 7. Malate synthase enzymatic activities of worms exposed to glucose. Enzymatic activities were determined in crude extracts from worms that were exposed from L1 to L4 larval stages to glucose 20, 40, 80 or 100 mM. Data is presented from 12 independent biological replicates. Error bars represent SEM (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; one-way Anova and Bonferroni test to evaluate multiple comparisons).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.g007>

acetyl-CoA to succinate, malate and CoA using glyoxylate as an intermediate [30]. As can be seen in Fig 7, the malate synthase enzyme activity was decreased in all of the glucose concentrations tested ($P < 0.01$). This result could be interpreted as that other energy producing pathways different from the glyoxylate shunt are functioning in glucose-treated animals.

Glucose decreases ceramide synthases *hyl-1* and *hyl-2* mRNA accumulation

As mitochondrial dysfunction could lead to the accumulation of ceramides [31], we aimed to determine the accumulation of the mRNAs of *hyl-1* and *hyl-2* genes, that code for ceramide synthases in glucose-fed worms. It has been described that the products encoded by *hyl-1* and *hyl-2* have proapoptotic and pro-survival effects, respectively [32]. HYL-1 function is required for synthesis of ceramides and sphingolipids containing very long acyl-chains ($\geq C24$), while HYL-2 is required for synthesis of ceramides and sphingolipids containing shorter acyl-chains ($\leq C22$). We found that *hyl-1* mRNA accumulation decreases about 60% in all the concentrations of glucose tested ($P < 0.01$, Fig 8A), while *hyl-2* mRNA accumulation decreases at glucose 40, 80 or 100 mM only ($P < 0.01$, Fig 8B). These results show that, contrary to our expectation, *hyl-1* and *hyl-2* mRNA levels are decreased in glucose-fed worms.

Glucose decreases *gcs-1* and *gst-4* mRNA accumulation

The expression of the genes gamma-glutamylcysteine synthetase heavy chain (*gcs-1*) and glutathione-S-transferase 4 (*gst-4*) is regulated by the transcription factor SKN-1 under conditions of environmental stress [33,34]. In a previous report we have shown that the mRNA level of *skn-1* was downregulated by glucose [17], so we aimed to determine the effect of glucose on the mRNA accumulation of these genes. We observed that the mRNA levels of *gcs-1* ($P < 0.001$, Fig 8C) and *gst-4* ($P < 0.01$, Fig 8D) were decreased at all the glucose concentrations tested. These results suggest that the downregulation of *skn-1* that our group previously

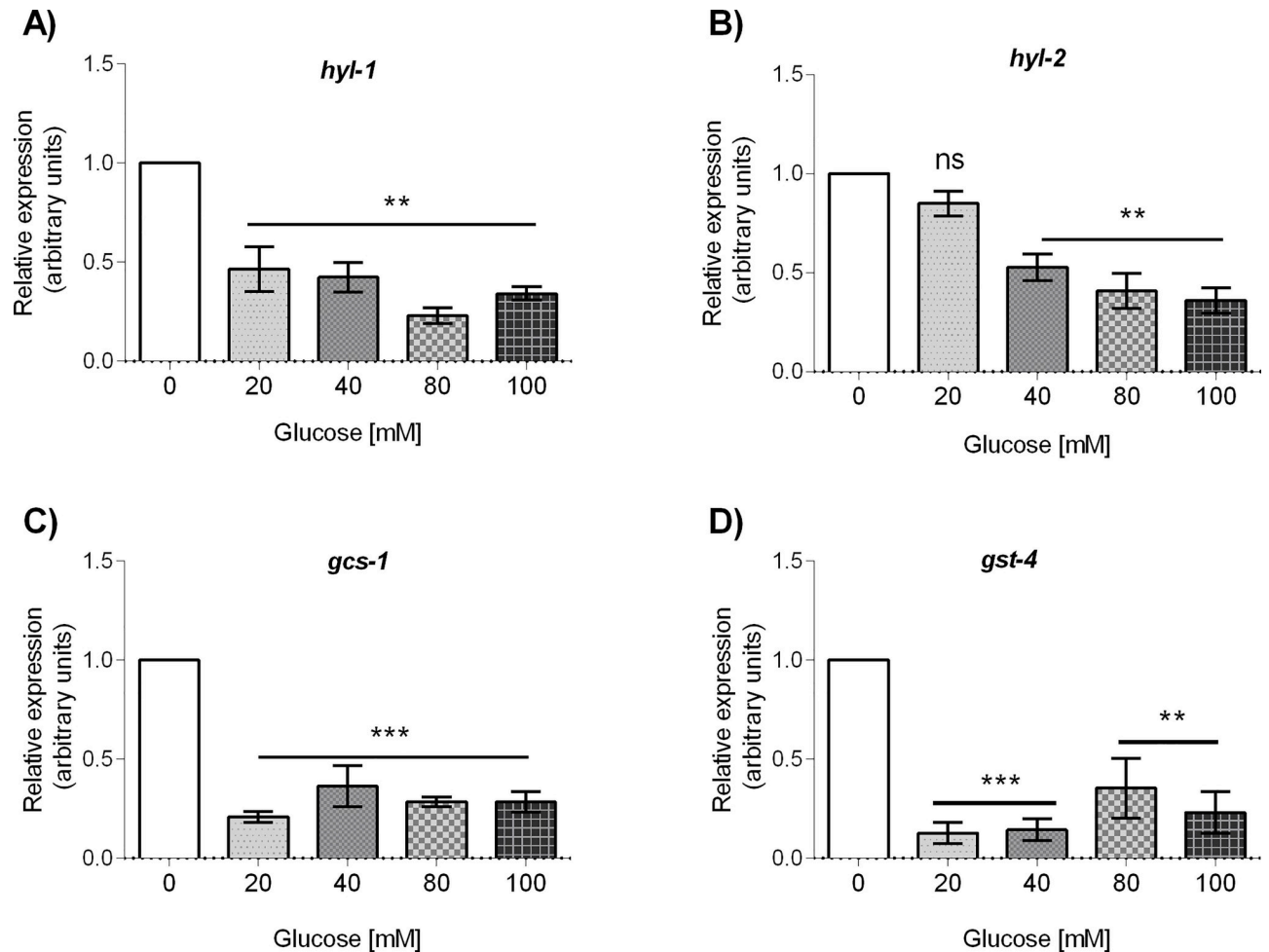


Fig 8. mRNA abundance of ceramide synthase enzymes and glutathione metabolism-related proteins of worms grown at different concentrations of glucose. Worms were exposed from L1 to L4 larval stage to 20, 40, 80 or 100 mM glucose. Panels show quantitative RT-PCR analysis of: (A) *hyl-1*, (B) *hyl-2*, (C) *gcs-1*, and (D) *gst-4* mRNA level in wild-type worms grown at the specified glucose concentration. Relative expression was analyzed with the Kruskal-Wallis test. Values expressed as median \pm IQR ($n = 6$). Significant differences with respect to control group are marked as follows: ns = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.g008>

reported in glucose-fed worms [17], probably leads to the decrease in the mRNA levels of *gcs-1* and *gst-4* in glucose-fed worms.

Glucose alters the mRNA accumulation of two genes involved in mitophagy: *pink-1* and *dct-1*

As mitophagy is important for clearance of damaged mitochondria in order to maintain mitochondrial homeostasis. As *pink-1* (PTEN-induced kinase-1) and *dct-1* (DAF-16/FOXO-controlled germline-tumor affecting-1) are two key mitophagy genes [35], we determined if the mRNA abundance of these genes was affected by glucose. We observed that the mRNA accumulation of *pink-1* and *dct-1* was upregulated at glucose 80 and 100 mM (* $P < 0.05$, Fig 9A and 9B). These results suggest that in the conditions when we found an increased proportion of damaged mitochondria in glucose-treated worms, there is an upregulation of mitophagy genes as a putative response to mitochondrial dysfunction.

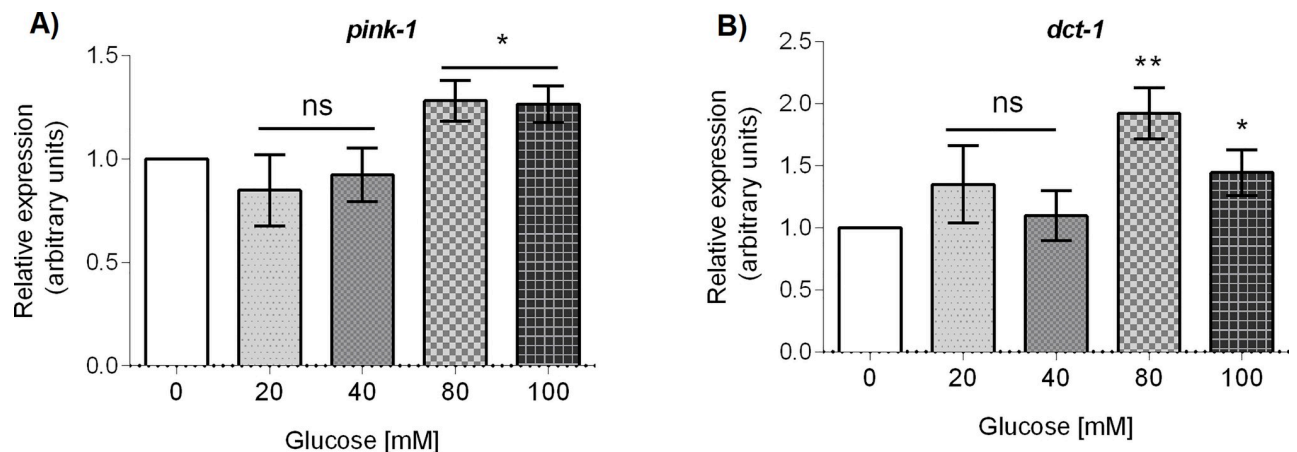


Fig 9. mRNA abundance of the mitophagy genes *pink-1* and *dct-1* of glucose-treated worms. Worms were exposed from L1 to L4 larval stage to 20, 40, 80, or 100 mM glucose. Panels show quantitative RT-PCR analysis of (A) *pink-1* and (B) *dct-1* mRNA levels in worms grown at the specified glucose concentration. Relative expression was analyzed with the Kruskal-Wallis test. Values expressed as median \pm IQR (n = 6). Significant differences to the control group are marked as follows: ns = not significant, * p <0.05, ** p <0.01.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652.g009>

Discussion

Metabolic changes produced by different nutritional situations are at the onset of pathological mechanisms in several diseases, including cancer, neurodegenerative diseases and diabetes, highlighting the relevance of understanding how mitochondria responds to the exposure to different nutrients. Furthermore, glucose has a wide array of effects on mitochondrial function, but the regulatory mechanisms implicated are poorly understood. Here, we addressed the question of how high-glucose diets impact *C. elegans* mitochondrial function.

First, we observed that mitochondria from muscle cells and germ cells from larvae grown from L1 to L4 stages in increasing concentrations of glucose was conspicuously different from that of control worms. A swelling of mitochondria from worms fed with glucose was apparent. Moreover, rupture of the external membrane was observed in both muscle cells and germ cells from worms fed glucose 100 mM. Also, in worms fed with glucose, an enlargement of the endoplasmic reticulum was evident. Additionally, a disorganization of the myofilaments and the line Z was observed in muscle cells from glucose-treated worms. Similar alterations in mitochondrial ultrastructure have been reported in the gastrocnemius muscle of rats fed a high-sugar diet (68% carbohydrate), showing a swollen appearance and damaged cristae [36]. Altered mitochondria was also observed in rat embryos from a diabetic pregnancy and in embryos cultured in high concentrations of D-glucose, but not in L-glucose [37].

Alterations in mitochondria morphology have also been observed in worms carrying mutations that affect mitochondrial fission or fusion [38], and in mutants in the electron transport complex V ATP synthase [39]. Additionally, it was found that all of the mutants that showed a disrupted mitochondrial and ATP synthesis function showed an abnormal mitochondrial morphology [40]. Moreover, knockdown of genes that code for most of the mitochondrial proteins, also lead to fragmented or elongated mitochondria [41]. Damaged mitochondria has been also observed in rat embryos from a diabetic pregnancy [37] and in the muscle of rats fed a high-sugar diet [36], as well as fragmented hepatic mitochondria in high-fat diet-fed mice [42], showing that this phenomenon also occurs in mammals.

Mitochondrial dysfunction gives rise to an unusual cristae morphology [7]. Subjecting the cells with the mitochondrial DNA (mtDNA) replication inhibitor 2', 3'-dideoxycytidine (ddC), the cells showed a concentrically remodeled cristae [43], which recently was also

visualized and confirmed by superresolution imaging of mitochondria cristae using stimulated emission depletion (STED) microscopy [44]. Mitochondrial volume homeostasis is important for function and is regulated by ion fluxes; levels of potassium (K^+) are important for mitochondrial osmotic balance, while levels of calcium (Ca^{2+}) for bioenergetics [45,46]. Recently, leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1 (LETM1) has been identified as the gene responsible for Wolf-Hirschhorn syndrome; these proteins are highly conserved and act as a mitochondrial K^+/H^+ exchanger and as a mitochondrial Ca^{2+}/H^+ antiporter [47]. In the case of *C. elegans* and human cells, the expression of Letm1 gene and mitochondrial volume is inversely correlated, and a reduction in the levels of the LETM1 protein lead to swollen mitochondria showing less electro-dense matrices [48]. In this context, it would be very interesting to determine if LETM1 is involved in the rupture of mitochondria seen under high-glucose conditions or other mechanisms explain the swelling of mitochondria.

Dysfunctional mitochondria has been associated with an increase in mitochondrial mass. So, we determined the mitochondrial DNA to nuclear DNA ratio and found only a slight increase at 100 mM glucose-treated worms. Recently, it has been reported that mtDNA is a poor marker of mitochondrial mass, while citrate synthase activity is strongly associated to mitochondrial content [49]. For this reason, we measured CS enzymatic activity and found an increase in CS activity in all of the glucose concentrations tested, suggestive of an increase in mitochondrial content. This result is similar to reports in which worms with defects in mitochondrial respiration [28,29] or wild-type worms fed with *E. coli* strain HT115 instead of OP50 [50], elicit a compensatory mechanism to produce more mitochondria.

As we observed that worms fed a high-glucose diet showed damaged mitochondria, it is possible that glucose-treated worms have dysfunctional mitochondria. We determined the enzymatic activities of the respiratory complexes of glucose-treated worms. We found a decreased activity of complex I at glucose 80 and 100 mM, while no change was observed at other glucose concentrations. Perplexingly, the activity of complex II was augmented at glucose 20 and 40 mM, while no change was evident at greater glucose concentrations. Activity of complex III was increased at glucose 40 and 80 mM, but was diminished at glucose 100 mM, while activity of complex IV was decreased at glucose 40, 80 and 100 mM. This data indicates that glucose has complex effects on individual enzymatic activities of the ETC that depends on the concentration of glucose used and the individual component of the ETC considered. Such a complex dynamics showing the interdependence of individual components of the ETC have been reported previously [7,51,52]. For example, a knockdown in ATP synthase subunit C led to a decrease in complex I enzymatic activity [29]. Also, a long-lived *clk-1* mutant showed deficiencies in complex I-dependent metabolism due to a different ability of complex I and II to use quinone pools [53]. Moreover, long-lived *isp-1* mutants have a decreased complex I activity explained by an altered allosteric interaction between ETC components [54]. Additionally, a knockdown in complex IV shortens the lifespan of *C. elegans* and diminishes complex I enzymatic activity [55]. In this regard, it is interesting to note that in a previous report we observed a diminished longevity in glucose-treated worms [17], and here we found a decrease in both complex I and complex IV enzymatic activities. These results provide evidence on the intertwined relationships between the different complexes of the ETC and the effects that glucose has on ETC enzymatic activities.

It has been reported that HGD-fed worms showed a reduced respiratory activity [56,57]. We observed that complex V (ATP synthase) enzymatic activity was augmented in glucose 20 and 40 mM, while it was diminished at 80 and 100 mM. Surprisingly, glucose-exposed worms did not show altered ATP, ADP or AMP levels. One possible explanation for this is the existence of a compensatory mechanism to low levels of ATP synthesis. It has been reported that worms possess a glyoxalate pathway that can bypass mitochondrial dysfunction and provide

an alternative energy source [58]. In our case, the enzymatic activity of isocitrate lyase/malate synthase, an enzyme with a dual function in the glyoxalate shunt, diminishes in a concentration-dependent manner. Another possibility is that glucose-treated worms show a decreased energy expenditure, so ATP levels could be maintained. For example, mutations in *clk-1* that decrease mitochondrial function showed normal or increased ATP levels that result from diminished energy utilization [59]. Interestingly, studies of worms with disrupted mitochondrial genes that extend longevity does not show changes in ATP levels [29,59,60,61].

Ceramides are known to participate in important cellular processes like apoptosis, stress response and the mitochondrial unfolded response [62,63,64,65,66]. Ceramides are produced in the endoplasmic reticulum (ER) and function within the ER and mitochondria [62]. As changes in ceramide concentration have been associated with diseases involving mitochondrial dysfunction [63,64,67], we determined the mRNA accumulation of *hyl-1* and *hyl-2*, genes involved in ceramide synthesis. It has been reported that *hyl-1* is necessary for the synthesis of C24 to C26 ceramide and sphingomyelin compounds, while *hyl-2* is required for the synthesis of C20 to C22 compounds [32]. A mutation in *hyl-1* increases oxygen deprivation survival, while a mutation in *hyl-2* results in oxygen deprivation sensitivity [15,32]. The sensitivity to oxygen deprivation of a *hyl-2* mutant is worsened if the worms are fed a glucose diet, showing an altered expression of genes involved in innate immunity, cuticle function and phase I and II detoxification system [68]. We observed that both *hyl-1* and *hyl-2* mRNAs were downregulated in glucose-treated worms. This downregulation could be part of a response mechanism to decrease sphingolipid synthesis to diminish the toxicity of high-glucose diets.

Recently, we reported that high-glucose diets lead to a mild activation of some antioxidant pathways in *C. elegans*, concomitant with a downregulation of *skn-1* mRNA accumulation [17]. Here we aimed to extend our query on the participation of other mitohormetic genes involved in antioxidant pathways. We found that the mRNAs of *gcs-1* and *gst-4*, that code for gamma glutamyl synthetase and glutathione S-transferase 4, respectively, involved in glutathione and detoxification metabolism, were downregulated in a glucose-supplemented diet. The correlation observed between the decreased mRNA levels of *skn-1* and two of their transcriptional targets in glucose-treated worms surely warrants a further in-depth study. A similar downregulation of *gcs-1* and *gst-4* mRNA has been reported in glucose-fed worms, which was shown to be a consequence of the inhibition of the SKN-1-mediated immune response to the infection with *Salmonella typhimurium* [69]. Along the same lines, the SKN-1-mediated increase of expression of *gcs-1* and *gst-4* in response to Paraquat was suppressed in the presence of glucose [70]. It is interesting to note that the knockdown of some genes of the detoxification system increased the anoxia survival rate of glucose-treated worms or *hyl-2* mutants [68]. Furthermore, it has been reported that the protective effect seen by the addition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) under high-glucose conditions was independent of antioxidant defense pathways [71]. It is thought that the detoxification system can modulate the stress response through secondary mechanisms, such as to promote excretion of toxic metabolites, so knockdown or downregulation of some detoxification genes may be beneficial in some circumstances [68].

Finally, mitophagy involves the targeting of damaged mitochondria to lysosomes for degradation and recycling of their components, particularly under conditions of environmental stress [72]. As mitophagy has been reported to be impaired under high-glucose treatments [73], we aimed to study the mRNA accumulation of two genes involved in this process. Mitochondrial phosphatase and tensin (PTEN)-induced kinase 1 (*pink-1*) and the ortholog of human BNIP3 (BCL2 interacting protein 3) (*dct-1*) are two key genes that code for proteins that regulate mitophagy in *C. elegans* and other organisms [74]. In damaged mitochondria, PINK-1 is accumulated in the outer membrane, where it recruits PARKIN to target the

damaged mitochondria for degradation by the lysosome [75]. Furthermore, DCT-1 acts downstream of PINK-1 which is ubiquitinated upon mitophagy-inducing conditions to help in the removal of damaged mitochondria [74]. We observed that the mRNA level of both genes slightly increased at glucose 80 or 100 mM, exactly in the same conditions in which we observed an increased number of damaged mitochondria. The upregulation of *pink-1* and *dct-1* could be part of a mitohormetic response involving mitophagy to adjust mitochondrial population under conditions of HGD.

Conclusions

In summary, our data clearly shows that HGD dramatically alter mitochondrial morphology, mass and function, without affecting adenine nucleotide pools. Moreover, our results suggest that perhaps the glyoxylate cycle does not represent an alternative energetic source as the malate synthase enzymatic activity was decreased in glucose-fed worms. We also observed a downregulation of genes involved in ceramide biosynthesis and genes involved in glutathione metabolism, maybe as these downregulation is beneficial in glucose-treated worms. Additionally, the upregulation of genes involved in mitophagy was observed as a response to the exposure to glucose. It will be a worthwhile future task to elucidate the molecular mechanisms involved in the alterations in morphology and function of the mitochondria induced by HGD in *C. elegans*.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the helpful remarks made by two anonymous reviewers that improved our work. This manuscript presents part of the PhD thesis of J. A-F., who is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

Author Contributions

Conceptualization: Jonathan Alcántar-Fernández, Juan Miranda-Ríos.

Data curation: Jonathan Alcántar-Fernández.

Formal analysis: Jonathan Alcántar-Fernández, Angélica González-Maciél, Rafael Reynoso-Robles, Alain de J. Hernández-Vázquez, Juan Miranda-Ríos.

Funding acquisition: Juan Miranda-Ríos.

Investigation: Jonathan Alcántar-Fernández, Rafael Reynoso-Robles, Martha Elva Pérez Andrade, Alain de J. Hernández-Vázquez, Antonio Velázquez-Arellano, Juan Miranda-Ríos.

Methodology: Jonathan Alcántar-Fernández, Angélica González-Maciél, Rafael Reynoso-Robles, Martha Elva Pérez Andrade, Alain de J. Hernández-Vázquez, Antonio Velázquez-Arellano, Juan Miranda-Ríos.

Project administration: Martha Elva Pérez Andrade, Juan Miranda-Ríos.

Resources: Angélica González-Maciél, Juan Miranda-Ríos.

Supervision: Antonio Velázquez-Arellano, Juan Miranda-Ríos.

Writing – original draft: Jonathan Alcántar-Fernández, Angélica González-Maciél, Juan Miranda-Ríos.

Writing – review & editing: Jonathan Alcántar-Fernández, Juan Miranda-Ríos.

References

1. Friedman F, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014; 505:335–343. <https://doi.org/10.1038/nature12985> PMID: 24429632
2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153:1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039> PMID: 23746838
3. Sebastián D, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics: coupling mitochondrial fitness with healthy aging. *Trends Mol Med*. 2017; 23: 201–215. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.01.003> PMID: 28188102
4. Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2011; 8:92–103. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.138> PMID: 21912398
5. Labbé K, Murley A, Nunnari J. Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30: 357–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155756> PMID: 25288115
6. Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15: 634–646. <https://doi.org/10.1038/nrm3877> PMID: 25237825
7. Cogliati S, Enriquez JA, Scorrano L. Mitochondrial cristae: where beauty meets functionality. *Trends Biochem. Sci*. 2016; 41:261–273. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.001> PMID: 26857402
8. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol*. 2011; 13:589–598. <https://doi.org/10.1038/ncb2220> PMID: 21478857
9. Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2011; 108: 10190–10195. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107402108> PMID: 21646527
10. Svensk E, Devkota R, Ståhlman M, Ranji P, Rauthan M, Magnusson F, et al. *Caenorhabditis elegans* PAQR-2 and IGLR-2 protect against glucose toxicity by modulating membrane lipid composition. *PLoS Genet*. 2016; 12(4):e1005982. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005982> PMID: 27082444
11. Mondoux MA, Love DC, Ghosh SK, Fukushima T, Bond M, Weerasinghe GR, et al. O-linked-N-acetylglucosamine cycling and insulin signaling are required for the glucose stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2011; 188(2):369–382. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.126490> PMID: 21441213
12. Choi SS. High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. *Nutr Res Pract*. 2011; 5(3):214–218. <https://doi.org/10.4162/nrp.2011.5.3.214> PMID: 21779524
13. Schlotterer A, Kukudov G, Bozorgmehr F, Hutter H, Du X, Oikonomou D, et al. *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction. *Diabetes*. 2009; 58(11):2450–2456. <https://doi.org/10.2337/db09-0567> PMID: 19675139
14. Lee SJ, Murphy CT, Kenyon C. Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metab*. 2009; 10(5):379–391. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.003> PMID: 19883616
15. Garcia AM, Ladage ML, Dumesnil DR, Zaman K, Shulaev V, Azad RK, et al. Glucose Induces Sensitivity to Oxygen Deprivation and Modulates Insulin/IGF-1 Signaling and Lipid Biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 2015; 200(1):167–184. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.174631> PMID: 25762526
16. Liggett MR, Hoy MJ, Mastroianni M, Mondoux MA. High-glucose diets have sex-specific effects on aging in *C. elegans*: toxic to hermaphrodites but beneficial to males. *Aging (Albany NY)*. 2015; 7(6):383–388.
17. Alcántar-Fernández J, Navarro RE, Salazar-Martínez AM, Pérez-Andrade ME, Miranda-Ríos J. *Caenorhabditis elegans* respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors. *PLoS One*. 2018; 13(7):e0199888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888> PMID: 29990370
18. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974; 77:71–94. PMID: 4366476
19. Wood W. The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1998; 17:667.
20. Furda AM, Bess AS, Meyer JN, Van Houten B. Analysis of DNA damage and repair in nuclear and mitochondrial DNA of animal cells using quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2012; 920:111–132. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3_9 PMID: 22941600

21. Li J, Cai T, Wu P, Cui Z, Chen X, Hou J, et al. Proteomic analysis of mitochondria from *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics*. 2009; 9(19):4539–53. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900101> PMID: 19670372
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999> PMID: 942051
23. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc.* 2012; 7(6):1235–1246. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058> PMID: 22653162
24. Hoogewijs D, Houthoofd K, Matthijssens F, Vandesompele J, Vanfleteren JR. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative *sod* gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Mol Biol.* 2008; 9:9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-9> PMID: 18211699
25. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9):e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45> PMID: 11328886
26. Lemire B. Mitochondrial genetics. *Wormbook.* 2005; 14:1–10.
27. Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, et al. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Amm J Physiol Cell Physiol.* 2006; 291(6):C1172–C1182.
28. Cristina D, Cary M, Lunceford A, Clarke C, Kenyon C. A regulated response to impaired respiration slows behavioral rates and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics.* 2009; 5: e1000450. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000450> PMID: 19360127
29. Xu C, Hwang W, Jeong DE, Ryu Y, Ha CM, Lee SV, et al. Genetic inhibition of an ATP synthase subunit extends lifespan in *C. elegans*. *Sci Rep.* 2018; 8(1):14836. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32025-w> PMID: 30287841
30. Liu F, Thatcher JD, Barral JM, Epstein HF. Bifunctional glyoxylate cycle protein of *Caenorhabditis elegans*: a developmentally regulated protein of intestine and muscle. *Dev Biol.* 1995; 169:399–414. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1156> PMID: 7781887
31. Montgomery MK, Turner N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr Connect.* 2015; 4(1):R1–R5. <https://doi.org/10.1530/EC-14-0092> PMID: 25385852
32. Menuz V, Howell KS, Gentina S, Epstein S, Riezman I, Fornallaz-Mulhauser M, et al. Protection of *C. elegans* from anoxia by HYL-2 ceramide synthase. *Science.* 2009; 324(5925):381–384. <https://doi.org/10.1126/science.1168532> PMID: 19372430
33. An JH, Blackwell TK, SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev.* 2003; 17:1882–1893. <https://doi.org/10.1101/gad.1107803> PMID: 12869585
34. Oliveira RP, Abate J, Dilks K, Landis J, Ashraf J, Murphy CT, et al. 2009. Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell.* 2009; 8:524–541. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00501.x> PMID: 19575768
35. Fang EF, Hou Y, Palikaras K, Adriaanse BA, Kerr JS, Yang B, et al. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2019; 22(3):401–412. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0332-9> PMID: 30742114
36. Barbosa de Queiroz K, Honorato-Sampaio K, Rossoni Júnior JV, Andrade Leal D, Pinto AB, Kappes-Becker L, et al. Physical activity prevents alterations in mitochondrial ultrastructure and glucometabolic parameters in a high-sugar diet model. *PLoS One.* 2017; 12(2):e0172103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172103> PMID: 28199417
37. Yang X, Borg LA, Eriksson UJ. Altered mitochondrial morphology of rat embryos in diabetic pregnancy. *Anat Rec.* 1995; 241(2):255–267. <https://doi.org/10.1002/ar.1092410212> PMID: 7710141
38. Griparic L, van der Bliek AM. The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic.* 2001; 2:235–244. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.1r008.x> PMID: 11285133
39. Paumard P, Vaillier J, Couly B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 2002; 21:221–230. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.221> PMID: 11823415
40. Lee SS, Lee RY, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat Genet.* 2003; 33: 40–48. <https://doi.org/10.1038/ng1056> PMID: 12447374
41. Ichishita R, Tanaka K, Sugiura Y, Sayano T, Mihara K, Oka T. An RNAi screen for mitochondrial proteins required to maintain the morphology of the organelle in *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem.* 2008; 143(4):449–454. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm245> PMID: 18174190
42. Hammerschmidt P, Ostkotte D, Nolte H, Gerl MJ, Jais A, Brunner HL, et al. CerS6-derived sphingolipids interact with Mff and promote mitochondrial fragmentation in obesity. *Cell.* 2019; 177(6):1536–1552. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.008> PMID: 31150623

43. Ban-Ishihara R, Ishihara T, Sasaki N, Mihara K, Ishihara N. Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013; 110:11863–11868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301951110> PMID: 23821750
44. Wang C, Taki M, Sato Y, Tamura Y, Yaginuma H, Okada Y, et al. A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019; 116(32):15817–15822. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905924116> PMID: 31337683
45. Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A. Energy-dissipating hub in muscle mitochondria: potassium channels and uncoupling proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 2019; 664:102–109. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.036> PMID: 30716282
46. Giorgi C, Marchi S, Pinton P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018; 19:713–730. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8> PMID: 30143745
47. Nowikovsky K, Froschauer EM, Zsurka G, Samaj J, Reipert S, Kolisek M, et al. The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf–Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem.* 2004; 279:30307–30315. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403607200> PMID: 15138253
48. Hasegawa A, van der Bliek AM. Inverse correlation between expression of the Wolfs Hirschhorn candidate gene *Letm1* and mitochondrial volume in *C. elegans* and in mammalian cells. *Hum Mol Genet.* 2007; 16(17):2061–2071. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm154> PMID: 17606466
49. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol.* 2012; 590(14):3349–3360. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230185> PMID: 22586215
50. Reinke SN, Hu X, Sykes BD, Lemire BD. *Caenorhabditis elegans* diet significantly affects metabolic profile, mitochondrial DNA levels and brood size. *Mol Genet Metab.* 2010; 100(3): 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.03.013> PMID: 20400348
51. Moreno-Loshuertos R, Enríquez JA. Respiratory supercomplexes and the functional segmentation of the CoQ pool. *Free Radic. Biol. Med.* 2016; 100:5–13. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.018> PMID: 27105951
52. Sergi D, Naumovski N, Heilbronn LK, Abeywardena M, O’Callaghan N, Lionetti L, et al. Mitochondrial (dys)function and insulin resistance: from pathophysiological molecular mechanisms to the impact of diet. *Front Physiol.* 2019; 10:532. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00532> PMID: 31130874
53. Kayser EB, Sedensky MM, Morgan PG, Hoppel CL. Mitochondrial oxidative phosphorylation is defective in the long-lived mutant *clk-1*. *J Biol Chem* 2004; 279:54479–54486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403066200> PMID: 15269213
54. Suthammarak W, Morgan PG, Sedensky MM. Mutations in mitochondrial complex III uniquely affect complex I in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 2010; 285:40724–40731. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.159608> PMID: 20971856
55. Suthammarak W, Yang YY, Morgan PG, Sedensky MM. Complex I function is defective in complex IV-deficient *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2009; 284: 6425–6435. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805733200> PMID: 19074434
56. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab.* 2007; 6(4):280–293. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.011> PMID: 17908557
57. Moreno-Arriola E, El Hafidi M, Ortega-Cuellar D, Carvajal K. AMP-Activated Protein Kinase Regulates Oxidative Metabolism in *Caenorhabditis elegans* through the NHR-49 and MDT-15 transcriptional regulators. *PLoS ONE.* 2016; 11(1):e0148089. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148089> PMID: 26824904
58. Gallo M, Park D, Riddle DL. Increased longevity of some *C. elegans* mitochondrial mutants explained by activation of an alternative energy-producing pathway. *Mechanisms Ageing Dev.* 2011; 132:515–518.
59. Van Raamsdonk JM, Meng Y, Camp D, Yang W, Jia X, Bénard C, et al. Decreased energy metabolism extends life span in *Caenorhabditis elegans* without reducing oxidative damage. *Genetics.* 2010; 185:559–571. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.115378> PMID: 20382831
60. Copeland JM, Cho J, Lo T Jr, Hur JH, Bahadorani S, Arabyan T, et al. Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain. *Curr Biol.* 2009; 19:1591–1598. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.016> PMID: 19747824
61. Dillin A, Hsu AL, Arantes-Oliveira N, Lehrer-Graiwer J, Hsin H, Fraser AG, et al. Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science.* 2002; 298:2398–2401. <https://doi.org/10.1126/science.1077780> PMID: 12471266

62. Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides. *J Biol Chem*. 2011; 286(32): 27855–27862. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.254359> PMID: 21693702
63. Xia JY, Morley TS, Scherer PE. The adipokine/ceramide axis: key aspects of insulin sensitization. *Biochimie*. 2014; 96:130–139. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.08.013> PMID: 23969158
64. Larsen PJ, Tennagels N. On ceramides, other sphingolipids and impaired glucose homeostasis. *Mol. Metab*. 2014; 3(3):252–260. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.01.011> PMID: 24749054
65. Liu Y, Samuel BS, Breen PC, Ruvkun G. *Caenorhabditis elegans* pathways that surveil and defend mitochondria. *Nature*. 2014; 508(7496): 406–410. <https://doi.org/10.1038/nature13204> PMID: 24695221
66. Deng X, Yin X, Allan R, Lu DD, Maurer CW, Haimovitz-Friedman A, et al. Ceramide biogenesis is required for radiation-induced apoptosis in the germ line of *C. elegans*. *Science*. 2008; 322(5898):110–115. <https://doi.org/10.1126/science.1158111> PMID: 18832646
67. Lopez X, Goldfine AB, Holland WL, Gordillo R, Scherer PE. Plasma ceramides are elevated in female children and adolescents with type 2 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2013; 26(9–10):995–998. <https://doi.org/10.1515/jpem-2012-0407> PMID: 23612696
68. Ladage ML, King SD, Burks DJ, Quan DL, Garcia AM, Azad RK, et al. Glucose or altered ceramide biosynthesis mediate oxygen deprivation sensitivity through novel pathways revealed by transcriptome analysis in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)*. 2016; 6(10):3149–3160.
69. Li L, Chen Y, Chenzhao C, Fus S, Xu Q, Zhao J. Glucose negatively affects Nrf2/SKN-1-mediated immunity in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)*. 2018; 10(11):3089–3103.
70. Wang C, Zhang Y, Li F, Wei Y. Conserved roles of glucose in suppressing reactive oxygen species-induced cell death and animal survival. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(15):5726–5743.
71. Riedinger C, Mendler M, Schlotterer A, Fleming T, Okun J, Hammes HP, et al. High-glucose toxicity is mediated by AICAR-transfomylase/IMP cyclohydrolase and mitigated by AMP-activated protein kinase in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2018; 293(13):4845–4859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.805879> PMID: 29414769
72. Sun N, Yun J, Liu J, Malide D, Liu C, Rovira II, et al. Measuring in vivo mitophagy. *Mol. Cell*. 2015; 60(4):685–696. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.009> PMID: 26549682
73. Song Y, Du Y, Zou W, Luo Y, Zhang X, Fu J. Involvement of impaired autophagy and mitophagy in Neuro-2a cell damage under hypoxic and/or high-glucose conditions. *Sci. Rep*. 2018; 8(1): 3301. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20162-1> PMID: 29459731
74. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature*. 2015; 521:525–528. <https://doi.org/10.1038/nature14300> PMID: 25896323
75. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. 2012. *Science*. 337(6098): 1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855> PMID: 22936770

**Notas periodísticas relacionadas con este trabajo de
investigación**

Martes, agosto 21, 2018



ÓRGANO INFORMATIVO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

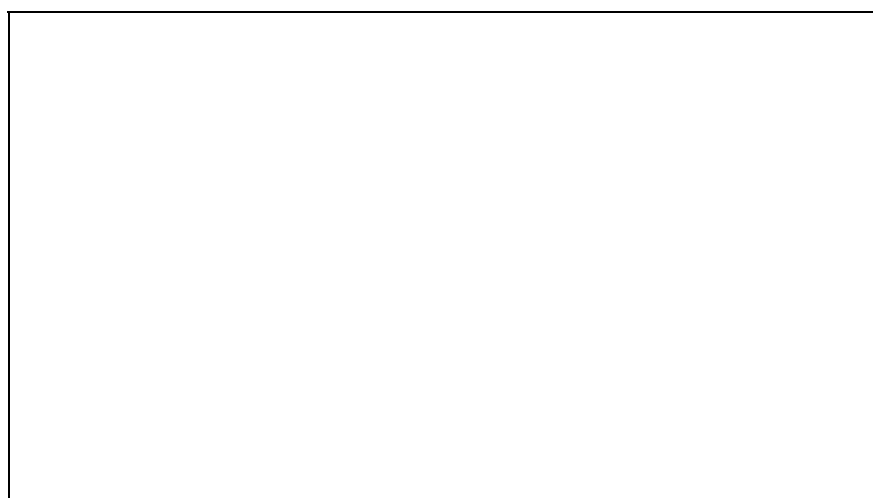
Análisis puma publicado en *PLOS ONE*

Alto consumo de azúcares reduce fertilidad hasta en 50%

No sólo la generación que ingiere altas cantidades tiene problemas de salud, sino su descendencia: Juan Miranda Ríos, del Instituto de Investigaciones Biomédicas

Diana Saavedra

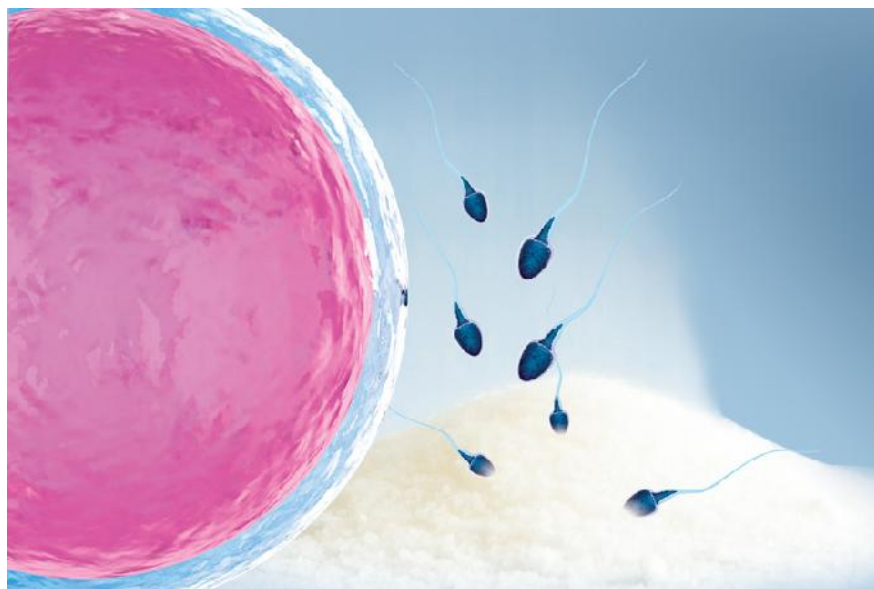
Ago 20, 2018



Además de reducir la esperanza de vida, el alto consumo de azúcares también puede afectar la capacidad reproductiva de futuras generaciones, sugiere un estudio encabezado por Juan Miranda Ríos, del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBm).

El especialista revisó los efectos en el organismo utilizando como modelo al gusano *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), que comparte 60 por ciento de sus genes con los del humano, especialmente los que tienen un equivalente en el control de la producción y utilización de azúcares y grasas.

Lo anterior permitió a Miranda Ríos y su equipo (formado por el estudiante Jonathan Alcántar Fernández, con la colaboración de Rosa E. Navarro y Ana María Salazar) observar las consecuencias no sólo en la generación que consume azúcares en altas cantidades, sino también en sus descendientes, en los que encontró una reducción en la capacidad de reproducción de hasta 50 por ciento.



Muchos de los genes de *C. elegans*, resaltó, son homólogos a los del humano, y su metabolismo de carbohidratos, como de lípidos, es exactamente igual. En ellos se observó un desajuste por la ingesta de azúcar, proceso que se reflejó en las siguientes generaciones, aunque ya no estuvieran expuestas al azúcar. Los resultados de esta investigación fueron publicados recientemente en la revista *PLOS ONE*.

“Pensando en que vivimos en una sociedad que consume dietas altas en carbohidratos, es importante contar con modelos biológicos que nos permitan dilucidar y entender a nivel molecular lo que ocurre”, comentó el investigador en la Unidad de Genética de la Nutrición del IIBm, localizado en el Instituto Nacional de Pediatría.



“Pensando en que vivimos en una sociedad que consume dietas altas en carbohidratos, es importante contar con modelos biológicos que nos permitan dilucidar y entender a nivel molecular lo que ocurre”

Juan Miranda
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Pandemia de obesidad

En México uno de cada tres niños en edad escolar y adolescentes tienen sobrepeso y obesidad, mientras que en los adultos se llega a 70 por ciento. Nuestro país ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil y el segundo de adultos. Además, para 2030 este mal afectará la salud de mil millones de habitantes del planeta.

Estudios indican que entre los años 2000 y 2016 este problema de salud ocasionó la muerte de un millón 200 mil personas en nuestro país, sobre todo por las dietas altas en carbohidratos y la vida sedentaria.

Lo anterior lleva a afecciones como las cardíacas y la diabetes tipo 2 que, según datos de la Secretaría de Salud, son causa del deceso de al menos 80 mil mexicanos al año, añadió el universitario.

Hasta muerte materna

En la indagación, Miranda Ríos y su equipo también encontraron que los gusanos alimentados con altas cantidades de azúcar (que causa una acumulación en el organismo equivalente a la que se encuentra en la sangre de un paciente diabético sin tratamiento) vivieron casi la mitad que aquellos que no la consumían.

Pero uno de los resultados que más llamó la atención de los expertos fue que las tasas de fertilidad en las siguientes generaciones se redujeron, y había problemas como la muerte de las madres.

C. elegans pone hasta 200 huevecillos en su vida, explicó el especialista, pero dos generaciones posteriores, los gusanos con dietas altas en azúcar no rebasaron los cien; además, “varios de

éstos no son expulsados, se quedan al interior de la madre hasta hacerla, literalmente, explotar”.

Esta investigación, concluyó el experto, permitirá diseñar fármacos más eficientes para controlar químicamente los cambios que se desencadenan ante los altos niveles de consumo de azúcares.



G4984

Instituto de Investigaciones Biomédicas

© 2017 - Hecho en México, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Esta página puede ser reproducida con fines no lucrativos, siempre y cuando no se mutile, se cite la fuente completa y su dirección electrónica. De otra forma, requiere permiso previo por escrito de la institución.



Dirección General de Comunicación Social



DGCS
Dirección General de Comunicación Social

Inicio

• Quiénes Somos

Boletines Recientes

Boletín UNAM-DGCS-503

Ciudad Universitaria.

11:00 hs. 19 de agosto de 2018



Juan Miranda Ríos

ALTO CONSUMO DE AZÚCARES REDUCE FERTILIDAD HASTA EN 50%: ESPECIALISTA DE LA UNAM

- *No sólo la generación que ingiere altas cantidades tiene problemas de salud, sino su descendencia, indicó Juan Miranda Ríos, del Instituto de Investigaciones Biomédicas*
- *Los resultados del estudio, aplicado al gusano *C. elegans*, que comparte 60 por ciento de sus genes con los del humano, fue publicado en la revista PLoS ONE*
- *Estudios indican que entre los años 2000 y 2016 la obesidad provocó la muerte de un millón 200 mil personas en México, sobre todo por las dietas altas en carbohidratos y la vida sedentaria*

Además de reducir la esperanza de vida, el alto consumo de azúcares también puede afectar la capacidad reproductiva de ésta y de futuras generaciones, sugiere un estudio encabezado por Juan Miranda Ríos, del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBm) de la UNAM.

El especialista revisó los efectos del alto consumo de azúcares en el organismo utilizando como modelo de estudio al gusano *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), que comparte 60 por ciento de sus genes con los del humano, especialmente los que tienen un equivalente en el control de la producción y utilización de azúcares y grasas.

Esto permitió a Miranda Ríos y su equipo (formado por el estudiante Jonathan Alcántar Fernández, con la colaboración de Rosa E. Navarro y Ana María Salazar) observar los efectos no sólo en la generación que consume azúcares en altas cantidades, sino en sus descendientes, en los que encontró una reducción en la capacidad de reproducción de hasta 50 por ciento.

Muchos de los genes de *C. elegans* son homólogos a los del humano, y su metabolismo de carbohidratos, como de lípidos, es exactamente igual. En ellos se observó un desajuste por la ingesta de azúcar, proceso que se reflejó en las siguientes generaciones, aunque ya no estuvieran expuestas al azúcar, resaltó.

“Pensando en que vivimos en una sociedad que consume dietas altas en carbohidratos, es importante contar con modelos biológicos que nos permitan dilucidar y entender a nivel molecular lo que ocurre. Aunque no lo parezca, este gusano se asemeja mucho a nosotros”, comentó el investigador en la Unidad de Genética de la Nutrición del IIBm, localizado en el Instituto Nacional de Pediatría.

El estudio, publicado recientemente en la revista *PLoS ONE*, ofrece la oportunidad de visualizar los efectos del alto consumo de azúcares en más de una generación, seguimiento difícil de realizar en el humano.

Pandemia de obesidad

En México uno de cada tres niños en edad escolar y adolescentes tienen sobrepeso y obesidad, mientras que en los adultos se llega al 70 por ciento. Nuestro país ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil y el segundo de adultos. Además, para 2030 este mal afectará la salud de mil millones de habitantes del planeta.

Estudios indican que entre los años 2000 y 2016 este problema de salud provocó la muerte de un millón 200 mil personas en nuestro país, sobre todo por las dietas altas en carbohidratos y la vida sedentaria.



Juan Miranda Ríos, investigador del IIBm de la UNAM.



Tweets by @SalaPrensaUN



Sala de Prensa UNAM
@SalaPrensaUNAM

#BoletinUNAM Convenio UNAM-CDMX para investigar partículas contaminantes dañinas a la salud >
bit.ly/2MzLH5J



Embed

View on Twitter

Esto lleva a afecciones como las cardíacas y la diabetes tipo 2 que, según datos de la Secretaría de Salud, son causa del deceso de al menos 80 mil mexicanos al año, añadió el universitario.

En la investigación, Miranda Ríos y su equipo también encontraron que los gusanos alimentados con altas cantidades de azúcar (que provocan una acumulación en el organismo equivalente a la que se encuentra en la sangre de un paciente diabético sin tratamiento) vivieron casi la mitad que aquellos que no la consumían.

Pero uno de los resultados que más llamaron la atención de los especialistas fue que las tasas de fertilidad en las siguientes generaciones se redujeron, y había problemas como la muerte de las madres.

C. elegans pone hasta 200 huevecillos en su vida, explicó el universitario, pero dos generaciones posteriores, los gusanos con dietas altas en azúcar no rebasaron los 100; además, “varios de éstos no son expulsados, se quedan al interior de la madre hasta hacerla, literalmente, explotar”.

Esta investigación, concluyó el experto, permitirá diseñar fármacos más eficientes para controlar químicamente los cambios que se desencadenan ante los altos niveles de consumo de azúcares.

—oOo—

Conoce más de la **Universidad Nacional**, visita:

www.dgcs.unam.mx

www.unamglobal.unam.mx

o sigue en Twitter a: [@SalaPrensaUNAM](https://twitter.com/SalaPrensaUNAM)



INICIO

NOTICIAS

DEPORTES

ENTRETENIMIENTO

TECNOLOGÍA

UNAM GLOBAL TV

NOSOTROS



CIENCIA Y SALUD



► Ciencia ► Tecnología ► Salud

Es Noticia: ► Conciencia ► Dinosaurios ► Universo ► Cambio climático

INICIO // CIENCIA Y SALUD // SALUD // ALTO CONSUMO DE AZÚCARES REDUCE FER



Mantente al día con el boletín de El Universal



Alto consumo de azúcares reduce fertilidad: especialista de la UNAM

● La investigación permitirá diseñar fármacos más eficientes para controlar químicamente los cambios que se desencadenan ante los altos niveles de consumo de azúcares



Foto: Especial

20/08/2018 | 12:05 | Notimex



GUARDAR

FACEBOOK

De acuerdo con un estudio que encabezó el integrante del **Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBm)** de la UNAM, Juan Miranda Ríos, el alto **consumo de azúcares** tiene diversos efectos

PATROCINADO

Echa un vistazo a la increíble casa de AMLO

FinanceBLVD

Enlaces Patrocinados por Taboola

EL UNIVERSAL VIDEO

NACIÓN



GOOGLE+

OTRAS

En un comunicado, precisó que además de **reducir la esperanza de vida**, también puede afectar la capacidad reproductiva de ésta y de futuras generaciones.

TEMAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

El especialista revisó los efectos del alto consumo de **azúcares** en el organismo utilizando como modelo de estudio al gusano *Caenorhabditis elegans*. (C. elegans), que comparte 60 por ciento de sus genes con los del humano, especialmente los que tienen un equivalente en el control de la producción y utilización de azúcares y grasas.



El investigador Juan Miranda Ríos. Foto: UNAM

Lo anterior permitió a Miranda Ríos y su equipo observar los efectos, no sólo en la generación que consume azúcares en altas cantidades, sino en sus descendientes, en los que encontró una reducción en la capacidad de **reproducción de hasta 50 por ciento**.

El estudio, en el que participan los alumnos Jonathan Alcántar Fernández, con la colaboración de Rosa E. Navarro y Ana María Salazar, señala que muchos de los genes de C. elegans son homólogos a los del humano, y su metabolismo de carbohidratos y de lípidos es exactamente igual.

En ellos se observó un **desajuste por la ingesta de azúcar**, proceso que se reflejó en las siguientes generaciones, aunque ya no estuvieran expuestas al azúcar, resaltó.

El estudio, publicado recientemente en la revista *PLoS ONE*, ofrece la oportunidad de visualizar los efectos del alto consumo de azúcares en más de una generación, seguimiento difícil de realizar en el humano.

En la investigación, Miranda Ríos y su equipo también encontraron que los gusanos **alimentados con altas cantidades de azúcar** (que provocan una acumulación en el organismo equivalente a la que se encuentra en la sangre de un paciente diabético sin tratamiento) vivieron casi la mitad que aquellos que no la consumían.

Pero uno de los resultados que más llamaron la atención de los especialistas fue que las **tasas de fertilidad** en las siguientes generaciones se redujeron, y había problemas como la muerte de las madres.



tienen diabetes: Secretaría de Salud

El año pasado la enfermedad fue la causa de muerte de 105 mil mexicanos, por lo que la Secretaría pide a los padres de familia cuidar la alimentación y los hábitos en los menores



C. elegans pone hasta 200 huevecillos en su vida, explicó el universitario, pero dos generaciones posteriores, los gusanos con dietas altas en azúcar no rebasaron los 100.

Esta investigación, concluyó el experto, **permitirá diseñar fármacos** más eficientes para controlar químicamente los cambios que se desencadenan ante los altos niveles de **consumo de azúcares**.

THE HIGH CONSUMPTION OF SUGARS CAN REDUCE FERTILITY, SAYS STUDY

🕒 August 21, 2018 📁 Health 👁 0 Views

This decrease would be 50 percent for consumers and their descendants, said the leadership of the research group Juan Miranda Ríos.

Research conducted at UNAM's IIB

A survey conducted by the Institute of Biomedical Research of UNAM, discovered that high consumption of sugars could reduce fertility by up to 50 percent, reported investigator Juan Miranda Ríos.

The study, published in the scientific journal *PLOS ONE* is important as it provided the opportunity to visualize the effects of high consumption of sugars for more than one generation, a difficult follow-up in humans.

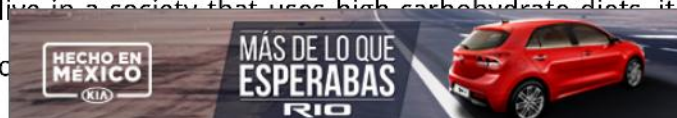
The specialists reported that the studies were conducted with a study model, a mask called *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) who shares 60 percent of its genes with people in particular those who are involved in control and the use of sugars and fats in the body.

Thus, university researchers succeeded in observing the effects not only in the generation that consumes sugars in large quantities, but also in their descendants, where they found a reduction in reproduction capacity of up to 50 percent.

Juan Miranda Ríos and his team, formed by the student Jonathan Alcántar Fernández, in collaboration with Rosa E. Navarro and Ana María Salazar, declared in an official communiqué of UNAM that many of the genres *C. elegans* homologous to humans, and their metabolism of both carbohydrates and lipids is exactly the same.

Ormar showed an imbalance due to sugar intake, a process that was reflected in the following generations, although they were no longer exposed to sugar, he said.

"Keep in mind that we live in a society that uses high carbohydrate diets, it's important to have biological models that enable us to



lot
^

look like this, it looks This worm is much on us, "said the researcher at the Nutrition Genetics Unit at IIBm, located at the National Institute of Pediatrics.

FIRST LOCATIONS IN OBESITY. In Mexico, one in three children in school age and adolescents is overweight and obese, while adults reach 70 percent. Our country occupies the first place in the world in childhood fatness and the other in adults. In addition, this evil will affect the health of one billion people on the planet in 2030.

Ads by Google

Age and Fertility

A Diabetes Diet

And Disease Treatment

A Health Nutrition

Studies show that between half 2000 and 201

6 this health problem caused a million 200,000 people in our country, mainly due to the high carbohydrate diets and sedentary lifestyle.

This leads to conditions such as heart disease and type 2 diabetes, which, according to information from the Ministry of Health, is the cause of at least 80,000 Mexicans per year, added the university.

During the investigation, Miranda Ríos and her team also found that worms feeding large amounts of sugar (which caused an accumulation in the body that correspond to the one in the blood of a diabetic without treatment) lived almost half of those who did not consume it.

However, one of the results that attracted most attention to the specialists was that fertility rates in the following generations were reduced and there were problems like the mothers' death.

The worm *C. elegans* puts up to 200 eggs in his life, declared the university student, but two generations later the high-sugar snakes did not exceed 100; In addition, "several of these are not expelled, they remain inside the mother until they literally explode".

This research, concluded the expert, will allow to design more effective drugs to chemically control the changes triggered by high levels of consumption.

Print

Source link

^

<https://www.facebook.com/LaCronicaDeHoy><https://www.twitter.com/lacronicadehoy><https://www.youtube.com/channel/UC6EbrdoUCWUts3MaHhb4lSg> Lunes 20 de Agosto, 2018

Buscar...

**Academia (<http://www.cronica.com.mx/academia.php>)**

El alto consumo de azúcares puede reducir la fertilidad, señala estudio

por ANTIMIO CRUZ 2018-08-21 - 00:00:00

Esta disminución sería del 50 por ciento en los consumidores y sus descendientes, dice el líder del equipo de investigación, Juan Miranda Ríos. La investigación fue realizada en el IIB de la UNAM



Un estudio realizado en animales por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, descubrió que el alto consumo de azúcares puede reducir la fertilidad hasta en 50 por ciento, reportó el líder del equipo de investigación, Juan Miranda Ríos.

El estudio, publicado en la revista científica *PLOS ONE* es importante porque dio la oportunidad de visualizar los efectos del alto consumo de azúcares en más de una generación, seguimiento difícil de realizar en el humano.

El especialista informó que los estudios se realizaron con un modelo de estudio, que es un gusano llamado *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), que comparte 60 por ciento de sus genes con el ser humano, en particular los que tienen que ver con el control y utilización de azúcares y grasas en el cuerpo.

Así, los científicos universitarios lograron observar los efectos no sólo en la generación que consume azúcares en altas cantidades, sino en sus descendientes, en los que encontró una reducción en la capacidad de reproducción de hasta 50 por ciento.

Juan Miranda Ríos y su equipo, formado por el estudiante Jonathan Alcántar Fernández, con la colaboración de Rosa E. Navarro y Ana María Salazar, explicó en un comunicado oficial de la UNAM que muchos de los genes de *C. elegans* son homólogos a los del humano, y su metabolismo tanto de carbohidratos, como de lípidos, es exactamente igual.

En los gusanos se observó un desajuste por la ingesta de azúcar, proceso que se reflejó en las siguientes generaciones, aunque ya no estuvieran expuestas al azúcar, resaltó.

“Pensando en que vivimos en una sociedad que consume dietas altas en carbohidratos, es importante contar con modelos biológicos que nos permitan dilucidar y entender a nivel molecular lo que ocurre. Aunque no lo parezca, este gusano se asemeja mucho a nosotros”, comentó el investigador en la Unidad de Genética de la Nutrición del IIBm, localizado en el Instituto Nacional de Pediatría.

PRIMEROS LUGARES EN OBESIDAD. En México uno de cada tres niños en edad escolar y adolescente tienen sobrepeso y obesidad, mientras que en los adultos se llega al 70 por ciento. Nuestro país ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil y el segundo de adultos. Además, para 2030 este mal afectará la salud de mil millones de habitantes del planeta.

Estudios indican que entre los años 2000 y 2016 este problema de salud provocó la muerte de un millón 200 mil personas en nuestro país, sobre todo por las dietas altas en carbohidratos y la vida sedentaria.

Esto lleva a afecciones como las cardíacas y la diabetes tipo 2 que, según datos de la Secretaría de Salud, son causa del deceso de al menos 80 mil mexicanos al año, añadió el universitario.

En la investigación, Miranda Ríos y su equipo también encontraron que los gusanos alimentados con altas cantidades

Crónica al Momento



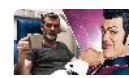
(notas/201
/1091208.l

**Claudia Ruiz
Massieu
rinde
protesta
como
nacidenta**



(notas/201
/1091207.l

**Busca AMLO
apego
constitucion:
en tema
energético
en TI CAN-**



(notas/201
/1091204.l

**Muere el
actor Stefan
Karl
Stefansson,
antagonista
de "I 222"**



(notas/201
/1091203.l

**Embajada
de México
activa
número de
emergencia
en**

de azúcar (que provocan una acumulación en el organismo equivalente a la que se encuentra en la sangre de un paciente diabético sin tratamiento) vivieron casi la mitad que aquellos que no la consumían.

Pero uno de los resultados que más llamaron la atención de los especialistas fue que las tasas de fertilidad en las siguientes generaciones se redujeron, y había problemas como la muerte de las madres.

El gusano *C. elegans* pone hasta 200 huevecillos en su vida, explicó el universitario, pero dos generaciones posteriores, los gusanos con dietas altas en azúcar no rebasaron los 100; además, “varios de éstos no son expulsados, se quedan al interior de la madre hasta hacerla, literalmente, explotar”.

Esta investigación, concluyó el experto, permitirá diseñar fármacos más eficientes para controlar químicamente los cambios que se desencadenan ante los altos niveles de consumo de azúcares.

Imprimir (http://www.cronica.com.mx/imprimir.php?id_nota=1091120)

Más recientes



Agregar un comentario...

[Plugin de comentarios de Facebook](#)

Destacado: