



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de los efectos de una dieta alta en glucosa y/o colesterol sobre el fenotipo y sobre la expresión de los microRNAs *miR-34* y *miR-35* y del gen *gld-1* en un modelo de *C. elegans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
LAYLA ORTIZ GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL:
DR. JUAN MIRANDA RÍOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ:
DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
FACULTAD DE QUÍMICA
DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F., Octubre, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del **Dr. Juan Miranda Ríos**, en el laboratorio 2 de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, que pertenece a la Unidad de Genética de la Nutrición del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Juan Miranda Ríos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova de la Facultad de Química, UNAM.

Dra. Patricia Coello Coutiño de la Facultad de Química, UNAM.

Se reconoce por su colaboración en el desarrollo experimental y discusión de este proyecto a:

L.N. Laura García Segura del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

IBt. Jonathan Alcántar Fernández del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

M. en C. César Alejandro Guzmán Pérez del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Se reconoce y agradece por el apoyo técnico que otorgaron durante el progreso de esta investigación a:

Dr. Jonatán Barrera Chimal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Dr. Jesús Chimal Monroy del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Se reconoce al **Dr. Tim Schedl** del Departamento de Genética de la Universidad de Washington por su contribución con reactivos y sugerencias para la discusión de este trabajo.

Se reconoce también a los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología de la UNAM por su asesoría y apoyo técnico.

El Jurado de Examen de Grado estuvo constituido por:

Presidente **Dra. Marina Gavilanes Ruiz** de la Facultad de Química, UNAM.

Vocal **Dra. María Teresa Tusié Luna** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Vocal **Dra. Claudia González Espinosa** del Departamento de Farmacobiología, CINVESTAV.

Vocal **Dra. Angélica Zepeda Rivera** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Secretario **Dr. Félix Recillas Targa** del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

A los que se les reconoce y agradece su contribución en la revisión y discusión de este manuscrito.

ÍNDICE

Reconocimientos	2
Introducción	6
Obesidad y diabetes, un panorama general	6
Metabolismo energético	7
Almacenamiento y utilización de energía	7
Carbohidratos	7
Lípidos	8
Regulación genética del metabolismo	11
Control de la expresión genética	11
A) Proteínas de unión a RNA	11
Proteínas STAR/GSG.....	12
GLD-1.....	12
B) El RNA como regulador de la expresión genética	13
Los microRNAs	16
Mecanismos de regulación por miRNAs	17
microRNAs y la respuesta a estrés	21
microRNAs y metabolismo	22
Regulación del metabolismo de lípidos por microRNAs.....	24
Regulación del metabolismo de glucosa por microRNAs.....	24
C. <i>elegans</i> como modelo experimental	25
Anatomía del gusano.....	25
Ciclo de vida.....	26
Composición lipídica en <i>C. elegans</i>	29
Almacenamiento de lípidos.....	29
Métodos disponibles para el análisis de los niveles de lípidos.....	31
Rojo Nilo.....	31
Negro Sudán.....	32
Oil Red.....	33
Colorantes BODIPY.....	33
Microscopía CARS.....	34
Metabolismo energético en <i>C. elegans</i>	35
microRNAs conservados en el nemátodo.....	37
microRNAs y metabolismo en <i>C. elegans</i>	38
Antecedentes	40
Condiciones experimentales para el estudio del metabolismo en <i>C. elegans</i>	40
Restricción calórica y ayuno.....	40
Altos niveles de glucosa.....	41
Metabolismo de lípidos.....	41
Estudio de los microRNAs expresados diferencialmente en condiciones de ayuno	42
Distribución de los miRNAs en condiciones control y en ayuno en larvas L4.....	43
MicroRNAs expresados diferencialmente en condiciones control y en ayuno en larvas L4.....	44
miR-34	44
miR-35	45

Análisis de los niveles de expresión de <i>miR-35-3p</i> en condiciones control y en ayuno	47
Análisis de los niveles de expresión de los mRNAs de los genes <i>gld-1</i> y <i>lin-23</i> en condiciones control y en ayuno	48
Planteamiento del problema	49
Hipótesis	49
Objetivos	49
Objetivo general.....	49
Objetivos particulares	50
Material y Métodos	50
Cultivo de <i>C. elegans</i>	50
Evaluación fenotípica.....	50
Tamaño de los especímenes	50
Tinción con Rojo Nilo <i>in vivo</i>	51
Tinción con Negro Sudán	52
Tinción con Rojo Nilo (fijación)	53
Conteo de progenie	54
Obtención de los perfiles de expresión de los microRNAs	54
Amplificación Mediante RT-PCR (protocolo Stem-Loop)	54
Análisis de los niveles de expresión de mRNA de genes blanco	55
Ensayos de RT-PCR	55
Western Blot.....	55
Análisis de datos	55
Resultados y Discusión	56
Evaluación fenotípica.....	56
El tamaño de los gusanos cambia cuando se someten a una dieta con niveles elevados de glucosa.....	56
Tamaño y producción de huevecillos	56
Acumulación de lípidos	58
Obtención del perfil de expresión del <i>miR-34-3p</i>	62
Obtención del perfil de expresión del <i>miR-35-3p</i>	65
<i>lin-23</i> y <i>gld-1</i>	66
Conclusiones	75
Perspectivas	75
Apéndice	76
Etapas del desarrollo del nemátodo <i>C. elegans</i>	76
Anexo I.....	80
Buffers y soluciones	80
Buffer TAE 50X	80
Buffer de Fosfatos	80
PBS 10X.....	80
Cloruro de calcio 1M.....	80
Sulfato de Magnesio 1M.....	80
Buffer M9 isotónico.....	81

Buffer TBE 10X	81
Buffer TBS 10X	81
TBST 1X	81
Acrilamida al 30%	81
Persulfato de amonio (APS) al 10%	81
Paraformaldehído al 10%	82
Solución de azida de sodio al 10%	82
Medios de cultivo para <i>C. elegans</i>	82
Nematode Growth Medium (Condiciones Estándar)	82
Nematode Growth Medium (Aumento de glucosa)	82
Nematode Growth Medium (Aumento de colesterol)	83
Nematode Growth Medium (Aumento de glucosa y colesterol)	83
Preparación de <i>E. coli</i> OP50	83
Congelación de gusanos (para extracción de RNA)	84
Sincronización de gusanos	84
Preparación de placas de agarosa para montaje de los nemátodos	85
Extracción de RNAs pequeños de los gusanos	85
Purificación de microRNAs de <i>C. elegans</i>	86
Preparación de oligonucleótidos para RT (Protocolo Stem-Loop)	87
RT-PCR	87
Electroforesis en geles de agarosa (al 1%)	88
Electroforesis en geles de acrilamida (al 12%)	88
Western Blot	88
Tinciones	89
Tinción con Negro Sudán	89
Tinción con Rojo Nilo <i>in vivo</i>	90
Tinción con Rojo Nilo (fijación)	90
Anexo II	92
Secuencias de los oligonucleótidos	92
Anexo III - Análisis Estadístico	98
Evaluación fenotípica	98
Tamaño de los gusanos	98
Puesta de huevos	100
Tinción Negro Sudán	100
Marcaje <i>in vivo</i> con Rojo Nilo	101
Perfiles microRNAs	102
<i>miR-35-3p</i>	102
<i>miR-34-3p</i> y <i>5p</i>	105
Perfiles mRNAs	109
<i>gld-1</i>	109
<i>lin-23</i>	110
Bibliografía	116

Introducción

Obesidad y diabetes, un panorama general

Las proyecciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud indican que en los próximos 5 años aproximadamente 2,300 millones de adultos de 20 años o más tendrán sobrepeso y más de 700 millones de adultos serán obesos (“OMS | Obesidad y sobrepeso,” 2012). La obesidad se define como la acumulación excesiva de grasa corporal que puede ser perjudicial para la salud. Ocurre cuando hay un incremento del tejido adiposo y un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las gastadas. Los factores que contribuyen incluyen tanto al aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos que son ricos en grasas, sal y azúcares pero pobres en vitaminas, minerales y otros nutrientes, como a la disminución en la actividad física resultante del sedentarismo y de una creciente urbanización. El sobrepeso y la obesidad son el quinto factor principal de riesgo de defunción en el mundo, causando por lo menos 2.8 millones de muertes de personas adultas por año (“World Health Statistics Annual 2011,” 2011). Son considerados un factor de alto riesgo para las enfermedades crónicas, el 44% de la carga de diabetes, el 23% de la carga de cardiopatías isquémicas y entre el 7% y el 20% de la carga de algunos tipos de cáncer son atribuibles al sobrepeso y la obesidad y además, se han asociado a patologías pulmonares, dislipidemias, osteoartritis e hipertensión (Cummings & Schwartz, 2003; “OMS | Obesidad y sobrepeso,” 2012).

En el mundo hay 347 millones de personas diabéticas¹, la diabetes es una enfermedad crónica que se desarrolla 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, que con el tiempo daña órganos y sistemas (“OMS | Diabetes,” 2012).

Diversas hipótesis proponen que los individuos fueron maximizando su capacidad de almacenar energía para aumentar sus probabilidades de sobrevivir pues la grasa almacenada puede ser usada en periodos de ayuno. Sin embargo, en contraste con sus efectos benéficos durante estos periodos de bajo consumo energético, en periodos en los que hay exceso de energía, los ácidos grasos pueden inducir resistencia a la insulina, aunque no son el único factor que la provoca, ya que también puede ser causada por la acumulación de grasa directamente, pues el tejido adiposo es una fuente de adipocinas, las cuales son capaces de mediar la sensibilidad a insulina (Guenther, B., Markku, 2004).

La susceptibilidad a padecer diabetes o ser obeso, dependerá al menos en parte de los niveles de expresión de los genes responsables de la regulación del metabolismo de carbohidratos y de lípidos, pues ambos procesos contribuyen su desarrollo. Los microRNAs (miRNAs) han sido identificados, junto con los factores de transcripción, como los factores de regulación genética más numerosos en genomas de organismos multicelulares y el papel que desempeñan en procesos tan importantes como proliferación celular, diferenciación celular y desarrollo nos hace considerar su participación en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Esto es de suma importancia, pues podrían ser potencialmente un blanco terapéutico para el tratamiento de estas patologías (Martinelli et al., 2010; Sebastiani, Vendrame, & Dotta, 2011).

¹ Definición de persona con diabetes utilizada: Paciente con glucemia (en ayunas o medicado) ≥ 7.0 mmol/l.

Metabolismo energético

El metabolismo incluye todos los procesos bioquímicos que participan en la producción y liberación de energía y crecimiento. Estos procesos pueden ser anabólicos o catabólicos. Al final, toda la energía contenida en la ingesta de nutrientes se manifiesta como calor, trabajo o crecimiento, por lo tanto, el estado nutricional del cuerpo influye en la efectividad de los procesos metabólicos (Figura 1) (Boron & Boulpaep, 2005).

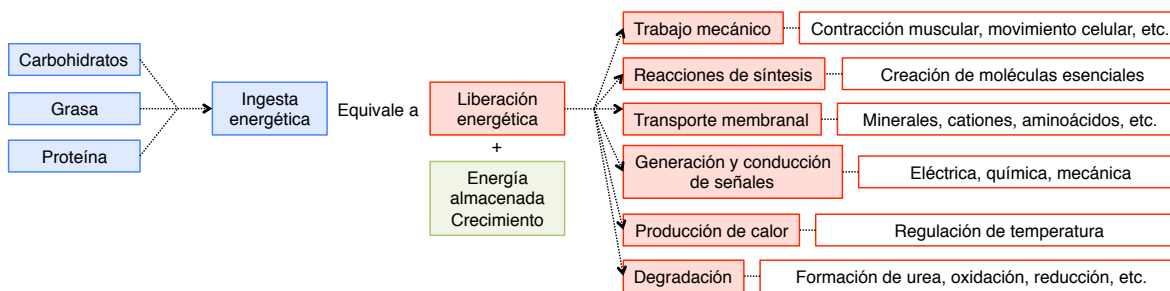


Figura 1. Balance energético. Los humanos adquieren su energía de los alimentos que ingieren, la almacenan y gastan en diversas formas; la ingesta debe balancear la suma de la liberación más el almacenamiento energético (Boron & Boulpaep, 2005).

Almacenamiento y utilización de energía

La capacidad de un organismo para regular la producción, almacenamiento y liberación de energía es vital para mantener un estado saludable y sobrevivir; debido a que la ingesta de energía es un proceso intermitente y que el gasto energético es continuo, los organismos requieren almacenar y repartir la energía que adquieren. Los alimentos contienen carbohidratos, lípidos, proteínas, minerales y vitaminas, los cuales se hidrolizan y se absorben; pero, cuando el uso de energía sobrepasa a la energía disponible proveniente de la dieta, el organismo toma la energía que tiene almacenada para satisfacer sus necesidades energéticas inmediatas (Hillgartner, Salati, & Goodridge, 1995; Jequier & Tappy, 1999).

Carbohidratos

Los carbohidratos tienen la fórmula química $(CH_2O)_n$ y se adquieren en la dieta en forma de monómeros como glucosa, fructosa y galactosa, y de dímeros como sacarosa y lactosa y carbohidratos complejos como el almidón. En el humano, el tracto intestinal rompe los carbohidratos digeribles y absorbe los productos; después de llegar al torrente sanguíneo, estos carbohidratos se almacenan en el hígado y en el músculo esquelético, en ambos casos la forma predominante de almacenaje es el glucógeno, un polímero de la glucosa. La síntesis del glucógeno a partir de la glucosa comienza con el transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática, ya sea en el hepatocito o en la célula de músculo esquelético; la elevación de los niveles de glucosa en sangre y el incremento subsecuente de insulina promueve esta entrada, una vez dentro de la célula, la glucosa se fosforila y se

convierte en glucosa-6-fosfato (G6P) en el citosol. Si la demanda metabólica es baja, la G6P se transforma en glucógeno (Figura 2) (Boron & Boulpaep, 2005; Katz, Wals, & Lee, 1991; Porporato, Dhup, Dadhich, Copetti, & Sonveaux, 2011).

Los carbohidratos contienen 4.1 kcal/g, el hígado contiene 75-100 g de glucógeno y el músculo esquelético 300-400 g, por lo tanto, un humano de 70 kg tiene aprox. 700 g de glucógeno, por lo que la energía almacenada en esta forma puede llegar a ser de 3000 kcal, lo cual es suficiente para mantener al metabolismo basal por un día asumiendo el 100% de eficiencia, sin embargo, esta forma de almacenamiento energético es esencial puesto que algunos tejidos, particularmente el cerebro, dependen totalmente de los carbohidratos para la obtención de energía (Katz et al., 1991).

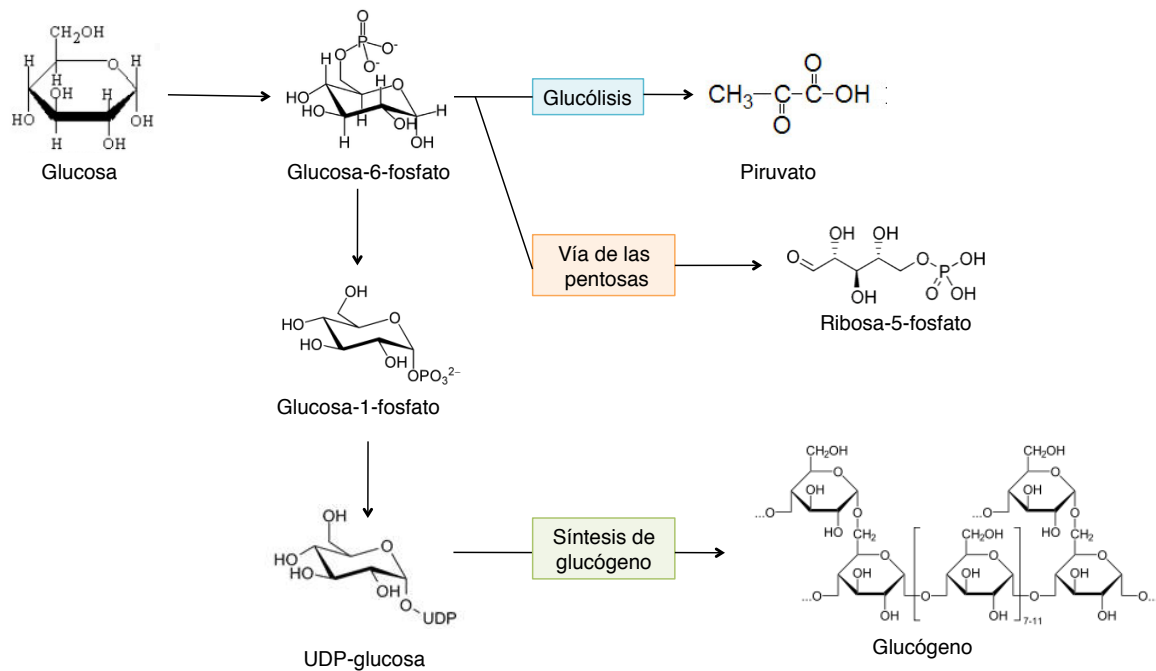


Figura 2. Metabolismo de la glucosa. Después de entrar a un hepatocito o a una célula de músculo esquelético, la glucosa se fosforila a glucosa-6-fosfato, la cual puede ingresar al proceso de glucólisis para generar piruvato, hacia la vía de las pentosas, o bien, puede ser utilizada para sintetizar glucógeno y así almacenar energía (Porporato et al., 2011).

Lípidos

Los lípidos son sustancias solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua. El tracto intestinal rompe los triglicéridos que se absorben como ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos se componen de cadenas largas de 14 a 24 carbonos, las cuales pueden ser saturadas o insaturadas, tienen además un grupo carboxilo terminal, siendo su fórmula general $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$. Las células epiteliales del intestino, o enterocitos permiten la entrada de los ácidos grasos a través de su membrana apical y es dentro de esta célula donde se esterifican para generar triglicéridos y fosfolípidos. El enterocito contiene entonces a los triglicéridos, al colesterol, a los fosfolípidos y a las apolipoproteínas en grandes agregados llamados quilomicrones, los cuales son llevados

hacia la superficie endotelial de los capilares del tejido adiposo, del músculo esquelético y del corazón, en donde se encuentran con la lipasa de lipoproteína (LPL) la cual hidroliza a los triglicéridos convirtiéndolos en ácidos grasos y glicerol (Figura 3) (Figura 4) (Auwerx & Staels, 1998; Gaudet et al., 2013; Koretsky, 1995).

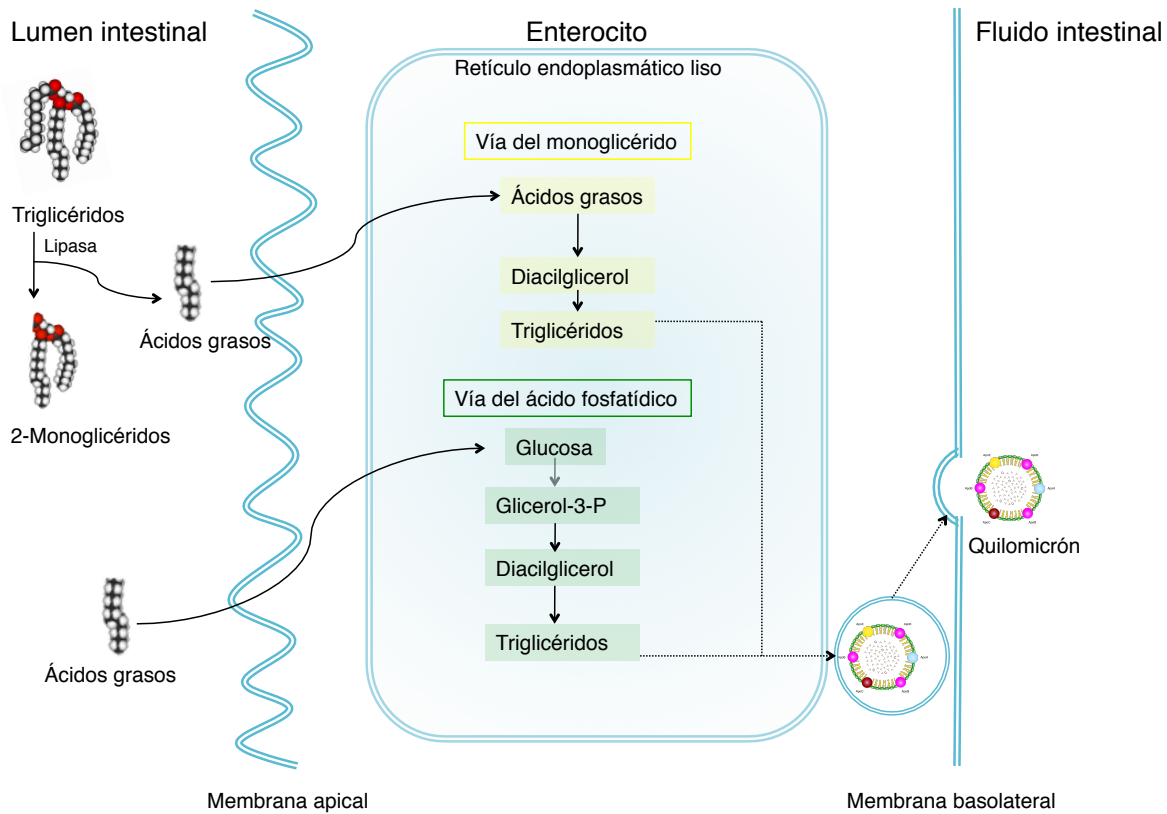


Figura 3. Absorción y re-esterificación de los triglicéridos en el intestino. La lipasa pancreática rompe a los triglicéridos convirtiéndolos en ácidos grasos y 2-monoglicéridos en el lumen del intestino delgado. Estos productos entran al enterocito, el cual los re-esterifica mediante las vías del monoglicérido o del ácido fosfatídico. Los triglicéridos resultantes se empaquetan en quilomicrones los cuales entran a la linfa y finalmente, al torrente sanguíneo (Boron & Boulpaep, 2005).

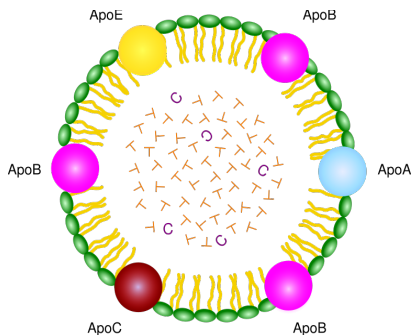


Figura 4. Estructura de un quilomicrón. Las apolipoproteínas representadas como (ApoA, ApoB, ApoC, ApoE), triglicéridos como (T), colesterol como (C) y en verde se muestran los fosfolípidos (Gaudet et al., 2013).

Los ácidos grasos entran a los adipocitos, al músculo y a los hepatocitos. Los adipocitos y las células musculares esterifican a los ácidos grasos hacia glicerol para formar

monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. Los lípidos se almacenan principalmente como triglicéridos en el tejido adiposo y en el músculo esquelético, y en todas las células, como fosfolípidos de membrana. En los hepatocitos, los ácidos grasos se llevan hacia β -oxidación o bien, convertidos en triglicéridos para almacenamiento.

El glicerol que se libera por acción de la LPL entra a los hepatocitos donde es convertido a glucosa en el proceso de gluconeogénesis o en piruvato por medio de la glucólisis. Los productos finales de la hidrólisis de la LPL son los quilomicrones que no tienen triglicéridos, estos quilomicrones entran entonces a los hepatocitos por endocitosis, e hidrolizan las grasas de estas estructuras utilizándolas como fuente de energía o convirtiéndolas en lipoproteínas de muy baja densidad, para su transporte en sangre u otros tejidos (Figura 5).

Los lípidos son el depósito que concentra la mayor cantidad de energía pues proveen 9.4 kcal/g. La grasa ha evolucionado para ser el depósito de energía por excelencia. La mayor cantidad de grasa corporal se concentra en el tejido adiposo subcutáneo, y en menor cantidad en el músculo y en depósitos viscerales. Un humano de 70 kg con 20% de grasa corporal (14 kg) tiene 131,000 kcal de energía almacenada en el tejido adiposo, si se asume un 100% de eficiencia para convertir a la grasa en energía el metabolismo podría mantenerse por 63 días (Boron & Boulpaep, 2005).

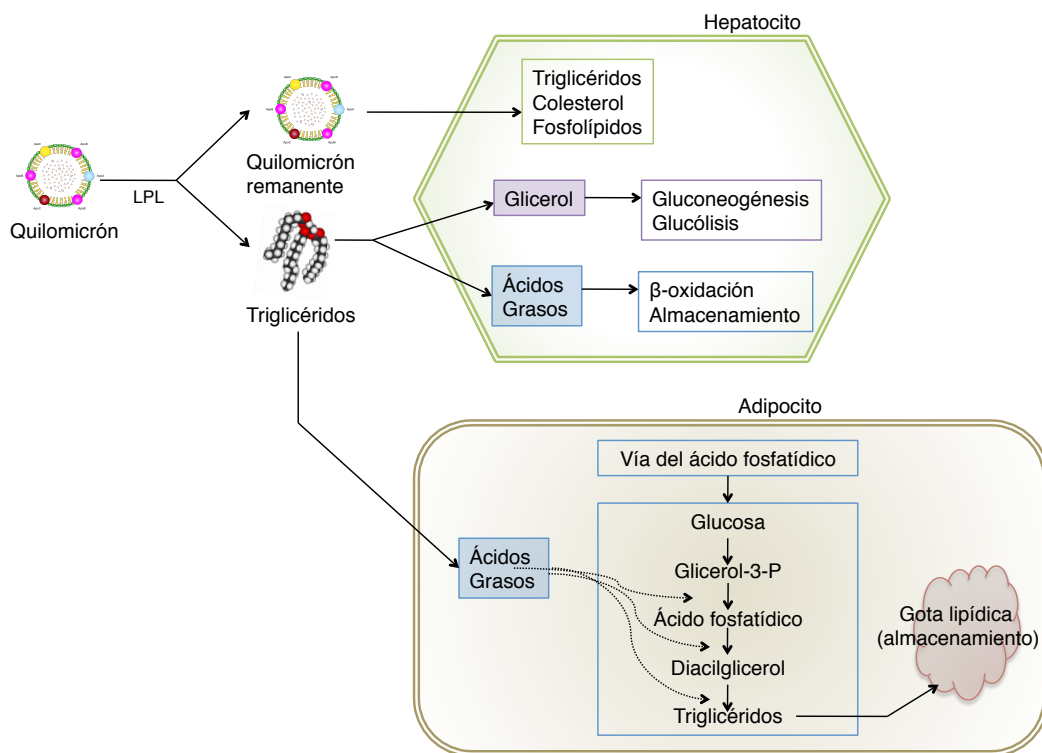


Figura 5. Utilización y almacenamiento de los lípidos ingeridos en la dieta en humanos. La LPL en los capilares rompe a los triglicéridos que están dentro de los quilomicrones convirtiéndolos en ácidos grasos y glicerol. Los adipocitos vuelven a esterificar a los ácidos grasos para convertirlos en triglicéridos, los cuales se almacenan en gotas lipídicas. Los hepatocitos toman a los quilomicrones remanentes por endocitosis, así como a los ácidos grasos y glicerol provenientes de la ruptura de los triglicéridos, los cuales serán utilizados en procesos metabólicos (Gaudet et al., 2013).

Existen interconversiones entre las moléculas que se ingieren en la dieta, por ejemplo, un exceso en la ingesta de carbohidratos puede ser almacenado como triglicéridos en el tejido adiposo (lipogénesis), también los aminoácidos ingeridos pueden ser convertidos en triglicéridos o glucosa. Sin embargo, un exceso en la ingesta de lípidos se almacena en el tejido adiposo en forma de triglicéridos, ya que los humanos no pueden convertir los ácidos grasos ni en glucógeno ni en proteínas (Boron & Boulpaep, 2005; Gaudet et al., 2013).

Regulación genética del metabolismo

Los requerimientos energéticos varían entre individuos y dependen de factores como la eficiencia con la que se usa la energía y la actividad física diaria. Las diferencias entre la eficiencia del uso de energía dependen en parte de factores genéticos. La regulación metabólica en organismos complejos tiene varios tipos de control, entre los que se encuentran el control alostérico clásico de la actividad de las enzimas que participan en las vías metabólicas; las modificaciones post-traduccionales como fosforilaciones, glicosilaciones, acetilaciones, etc.; la regulación traduccional, la cual afecta a los niveles de expresión de las proteínas claves del metabolismo y el control post-transcripcional donde participan moléculas como los RNAs pequeños.

El control transcripcional depende de las señales específicas que van al núcleo celular, de los mecanismos moleculares de los factores de transcripción que participan de manera específica y, de los eventos que ocurren como consecuencia de la transcripción de un gen determinado. Los cambios en los niveles de glucosa influyen a la expresión de diferentes genes directamente o mediante la producción de insulina por las células β pancreáticas. Algunos genes blanco tienen relación con procesos como el transporte de glucosa, síntesis de glucagón, etc. La regulación de los genes que participan en el metabolismo de ácidos grasos es considerada como un mecanismo de regulación a largo plazo, se lleva a cabo por una variedad de factores de transcripción como los SREBPs (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins), los cuales participan en la síntesis de colesterol y la toma y biosíntesis de ácidos grasos o los C/EBPs (CCAAT-enhancer-binding protein) los cuales se encuentran en células como los hepatocitos, adipocitos, etc., y controlan genes esenciales de procesos metabólicos como la adipogénesis (Boron & Boulpaep, 2005; Desvergne, Michalik, & Wahli, 2006; Rottiers & Näär, 2012; Salway, 2004).

Control de la expresión genética

A) Proteínas de unión a RNA

La regulación post-transcripcional de la expresión genética es un mecanismo conservado que permite modular la cantidad de proteína que hay en una célula eucarionte, esto tiene un efecto importante en el metabolismo, ya que controla la localización y los tiempos de las vías implicadas en el mismo. Este proceso puede darse mediante la unión de complejos específicos RNA-proteína a las regiones no traducidas de los mensajeros blanco (Beuck et al., 2010). Por lo tanto, las proteínas de unión a RNA (RBPs; RNA-binding proteins) son capaces de regular la expresión de genes cruciales en el

metabolismo, en el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis ya que estas proteínas regulan múltiples aspectos del metabolismo del mRNA (Wang et al., 2009; Wright et al., 2011).

Proteínas STAR/GSG

La familia de proteínas STAR/GSG (STAR/GSG; Signal Transduction and Activation of RNA/ GRP33, Sam68, GLD-1) está conformada por proteínas de regulación que son capaces de unir moléculas de RNA. Se han encontrado conservadas en varios eucariontes superiores. Entre estos se encuentran los nemátodos, las moscas y los ratones (Biedermann, Hotz, & Ciosk, 2010; Jan, Motzny, Graves, & Goodwin, 1999). Las proteínas STAR participan en procesos como la espermatogénesis, el desarrollo del sistema nervioso de los metazoarios y el desarrollo de las alas en *Drosophila* (Chénard & Richard, 2008; Matter, Herrlich, & König, 2002).

Se caracterizan por tener un dominio de 200 aminoácidos altamente conservado llamado STAR, que consiste en un dominio KH (KH; heteronuclear ribonucleoprotein particle K Homology) que se encuentra flanqueado por dos regiones homólogas llamadas QUA1 y QUA2, el subdominio QUA1 es el que permite la homodimerización de estas proteínas, mientras que el dominio QUA2 en conjunto con el KH permiten la unión del RNA (Figura 6) (Ryder & Williamson, 2004). Y, aunque las bases estructurales de la unión al RNA aún no se conocen, el hecho de que el dominio STAR esté altamente conservado sugiere que participa en el mecanismo de reconocimiento (Beuck et al., 2010).

Además de su capacidad de unir RNA, se ha descrito que las proteínas STAR tienen un papel en la transducción de señales pues tienen regiones ricas en prolina, dominios SH3- y WW, así como una cola de tirosinas en su extremo carboxilo terminal (Chen, Damaj, Herrera, Lasko, & Richard, 1997).

GLD-1

La proteína GLD-1 es una proteína prototipo de la familia STAR capaz de reprimir la traducción de ciertos mensajeros. Se ha visto que se asocia directamente a cientos de transcritos mediante secuencias que se encuentran en la región 3' UTR de los mensajeros blanco; el subdominio KH-QUA2 es suficiente para que GLD-1 se una al RNA aunque la falta del subdominio QUA1 reduce considerablemente la afinidad por su secuencia de unión (Figura 6) (Beuck et al., 2010; Jan et al., 1999; Scheckel, Gaidatzis, Wright, & Ciosk, 2012). Se ha reportado que la proteína GLD-1 participa en el almacenamiento del RNA mensajero y, debido a que los mensajeros estables codifican para proteínas críticas para diferentes procesos como el metabolismo y el desarrollo, y, a que su estabilidad es importante para que se acumulen eficientemente, se puede entender la importancia que tiene esta proteína (Scheckel et al., 2012; S. Zhang, Williams, Wormington, Stevens, & Peltz, 1999).

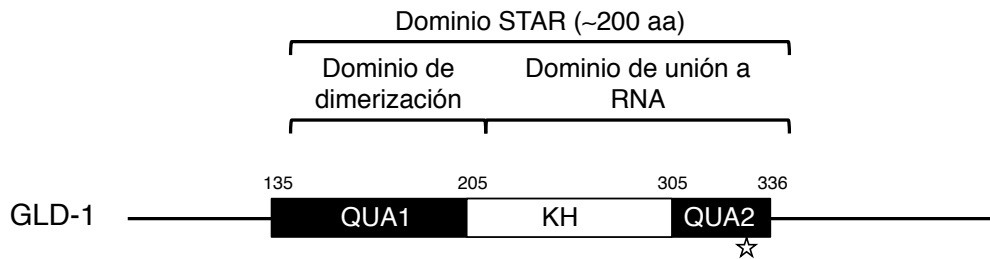


Figura 6. Estructura de la proteína GLD-1, miembro de la familia de proteínas STAR. Se muestran los dominios descritos; la estrella en el dominio QUA2 representa una variación interna de 3 aminoácidos causada por splicing alternativo (Beuck et al., 2010).

B) El RNA como regulador de la expresión genética

Análisis recientes han revelado que el 80-98% del genoma humano se transcribe pero sólo el 1.4% de estos transcritos codifica para proteínas; el 98% de los transcritos restantes permanecen en forma de RNA no codificante (ncRNA) (Gerstein et al., 2010)

El RNA es la molécula central en la expresión genética pues sirve como mensajero. También es central en procesos de catálisis y puede unirse a distintos metabolitos. Evolutivamente hablando, el repertorio de genes que codifican para proteínas ha permanecido relativamente estático, mientras que la cantidad de secuencias no codificantes ha aumentado significativamente junto con la complejidad de los organismos, esta observación se basa en la evidencia que se ha encontrado de la funcionalidad de estos transcritos (Amaral & Mattick, 2008).

Los ncRNAs pueden dividirse en infraestructurales y reguladores, los infraestructurales se expresan constitutivamente e incluyen a los RNAs ribosomales (rRNAs), RNAs de transferencia (tRNAs) y a los RNAs pequeños nucleares (snRNAs). Los ncRNAs reguladores se han clasificado en Piwi-Interacting RNAs (piRNAs), RNAs de interferencia pequeños (siRNAs), RNAs largos no codificantes (lncRNAs), RNAs asociados a promotores (PARs), RNAs “enhancers” (eRNAs), RNAs pequeños temporales (stRNAs) y los microRNAs (miRNAs), todos estos elementos pueden controlar la expresión de RNAs mensajeros blancos creando una respuesta a la señal de una serie de complejas redes celulares entrelazadas (Tabla 1) (Cech, 2010; Kaikkonen, Lam, & Glass, 2011; Ponting, Oliver, & Reik, 2009). En organismos vertebrados, se producen miles de estas moléculas, y resulta importante caracterizar sus blancos y sus funciones, ya que el entendimiento de la biología de estos RNAs no codificantes nos ayudará a comprender procesos biológicos globales (Neilson & Sharp, 2008).

Tabla 1. Tipos de ncRNAs en células eucariontes, características y funciones

Tipo	Nombre	Longitud (nt)	Características	Funciones
piRNA	PIWI - interacting RNA	24 - 31	<p>Pueden formar complejos con las proteínas PIWI que pertenecen a la familia Argonauta.</p> <p>Tienen una modificación 2'-O-metil en su extremo 3' y una uridina en su extremo 5'.</p> <p>Son complementarios a una variedad de secuencias repetitivas y transposones (Kaikkonen et al., 2011).</p>	<p>Participan suprimiendo la actividad de los elementos transposones durante el desarrollo de la línea germinal en <i>Drosophila</i> (Aravin et al., 2003).</p> <p>En mamíferos también participan en el silenciamiento de transposones durante la espermatogénesis (Kuramochi-Miyagawa et al., 2008).</p> <p>En células somáticas participan regulando al ciclo celular, como se observó en un modelo murino (Quiling Wu, 2010).</p>
siRNA	Small Interfering RNA	20 - 24	<p>RNAs de doble cadena con dos nucleótidos sin aparear en sus extremos 3'.</p> <p>Sus funciones efectoras ocurren en el citoplasma en conjunto con las proteínas Argonauta (Carthew & Sontheimer, 2009; Voinnet, 2002).</p>	<p>Un apareamiento perfecto con sus blancos los lleva a un corte endonucleolítico, un apareamiento no perfecto con sus blancos los lleva a represión traduccional o degradación exonucleolítica (Fire, A., 1998)</p> <p>Induce la formación de heterocromatina (Carthew & Sontheimer, 2009).</p> <p>Provoca silenciamiento del mismo locus del que se derivan (Grewal, 2010).</p>
PAR	Promoter-associated RNA	16 - 200	<p>RNAs de cadena sencilla, expresados a bajos niveles y con una vida media muy corta (Kapranov et al., 2007).</p>	<p>Pueden activar o reprimir la transcripción de sus blancos, los mecanismos que usan este tipo de RNAs aún no son dilucidados pero se ha encontrado que pueden ser por medio de modificaciones a la cromatina (Han, Kim, & Morris, 2007; Morris, Santoso, Turner, Pastori, & Hawkins, 2008).</p>
eRNA	"Enhancer" RNA	100 - 9000	<p>RNAs de cadena sencilla, producidos bidireccionalmente de regiones "enhancer" enriquecidas para PolIII y coactivadores como p300.</p> <p>Tienen una vida media corta y sus secuencias están conservadas, su expresión correlaciona positivamente con la expresión sus mRNAs blanco (De Santa et al., 2010).</p>	<p>Aún no se han dilucidado sus mecanismos de funcionamiento, pero se especula que funcionan como activadores transcripcionales y su actividad parece ser secuencia específica (Ørom et al., 2010).</p>

lncRNA	Long non-coding RNA	> 200	Son en su mayoría RNAs nucleares aunque hay algunos subgrupos localizados en el citoplasma. No están evolutivamente conservados a excepción de los RNAs no codificantes largos intergénicos (lincRNAs). Están sujetos a modificaciones por splicing, poliadenilación y modificaciones post-traduccionales (Ponting et al., 2009).	Remodelación de la cromatina, regulación transcripcional, regulación post-transcripcional, splicing, localización de factores de transcripción, son precursores de los siRNAs, son componentes de los organelos nucleares (Kaikkonen et al., 2011; Ponting et al., 2009; Wilusz, Sunwoo, & Spector, 2009).
stRNA	Short temporal RNA	~ 70	RNAs de cadena sencilla, parcialmente complementarios a sus RNAs blanco, altamente conservados entre especies (Voinnet, 2002).	Inhiben el inicio de la traducción (Kaikkonen et al., 2011; Voinnet, 2002).
miRNA	microRNA	20 - 24	RNAs de cadena sencilla, parcial o totalmente complementarios a sus mRNAs blanco, conservados entre especies (Voinnet, 2002).	Puede llevar a degradación a sus mRNAs blancos, bloqueo de la traducción, etc. (Neilson & Sharp, 2008). Las funciones de este tipo de RNAs serán detalladas más adelante en el texto.

Los microRNAs

Los microRNAs son moléculas de RNA no traducidas que se encuentran codificadas en el genoma, miden aproximadamente 21-24 nucleótidos y son capaces de regular los niveles de expresión de sus genes blanco, pues los mensajeros blanco contienen secuencias complementarias a los microRNAs. Estas moléculas se expresan en una amplia variedad de organismos, desde plantas hasta gusanos y humanos, y muchos están conservados entre especies. Se encontró que más de un tercio de los microRNAs identificados en *C. elegans* tienen homólogos en el humano. Se ha predicho que en mamíferos el 50% de los genes que codifican para proteínas se encuentra bajo el control de los microRNAs. Estudios funcionales indican que participan en todos los procesos celulares que se han investigado hasta el momento, es importante señalar se han asociado cambios en su expresión con algunas patologías como el cáncer (Bartel, Lee, & Feinbaum, 2004; Krol, Loedige, & Filipowicz, 2010; Lim et al., 2003; Pillai, 2005). La investigación pionera en el campo de los microRNAs y sus funciones se realizó precisamente en el nemátodo *C. elegans*. Fue en este organismo en el que se descubrieron los dos primeros microRNAs que fueron caracterizados *lin-4* y *let-7* (Chalfie, Horvitz, & Sulston, 1981). En el genoma del *C. elegans* se han encontrado alrededor de 300 genes que codifican para microRNAs y se estima que este número aún puede aumentar (Grad et al., 2003; Lim et al., 2003).

Los microRNAs se procesan a partir de moléculas precursoras llamadas pri-microRNAs, las cuales se transcriben por la RNA polimerasa II a partir de genes independientes. También pueden estar en los intrones de genes que codifican para proteínas, y, algunos de ellos se encuentran agrupados en transcritos policistrónicos, lo que permite una expresión coordinada de los mismos. Los pri-microRNAs generalmente se transcriben como moléculas poliadeniladas de aproximadamente 1 kb de longitud, y adquieren una estructura de tallo-asa al plegarse sobre sí mismos para poder actuar como sustratos de dos enzimas de la familia de las RNAsas III, llamadas Drosha y Dicer. El producto que se obtiene del corte de Drosha es otro precursor del microRNA llamado pre-microRNA, esta es una molécula de ~70 nucleótidos con estructura de tallo-asa blanco de la Exportina 5 y por tanto es exportado del núcleo al citoplasma donde es procesada por Dicer. Esta enzima remueve la región que forma al asa del pre-microRNA y genera un segmento de doble cadena de 21-24 nucleótidos. Una de las hebras de este segmento se incorpora al Complejo de Silenciamiento Inducido por microRNA (miRISC), uno de los componentes principales de este complejo son las proteínas Argonauta, las cuales pueden unirse directamente al microRNA; ya como parte de este complejo, los microRNAs pueden unirse a sus mensajeros blanco e inducir su represión transcripcional o su degradación. En animales, el apareamiento puede ser parcial entre el microRNA y el RNA mensajero blanco y normalmente resulta en una menor expresión de la proteína, a través de una variedad de mecanismos que incluyen la degradación del mensajero y la represión traduccional. Se ha visto que las plantas también pueden usar control transcripcional como mecanismo para el silenciamiento de sus blancos. En cualquier organismo estudiado hasta el momento se ha visto que si la secuencia del microRNA y de su sitio blanco son totalmente complementarias el mensajero blanco será degradado si una proteína Argonauta activa se encuentra unida. Es importante tener en cuenta que en todo este proceso participan cofactores, proteínas accesorias y proteínas reguladoras que resaltan la importancia del control preciso que debe existir sobre el proceso (Figura 7) (Bracht, Hunter, Eachus, Weeks, & Pasquinelli, 2004; Grishok et al., 2001; Krol et al.,

2010; Y. Lee, Jeon, Lee, Kim, & Kim, 2002; Pasquinelli, 2012; Yi, Qin, Macara, & Cullen, 2003).

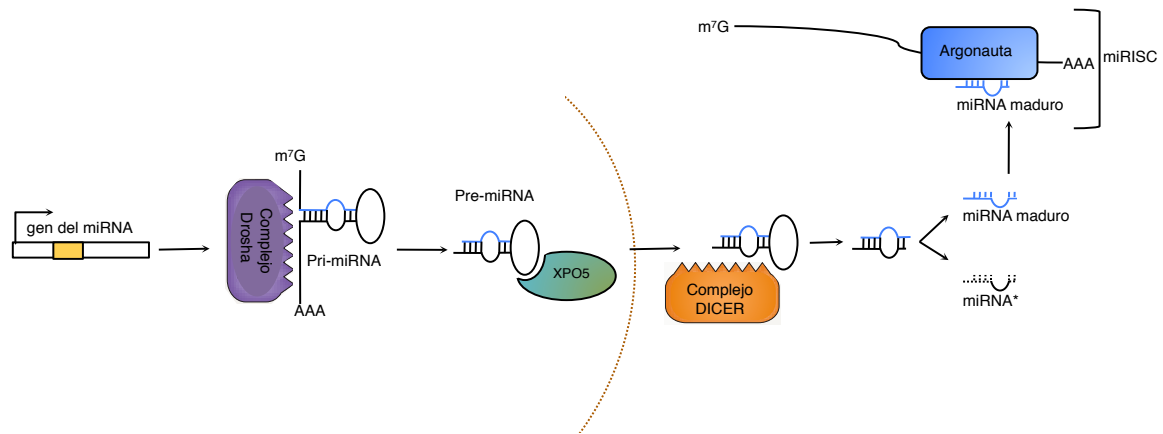


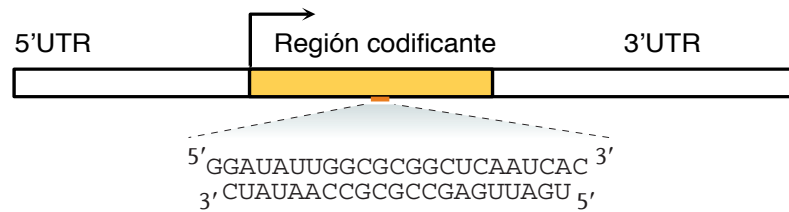
Figura 7. Biogénesis de los microRNAs. En animales, los genes de los microRNAs se transcriben como pri-microRNAs que son procesados hasta pre-microRNAs por Drosha, los pre-microRNAs son exportados por la Exportina 5 (XPO 5) y procesados en citoplasma por Dicer, una de las hebras se une entonces al complejo de silenciamiento inducido por microRNAs (miRISC) que unirá al mensajero para su regulación, la otra hebra del duplex se degradará. En plantas, el proceso es similar excepto que la proteína Dicer-like (DCL) lleva a cabo ambos cortes en el núcleo (Modificada de Pasquinelli, 2012).

Mecanismos de regulación por miRNAs

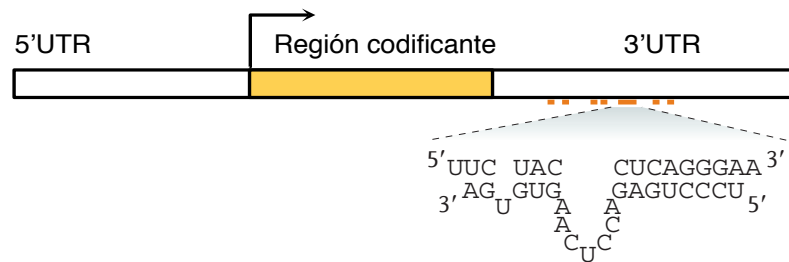
1) Reconocimiento de los blancos

La regulación de la expresión de los genes blanco de los microRNAs ocurre predominantemente a nivel post-transcripcional. Inicialmente, los blancos son seleccionados mediante apareamiento Watson-Crick de bases complementarias entre el microRNA cargado en el complejo miRISC y el mensajero blanco. El hecho de que sólo requieran ser parcialmente complementarios a sus blancos les permite regular a múltiples mensajeros; su tamaño pequeño limita la información que se podría obtener de su secuencia con respecto a la especificidad que tienen y la función que desempeñarán, sin embargo, se ha encontrado un motivo común: se ha visto un apareamiento entre el mensajero y los nucleótidos 2 y 7 en el extremo 5' del microRNA, esta región se conoce como la región semilla y en algunos contextos experimentales se ha visto que es necesaria y suficiente para la regulación del blanco. También hay casos en los que existe un apareamiento imperfecto en el extremo 5' que puede ser compensado con interacciones abundantes en el extremo 3', y recientemente se han descrito sitios centrales en los que los nucleótidos del centro del microRNA son los que forman uniones contiguas con el blanco. Es importante mencionar que se han descrito sitios de unión funcionales que no encajan en ninguna de las categorías descritas, esta flexibilidad sugiere que hay factores adicionales al apareamiento de bases que se requieren para generar interacciones funcionales *in vivo* para la regulación de los mensajeros (Figura 8) (Pasquinelli, 2012).

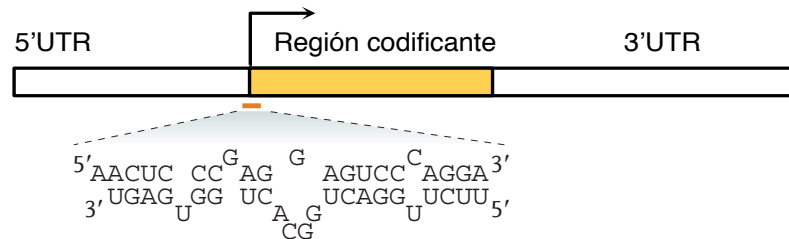
a) *Arabidopsis thaliana*



b) *C. elegans*



c) *Mus musculus*



d) Humano

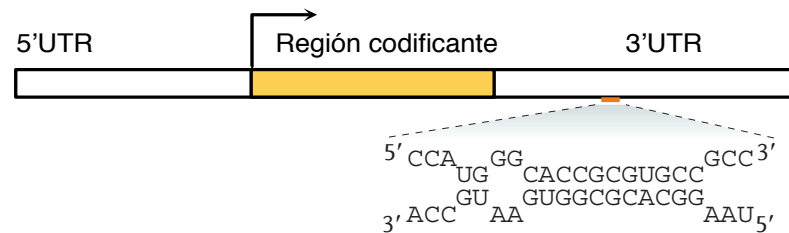


Figura 8. Ejemplos de sitios blanco funcionales de diferentes microRNAs.

a) En plantas los microRNAs tienen un apareamiento casi perfecto con sus blancos, se observa como ejemplo el sitio de unión del *miRNA-171* en la región codificante del mensajero del gen *SCL6-III* de *Arabidopsis thaliana*.

b) En animales es más frecuente el apareamiento parcial entre los microRNAs y sus blancos. Se observa un ejemplo de región semilla, los nucleótidos 2-7 del microRNA *lin-4* se unen a la región 3' UTR del mensajero del gen *lin-14* de *C. elegans*. Las líneas adicionales indican otros sitios blanco de *lin-4*, no todos tienen región semilla.

c) En animales se ha visto también regulación de los mensajeros si éstos tienen sitios de unión a microRNAs en sus regiones codificantes, como es el caso del gen *oct4* de *Mus musculus* que puede unirse al *miRNA-470*.

d) Se observa la unión de la región central de la secuencia del *miRNA-124* con su mensajero blanco, el sitio de unión se encuentra en la región 3' UTR del gen *raptor* de humano (Modificada de Pasquinelli, 2012).

2) Degradación de los blancos

En células animales se ha caracterizado un mecanismo en el cual el microRNA dirige a sus blancos hacia una vía de degradación 5'-3' de mensajeros, donde el mensajero pierde primero su cola de adeninas en el extremo 3' por acción de un complejo de desadenilasas y después pierde el CAP en el extremo 5', lo que lo llevará a ser degradado por exonucleasas en el citoplasma. El papel de cada una de estas proteínas ha sido demostrado al observarse que la cantidad de mensajeros blanco aumenta cuando estos factores se depletan (Figura 9) (Eulalio et al., 2009; Huntzinger & Izaurralde, 2011; Rehwinkel, Behm-ansmant, Gatfield, & Izaurralde, 2005; Schmitter et al., 2006).

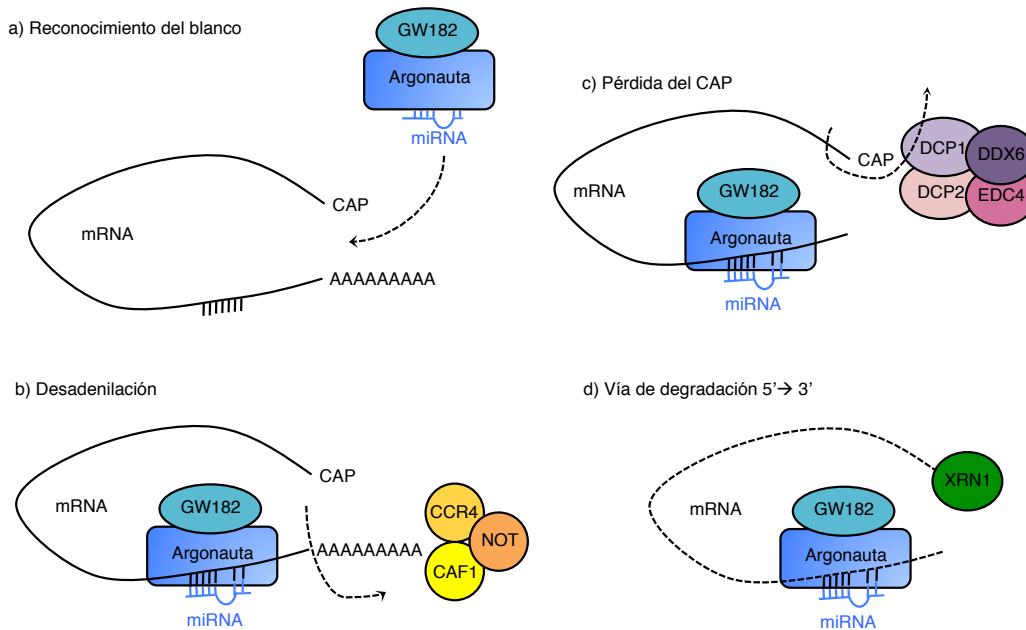


Figura 9. Degradación de mensajeros blanco en células animales. a) El microRNA unido a las proteínas Argonaua y GW182 es capaz de reconocer a sus mensajeros blanco mediante apareamiento de bases parcialmente complementarias. b) Los componentes del complejo de proteínas desadenilasas CAF1, CCR4 y NOT remueven la cola de adeninas del mensajero, este proceso es mediado por el complejo GW182-Argonaua c) La enzima DCP2 es activada por factores como DCP1, DDX6 y EDC4 para remover el CAP del extremo 5' del mensajero, este proceso es dependiente del tipo celular y/o blanco específico. d) Los mensajeros que pierden su CAP son rápidamente degradados en el citoplasma por la enzima XRN1, una exonucleasa 5'-3' (Huntzinger & Izaurralde, 2011).

3) Regulación a nivel traduccional

a) Represión

Hay casos en animales y plantas en los que los microRNAs son capaces de reducir los niveles de las proteínas blanco, pero no de su mensajero, esto sugiere que se lleva a cabo una represión a nivel traduccional. Hay evidencia de inhibición del inicio y de la elongación de la traducción, así como de proteólisis dirigida al péptido que está siendo sintetizado a partir del mensajero blanco (Humphreys, Westman, Martin, & Preiss, 2005; Petersen, Bordeleau, Pelletier, & Sharp, 2006).

Para el caso de los animales, un mensajero es apto para ser traducido si tiene la estructura CAP en su extremo 5' y la cola de adeninas en su extremo 3' pues los factores que se asocian a estas estructuras provocan que el mensajero adopte una estructura circular quedando protegido de la degradación y además, esta estructura es eficientemente traducida; hay evidencia que indica que los microRNAs interfieren con estos factores, particularmente con el complejo eIF4F y con la proteína PABPC, que son los que se asocian con el CAP y con la cola de adeninas, respectivamente, comprometiendo así la estructura y la estabilidad del mensajero. Se ha descrito otro mecanismo, en el cual el complejo CCR4-NOT es reclutado por la proteína GW182, para remover la cola de adeninas del extremo 3' del mensajero blanco, comprometiendo de igual manera su estructura e inhibiendo así el inicio de la traducción. La represión traduccional también puede ser inducida por el complejo miRISC un paso después del inicio ya que este complejo es capaz de quitar al ribosoma que se encuentra posicionado sobre el mensajero y además se ha visto que puede estimular la proteólisis del péptido recién sintetizado (Figura 10) (Braun, Huntzinger, Fauser, & Izaurralde, 2011; Huntzinger & Izaurralde, 2011; Jackson, Hellen, & Pestova, 2010).

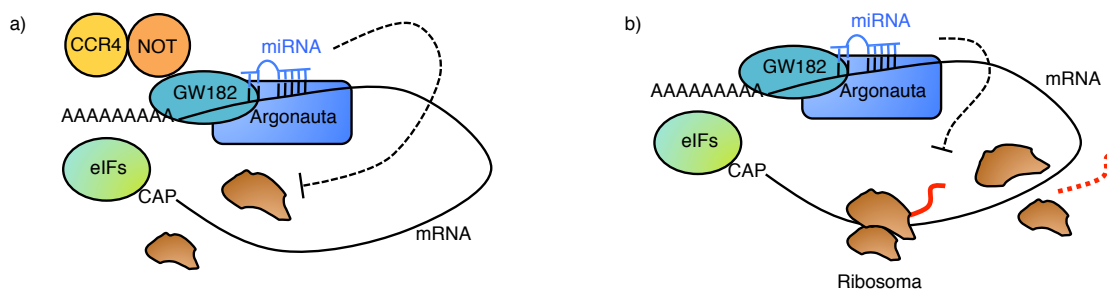


Figura 10. Represión a nivel traduccional mediada por microRNAs a) El complejo miRISC lleva a cabo la inhibición del inicio de la traducción, al reclutar al complejo CCR4-NOT se impide el posicionamiento del ribosoma, mostrado en color café. b) La inhibición de la elongación de la traducción es causada por el complejo miRISC, ya que remueve al ribosoma posicionado sobre el mensajero y causa la proteólisis del péptido recién sintetizado mostrado en color rojo (Braun et al., 2011).

b) Activación

Se ha observado que los microRNAs son también capaces de estimular la traducción de sus mensajeros blanco; por ejemplo, los complejos microRNA-Argonata pueden inducir la traducción de mensajeros específicos en células de mamífero si éstas se encuentran en estado quiescente, lo que se probó en un modelo de *Xenopus laevis*. Se ha reportado además que hay secuencias ARE (AU-rich elements; elementos ricos en adenilato-uridilato) que están conservadas en las regiones 3' no traducidas de algunos mensajeros, y que controlan la expresión del gen de forma post-transcripcional, ya que a estas secuencias pueden unirse factores que activan la traducción. Esta unión está dirigida por microRNAs: esto se describió en un modelo de células HEK293 en donde la unión y activación de la traducción ocurre si el ciclo celular se encuentra en arresto. En un modelo de células de ratón, se describió la asociación de un microRNA (el *miR-10a*) con la región 5' no traducida de mensajeros que codifican para proteínas ribosomales, induciendo de esta manera su traducción (Mortensen, Serra, Steitz, & Vasudevan, 2011; Ørom, Nielsen, & Lund, 2008; Vasudevan, Tong, & Steitz, 2007).

microRNAs y la respuesta a estrés

El estrés celular puede definirse como la respuesta de la célula a la amenaza de daño macromolecular. Comprende un mecanismo evolutivo altamente conservado que protege a las células de cambios ambientales súbitos o fluctuaciones frecuentes de factores ambientales (Kültz, 2003). La respuesta al estrés se asocia con aspectos esenciales del procesamiento y estabilidad de proteínas y DNA; el estado al que las células se desvían puede causar un desbalance metabólico (Leung & Sharp, 2010). Dependiendo de la severidad y la duración del estrés, las células pueden reestablecer su estado previo de homeostasis o bien, adoptar un estado alterado en el nuevo ambiente, estas respuestas al estrés son mediadas por varios mecanismos como, por ejemplo, el arresto del crecimiento celular, la rápida eliminación de macromoléculas dañadas o la activación de ciertos programas de expresión de genes e incluso, la muerte celular cuando las células ya no pueden lidiar con el daño excesivo causado por el estrés (Kültz, 2005).

Los microRNAs tienen varias propiedades que los hacen candidatos ideales para defender al organismo durante el estrés: estratégicamente regulan los pasos finales en la traducción, pueden controlar la estabilidad de numerosos mensajeros blanco que se encuentran presentes antes del estrés y entonces, cuando el estrés pase, la célula pueda ser programada para comenzar múltiples procesos correctivos y asegurar así la sobrevivencia; los microRNAs pueden aumentar o disminuir la expresión de genes, dependiendo de la asociación con otras proteínas de unión a RNA y pueden unir múltiples blancos ya que no requieren ser totalmente complementarios y, por tanto, puede potencialmente haber un cambio en los blancos particulares que regulan durante el estrés (Leung & Sharp, 2007; van Rooij et al., 2007).

Varios estudios de inactivación han revelado que algunos microRNAs son dispensables para el desarrollo o viabilidad de los organismos en condiciones normales, sin embargo, cuando los organismos se someten a condiciones de estrés la falta de microRNAs específicos se ve reflejada en un fenotipo alterado, por ejemplo, las moscas que no tienen *miR-7* no desarrollan bien los ojos cuando hay temperaturas cambiantes (X. Li, Cassidy, Reinke, Fischboeck, & Carthew, 2009). La inactivación del *miR-8* impide la respuesta a estrés osmótico como se observó en un modelo de pez cebra (Flynt et al., 2009) y los

ratones que no tienen *miR-208* no pueden hacer frente a sobrecargas cardíacas (Van Rooij et al., 2007). Por lo tanto, a pesar de que las mutaciones en distintos microRNAs pueden resultar aparentemente normales, los organismos pueden exhibir crisis fenotípicas en condiciones de estrés. Otros ejemplos específicos que denotan la participación de los microRNAs en condiciones de estrés son los microRNAs *miR-34a*, *miR-34b* y *miR-34c* cuya expresión se induce cuando hay daño a DNA (Wong, Yu, Walsh, & Yang, 2011) y *miR-399* que se induce en plantas cuando enfrentan falta de fosfato (Franco-Zorrilla et al., 2007).

Se ha visto que en condiciones de estrés, una subpoblación tanto de los microRNAs, como de los blancos y de las proteínas Argonautas se concentra en gránulos específicos llamados gránulos de estrés (SGs, Stress Granules), cuya formación se regula por cinasas que responden al calor, radiación UV, estrés oxidativo, etc. modulando así la actividad de los microRNAs (Anderson & Kedersha, 2008; Leung, Calabrese, & Sharp, 2006).

Las observaciones que se han descrito de la participación de los microRNAs en condiciones de estrés y la regulación que ejerce el estrés sobre los microRNAs forman sólo una parte de la respuesta, pues aún no se conocen los mecanismos moleculares mediante los cuales un organismo puede responder a cambios en el ambiente, como fluctuaciones en la temperatura o disponibilidad limitada de agua y comida, o por el contrario, si se tiene un exceso de nutrientes, nuevos componentes en la dieta o si hay falta de actividad física; cualquiera que sea el caso, la homeostasis que se alcanza mediante los procesos biológicos está directamente relacionada con las respuestas a estrés.

microRNAs y metabolismo

El control del metabolismo es crucial para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo, han surgido redes para monitorear y responder a los cambios en el ambiente, y a los diferentes estados fisiológicos. El trabajo que se ha desarrollado en el área indica que gran parte de las respuestas celulares y fisiológicas a cambios en las condiciones metabólicas y en la dieta ocurren a nivel de la regulación de la expresión de genes, en el núcleo de la célula; se ha visto, por ejemplo, que algunos factores de transcripción responden directa o indirectamente a nutrientes y señales metabólicas como los niveles de colesterol, lípidos, glucosa e insulina, y rápidamente alteran la expresión de genes que controlan la homeostasis metabólica. Los microRNAs representan otro nivel de regulación genética además de los mecanismos de regulación a nivel transcripcional, el hecho de que un microRNA en principio tenga muchos mensajeros blancos, nos hace pensar en lo complejos que son estos mecanismos reguladores funcionando en conjunto. En la Tabla 2 se muestra una lista de algunos de los microRNAs que se ha visto que participan en el metabolismo en humano, sus genes blanco, y su relevancia fisiológica; tomando esto en cuenta, las diferentes condiciones fisiológicas bajo las que un determinado microRNA puede funcionar son de suma relevancia, y deben ser integradas al complejo circuito que permite el mantenimiento de la homeostasis. La desregulación de la expresión de un microRNA o su funcionamiento en respuesta a factores intrínsecos ya sea genéticos o epigenéticos o extrínsecos como señales ambientales o estrés, pueden contribuir a la expresión aberrante de genes causando así una desregulación metabólica, y, aunque es claro el papel que tienen estas moléculas en el desarrollo y la fisiología, aún es necesario

comprender más a fondo el papel que tienen en diferentes contextos biológicos y si son específicos para alguno de ellos (Grimson et al., 2007; Rottiers & Näär, 2012).

Tabla 2. MicroRNAs que participan en el metabolismo en humano.

microRNA	Tejidos blanco	Genes blanco	Funciones	Referencias
<i>miR-103</i>	Tejido adiposo Hígado	CAV1 DICER	Homeostasis de la insulina y glucosa Adipogénesis	(Trajkovski et al., 2011)
<i>miR-107</i>	Tejido adiposo Hígado	CAV1 DICER	Adipogénesis Regulación vía de insulina	(Trajkovski et al., 2011)
<i>miR-122</i>	Hígado	SLC7A1 ADAM17	Metabolismo hepático de lípidos	(Bai et al., 2009; Lewis & Jopling, 2010)
<i>miR-124a</i>	Páncreas	FOXA2 RAB27A	Desarrollo de los islotes pancreáticos	(Baroukh et al., 2007)
<i>miR-143</i>	Tejido adiposo Hígado Páncreas	ERK5 OSBPL8	Diferenciación de adipocitos Resistencia a insulina	(Esau et al., 2004)
<i>miR-223</i>	Músculo	GLUT4	Metabolismo de glucosa Resistencia a insulina	(Lu, Buchan, & Cook, 2010)
<i>miR-27a</i>	Tejido adiposo	PPARG CEBPA	Adipogénesis	(Karbiener et al., 2009)
<i>miR-29</i>	Músculo Tejido adiposo Hígado	INSIG1 CAV2 SLC16A1 PIK3R1	Transporte de glucosa	(He, Zhu, Gupta, Chang, & Fang, 2007; Pullen, da Silva Xavier, Kelsey, & Rutter, 2011)
<i>miR-335</i>	Páncreas Hígado Tejido adiposo	STXBP1	Producción de insulina, ácidos grasos, y triglicéridos	(Esguerra, Bolmeson, Cilio, & Eliasson, 2011)
<i>miR-34a</i>	Hígado Páncreas	SIRT1 VAMP2 ACSL1	Metabolismo de lípidos	(W.-Q. Li et al., 2011; Lovis et al., 2008)
<i>miR-375</i>	Páncreas	MTPN USP1 JAK2 PDPK1	Secreción de insulina Desarrollo de islotes pancreáticos	(Poy et al., 2009)
<i>miR378 y miR-378*</i>	Tejido adiposo	ESRRG Genes ribosomales	Diferenciación de adipocitos Síntesis de lípidos	(Gerin, Bommer, et al., 2010)
<i>miR-9</i>	Páncreas	SIRT1	Secreción de insulina	(Plaisance et al., 2006)
<i>miR-130</i>	Tejido adiposo	PPARG	Adipogenesis	(E. K. Lee et al., 2011)
<i>let-7</i>	Músculo Tejido adiposo	IGF1R INSR IRS2 HMGA2	Sensibilidad a insulina	(Sun, Fu, Bookout, Kliewer, & Mangelsdorf, 2009)
<i>miR-159d</i>	Tejido adiposo	PPARA	Homeostasis de ácidos grasos (Obesidad)	(Martinelli et al., 2010)
<i>miR-33a y miR-33b</i>	Hígado	ABCA1 NPC1 CPT1A	Homeostasis energética, de colesterol, y lipídica	(Gerin, Clerbaux, et al., 2010; Rayner et al., 2010)

Regulación del metabolismo de lípidos por microRNAs

Como ya se describió, los lípidos son componentes estructurales de las membranas celulares, son importantes para el almacenamiento de energía y pueden actuar como moléculas de señalización. Lípidos como el colesterol y los ácidos grasos se ingieren en la dieta o bien, son sintetizados *de novo* predominantemente en el hígado. La regulación de la biosíntesis del colesterol, de los ácidos grasos y de los fosfolípidos está mediada por factores de transcripción específicos, es decir, la célula cuenta con mecanismos para sensor y mantener los niveles de lípidos adecuados y por ende la homeostasis (Raghow, Yellaturu, Deng, Park, & Elam, 2008). Un desbalance en la homeostasis de los lípidos representa un factor de riesgo crucial para enfermedades cardiometabólicas; resistencia a insulina y otras alteraciones que pueden resultar en una acumulación excesiva de triglicéridos y ácidos grasos que se asocian a otras patologías, como puede ser la fibrosis (Angulo, 2007).

El primer microRNA que fue relacionado con el control del metabolismo fue el *miR-122*, este microRNA se expresa principalmente en el hígado, y participa en el mantenimiento de los niveles del colesterol y en la regulación de la β -oxidación de ácidos grasos (Krützfeldt et al., 2005). La familia SREBP es una familia de factores de transcripción que controla la expresión de numerosos genes que participan en la biosíntesis y la entrada de colesterol y ácidos grasos, y en la producción de fosfolípidos y triglicéridos. La expresión de estos factores de transcripción está controlada por microRNAs altamente conservados, como el *miR-33a* y *miR33-b*, los cuales cooperan con factores transcripcionales colesterogénicos para incrementar los niveles de colesterol intracelulares y que además tienen como sustrato a los receptores de insulina, lo que a su vez permite regular los niveles de ácidos grasos y de lípidos mediante las proteínas efectoras de la vía de insulina, particularmente las fosfoinositol-3 cinasas (Rottiers & Näär, 2012). Estos son sólo algunos ejemplos que han sido caracterizados de moléculas que son reguladas por microRNAs, si bien aún quedan muchos blancos y circuitos por describirse.

Regulación del metabolismo de glucosa por microRNAs

El *miR-375* es un microRNA expresado en células pancreáticas que se ha demostrado que se requiere para el desarrollo de los islotes pancreáticos y para el mantenimiento de las células α y β pancreáticas (Poy et al., 2009). El *miR-124a* se coexpresa con el *miR-375*, al menos en un modelo de células en cultivo y también participa en el desarrollo de islotes pancreáticos a través de la regulación del factor transcripcional FOXA2 que participa en la diferenciación de las células β , y controla a su vez a *pdx1*, un gen esencial en la diferenciación de células β , el *miR-124a* puede modular también a un canal de potasio que se necesita para la liberación de insulina y a los componentes estructurales de la maquinaria responsable de esta liberación (Baroukh et al., 2007).

Muchos genes expresados en las células β pancreáticas se expresan diferencialmente en respuesta a cambios en los niveles de glucosa en sangre para optimizar la producción y secreción de insulina. La transcripción y estabilidad del mensajero del gen de insulina y el procesamiento de la insulina son regulados por las concentraciones de glucosa en las células β , el *miR-9* puede regular la secreción de insulina al inhibir al factor transcripcional OC2. En un modelo de ratones diabéticos se observó que el *miR-29a* y el *miR-29b* se expresan en altos niveles en los islotes pancreáticos, inhibiendo la expresión de MCT1, un transportador de monocarboxilato que participa en la liberación de insulina (Pullen et al.,

2011). Todos estos datos sugieren que los microRNAs participan en el control de la secreción de insulina y en el desarrollo pancreático. Se ha implicado a otro grupo de microRNAs en el control metabólico de la glucosa al ser relacionados con una respuesta a insulina, como es el caso de *miR-103* y *miR-107* (Trajkovski et al., 2011).

C. *elegans* como modelo experimental

Anatomía del gusano

El nemátodo *Caenorhabditis elegans* (del griego *caeno*, reciente, *rhabditis*, vara y *elegans*, agradable) es un organismo multicelular que ha sido utilizado como modelo experimental, es un gusano pequeño que mide 1 mm de longitud en su etapa adulta, vive libremente de forma no parasítica en el suelo en donde se alimenta de bacterias (Hope, 1999). Hay dos sexos en *C. elegans*, los gusanos hermafroditas (XX) y los machos (XO) que son menos frecuentes (0.1%), los gusanos hermafroditas producen tanto esperma como ovocitos y pueden reproducirse por auto-fertilización, los machos producen sólo esperma y se reproducen al aparearse con los gusanos hermafroditas, ambos sexos tienen la misma anatomía general, la cual se basa en una estructura de dos tubos concéntricos separados por un espacio lleno de fluido; el tubo exterior está cubierto por una cutícula extracelular de colágeno, la cual es secretada por la hipodermis. La musculatura corporal se arregla en cuatro segmentos longitudinales que se unen a la cutícula por medio de una capa delgada de hipodermis (Moerman DG, 1997). La contracción de los dos segmentos musculares subcentrales en conjunto con la relajación de los segmentos dorsales genera un movimiento sinusoidal que permite a los animales moverse hacia delante y hacia atrás (Driscoll M, 1997).

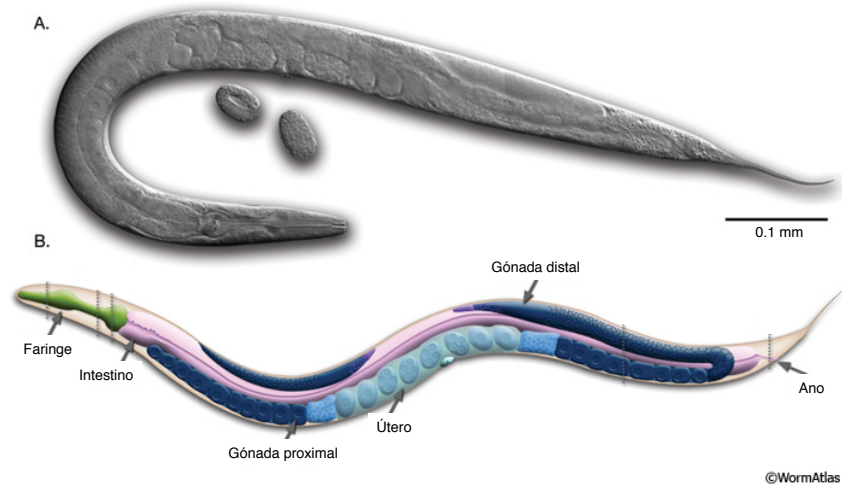


Figura 11. Anatomía básica de un *C. elegans* hermafrodita. A. Imagen de microscopía de contraste de interferencia diferencial, vista lateral izquierda B. Esquema de las estructuras anatómicas, vista lateral izquierda (Modificada de Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R., Hall, 2012).

La boca se encuentra en la punta de la cabeza mientras que el ano es ventral junto con la cloaca (en el macho y se encuentran en la parte posterior del gusano). El tubo interno está conformado por la faringe y el intestino, la faringe se compone de 20 células musculares, 20 células nerviosas y 18 células epiteliales arregladas simétricamente, tiene dos lóbulos, el primero bombea comida hacia el intestino y el segundo la muele mientras pasa a través del mismo. El intestino se compone de 20 células las cuales rodean a un lumen central que va de la cabeza a la cola y están organizadas en 9 anillos arreglados en pares, excepto el más anterior (Leon Avery & You, 2012).

El gusano hermafrodita tiene 302 células nerviosas que se encuentran concentradas en un anillo por la faringe, en un nervio ventral y en la cola. Estas células coordinan el comportamiento y la respuesta a estímulos ambientales, las células sensoriales se encuentran concentradas en la cabeza. El gusano macho tiene 79 células nerviosas adicionales y las diferencias en los sistemas nerviosos de ambos sexos pueden relacionarse a sus diferentes comportamientos sexuales. Los sexos también difieren en el arreglo de sus gónadas y de la cola, estas diferencias surgen durante el desarrollo post-embrionario. El sistema reproductivo hermafrodita tiene dos brazos independientes, cada uno contiene un ovario distal de la vulva, un oviducto proximal y una espermateca, los cuales están conectados a un útero común centrado alrededor de la vulva. La gónada masculina es un órgano que se extiende desde la punta distal y se conecta vía el conducto deferente a la cloaca, que está cerca del ano. Hay otras estructuras anatómicas menores, como los coelomocitos cuya función aún no es clara pero que en otros nemátodos se ha visto que contribuyen a procesos de fagocitosis. Y el sistema de excreción/secreción, responsable de la osmoregulación consiste en una célula ducto excretoria, una célula poro excretoria y una apertura hacia la superficie ventral (Figura 11) (Hope, 1999; Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, 1997).

Ciclo de vida

Su ciclo de vida es corto, en condiciones estándar en el laboratorio a 20 °C tarda 3.5 días en llegar a la etapa adulta. Consta de una etapa embrionaria, 4 etapas larvarias y una etapa adulta de las que se puede encontrar una descripción detallada en el apéndice (Figura 12).. El fin de cada etapa larvaria está marcado por un cambio de cutícula (Kenyon, 1988). En la presente tesis se utilizarán únicamente larvas L4 para la realización de los experimentos. Esto debido a en esta etapa larvaria, los gusanos aún no están comprometidos con procesos de reproducción puesto que, como se describe a detalle en el apéndice, en esta etapa apenas comienza la formación de las estructuras que le permitirán poner huevecillos. Además, como se observa en la Figura 12, este nemátodo es capaz de entrar en etapas de diapausia (también llamada Etapa Dauer). Esta entrada se da entre el paso de la etapa L1 y L2, y sucede cuando el nemátodo enfrenta condiciones adversas como puede ser estrés nutricional. La utilización de L4 en este proyecto también se justifica pues en esta etapa evitaríamos que los gusanos entren en cualquier tipo de diapausia causada por las condiciones ambientales, de alimentación a los que se someterán.

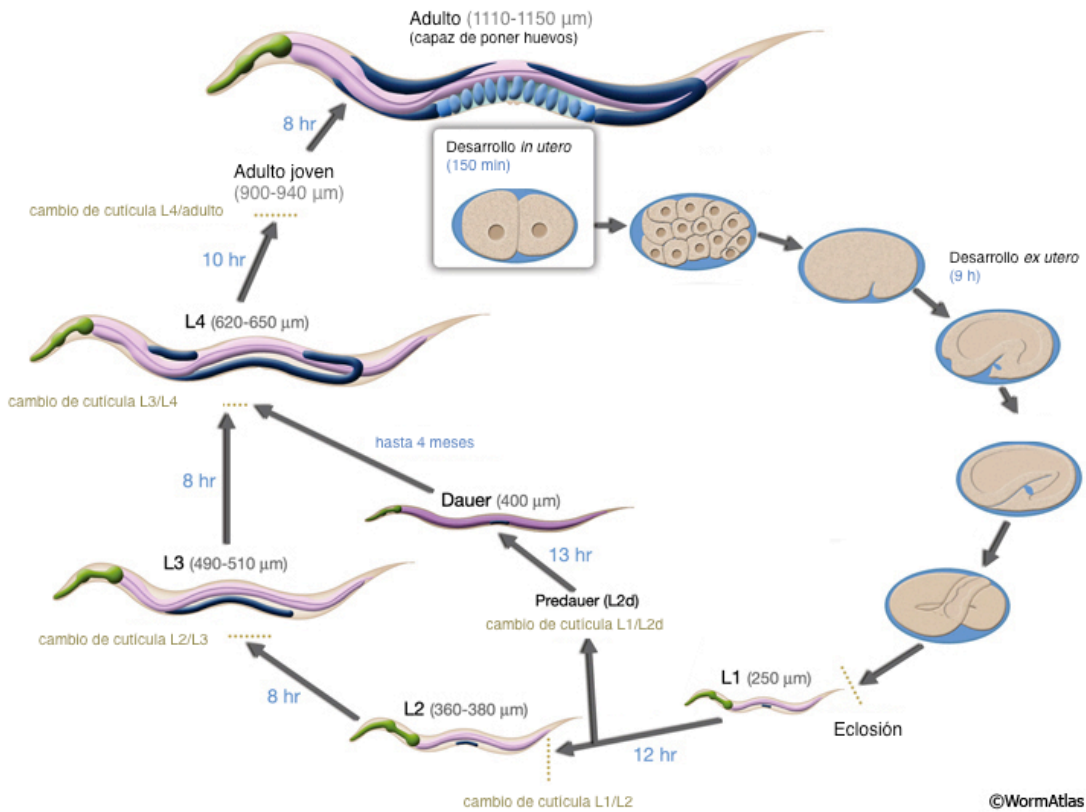


Figura 12. Ciclo de vida del nemátodo *C. elegans*. El tiempo cero corresponde al momento de la fertilización, en azul se indica el tiempo que el animal pasa en cada etapa, los μm en gris indican el tamaño que el animal alcanza en cada etapa (Modificada de Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R., Hall, 2012).

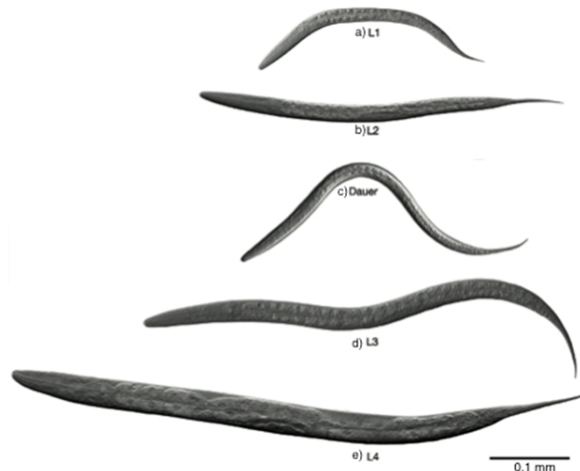


Figura 13. Etapas larvares del desarrollo. Imagen de microscopía de contraste de interferencia diferencial, vista lateral izquierda. a) Etapa larvaria L1 b) Etapa larvaria L2 c) Larva Dauer d) Etapa larvaria L3 e) Etapa larvaria L4 (Modificada de Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R., Hall, 2012).

Genes y genoma

El *C. elegans* fue el primer organismo multicelular y el segundo eucarionte, sólo detrás de *Saccharomyces cerevisiae*, del que se obtuvo la secuencia completa de su genoma, que tiene 100 Mb. Si se define a un gen como la secuencia necesaria para generar un producto funcional, se ha reportado que los genes contenidos ocuparían al menos un 40% del genoma, esto incluiría además de los genes que codifican para proteínas a los genes que codifican para RNAs ribosomales, de transferencia, pequeños y microRNAs. Aún no se conocen todas las secuencias completas de los transcritos, se sabe que una porción sustancial del genoma corresponde a los transposones, que un número significativo de sus genes están arreglados en operones y que su genoma contiene algunos pseudogenes (Zorio, Cheng, Blumenthal, & Spieth, 1994).

Hasta ahora se han identificado aproximadamente 19,800 genes que codifican para proteínas, muchas de las cuales pertenecen a grandes familias conservadas. El grupo de Erich Schwarz realizó en 2005 una clasificación de las proteínas de este nematodo utilizando al sistema NCBI, y mediante alineamientos se logró clasificar al 66% de las proteínas predichas en base a la función que desempeñan como se observa en la Figura 14 (Schwarz, 2005).

Clasificación de las proteínas de *C. Elegans* en base a su función

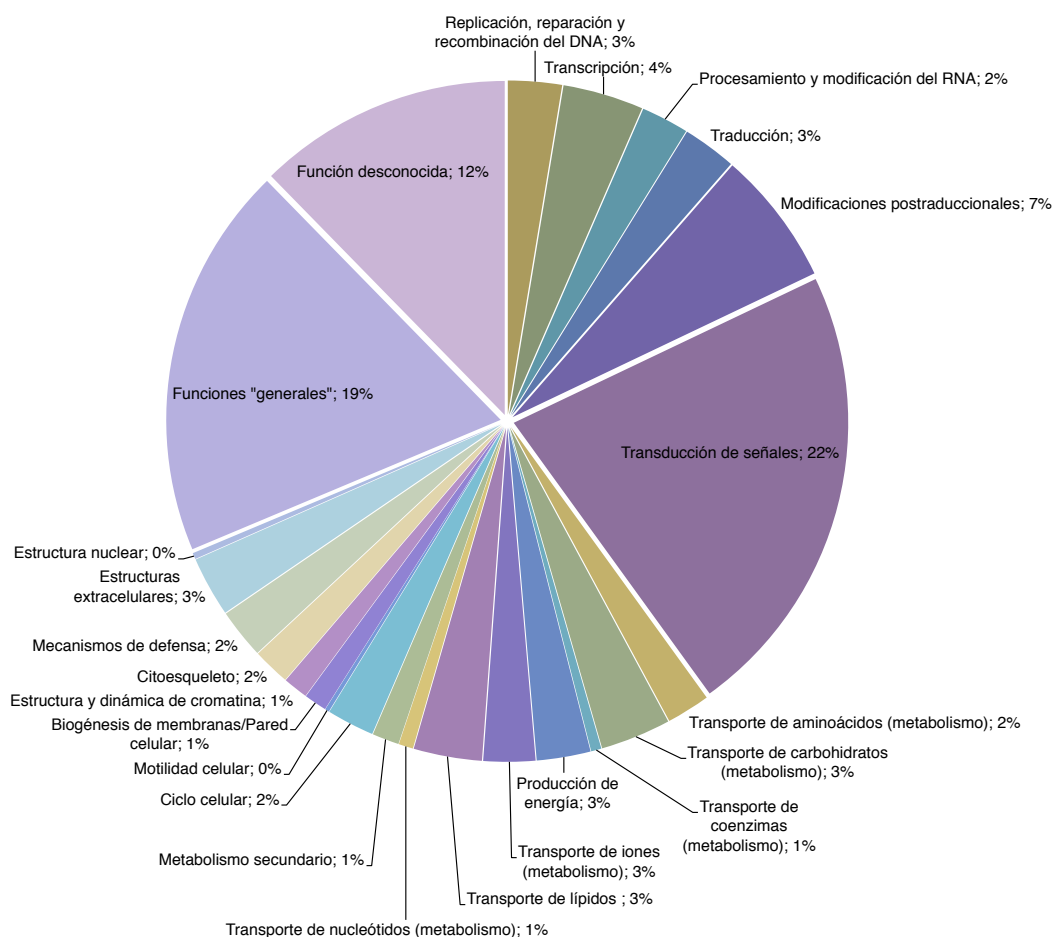


Figura 14. Clasificación de las proteínas de *C. elegans* según su función (Modificada de Schwarz, 2005).

Composición lipídica en *C. elegans*

La grasa que contiene el *C. elegans* ha sido caracterizada por métodos bioquímicos, extrayendo los lípidos de animales completos, fraccionándolos en fosfolípidos y lípidos neutros y analizándolos con técnicas de cromatografía. Los triglicéridos conforman aproximadamente la mitad de los lípidos totales, las reservas de fosfolípidos se componen principalmente de etanolamina, colina, y esfingomiélna, la abundancia relativa de estos lípidos va a depender de la dieta y de la etapa en la que se encuentren los gusanos, así como de la expresión de genes específicos como ciertas elongasas o desaturasas ligadas a procesos metabólicos. El mantenimiento de los niveles de grasas está ligado a procesos metabólicos, crecimiento, movimiento y tiempo de vida de los gusanos (Brooks, Liang, & Watts, 2009; Satouchi, Hirano, Sakaguchi, Takehara, & Matsuura, 1993; Wallis, Watts, & Browse, 2002).

El gusano también tiene ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, como los mamíferos y, debido a que cuenta con algunas desaturasas y elongasas que no se encuentran en el humano, no requiere ingerir ácidos grasos C18:2n6 y C18:3n3 en la dieta pues puede sintetizarlos (Ashrafi, 2007; Satouchi et al., 1993). Finalmente, los gusanos son auxótrofos para colesterol, es decir que requieren este esteroide en su ingesta como precursor de hormonas, para la señalización que se basa en esteroides y para la composición estructural de la membrana celular (E.-Y. Lee et al., 2005; Mullaney et al., 2010).

Almacenamiento de lípidos

Mientras que los mamíferos tienen adipocitos derivados del mesodermo dedicados específicamente al almacenamiento de lípidos, los gusanos *C. elegans* almacenan sus lípidos en el intestino y en células de la hipodermis, a pesar de esto, el origen, forma y función de estas estructuras se encuentra regulado por factores altamente conservados entre especies; inspeccionando al genoma secuenciado del nemátodo se ha revelado, que están conservados genes involucrados en la síntesis, elongación, desaturación y degradación de ácidos grasos (Ashrafi et al., 2003; Ida Coordt Elle, Olsen, Pultz, Rødkaer, & Faergeman, 2010).

Además se ha identificado a factores como *tub-1*, un homólogo del gen *tubby* de mamíferos, como regulador del almacenamiento de lípidos. Las mutaciones en este gen llevan a un incremento en los niveles de lípidos; también se identificó a *kat-1* un gen que codifica para una enzima conservada de la β -oxidación, que participa en el proceso de oxidación de ácidos grasos en el intestino del *C. elegans*, la expresión de estos y otros genes tienen efecto en el tamaño y forma de los gránulos de almacenamiento, aunque sus características biofísicas, proteínas asociadas y el grado de heterogeneidad en la composición bioquímica de su contenido aún no se comprende en su totalidad (Ashrafi et al., 2003; Mak, Nelson, Basson, Johnson, & Ruvkun, 2006; Mukhopadhyay, Deplancke, Walhout, & Tissenbaum, 2005). También se ha descrito que el almacenamiento de lípidos en *C. elegans* se encuentra controlado por vías de señalización altamente conservadas como la de insulina, TGF- β , serotonina y mTOR (mammalian target of rapamycin) (Mak, 2012). Sin embargo, carece de reguladores como la leptina, para la cual no se ha encontrado un homólogo en *C. elegans* identificado por la secuencia de nucleótidos,

aunque evidencia experimental sugiere la existencia de mecanismos de señalización que comunican sitios periféricos de almacenamiento y utilización de grasas con sitios neurales para regular así el balance energético (Mullaney & Ashrafi, 2009).

Como ya se describió, el gusano tiene una estructura corporal simple, se alimenta de bacterias por acción del bombeo de su faringe, donde las rompe para introducirlas al lumen del intestino. Las células intestinales son células epiteliales polarizadas, cuyas membranas apicales encaran al lumen intestinal. La superficie apical de las células intestinales contiene microvellosidades necesarias para la absorción de nutrientes, y siendo el único tipo de célula con acceso al lumen intestinal, estas células son responsables de la secreción de lipasas digestivas y peptidasas (Mullaney & Ashrafi, 2009). Además de su rol como barrera epitelial, como tracto digestivo y de absorción, las células intestinales llevan a cabo funciones de desintoxicación que se asemejan a las que lleva a cabo un hepatocito en mamíferos, expresan una variedad de enzimas biosintéticas y de degradación como la acil-CoA oxidasa o la enoil-CoA hidratasa 3-hidroxil acil-CoA deshidrogenasa (McGhee et al., 2007).

En el intestino de *C. elegans* se sintetizan lipoproteínas, las cuales se exportan dentro de la cavidad corporal para ser tomadas por los ovocitos en desarrollo, esto sucede de manera similar en el pollo, en donde las lipoproteínas de la yema se sintetizan en el hígado y se transportan hacia el huevo a través del flujo sanguíneo, por lo tanto, el intestino del *C. elegans* puede ser visto como un órgano multifuncional que lleva a cabo los roles del hígado y de los tejidos adiposos (Grant & Hirsh, 1999; McGhee, 2007). Es en el intestino de *C. elegans* donde se han descrito dos probables compartimentos especializados para el almacenamiento de lípidos, los cuales pueden ser diferenciados pues tienen diferentes densidades electrónicas: los compartimentos translúcidos llamados gotas lipídicas y los compartimentos opacos o gránulos intestinales (Mak, 2012).

Las gotas lipídicas se definen como un tipo de organelo eucarionte cuya función en la célula es el almacenamiento de grasa neutra como triglicéridos y ésteres de colesterol; son estructuras esféricas delimitadas por una monocapa de fosfolípidos y están cubiertas por proteínas como la adipofilina, la perilipina; algunas de estas proteínas asociadas a las gotas lipídicas que han sido caracterizadas en mamífero no tienen homólogos obvios en *C. elegans*, como la perilipina; pero otras sí, se han encontrado homólogos de seipina (R01B10.6), leipina (H37A05.1), caveolina (T13F2.8 y C56A3.7) y varias proteínas Rab, lo que sugiere que aspectos generales del metabolismo de las gotas lipídicas se encuentran conservados (Mullaney & Ashrafi, 2009; S. O. Zhang, Trimble, Guo, & Mak, 2010). El tamaño y contenido de las gotas lipídicas está dinámicamente regulado por procesos que no se han dilucidado en su totalidad. Comprender esta regulación será un punto importante en el entendimiento de patologías como la diabetes, obesidad y otras enfermedades metabólicas y para esto el estudio en un organismo como el *C. elegans* adquiere su relevancia (Fujimoto, Ohsaki, Cheng, Suzuki, & Shinohara, 2008). Y es particularmente en este nemátodo en donde se han estudiado la naturaleza y las propiedades de estos organelos. Estudios bioquímicos, de microscopía y tinciones han demostrado que las gotas lipídicas son los organelos ubicuos más importantes en donde se almacenan las grasas en *C. elegans*. Son estructuras que contienen grasa neutra como triglicéridos y ésteres de colesterol delimitadas por una monocapa de fosfolípidos, uniformemente translúcidas al observarse en un microscopio electrónico, muy similares a las gotas lipídicas descritas en levadura, en *Drosophila* y en células de mamíferos, con una densidad menor al agua y a la de la mayoría de los organelos intracelulares (Robenek et al., 2006; Tauchi-Sato, Ozeki, Houjou, Taguchi, & Fujimoto, 2002; S. O. Zhang et al., 2010).

Por otro lado, los gránulos intestinales fueron detectados usando microscopía de luz y subsecuentemente definidos como LROs (organelos relacionados a los lisosomas) pues no contienen a LMP-1, el homólogo en *C. elegans* de LAMP, un marcador de lisosomas; la abundancia relativa y apariencia de estos compartimentos dependen de la etapa de desarrollo del animal, y aunque estas estructuras son capaces de almacenar grasa son distintas de las gotas lipídicas, las cuales han sido descritas como los principales depósitos de lípidos (Mak, 2012). Tienen una bicapa lipídica, y contienen una bomba de protones vacuolar que los acidifica (Schroeder et al., 2007). Las células epidermales también almacenan grasa, sin embargo, no contienen gránulos de almacenamiento, se ha descrito mediante métodos de microscopía que la hipodermis puede almacenar lípidos neutros y que estos depósitos disminuyen cuando se somete al animal a periodos de ayuno, sin embargo, aún no se conocen los mecanismos subcelulares y moleculares de almacenamiento en estas células (Mobbs, 2010; Yen et al., 2010).

Los depósitos de grasa en *C. elegans* son dinámicos, se ha visto que durante el desarrollo normal, las gotas lipídicas se incrementan tanto en tamaño como en número (Hellerer et al., 2007). El número, tamaño y distribución de estos organelos también cambia dramáticamente en respuesta a señales ambientales; por ejemplo, bajo condiciones ambientales poco favorables que hacen que los gusanos entren en etapa dauer, hay una acumulación de reservas de grasa y un cambio subsecuente en el metabolismo para favorecer la utilización de la mismas en periodos prolongados de ayuno, de acuerdo con esto, los gusanos muestran un incremento en la densidad de las gotas lipídicas (Burnell et al., 2005; Hellerer et al., 2007; Kimura, Tissenbaum, Liu, & Ruvkun, 1997). Los mecanismos moleculares que regulan la biogénesis de las gotas lipídicas, así como su contenido, tamaño y distribución aún no se han dilucidado.

Métodos disponibles para el análisis de los niveles de lípidos

La transparencia del gusano y su versatilidad para realizar estudios genéticos han sido importantes para identificar a los factores que afectan la homeostasis metabólica. A continuación se describen los métodos que han sido utilizados para el marcaje de lípidos, los cuales se ha descrito que no producen efectos adversos en el nemátodo en cuanto a crecimiento, bombeo de la faringe, entrada y recuperación de la etapa dauer y tiempo de vida, por lo tanto, la utilización de estos métodos constituye una aproximación inicial para evaluar los niveles de lípidos dentro del gusano (Ashrafi, 2007).

Rojo Nilo

El Rojo Nilo es un colorante derivado del Azul Nilo, un colorante lipofílico que se concentra en ambientes hidrofóbicos que ha sido utilizado para el marcaje de lípidos en diversas líneas celulares (Greenspan, Mayer, & Fowler, 1985a; O'Rourke, Soukas, Carr, & Ruvkun, 2009). En solventes polares, el Rojo Nilo no es fluorescente, pero se vuelve fluorescente cuando se encuentra en un ambiente rico en lípidos, lo que lo convierte en un indicador muy útil de estas fracciones. Se excita generalmente a 485 nm y emite a 525 nm. Sin embargo, las propiedades espectrales del Rojo Nilo dependen de la polaridad del ambiente y del solvente utilizado. Se ha visto que su emisión máxima va desde el rojo a

628 nm cuando se encuentra dentro de vesículas de fosfolípidos y puede llegar hasta el amarillo-dorado a 580 nm cuando se encuentra junto con lípidos neutros como los triglicéridos o los ésteres. En diversos artículos se ha destacado el uso de este colorante para teñir al nemátodo *C. elegans* y observar así los lípidos dentro del animal (Ashrafi et al., 2003; Bonilla & Prella, 1987; Ida Coordt Elle et al., 2010; Nomura, Horikawa, Shimamura, Hashimoto, & Sakamoto, 2010; Yen et al., 2010) (Figura 15).

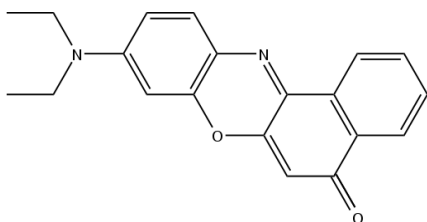


Figura 15. Estructura química del Rojo Nilo ($C_{20}H_{18}N_2O_2$) (9-diethylamino-5H-benzo [α] fenoxazina-5-ona), este colorante tiene en su estructura un anillo de fenoxazona cromófora, que le confiere el color rojo.

Negro Sudán

El Negro Sudán pertenece a la familia de colorantes Sudán, los cuales son colorantes solubles en grasas, también llamados lisocromos pues tiñen a los lípidos. En su clasificación estructural pertenecen a la familia diazo pues contienen al grupo funcional $R-N=N-R'$, donde R y R' pueden ser grupos arilos o alquilos. El Negro Sudán, un polvo negro termoestable, no es fluorescente, su máxima absorción es a 596-605 nm y no es tan específico en cuanto al tipo de lípidos que marca como lo son otros colorantes de la familia Sudán. Tiñe de color negro-azul principalmente a los triglicéridos y lípidos neutros debido a que puede disolverse en lípidos apolares; pero también, al poseer dos átomos de nitrógeno potencialmente ionizables puede considerarse un colorante catiónico si se une a lípidos polares como los fosfolípidos (Figura 16) (Bayliss High, 1981; Frank, Tas, & Frederiks, 1981; Pfüller, Franz, & Preiss, 1977; Tas, Frederiks, & Frank, 1980; Xu & Wang, 2009; Yen et al., 2010).

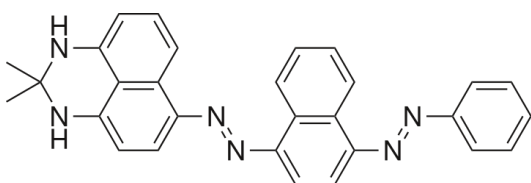


Figura 16. Estructura química del Negro Sudán ($C_{29}H_{24}N_6$) (2,2-dimetil-1, 3-dihidroperimidin-6-il) - (4-fenilazo-1-naftil) diazeno, un marcador no fluorescente de lípidos.

El Negro Sudán se ha utilizado para el marcaje de lípidos en el *C. elegans*, donde se ha visto que marca la acumulación de lípidos en gránulos en el cuerpo y cabeza del gusano, marcando ésteres de colesterol y triglicéridos y, en menor proporción, fosfolípidos y ácidos grasos libres; se ha observado particularmente un marcaje de los niveles de triglicéridos en el intestino e hipodermis del animal (Gomez, Banfield, Trogler, & Clarke, 2007; Kim, Do, & Lee, 2010; Strnadova, Jirsova, Klusonova, & Republic, 2009).

Oil Red

El Oil Red, previamente conocido como Rojo Sudán 5B, es otro colorante de la familia diazo, es un lisocromo soluble en grasas utilizado para teñir triglicéridos neutros. Su absorción máxima se da a los 518 nm. Ha sido utilizado para teñir gotas lipídicas en células de mamífero y tejidos, particularmente en el hígado, donde se ha utilizado para teñir ácidos grasos insaturados y lípidos neutros (Strnadova et al., 2009).

Recientemente se ha utilizado para visualizar lípidos en el nemátodo *C. elegans* en donde se ha visto que la tinción con este colorante muestra una correlación con los niveles de triglicéridos determinados por métodos bioquímicos y de espectrometría de masas y cromatografía. Se ha observado además, que esta tinción es consistente con los datos obtenidos con la tinción con Negro Sudán (Aarnio et al., 2011; Klapper et al., 2011; Nomura et al., 2010; O'Rourke et al., 2009; Soukas, Kane, Carr, Melo, & Ruvkun, 2009).

La eficiencia de este colorante depende del solvente en el que se encuentre disuelto, lo cual debe tenerse en cuenta al momento de hacer el marcaje (Kinkel et al., 2004) (Figura 17).

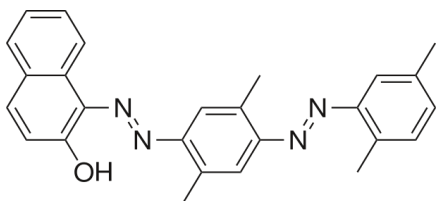


Figura 17. Estructura química del Oil Red ($C_{26}H_{24}N_4O$) 1-(2,5-dimetil-4-(2-5-dimetilfenil) fenildiazenil) azonaftalen-2-ol, un marcador no fluorescente de lípidos.

Colorantes BODIPY

Los colorantes BODIPY son fluoróforos que contienen un átomo de boro como parte de su estructura base, son muy versátiles, se han usado para generar conjugados fluorescentes de proteínas, nucleótidos y oligonucleótidos, y también para preparar sustratos fluorescentes de enzimas, ácidos grasos, fosfolípidos, lipopolisacáridos, ligandos de receptores, etcétera. Han sido usados para marcar un amplio rango de lípidos entre los que se incluyen ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol y ceramidas.

Un ejemplo es el C_1 -BODIPY 500/510 que se excita a 508 nm y emite a 514 nm exhibiendo fluorescencia roja cuando se incorpora a células vivas, estos análogos que se forman son transportados y metabolizados lo cual los hace buenos marcadores. Además, son estables en condiciones fisiológicas e insensibles a variaciones en el pH, esto junto a su baja polaridad hace que las sondas que contienen a estos colorantes sean excelentes análogos de los lípidos biológicos haciendo posible su cuantificación por medio de imágenes o bien, con un escáner basado en fluorescencia o absorción (Figura 18) (Brown, 2005; Iain Johnson, 2011; Wu & Burgess, 2008)

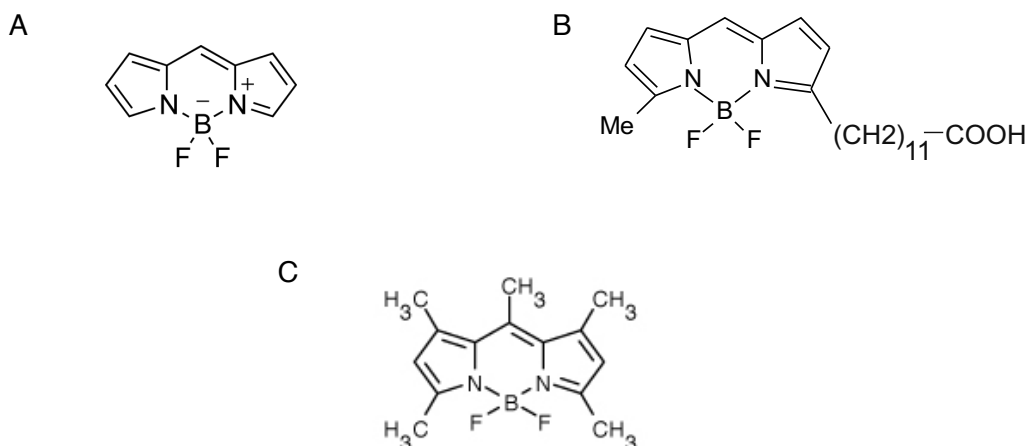


Figura 18. A) Estructura química base del colorante BODIPY (4,4- Difluoro - 4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno) B) Estructura química del BODIPY 500/510 C1-C12, un análogo de los ácidos grasos que se incorpora a las células. C) Estructura del BODIPY 493/503 ($C_{14}H_{17}BF_2N_2$, 4,4 - Difluoro - 1,3,5,7,8 - Pentametil-4-Bora- 3a, 4a - Diaza-s-Indaceno), utilizado para marcar lípidos neutros.

Los colorantes BODIPY han sido usados para el estudio del metabolismo de lípidos en *C. elegans*. Particularmente se ha utilizado al BODIPY 493/503 para el marcaje de lípidos neutros, y para ver el tráfico de lípidos en el intestino de los gusanos (Figura 17) (Klapper et al., 2011; Parker, Walker, Ly, & Baylis, 2009). Sin embargo, se ha reportado también que estos colorantes presentan algunas desventajas, por ejemplo, se necesita que los gusanos lo ingieran y por lo tanto es dependiente de que los gusanos coman normalmente y si no es así, como puede suceder en cepas con ciertas mutaciones, pueden verse afectados los niveles de marcaje y no obtenerse una medición adecuada de los lípidos; además algunos reportes muestran datos que se contradicen con los obtenidos con las tinciones con Negro Sudán (Gocze & Freeman, 1994; Soukas et al., 2009; Yen et al., 2010).

Microscopía CARS

La microscopía CARS (Coherent Anti-stokes Raman Spectroscopy) es una técnica que permite la visualización de las moléculas sin necesidad que sean marcadas ya que se analizan las propiedades de las vibraciones características de las mismas. Se utiliza un láser para iluminar y se analiza la interacción de la luz con las moléculas; para la visualización selectiva de los lípidos se mide la vibración de los enlaces carbono-hidrógeno (Hellerer et al., 2007). Es un método directo de medición y permite obtener incluso el grado de saturación de las cadenas lipídicas, además, presenta la ventaja de no ser una técnica invasiva, sin embargo, se requiere de un equipo especial y por lo tanto es una técnica que no es fácilmente accesible pues es muy costoso llevarla a cabo (Le, Duren, Slipchenko, Hu, & Cheng, 2010; Yen et al., 2010).

Metabolismo energético en *C. elegans*

En el gusano se conservan las principales vías metabólicas de flujo, síntesis, almacenamiento y utilización de azúcares y grasas, en las que se incluyen la síntesis, elongación, desaturación de ácidos grasos, β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos, glucólisis, gluconeogénesis y metabolismo de aminoácidos (Mullaney & Ashrafi, 2009). Las células utilizan a los carbohidratos, aminoácidos y grasas para generar ATP, los carbohidratos se utilizan para formar piruvato y posteriormente Acetil-CoA, lo que genera NADH y FADH₂ mediante el ciclo de Krebs, con los cuales se genera ATP mediante la fosforilación oxidativa. El Acetil-CoA es el sustrato clave en la síntesis de ácidos grasos, en el gusano se carboxila por una enzima llamada Acetil-CoA carboxilasa (ACC) y se elonga por una Sintasa de Ácidos grasos (FAS), para generar ácido palmítico que es procesado por desaturasas y elongasas para generar ácidos grasos insaturados. El almacenamiento de los ácidos grasos incluye al proceso de conversión de los mismos en triglicéridos, el gusano cuenta con las enzimas del ciclo de glioxilato que permite la interconversión de carbohidratos y grasas a través de componentes del ciclo de Krebs (Salway, 2004).

El genoma del gusano codifica para proteínas con homología en secuencia de componentes de las vías de utilización y síntesis de lípidos y carbohidratos. En la siguiente tabla se muestra una lista parcial de las vías metabólicas conservadas (Tabla 3).

Tabla 3. Vías metabólicas del *C. elegans* de deducen mediante análisis de la secuencia genómica.

Metabolismo de carbohidratos	Metabolismo de lípidos
Glucólisis/Gluconeogénesis	Lipólisis
Síntesis y utilización de glucógeno	Entrada de ácidos grasos (Carnitina)
Síntesis y utilización de trehalosa	β -oxidación mitocondrial
Metabolismo de galactosa	β -oxidación peroxisomal
Metabolismo de manosa y fructosa	Catabolismo del glicerol
Vía de Glioxilato	Síntesis de ácidos grasos
Ciclo de Krebs	Elongación y desaturación de ácidos grasos
	Síntesis de triglicéridos
Metabolismo energético	Biosíntesis de fosfolípidos
Fosforilación oxidativa	Síntesis y utilización de cuerpos cetónicos
Síntesis de ATP	Síntesis de esfingolípidos y ceramida.

La movilización de la grasa almacenada depende del flujo de lípidos por la β -oxidación. Se ha visto que el gusano tiene componentes conservados de este proceso de mitocondria y peroxisoma, y que el flujo de lípidos depende a su vez de la liberación de ácidos grasos de los triglicéridos, acción que realizan las enzimas lipasas. En *C. elegans* se han descrito homólogos de la lipasa sensible a hormonas, la fosfolipasa A2 y la ATGL (lipasa de triglicéridos) (Branicky, Desjardins, Liu, & Hekimi, 2010). Los ácidos grasos

entran por difusión a través de la membrana o bien, por medio de transporte activo en la célula; en *C. elegans* la familia FATPs (fatty acid transport protein) se encuentra conservada (Hirsch, Stahl, & Lodish, 1998). Los ácidos grasos quedan atrapados en la células para ser metabolizados. La conversión a acil-CoA se lleva a cabo por las enzimas acil-CoA sintetasas y en el nemátodo se han encontrado 7 miembros de esta familia, conservada también en mamíferos (Mullaney et al., 2010). Se han encontrado 9 miembros de la familia FABPs (Fatty acid binding proteins) y 7 miembros de la familia ACBP (acil-CoA Binding protein), los cuales participan en la toma y transporte de ácidos grasos. Además, se ha reportado la presencia de los genes *dsc-4* y *lrp-1*, un homólogo de la proteína de transferencia de triglicéridos en mamíferos y homólogo del receptor de LDL que participa en la toma de esteroides respectivamente (Mullaney & Ashrafi, 2009). No se han encontrado homólogos de las lipoproteínas, el gusano utiliza a las vitelogeninas como el componente proteico en el proceso de transporte de lípidos. Se han encontrado 6 de estas proteínas, las cuales conservan homología con las lipoproteínas de mamíferos (Spieth, Nettleton, Zucker-Aprison, Lea, & Blumenthal, 1991).

Los mecanismos mediante los cuales las células y los organismos regulan la toma, biosíntesis y oxidación de lípidos para satisfacer sus necesidades nutricionales y celulares implican procesos complejos en donde participan una gran cantidad de componentes celulares, enzimas metabólicas y factores de transcripción. En mamíferos, se han identificado factores como los PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), los receptores LXR (liver X receptors), los SREBPs (sterol regulatory element-binding proteins) entre otros, que regulan el metabolismo de ácidos grasos y lípidos. De manera similar, se han identificado factores en *C. elegans* que regulan la expresión de distintos genes, cuyos productos participan ya sea en el catabolismo o en el anabolismo de lípidos. Por ejemplo, *C. elegans* tiene sólo un ortólogo de SREBP llamado SBP-1, lo cual ha permitido la identificación de sus blancos y el estudio de su participación en el metabolismo de ácidos grasos a nivel de organismo (Foretz et al., 1999; Mullaney et al., 2010; Nomura et al., 2010; Raghov et al., 2008).

A pesar de que se han encontrado en el genoma del nemátodo alrededor de 300 receptores nucleares para hormonas, no se han identificado ortólogos de PPARs de mamíferos, sin embargo, a pesar de que su secuencia tiene homología con HNF4 γ , NHR-49 es considerado un homólogo funcional de PPAR α de mamífero, debido a que regula la expresión de genes que participan en la toma de ácidos grasos, la oxidación, desaturación y en la unión de lípidos a proteínas, además mutaciones en su gen o en otros receptores nucleares como NHR-8, NHR-137 o NHR-178, causan un incremento en los niveles de lípidos almacenados (Van Gilst, Hadjivassiliou, & Yamamoto, 2005; Xu & Wang, 2009).

Además de SBP-1 y NHR-49, en *C. elegans* se ha identificado al homólogo de C/EBP de mamífero, el cual es un importante regulador de la homeostasis lipídica. La pérdida de este gen afecta negativamente la acumulación de lípidos, así como la expresión de distintas enzimas lipogénicas como la Acetil-CoA carboxilasa o la sintasa de ácidos grasos (Ida C Elle et al., 2008; McKay, McKay, Avery, & Graff, 2003).

En estudios de mutagénesis, deleciones y ensayos con RNA interferente en *C. elegans*, se han identificado 300 genes que, al inactivarse causan una reducción en la acumulación de grasas y 100 genes que causan acumulación sin causar efectos drásticos en crecimiento y viabilidad; otras 250 inactivaciones causan reducciones dramáticas y tienen efectos como esterilidad, arresto del crecimiento y letalidad; el análisis de la función de estos genes apenas comienza (Ashrafi, 2007).

microRNAs conservados en el nemátodo

La investigación pionera en microRNAs se llevó a cabo en el *C. elegans*. Se ha visto que los microRNAs del gusano no tienen que ser perfectamente complementarios para unirse a sus blancos (Lim et al., 2003). Los microRNAs del *C. elegans* se clasificaron en 48 grupos, de los cuales todos excepto dos fueron identificados en *C. briggsae*, de estas 48 familias 22 tienen representación en los genes de microRNAs de humano y, al menos un tercio de los genes de microRNAs de *C. elegans* tienen homólogos en humanos y otros vertebrados (Cutter, Dey, & Murray, 2009). El punto inicial del análisis de la función de los microRNAs se basó en fenotipos causados por la pérdida de estas moléculas que se identificaron fácilmente, en la Tabla 4 se presenta una lista de los microRNAs identificados en el gusano mediante análisis de mutantes por pérdida de función. Sin embargo, análisis subsecuentes se han complicado por la falta de estos fenotipos fácilmente observables, la redundancia entre microRNAs relacionados o incluso entre microRNAs no relacionados puede explicar este fenómeno; además, estas moléculas pueden tener funciones muy especializadas que requieren análisis en células específicas y, por lo tanto pueden pasarse por alto en análisis fenotípicos generales. Finalmente, se han comenzado a analizar las funciones de microRNAs individuales en condiciones de estrés ambiental o fisiológico, y por tanto podrá identificarse la función en análisis en condiciones fisiológicas se ha pasado por alto.

Tabla 4. MicroRNAs identificados en *C. elegans* mediante análisis por pérdida de función.

microRNA gen/familia	Secuencia semilla	Blancos	Funciones	Referencias
<i>lin-4</i>	CCCUGAG	<i>lin-14, lin-28</i>	Desarrollo, longevidad, crecimiento axonal	(V Ambros, 2000)
<i>let-7</i> <i>miR-48</i> , <i>miR-84</i> , <i>miR-241</i>	GAGGUAG	<i>daf-12, let-60, lin-41</i>	Desarrollo, longevidad, entrada a etapa dauer	(Antebi, Yeh, Tait, Hedgecock, & Riddle, 2000; Sun et al., 2009)
<i>miR-1</i>	GGAAUGU	<i>unc-29, unc-63, mef-2</i>	Transmisión sináptica	(Simon et al., 2008)
<i>miR-34</i>	GGCAGUG		Respuesta a daño al DNA	(Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010; M Kato et al., 2009)
Familia <i>miR-35</i> - <i>miR-42</i>	CACCGGG	<i>lin-23, gld-1</i>	Embriogénesis, transición G1/S de las células intestinales, proliferación de la línea germinal	(Liu et al., 2011; Massirer, Perez, Mondol, & Pasquinelli, 2012).
Familia <i>miR-51</i> - <i>miR-56</i>	ACCCGUA	<i>cdh-3</i>	Embriogénesis, desarrollo y bombeo de la faringe	(Shaw, Armisen, Lehrbach, & Miska, 2010)
<i>miR-57</i>	ACCCUGU	<i>nob-1</i>	Especificación de la diferenciación de células posteriores	(Z. Zhao et al., 2010)

<i>miR-58</i>	GAGAUCG		Locomoción, entrada a dauer	(Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010)
<i>miR-59</i>	CGAAUCG		Migración de la gónada, embriogénesis	(Victor Ambros, 2010; Brenner, Jasiewicz, Fahley, Kemp, & Abbott, 2010)
Familia <i>miR-80 - miR-82</i>	GAGAUCA		Locomoción, entrada a etapa dauer, respuesta a estrés, longevidad	(Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010; Vora, 2011)
<i>miR-71</i>	GAAAGAC		Longevidad	(De Lencastre et al., 2010)
<i>miR-77</i>	UCAUCAG		Embriogénesis	(Brenner et al., 2010; Lim et al., 2003)
<i>miR-124</i>	AAGGCAC		Migración de la gónada	(Baroukh et al., 2007; Brenner et al., 2010)
<i>miR-238, -239a/b</i>	UUGUACU		Longevidad, control temporal del desarrollo, respuesta a estrés	(Brenner et al., 2010; de Lencastre et al., 2010)
<i>miR-246</i>	UACAUGU		Longevidad, respuesta a estrés	(Miska et al., 2007)
<i>miR-797</i>	AUCACAG		Migración de la gónada	(Brenner et al., 2010)

microRNAs y metabolismo en *C. elegans*

Se han identificado genes que codifican para enzimas de biosíntesis y de utilización de lípidos y carbohidratos, estos genes regulan el flujo del metabolismo energético. Es relevante conocer la regulación de estos genes y si los microRNAs participan en la regulación del metabolismo ya que estas moléculas son capaces de regular la expresión de sus diferentes blancos.

Los mecanismos celulares y genéticos de regulación pueden verse comprometidos por condiciones de estrés ambiental o fisiológico. Un análisis funcional reciente indica que algunos microRNAs específicos regulan procesos como la longevidad en *C. elegans*. Una de las vías principales que funciona en la regulación de la longevidad en gusanos es la vía de la Insulina/IGF-1 (Insulin-like Growth Factor I), la cual se ha visto que es regulada por el microRNA *lin-4*. Una mutante de este miRNA muestra un envejecimiento acelerado y una sensibilidad incrementada a varios tipos de estrés, como por ejemplo choque térmico (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). Mutantes de *miR-71*, *miR-238* y *miR-246* mostraron menor resistencia a estrés, es decir, al someter a estas cepas a condiciones como choque térmico su crecimiento y desarrollo se veía afectado. Mientras que, por otro lado, mutantes de *miR-239* mostraron un incremento en la resistencia (Brenner et al., 2010). La expresión de dos genes de microRNAs, *miR-34* y *miR-71* se incrementa durante el envejecimiento, y en respuesta al desarrollo a través de la etapa dauer, lo cual indica que estos microRNAs tienen un papel más general en la respuesta del gusano al estrés fisiológico y ambiental pues se expresan a lo largo de la vida del nemátodo (De Lencastre et al., 2010). Además, mutantes de *miR-34* muestran una mayor sensibilidad al estrés causado por radiación (Masami Kato, Chen, Inukai, Zhao, & Slack, 2011).

Se ha visto que los microRNAs que participan directamente en el metabolismo en humanos se encuentran conservados en el nemátodo, tal es el caso de *let-7*, *miR-34* y *miR-124*, los cuales participan en la sensibilidad a insulina, metabolismo de lípidos y

desarrollo de islotes pancreáticos, respectivamente (Baroukh et al., 2007; Sun et al., 2009; Wong et al., 2011). Estos microRNAs también han sido caracterizados en el gusano, se ha descrito que participan en procesos de desarrollo, respuesta de daño al DNA y migración de la gónada (Brenner et al., 2010; Masaomi Kato et al., 2011; Miska et al., 2007). No puede descartarse la participación de estas moléculas en el metabolismo, ya que aún no hay evidencia de su función en condiciones de estrés ambiental, particularmente estrés nutricional. Caracterizar esta función, se ha complicado por la falta de fenotipos contundentes, por la redundancia de función entre los distintos microRNAs y porque el estrés metabólico requiere de análisis en condiciones específicas. En el presente trabajo se pretende llevar a cabo una aproximación inicial al estudio de los factores implicados en la respuesta a tipos de estrés específicos en el gusano, particularmente los microRNAs.

Antecedentes

Condiciones experimentales para el estudio del metabolismo en *C. elegans*

Una gran ventaja que presenta el nemátodo es que se pueden controlar directamente las condiciones de los medios en los que se crece, además, es posible aislar mutantes con relativa facilidad bajo condiciones específicas; es por eso que distintos grupos de investigación lo han utilizado como modelo para estudiar su desarrollo en condiciones como la restricción calórica, el ayuno o diferentes niveles de glucosa.

Restricción calórica y ayuno

Se ha descrito que la restricción calórica en diferentes organismos como ratas, ratones y nemátodos causa un incremento en el tiempo de vida (Lakowski & Hekimi, 1998; Schulz et al., 2007; Walker & Houthoofd, 2005; Wei et al., 2008). También se ha visto que retrasa y atenúa cambios relacionados con el envejecimiento en primates (Choi, 2011; C. Lee, 1999; Partridge, 2011). El efecto se conserva en humanos, en donde la restricción calórica ha sido ligada a una reducción en el índice metabólico que podría ser benéfico para el organismo (Heilbronn et al., 2006).

Es en *C. elegans* donde los mecanismos genéticos de este efecto han sido mejor caracterizados. Para estudiar la restricción de alimento directamente, los gusanos se crecen en medios líquidos con concentraciones conocidas de bacterias, o bien, pueden mutarse genes que causan defectos en la función de la faringe y por tanto ingieren menor cantidad de alimento (L Avery, 1993).

Por otro lado, la capacidad del *C. elegans* de entrar en diapausia le permite sobrevivir en distintas condiciones de estrés, como el ayuno, temperaturas elevadas y sobrepoblación, distintos estudios han revelado que estas etapas alternativas son más resistentes y viven más tiempo, es por eso que se han establecido protocolos experimentales para estudiar al nemátodo en diferentes condiciones de estrés; por ejemplo, se han utilizado protocolos donde se somete al gusano a choques térmicos para poder aislar mutantes termoresistentes (Muñoz & Riddle, 2003). Para el caso del ayuno, un protocolo típico incluye resuspender a los huevecillos en una solución de buffer estéril donde los gusanos que eclosionen sufrirán arresto debido a la falta de alimento, o bien, dependiendo de la etapa larvaria que se quiera estudiar a los gusanos pueden dejarse crecer y después cambiarse a cajas sin alimento. Deben tomarse en cuenta factores como la temperatura y los antecedentes genéticos de los gusanos. Debe monitorearse que sobrevivan en ayuno en los días siguientes a la eclosión o a que se retira el alimento, tomando alícuotas y contando a los gusanos vivos. Este tipo de protocolos con condiciones experimentales sencillas y bien definidas dejan en teoría poco espacio a la variabilidad, convirtiéndose así en herramientas valiosas para el estudio del metabolismo (Artyukhin & Avery, 2012; L Avery & Horvitz, 1990; Castro, Khare, Young, & Clarke, 2012; Muñoz & Riddle, 2003).

Altos niveles de glucosa

En humanos se ha determinado que aproximadamente el 15% de las calorías ingeridas son carbohidratos, esta alta ingesta se ha vinculado a diversas enfermedades (Malik, Schulze, & Hu, 2006); sin embargo, ha sido difícil encontrar un modelo experimental adecuado para estudiar el metabolismo de los carbohidratos. Células epiteliales de cordón umbilical de humano se cultivaron con concentraciones elevadas de glucosa (33.3 mM) para observar el efecto de la misma sobre las vías metabólicas y de apoptosis (H. Zhao et al., 2007). Distintos grupos de investigación han comenzado a utilizar al *C. elegans* como modelo para estudiar el metabolismo de la glucosa directamente en un organismo multicelular eucarionte, ya se han creado entonces algunos protocolos para establecer las condiciones experimentales adecuadas.

Para crear un modelo de restricción de glucosa en el gusano se utilizó a un inhibidor de la glucólisis (inhibidor de la glucosa fosfato isomerasa) (Schulz et al., 2007). Para estudiar condiciones de altos niveles de glucosa se agregaron diferentes cantidades de glucosa directamente al medio de crecimiento; las concentraciones utilizadas en estos estudios varían. Se ha visto que al agregar desde 0.1 mM de glucosa (20 mg/l) hay un efecto deletéreo pues disminuye el tiempo de vida de los gusanos (Choi, 2011). Otro estudio utilizó hasta 50 mM de glucosa en el medio, y con esta concentración se observaron también efectos en el tiempo de vida y, además, en la producción de especies reactivas de oxígeno (Schulz et al., 2007). En otro estudio que utilizó un rango de concentraciones que van desde 0.1% a 2% de glucosa en el medio. Se observaron efectos a partir de la menor concentración (0.1% o 5.6 mM) comprobándose además que los gusanos ingieren a la glucosa del medio pues los niveles de glucosa en su interior incrementaron dos veces con respecto a los que fueron cultivados en el medio control (Lee, Murphy, & Kenyon, 2009). Finalmente, hay un estudio que empleó una concentración de glucosa de 40 mM en el medio, que es la concentración que se utiliza en el presente trabajo para la condición de alta glucosa, pues además de que con esta concentración se observan efectos reportados previamente al cultivar al gusano en altas concentraciones de glucosa (como por ejemplo la disminución del tiempo de vida), cuando se midió la glucosa en extractos del gusano se obtuvo una concentración en el interior de 14 mM, concentración que se asemeja a la de un paciente con hiperglicemia sin tratar (Schlotterer et al., 2009), lo cual establece al gusano como un modelo para enfermedades como la diabetes y para estudiar el efecto de la glucosa en la función celular.

Metabolismo de lípidos

Algunos grupos de investigación también han utilizado al gusano como un modelo para el estudio de la regulación, síntesis y almacenamiento de grasas *in vivo*. Se ha utilizado para identificar a los genes responsables de la acumulación de grasas mediante estudios de knockdown genético que afecten los niveles de lípidos (Chiang & MacDougald, 2003).

Al igual que con la glucosa, se puede controlar la concentración de lípidos en los medios de cultivo del gusano y así evaluar su efecto en el organismo. Se han utilizado, por ejemplo, medios que contienen 1% de glicerol, un componente de los ácidos grasos (S. Lee et al., 2009); otro estudio reporta el efecto de añadir al cultivo ácidos grasos como el ácido esteárico, oleico o linoleico a una concentración de 1 mM (Nomura et al., 2010); se realizó también un estudio en donde se utilizó al colesterol para simular una dieta elevada en grasas, se consideró una concentración de 12.5 μ M como condición control y una de

50 μ M como una concentración elevada. Se observó un efecto en los gusanos, pues se incrementaron los niveles de triglicéridos, es por eso que en este estudio utilizamos al colesterol a una concentración de 50 μ M para establecer una dieta alta en lípidos (Kim et al., 2010).

Estudio de los microRNAs expresados diferencialmente en condiciones de ayuno

En nuestro laboratorio se realizó un estudio para caracterizar a los microRNAs de *C. elegans* que cambian su expresión cuando se somete a los gusanos a un ayuno de 12 h, siguiendo un protocolo similar al establecido previamente por Horvitz y colaboradores (L Avery & Horvitz, 1990) en donde se mide la cantidad de alimento para establecer el tiempo de ayuno de los gusanos, es decir, cuanto tiempo se requiere para que los gusanos ingieran una determinada cantidad de alimento y a partir de que la consumen toda comienza su etapa de ayuno. Posteriormente se realizó la secuenciación masiva de RNAs de tamaño pequeño (RNA-seq). Para estos experimentos se generaron bibliotecas de cDNA de microRNAs de larvas L4; las larvas se utilizaron en esta etapa para evitar la entrada en etapa dauer por falta de alimento como ocurre en etapas previas y también para descartar las alteraciones propias de la reproducción en gusanos adultos. La secuenciación de las bibliotecas de cDNA se realizó mediante la tecnología Illumina. En este método, las moléculas de DNA se amplifican formando “clusters” de DNA en la superficie de una placa, para determinar la secuencia de cada uno de los clusters, se agregan 4 tipos de bases de término que se van removiendo químicamente en ciclos, durante los cuales se toman imágenes secuenciales de los nucleótidos que están marcados con fluorescencia. Se obtuvieron un total de 27.4 millones de lecturas para el control y 27.1 millones de lecturas para el ayuno de 12 horas. De los RNAs no codificantes identificados, el 74.9% corresponden a secuencias de microRNAs en condiciones control y el 69.1% en condiciones de ayuno, y un 13.5 y 17.3% a otros RNAs no codificantes, como se observa en la Figura 19.

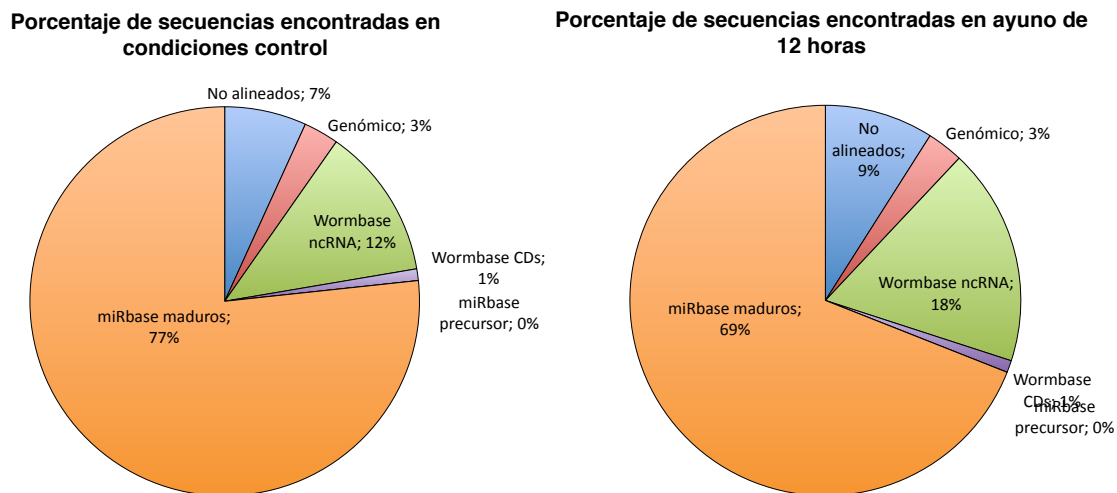


Figura 19. Tipos de RNAs encontrados en las bibliotecas de RNAs no codificantes de larvas L4 alimentadas normalmente (control) y sometidas a un ayuno de 12 h.

Distribución de los miRNAs en condiciones control y en ayuno en larvas L4

Los microRNAs más expresados en las larvas L4 en las condiciones estudiadas son: *miR-58-3p*, *miR-1-3p*, *miR-84-5p*, *miR-228-5p*, *miR-66-5p*, *miR-48-5p*, *miR-70-3p* y *let-7-5p* (Figura 20). El *miR-58-3p* participa en procesos de locomoción, control del tamaño corporal, puesta de huevecillos, y, dado su patrón de expresión y abundancia, se considera que tiene un papel 'housekeeping' (Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010). De *miR-1-3p* se ha reportado que es importante para el funcionamiento de las uniones neuromusculares en *C. elegans*, mientras que el homólogo en *Drosophila* tiene un papel en el desarrollo del músculo (Simon et al., 2008).

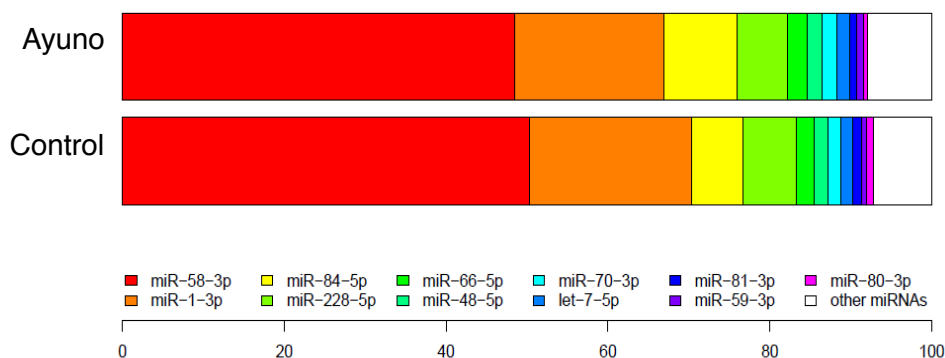


Figura 20. Distribución de los microRNAs más abundantes encontrados en *C. elegans* en condiciones control y de ayuno de 12 h en etapa L4.

El haber obtenido que los microRNAs *miR-58-3p* y *miR-1-3p* son los más abundantes, coinciden con los datos publicados por Kato y colaboradores, quienes hicieron un estudio en donde caracterizan y evalúan el cambio de expresión de los diferentes microRNAs en las diferentes etapas de vida de *C. elegans*; se obtuvo que en la etapa L4 los microRNAs más abundantes son el *miR-58-3p* y el *miR-1-3p* (Masaomi Kato, De Lencastre, Pincus, & Slack, 2009) (Figura 21).

Gusanos hermafroditas (*wild-type* N2)

	Embrión	L1	L2	L3	L4	Adulto						
1	miR-58	48.9	miR-58	45.0	miR-58	48.9	miR-58	43.8	miR-58	46.0	miR-58	54.3
2	miR-1	21.9	miR-1	32.3	miR-1	29.9	miR-1	32.3	miR-1	25.1	miR-1	19.0
3	miR-52	5.0	miR-228	6.0	miR-228	6.6	miR-228	7.1	miR-48	10.5	miR-48	11.1
4	miR-35	5.0	miR-72	5.2	miR-72	4.2	miR-72	3.1	miR-228	3.3	miR-71	2.2

Figura 21. microRNAs más abundantes en cada una de las etapas de desarrollo del *C. elegans*. En colores se muestran los miRNAs que coinciden con los resultados obtenidos en el análisis de abundancia presentado en la figura anterior (Masaomi Kato et al., 2009).

MicroRNAs expresados diferencialmente en condiciones control y en ayuno en larvas L4

Una vez que se obtuvo la caracterización de los microRNAs más expresados en la etapa L4 en las dos condiciones de interés, control y ayuno, se evaluó cuales son los microRNAs que se expresan diferencialmente en ambas condiciones, se encontró entonces que los que aumentan su expresión en las larvas sujetas al ayuno de 12 h con respecto al control son el *miR-34-3p*, *miR-35-3p*, *miR-36-3p*, *miR-37-3p*, *miR-38-3p*, *miR-39-3p*, *miR-41-3p* y *miR-4813-5p*, y entre los que disminuyen su expresión se encuentra *let-7-3p* (Figura 22).

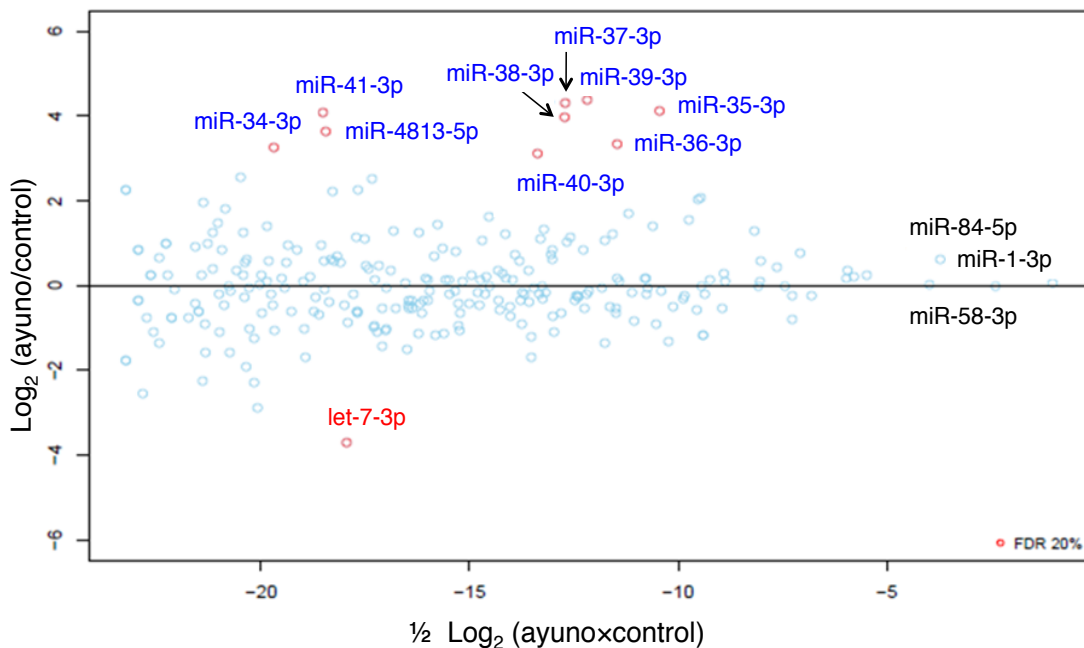


Figura 22. microRNAs que se expresan diferencialmente en condiciones de ayuno con respecto al control. En azul se muestran los microRNAs que aumentan su expresión y en rojo *let-7-3p* que disminuye su expresión de forma significativa. En negro se muestran *miR-58-3p*, *miR-1-3p* y *miR-84-5p*, que se mantienen constantes en ambas condiciones, resultados que coinciden con lo que se había reportado previamente por Kato y colaboradores (Masaomi Kato et al., 2009) ($M = \log_2 \text{ayuno} - \log_2 \text{control}$).

miR-34

Fue identificado inicialmente en el nemátodo *C. elegans* donde se caracterizó su expresión a lo largo de tejidos somáticos como la faringe, el intestino, neuronas y vulva, lo que sugirió un papel en el soma (Weidhaas et al., 2007). En el nemátodo se caracterizó además su perfil de expresión a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo, se encontró que su expresión es muy baja, casi imperceptible en el embrión y va

incrementando a lo largo de la vida (Masaomi Kato et al., 2011). Pertenece a una familia que se encuentra altamente conservada, incluso en el humano, donde se ha visto en cultivos de células de pulmón que su expresión incrementa después de su exposición a radiación (Wong et al., 2011), este incremento se observó también en el nemátodo. Se observó además que el incremento de este microRNA ocurre a través de p53 y se requiere para la respuesta al daño del DNA (M Kato et al., 2009). En resultados del laboratorio, se ha caracterizado a este microRNA como una de las moléculas que cambia su expresión cuando se somete al gusano a condiciones de ayuno, es por eso que es relevante para esta investigación (Figura 23).

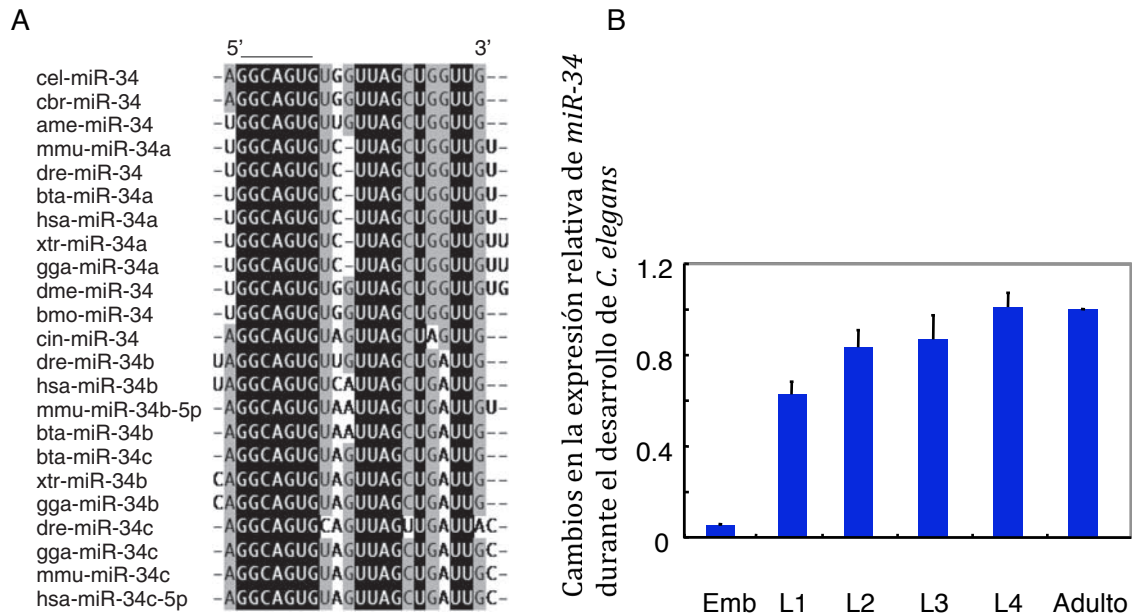
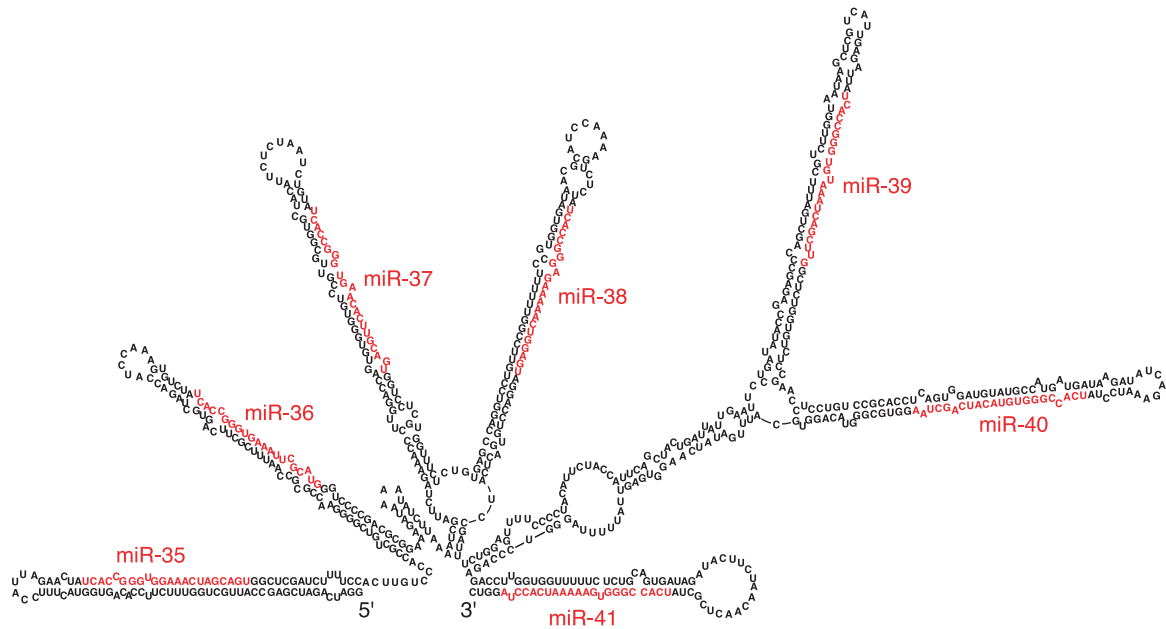


Figura 23. A) El *miR-34* se encuentra conservado en diferentes especies. cel: *Caenorhabditis elegans*, cbr: *Caenorhabditis briggsae*, ame: Abeja (*Apis mellifera*), mmu: Ratón (*Mus musculus*), dre: Pez cebra (*Danio rerio*), bta: Vaca (*Bos taurus*), hsa: Humano (*Homo sapiens*), xtr: *Xenopus tropicalis*, gga: Pollo (*Gallus gallus*), dme: *Drosophila melanogaster*, bmo: Gusano de seda (*Bombyx mori*), cin: Ascidiacea (*Ciona intestinalis*) B) Cambios en la expresión del *miR-34* en el desarrollo de gusanos hermafroditas (Masaomi Kato et al., 2011).

miR-35

La familia *miR-35* se compone por 8 miRNAs, que van del *miR-35* al *miR-42*, se localizan en dos clusters genómicos separados por 350 kb. El primero de los clusters abarca de *miR-35* a *miR-41* y el otro contiene a *miR-42*, *miR-43*, y *miR-44*, no obstante, estos dos últimos no están relacionados por secuencia a la familia *miR-35* y pertenecen a otras dos familias diferentes (Figura 24) (Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010; Lim et al., 2003).

A



B

<i>miR-35</i>	U	C	A	C	C	G	G	G	U	G	G	A	A	A	C	U	A	G	C	A	G	U
<i>miR-36</i>	U	C	A	C	C	G	G	G	U	G	A	A	A	A	U	U	C	G	C	A	U	G
<i>miR-37</i>	U	C	A	C	C	G	G	G	U	G	A	A	C	A	C	U	U	G	C	A	G	U
<i>miR-38</i>	U	C	A	C	C	G	G	G	A	G	A	A	A	A	A	C	U	G	G	A	G	U
<i>miR-39</i>	U	C	A	C	C	G	G	G	U	G	U	A	A	A	U	C	A	G	C	U	U	G
<i>miR-40</i>	U	C	A	C	C	G	G	G	U	G	U	A	C	A	U	C	A	G	C	U	A	A
<i>miR-41</i>	U	C	A	C	C	G	G	G	U	G	A	A	A	A	A	U	C	A	C	C	U	A
<i>miR-42</i>	U	C	A	C	C	G	G	G	U	U	A	A	C	A	U	C	U	A	C	A	G	A

Figura 24. A) Estructura secundaria del cluster *miR-35-41* como la predice el programa RNAfold, los microRNAs se muestran en rojo y las secuencias que los flanquean en negro (Hofacker, 2004; Lau, Lim, Weinstein, & Bartel, 2001). B) Secuencias de los 8 miembros de la familia *miR-35*. Los nucleótidos conservados se muestran en letras negras con fondo blanco, se consideraron así al ser idénticos en más de la mitad de los miembros de la familia, en azul se muestran las variantes (Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010).

Mediante reporteros de GFP se ha encontrado que *miR-35* se expresa en células embrionarias comenzando en la gastrulación y alcanzando su máximo nivel de expresión en la elongación (Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010) y, mediante northern blots se ha descrito que se expresa solamente en el embrión y en adultos, no se encontró expresión en ninguna etapa larvaria (Lau et al., 2001),

En cuanto a la función que desempeñan estos microRNAs, se ha caracterizado que la delección del cluster completo (del *miR-35* al 42) provoca letalidad embrionaria o en la etapa L1, mientras que la delección del cluster del *miR-35* al 41 provoca letalidad embrionaria o en la etapa L1 sensible a temperatura, algunos embriones sufrieron arresto del desarrollo embrionario, morfogénesis fallida, y falta de elongación de la faringe. Debido a que la expresión individual de cada uno de los miembros de la familia pero no así de *miR-43* o *miR-44* rescataron los defectos causados por la delección de todo el

cluster. Se ha descrito que los miembros de este cluster actúan de forma redundante, ya que la expresión de los microRNAs individuales es suficiente para que el desarrollo embrionario se lleve a cabo (Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010; Miska et al., 2007).

Mediante estudios con microarreglos se encontró que su expresión se origina en la gónada pues nemátodos sin gónada no lo expresan, además se encontró que se encuentra expresado en mayor proporción en la ovogénesis con respecto a la espermatogénesis. Este cluster es el único que se ha caracterizado con este patrón particular de expresión (Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010).

Estudios recientes han encontrado que este cluster participa en la respuesta a RNA de interferencia, se encontró que gusanos que carecen de este cluster mostraron una reducción en la expresión del gen *lin-35/Rb* que participa en la regulación de la respuesta al RNA de interferencia, sin embargo, la forma en la que el cluster regula positivamente a este gen aún no se conoce (Massirer et al., 2012).

Finalmente, hay otro estudio donde se describe una función de la familia *miR-35* en la transición G1/S de las células intestinales y en la proliferación de la línea germinal. Se observa que la pérdida del cluster provoca una reducción en el número de núcleos en el intestino y en la gónada distal mitótica. En este estudio se propone a los genes conservados *lin-23* y *gld-1* como posibles blancos (Liu et al., 2011). Esto es relevante puesto que este cluster tiene la capacidad de controlar muchos genes blanco en paralelo (Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010). Debido a que el *miR-35-3p* fue uno de los microRNAs que cambiaron su expresión significativamente en condiciones de ayuno, se evaluaron los niveles de expresión del mismo mediante RT-PCR como se muestra a continuación.

Análisis de los niveles de expresión de *miR-35-3p* en condiciones control y en ayuno

Se confirmó la expresión diferencial del *miR-35-3p* mediante RT-PCR y los resultados obtenidos coincidieron con los datos de la secuenciación masiva en donde se observó que la expresión de *mir-35-3p* incrementa en condiciones de ayuno. En los datos de la secuenciación masiva se observó además que los niveles de expresión del *miR-58-3p* se mantienen constantes en ambas condiciones y esto también se confirmó con un ensayo de RT-PCR, por lo que se estableció entonces que este microRNA puede utilizarse como control de carga de los niveles de RNA al igual que el rRNA 5S (Figura 25).

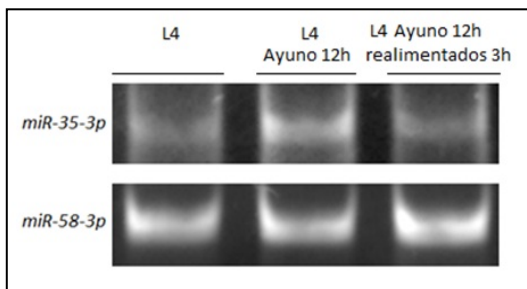


Figura 25. Análisis por RT-PCR de la expresión de *miR-35-3p* en larvas L4 en condiciones control, sometidas a un ayuno de 12 h y realimentadas por 3 h. Se muestran los niveles del *miR-58-3p* como control de carga (Datos no publicados de Laura García Segura, Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM).

Análisis de los niveles de expresión de los mRNAs de los genes *gld-1* y *lin-23* en condiciones control y en ayuno

Una vez que se confirmó la expresión diferencial del *miR-35-3p*, se analizaron los niveles de expresión de dos de los posibles genes blanco de este microRNA, *lin-23* y *gld-1*. Estos genes fueron propuestos en el estudio realizado por Liu y colaboradores (Liu et al., 2011). Los resultados mostraron una disminución en los niveles de expresión de los mensajeros de estos genes en condiciones de ayuno con respecto al control (Figura 26).

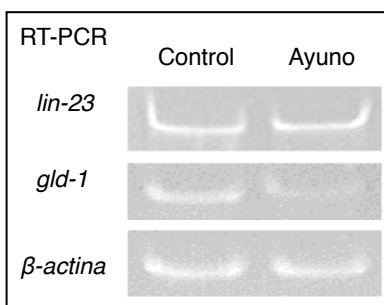


Figura 26. Análisis por RT-PCR de la expresión de los niveles de RNA mensajero de *lin-23* y *gld-1* en larvas L4 en condiciones control y sometidas a un ayuno de 12 h. Se muestran los niveles de β -actina como control de carga. (Datos no publicados de Laura García Segura, Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM).

Los resultados y datos anteriores son antecedentes directos para este proyecto, ya que en primera instancia, se muestran las bases que nos permitirán establecer las condiciones experimentales para poder estudiar al *C. elegans* en distintas condiciones de estrés nutricional. Los resultados de la secuenciación masiva muestran que hay microRNAs que cambian sus niveles de expresión si se somete a las larvas *C. elegans* a condiciones de ayuno de 12 h, esto es relevante pues los niveles de RNA mensajero de dos de los posibles genes blancos reportados para este microRNA de interés disminuyen su expresión cuando incrementan los niveles del mismo en esta condición, lo cual nos lleva a pensar que la regulación de la expresión de genes dependerá al menos en parte de los niveles de expresión de los diversos microRNAs presentes en esta condición de manera específica.

Planteamiento del problema

A pesar de que ya se ha establecido la importancia del control del metabolismo a nivel molecular, ha sido difícil el desarrollo de un modelo de estudio que permita la identificación de los blancos que participan en este proceso; se ha utilizado recientemente al nemátodo *C. elegans* como un modelo para el estudio del metabolismo de carbohidratos y lípidos, puesto que muchos de sus genes conservan homología con el humano. Es por eso que en este trabajo se busca incorporar un perfil de expresión de microRNAs cuyos niveles se han visto afectados al someter al nemátodo a condiciones de ayuno e identificarlos como componentes moleculares que participan en la regulación de estos procesos.

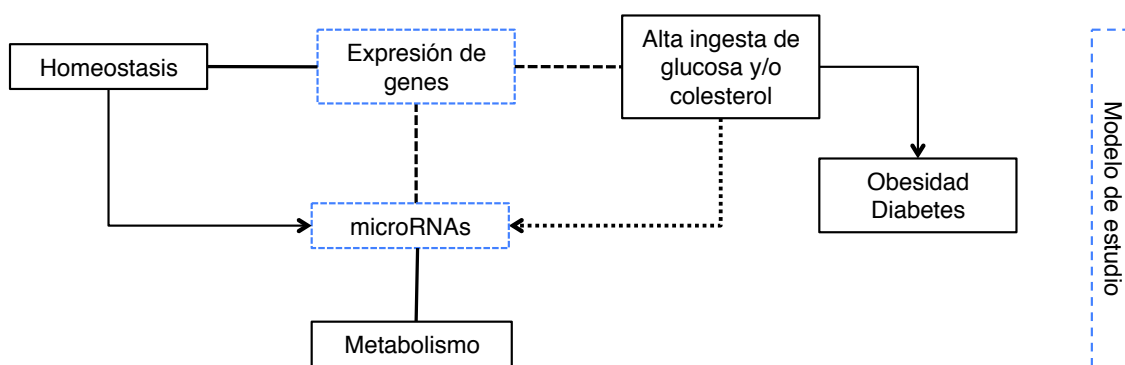


Figura 27. Planteamiento del problema. En el esquema se muestran a grandes rasgos las cuestiones a dilucidar en este proyecto resaltadas en color azul.

Hipótesis

Una ingesta elevada de glucosa y/o colesterol en *C. elegans* como modelo experimental, provoca una expresión diferencial de microRNAs y por lo tanto altera la expresión de genes.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los niveles de expresión de microRNAs de interés y los cambios fenotípicos que ocurren al someter a gusanos *C. elegans* a una dieta alta en glucosa, en colesterol y en glucosa y colesterol con respecto a una dieta control.

Objetivos particulares

1. Estandarizar el modelo de alta glucosa y colesterol al que se someterán los gusanos.
2. Evaluar el efecto de las dietas altas en glucosa y/o colesterol sobre el fenotipo, particularmente sobre el almacenamiento de lípidos.
3. Medir los niveles de expresión de microRNAs como se realizó en condiciones de ayuno en estas dietas altas en glucosa y/o colesterol.
4. Evaluar los cambios de expresión a nivel de mRNA y proteína de posibles genes blanco de estos microRNAs.

Material y Métodos

Cultivo de *C. elegans*

En el presente trabajo se utilizaron dos cepas de *C. elegans*: la cepa silvestre N2 y la cepa BS1080 (oz155es, GLD-1:: GFP/FLAG, unc-119(+)) [MM016] proporcionada por el Dr. Tim Schedl del Departamento de Genética de la Universidad de Washington. Ambas cepas se cultivaron en condiciones estándar (Wood, 1988) utilizando los diferentes medios NGM descritos en el apéndice. Se utilizaron varios medios de cultivo: un medio control, uno con exceso de glucosa, uno con exceso de colesterol y uno con exceso de glucosa y colesterol, se mantuvieron a 18°C.

Evaluación fenotípica

Tamaño de los especímenes

Para llevar a cabo la medición de gusanos se partió de un cultivo de *C. elegans* que fue sincronizado con el protocolo que se describe en el apéndice, posteriormente se repartieron los embriones obtenidos en partes iguales en cajas petri con los 4 medios de interés y se mantuvieron hasta la segunda generación. Los gusanos de la primera y segunda generación se separaron por tamaño, los pequeños que corresponden a la segunda generación se colocaron en cajas nuevas con los mismos medios de crecimiento y se dejaron hasta que alcanzaron la etapa larvaria L4. Estos gusanos se colectaron en tubos eppendorf con 1 ml de Buffer M9, y se sometieron al tratamiento descrito en el apéndice con la solución al 10% de azida de sodio, un inhibidor metabólico utilizado para inmovilizar a los gusanos pues inhibe la citocromo c oxidasa y la ATP sintasa. Posteriormente, se observaron al microscopio y se fotografiaron colocados en una cámara de Neubauer. Se analizaron al menos 5 cultivos para cada condición.

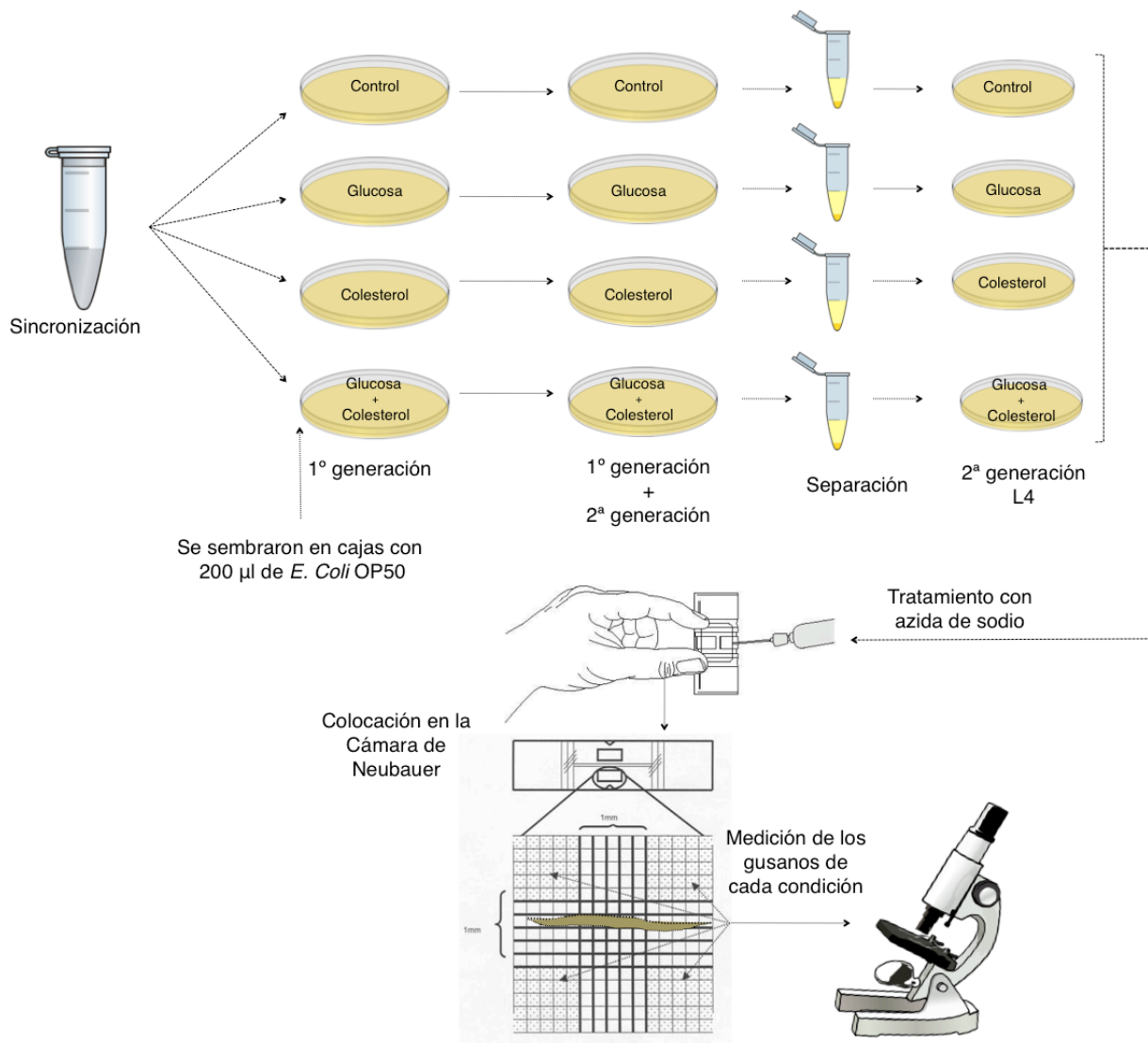


Figura 28. Tamaño de los especímenes. En el esquema se muestra de manera general el protocolo que se siguió para observar y medir a los gusanos.

Tinción con Rojo Nilo *in vivo*

Para la tinción *in vivo* con Rojo Nilo se utilizó el protocolo establecido por Soukas y colaboradores (Rourke, Soukas, Carr, & Ruvkun, 2009). Brevemente, se partió de un cultivo de *C. elegans* que fue sincronizado con el protocolo que se describe en el apéndice, posteriormente se repartieron los embriones obtenidos en partes iguales en cajas petri con los 4 medios de interés que se prepararon adicionando 550 μ l de Solución Stock de Rojo Nilo, y se mantuvieron hasta la segunda generación. Los gusanos de la primera y segunda generación se separaron por tamaño, los pequeños que corresponden a la segunda generación se colocaron en cajas nuevas con los mismos medios de crecimiento con Rojo Nilo adicionado y se dejaron hasta que alcanzaron la etapa larvaria L4. Estos gusanos se colectaron en tubos eppendorf con 1 ml de Buffer M9, y se colocaron en un portaobjetos preparado con una placa de agar para su observación al

microscopio. Este experimento se realizó al menos 3 veces para cada condición. Para cuantificar la intensidad de fluorescencia se hizo un análisis con las herramientas del programa ImageJ64. Las especificaciones de este análisis se describen en el apéndice.

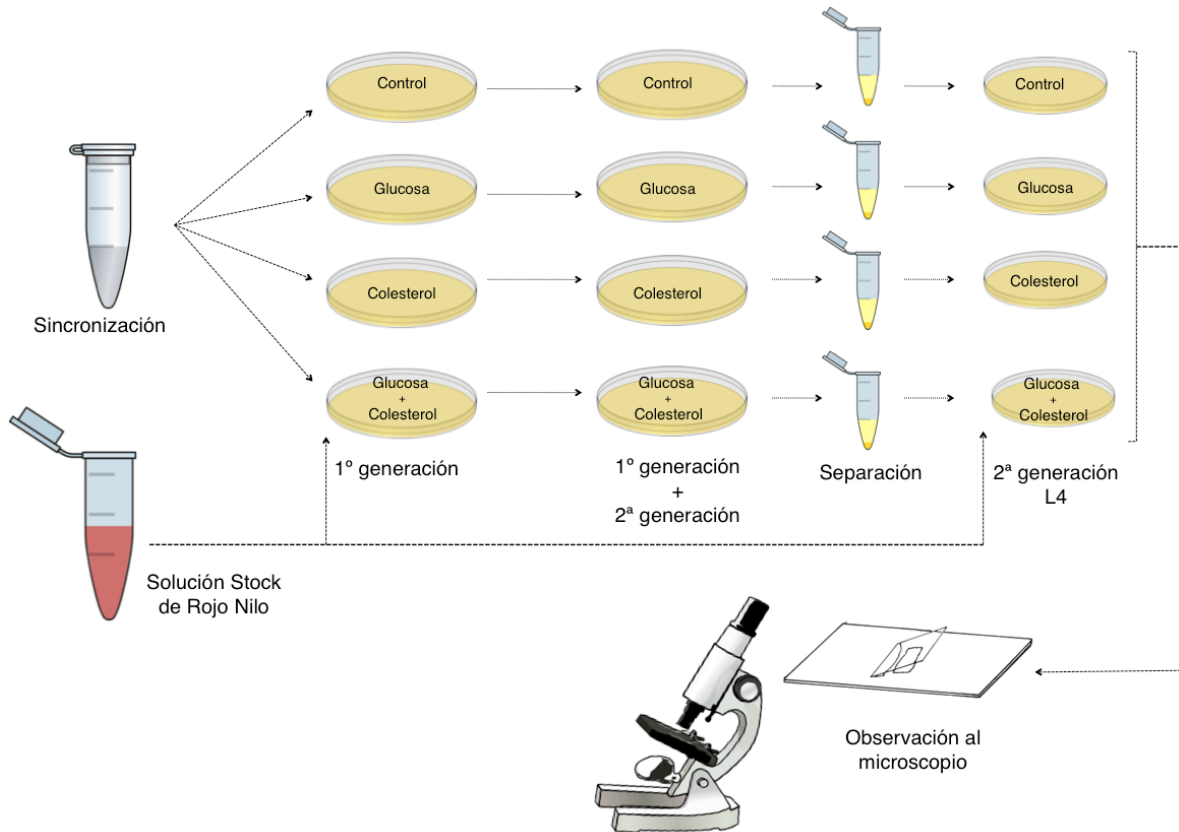


Figura 29. Tinción con Rojo Nilo *in vivo*. En el esquema se muestra de manera general el protocolo que se siguió para teñir a los gusanos sometidos a dietas altas en glucosa y/o colesterol con Rojo Nilo adicionado que permite el marcaje con fluorescencia de lípidos.

Tinción con Negro Sudán

Para la tinción con Negro Sudán se siguió el protocolo establecido por Kim y colaboradores (Kim et al., 2010) descrito a detalle en el apéndice. Brevemente, se partió de un cultivo de *C. elegans* que fue sincronizado con el protocolo que se describe en el apéndice, posteriormente se repartieron los huevecillos obtenidos en partes iguales en cajas petri con los 4 medios de interés y se mantuvieron hasta la segunda generación. Los gusanos de la primera y segunda generación se separaron por tamaño, los pequeños que corresponden a la segunda generación se colocaron en cajas nuevas con los mismos medios de crecimiento y se dejaron hasta que llegaron a la etapa larvaria L4. Estos gusanos se colectaron en tubos eppendorf y se fijaron con paraformaldehído, se pasaron por un gradiente de etanol, se trataron con una solución saturada de Negro Sudán y se observaron al microscopio, las especificaciones de este protocolo se encuentran en el apéndice. Para hacer este análisis cuantitativo se utilizó el protocolo reportado por Tan y

colaboradores (Tan, Luo, Ho, & Lee, 2011) explicado también a detalle en el apéndice; brevemente, se extrae el colorante de los gusanos teñidos con etanol al 95% y se mide la absorbancia a 500 nm. Los valores se analizaron mediante las herramientas estadísticas del programa GraphPad Prism 6.0, como se muestra en el Anexo II.

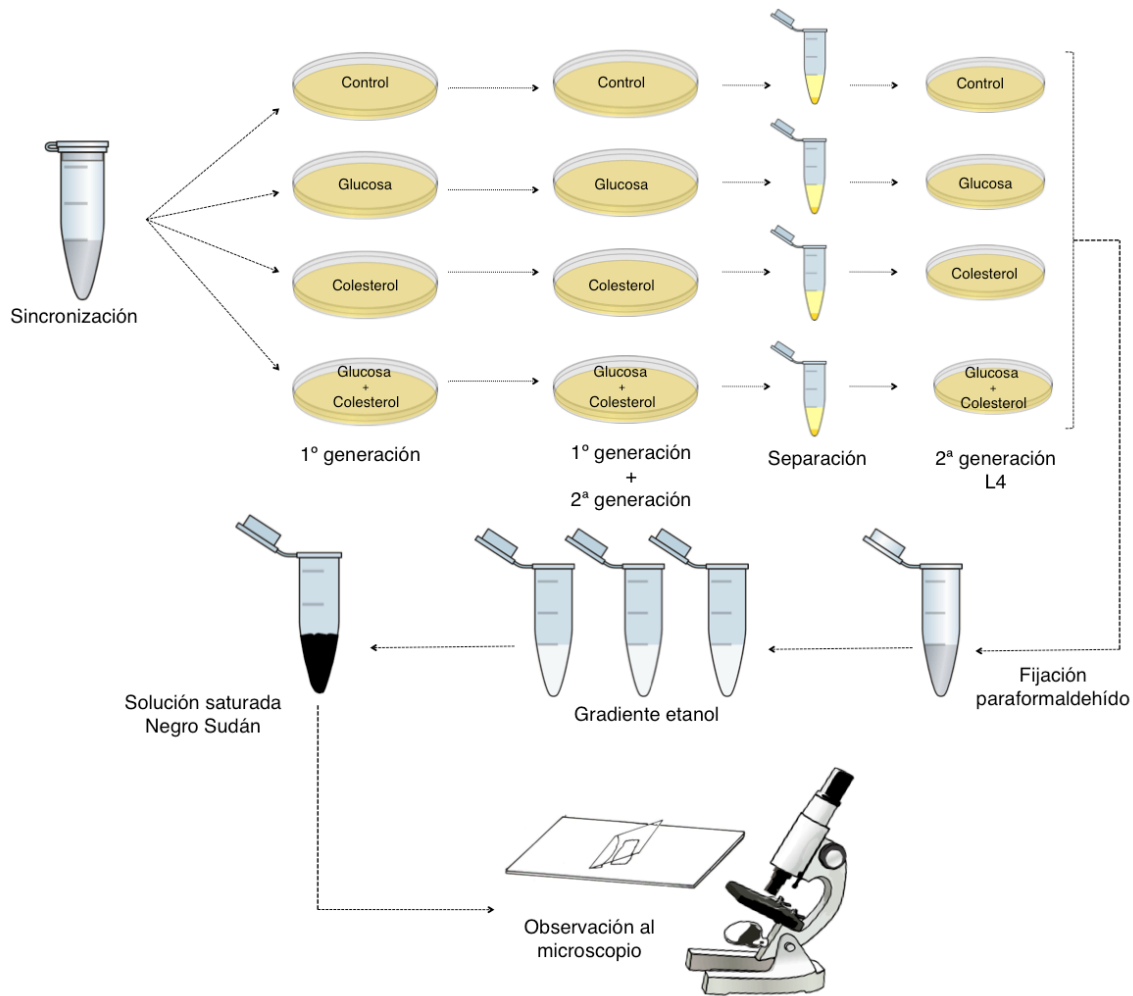


Figura 30. Tinción con Negro Sudán. En el esquema se muestra el protocolo que se siguió para la tinción de los gusanos sometidos a dietas altas en glucosa y/o colesterol con el colorante Negro Sudán, el cual permite el marcaje de lípidos.

Tinción con Rojo Nilo (fijación)

Para la tinción con Rojo Nilo con un paso previo de fijación se utilizó un protocolo basado en los previamente establecidos por Brooks y colaboradores y por el grupo de Soukas y colaboradores (Brooks et al., 2009; Pino, Webster, Carr, & Soukas, 2013); es un protocolo modificado del descrito anteriormente para la tinción con el colorante Negro Sudán; en este caso, se fija a los gusanos con isopropanol, el método a detalle se describe en el apéndice.

Conteo de progenie

Para ver si el número de progenie cambia entre una condición y otra por efecto de la dieta, se utilizó el protocolo establecido por Horvitz y colaboradores (Trent, Tsuing, & Horvitz, 1983). Brevemente, se sincronizó un cultivo con la técnica descrita en el apéndice, se repartieron por igual los huevecillos obtenidos en cajas de cada uno de los medios de interés. Se dejaron crecer a 18 °C y cuando los gusanos alcanzaron un tamaño manipulable, se tomó un gusano hermafrodita con la ayuda de un gendarme y se pasó a una caja chica (3 cm de diámetro) (denominada caja 1) con el mismo medio en el que se estaba creciendo, se dejó 24 horas, se movió al mismo gusano a una nueva caja (denominada caja 2) y se dejó 24 horas, después de que transcurrió este tiempo se movió a una caja nueva (denominada caja 3). En el cuarto día se realizó el conteo de larvas y embriones al microscopio marcando los ya contados para evitar doble conteo. Este experimento se hizo al menos 3 veces para cada condición. La estrategia de transferir al animal a cajas nuevas cada 24 horas durante 3 días permite hacer un mejor conteo del número de embriones no eclosionados y de larvas, para tener mejor aproximación al número de progenie para un gusano hermafrodita de cada condición.

Obtención de los perfiles de expresión de los microRNAs

Amplificación Mediante RT-PCR (protocolo Stem-Loop)

Se realizaron RT-PCRs para cuantificar las diferencias de expresión de los microRNAs de interés, esta técnica es muy específica, el protocolo a seguir se basa en el establecido por Kramer y colaboradores (Kramer, 2011) y se describe a detalle en el apéndice junto con la preparación que tiene que llevarse a cabo de los oligonucleótidos, los fundamentos de la técnica se describen brevemente en la Figura 31.

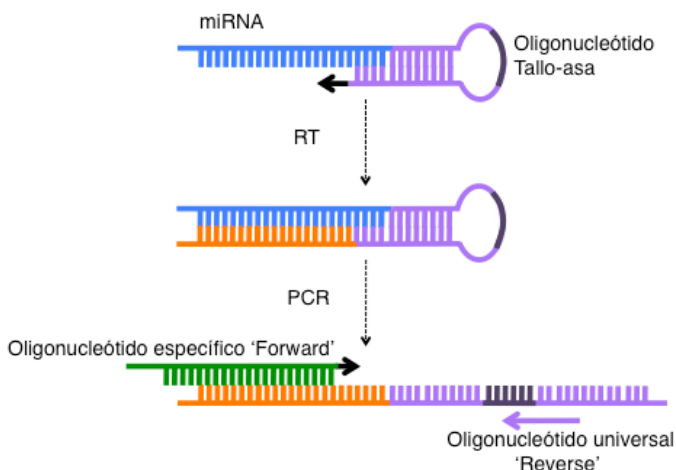


Figura 31. Fundamento de la técnica RT-PCR para amplificación de microRNAs. En color morado se muestra el oligonucleótido con estructura de tallo-asa, 6 nucleótidos del extremo 5' de este oligonucleótido se aparean con 6 nucleótidos del extremo 3' del microRNA. Esta hibridación permite la síntesis de cDNA (en color naranja) mediante una reacción de transcripción inversa, el sentido de la flecha muestra el sentido en que ocurre la reacción de polimerización. Después se llevó a cabo la reacción de PCR, en esta reacción se utilizaron dos oligonucleótidos convencionales,

uno que se une específicamente a la secuencia complementaria a la copia del microRNA (Forward, en verde) y el otro (Reverse, en morado) que se une a una secuencia resaltada en color morado oscuro que forma parte de la estructura del oligonucleótido tallo-asa, y por ende se considera un oligonucleótido universal (Kramer, 2011).

Análisis de los niveles de expresión de mRNA de genes blanco

Ensayos de RT-PCR

El RNA total de los gusanos cultivados en cada condición se purificó por el método de Trizol descrito en el apéndice. El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg del RNA total usando una mezcla de hexámeros y transcriptasa reversa, bajo las condiciones descritas en el apéndice y en seguida se llevó a cabo la amplificación por PCR de los mensajeros de interés junto con el de *β-actina* que se utilizó como control. Los productos de PCR se separaron en un gel de acrilamida al 12%, que fue teñido con Gel Red y fotografiado bajo luz UV en un fotodocumentador. Para la cuantificación de las bandas se hizo un ensayo densitométrico con el software de análisis TotalLab Quant.

Western Blot

El protocolo que se siguió se describe con detalle en el apéndice, se basó en los protocolos de bioquímica de proteínas establecidos por Hyman y colaboradores del Instituto Max Planck, los cuales pueden encontrarse en el siguiente enlace:

http://hymanlab.mpi-cbg.de/hyman_lab/c-elegans/

En este caso se hirvieron las muestras en lugar de utilizar un sonicador como lo establece Hyman, esta modificación se basa en lo indicado en el protocolo establecido por Greiss y colaboradores (Greiss, Schumacher, Grandien, Rothblatt, & Gartner, 2008). Para la cuantificación de las bandas se hizo un ensayo densitométrico con el software de análisis de imágenes TotalLab Quant.

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante las herramientas estadísticas del programa GraphPad Prism 6.0. Las especificaciones de cada análisis se encuentran en el Anexo II.

Resultados y Discusión

Evaluación fenotípica

El tamaño de los gusanos cambia cuando se someten a una dieta con niveles elevados de glucosa

Tamaño y producción de huevecillos

En primera instancia pudimos observar las diferencias fenotípicas que presentan los gusanos sometidos a las diferentes dietas. El primer efecto que observamos fue un incremento en el tamaño de los gusanos de manera dependiente de los niveles de glucosa (Figura 32).

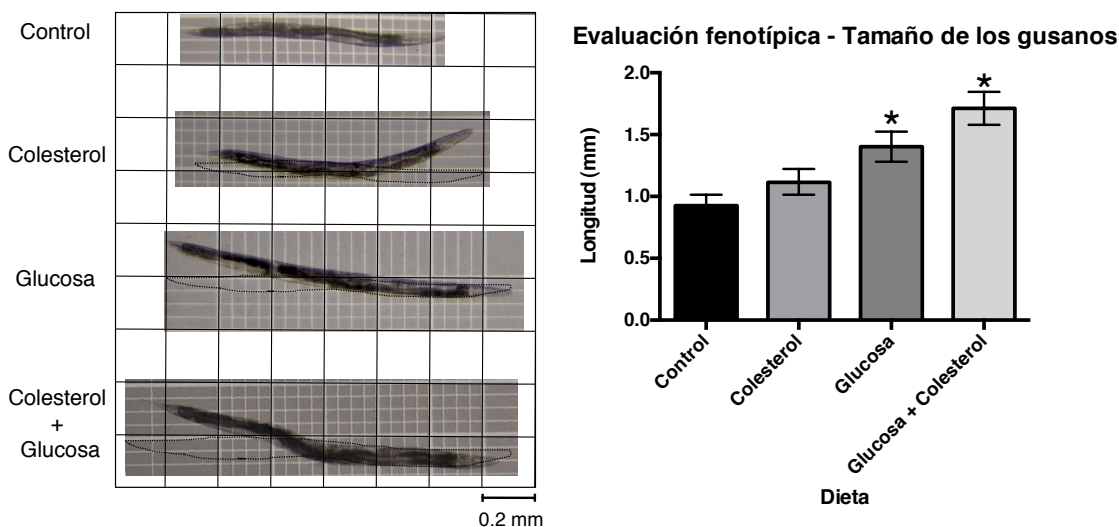


Figura 32. Efecto de la dieta alta en glucosa y/o colesterol sobre el tamaño de los gusanos. En el lado izquierdo se muestran fotografías representativas de gusanos *C. elegans* que se mantuvieron hasta la segunda generación en las dietas indicadas. Se colocaron en una cámara de Neubauer como se describió en material y métodos, las fotografías se alinearon de manera que la cuadrícula al fondo coincidiera en todas las imágenes para poder compararlas. Las líneas punteadas indican la forma que tendría el gusano en posición recta, indicando la longitud aproximada. La gráfica en el lado derecho muestra el promedio de las mediciones, para cada condición se hicieron como mínimo 30 mediciones independientes, se muestra el error estándar correspondiente, * $p < 0.05$ comparando contra el control.

Resulta significativo el incremento en tamaño de manera dependiente de los niveles de glucosa, el mayor efecto se observa en la dieta que contiene glucosa + colesterol (G+C). En promedio, los gusanos en condiciones control midieron 1 mm de longitud, los que se sometieron a una dieta alta en colesterol, 1.1 mm, los gusanos en dietas que contienen solamente un incremento en glucosa, 1.4 mm y los que estuvieron en dietas G+C alcanzaron una longitud de 1.7 mm.

También se compararon las diferentes dietas entre sí, con un p valor de 0.01, se obtuvo que las diferencias en tamaño entre los gusanos alimentados con colesterol comparados contra los alimentados con glucosa y G+C son significativas, al igual que los gusanos alimentados con glucosa al compararse contra los gusanos G+C, en seguida se abordarán las causas de estas diferencias.

Se ha descrito que el número de células, el tamaño de éstas y el espacio extracelular determinan el tamaño final de un organismo, y que a esto también contribuyen factores nutricionales y genéticos (Conlon & Raff, 1999). Los organismos multicelulares deben mantener dimensiones apropiadas de órganos y tejidos relativas al tamaño del organismo, y el proceso debe ser lo suficientemente flexible para tomar en cuenta las condiciones ambientales en las que se encuentra y, si es necesario, ajustar el tamaño (Stern, 2003).

Un factor clave que influye en el crecimiento es la nutrición. En los resultados se observa que un incremento en la cantidad de glucosa que los *C. elegans* consumen en la dieta causa un incremento en su tamaño; distintos estudios han reportado que someter a estos gusanos a condiciones de ayuno o restricción calórica los lleva a una disminución en su tamaño, por lo tanto se especula que los procesos que regulan el crecimiento están acoplados a los que regulan el metabolismo (So, Miyahara, & Ohshima, 2011; Stern, 2003).

En estudios previos, se ha visto variación en el tamaño a causa de la ingesta de diferentes cepas de *E. coli* con diferente composición de lípidos, proteínas y carbohidratos. Se observó que la ingesta de la cepa K12 de *E. coli*, que contiene de 3 a 5 veces más carbohidratos que la cepa OP50, causa un incremento en el tamaño de los gusanos de 1.65 veces (Brooks et al., 2009; So et al., 2011).

Se ha visto en *Drosophila* que la disponibilidad de nutrientes estimula la señalización de la insulina, y esto, a su vez, estimula el crecimiento y la proliferación de células, lo que lleva a una alteración final en el tamaño del organismo (Britton, Lockwood, Li, Cohen, & Edgar, 2002), lo cual podría explicar el incremento de tamaño que observamos en los nemátodos, ya que se sabe además que los nemátodos con mutaciones en el gen *daf-2* (que codifica para el receptor IGF-1; Insulin-like Growth Factor 1) no incrementan en tamaño cuando se alimentan de la cepa de *E. coli* K12 que contiene más carbohidratos (So et al., 2011).

Los gusanos se midieron a un mismo tiempo, es decir, después de sincronizar a los gusanos se esperó a que los gusanos en dieta control alcanzaran la etapa larvaria L4 y se realizaron las mediciones para todas las condiciones, esto es relevante pues las diferencias en tamaño pueden ser en parte a un desarrollo más rápido. Lo que coincide con reportes de Choi y colaboradores y Lee y colaboradores en los que se observó que una dieta alta en glucosa acorta el tiempo de vida del *C. elegans*, el grupo de Lee y colaboradores determinó que la glucosa disminuía el tiempo de vida de los gusanos al influenciar los componentes de la vía de señalización de insulina/IGF-1 (Choi, 2011; S. Lee et al., 2009). Datos que concuerdan además con lo observado por So y colaboradores, pues determinaron que una dieta con una cepa de *E. coli* que tiene altos niveles de glucosa disminuye el tiempo que tardan los nemátodos en llegar a la etapa adulta (So et al., 2011).

En nuestro laboratorio se ha observado que el tiempo de vida de los gusanos incrementa cuando se someten a condiciones de ayuno, el tiempo de desarrollo por las diferentes etapas larvianas de los mismos ha comenzado a estudiarse (Datos no publicados de Laura García Segura, Doctorado en Ciencias Biomédicas).

No se observaron fenotipos evidentes en cuanto a motilidad o defectos en las estructuras anatómicas del gusano, sin embargo, al estudiarse si las dietas afectaban la fertilidad del gusano, se evaluó el número de progenie, y se observó que éste incrementa significativamente cuando se le somete a una dieta alta en glucosa o G+C, pero no así en una dieta alta solamente en colesterol, como se muestra en la gráfica de la Figura 33.

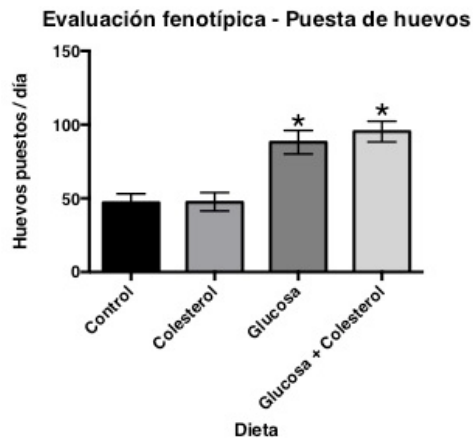


Figura 33. Efecto de la dieta alta en glucosa y/o colesterol sobre el número de progenie que tiene un gusano. Se muestra una gráfica del promedio del número de huevecillos que un gusano en aislamiento puso por día, se muestra el error estándar correspondiente, * $p < 0.01$ comparando cada condición contra el control, $n=12$.

Los resultados concuerdan con el estudio realizado por Valdés y colaboradores, que indica que nemátodos con alteraciones en la proteína CUP-1 (Cholesterol Uptake Protein-1,) una proteína que participa en la toma de colesterol de la dieta no presentan defectos en la espermatogénesis ni en la cantidad de progenie que tienen si se crecen en medios con altos niveles de colesterol, sin embargo, observaron que, cuando se crecen en medios con poco colesterol la cantidad de progenie que tienen se reduce considerablemente, pero no así el tamaño de los gusanos, lo que concuerda con nuestro resultado del efecto del colesterol sobre el tamaño de los gusanos (Valdes, Athie, Salinas, Navarro, & Vaca, 2012).

Por otro lado, se ha observado que la restricción calórica causa una disminución en la cantidad de progenie que tienen los gusanos (Seidel & Kimble, 2011); en un estudio donde se creó un modelo de restricción calórica al tratar a los gusanos *C. elegans* con metformina, una droga utilizada para el tratamiento de la obesidad y también en pacientes con diabetes tipo 2, pues reduce los niveles de glucosa en sangre e incrementa la sensibilidad a la insulina, se observó una disminución en el número de progenie de los mismos (Onken & Driscoll, 2010).

Acumulación de lípidos

También se evaluó si la cantidad de lípidos acumulados variaba cuando se sometía a los gusanos a las diferentes dietas, para esto se tiñeron gusanos en etapa larvaria L4 que se mantuvieron hasta la segunda generación en los medios a estudiar con un colorante

liposoluble, el Negro Sudán. El patrón que se obtuvo de las tinciones varía entre una condición y otra como se puede observar en los paneles A y B de la Figura 34, donde observamos una mayor tinción en los gusanos sometidos a dieta alta en glucosa y G+C. Como ya se describió, para hacer este análisis cuantitativo, se extrajo el colorante de los gusanos con el protocolo reportado por Tan y colaboradores (Tan et al., 2011) descrito a detalle en el apéndice. Los datos obtenidos se muestran en la gráfica del panel C de la Figura 34. Se obtuvo un incremento significativo en la cantidad de colorante que se extrajo de los gusanos con una dieta alta en glucosa y G+C, lo cual indica que estos gusanos acumulan una mayor cantidad de lípidos.

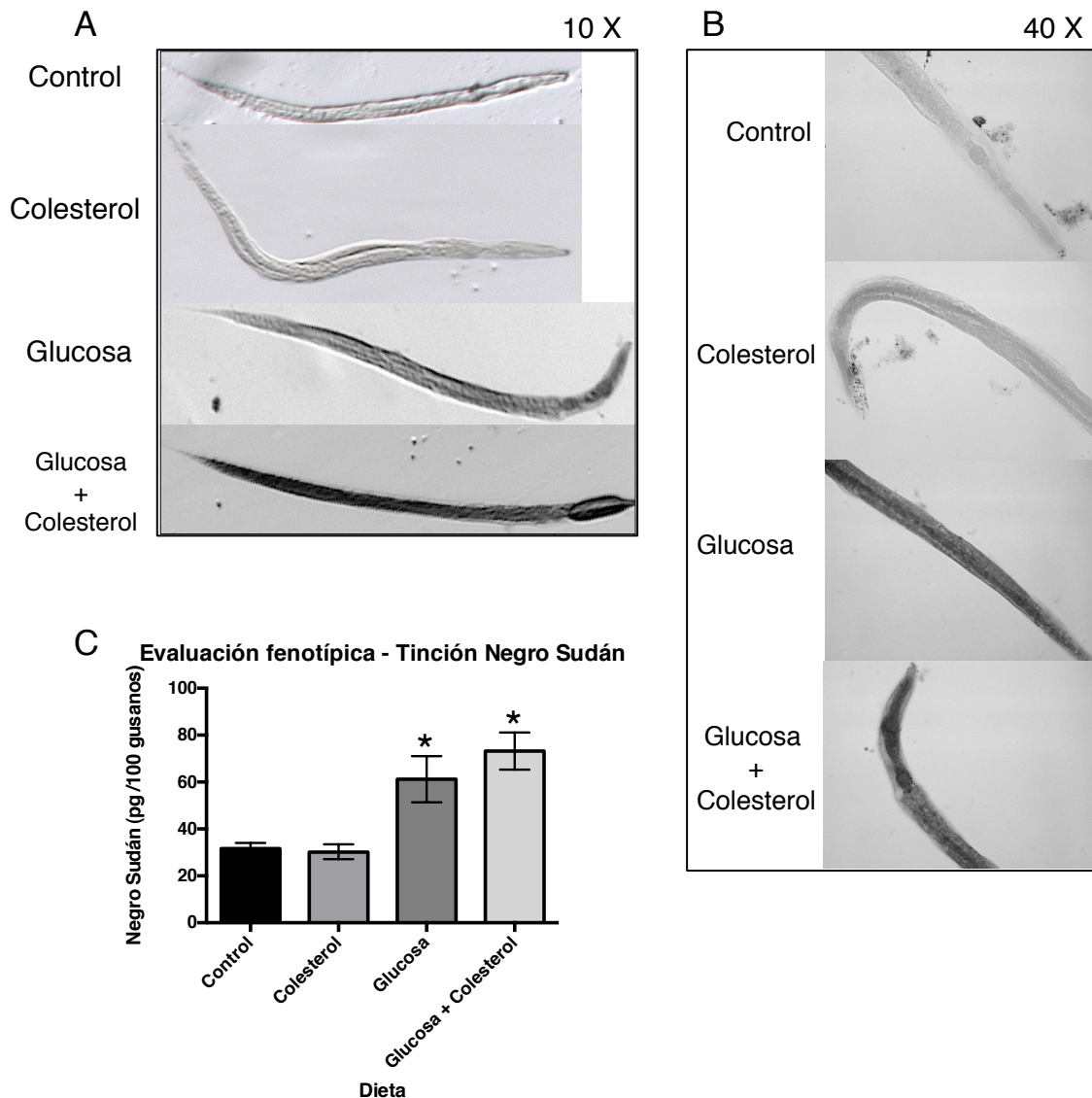


Figura 34. Tinción con Negro Sudán. En el panel A se muestran fotografías representativas de gusanos teñidos en un aumento 10 X. En el panel B se observan segmentos de gusanos teñidos en un aumento 40 X. El Panel C muestra la gráfica del colorante cuantificado después de extraerlo de los gusanos como se describe en el apéndice, se observa el error estándar correspondiente, *p < 0.01 comparando cada las diferentes condiciones contra el control, n=3.

Se realizó también el marcaje *in vivo* con el colorante Rojo Nilo en gusanos que se mantuvieron hasta la segunda generación en los diferentes medios; como ya se describió, este compuesto no fluoresce cuando se encuentra en solventes polares, pero, cuando se encuentra en un ambiente rico en lípidos fluoresce intensamente, por lo que ha sido utilizado como un marcador de los lípidos almacenados en *C. elegans*. Este marcaje, a diferencia de la tinción con Negro Sudán, se realizó con gusanos vivos pues al agregarlo a los medios de crecimiento de los gusanos éstos pueden ingerirlo como fue descrito en el protocolo de Soukas y colaboradores (Rourke et al., 2009). Como se muestra en la Figura 35, el gusano sometido a una dieta control y el gusano sometido a una dieta solamente alta en colesterol muestran menor intensidad de fluorescencia que los que se cultivaron en dietas altas en glucosa y en glucosa y colesterol.

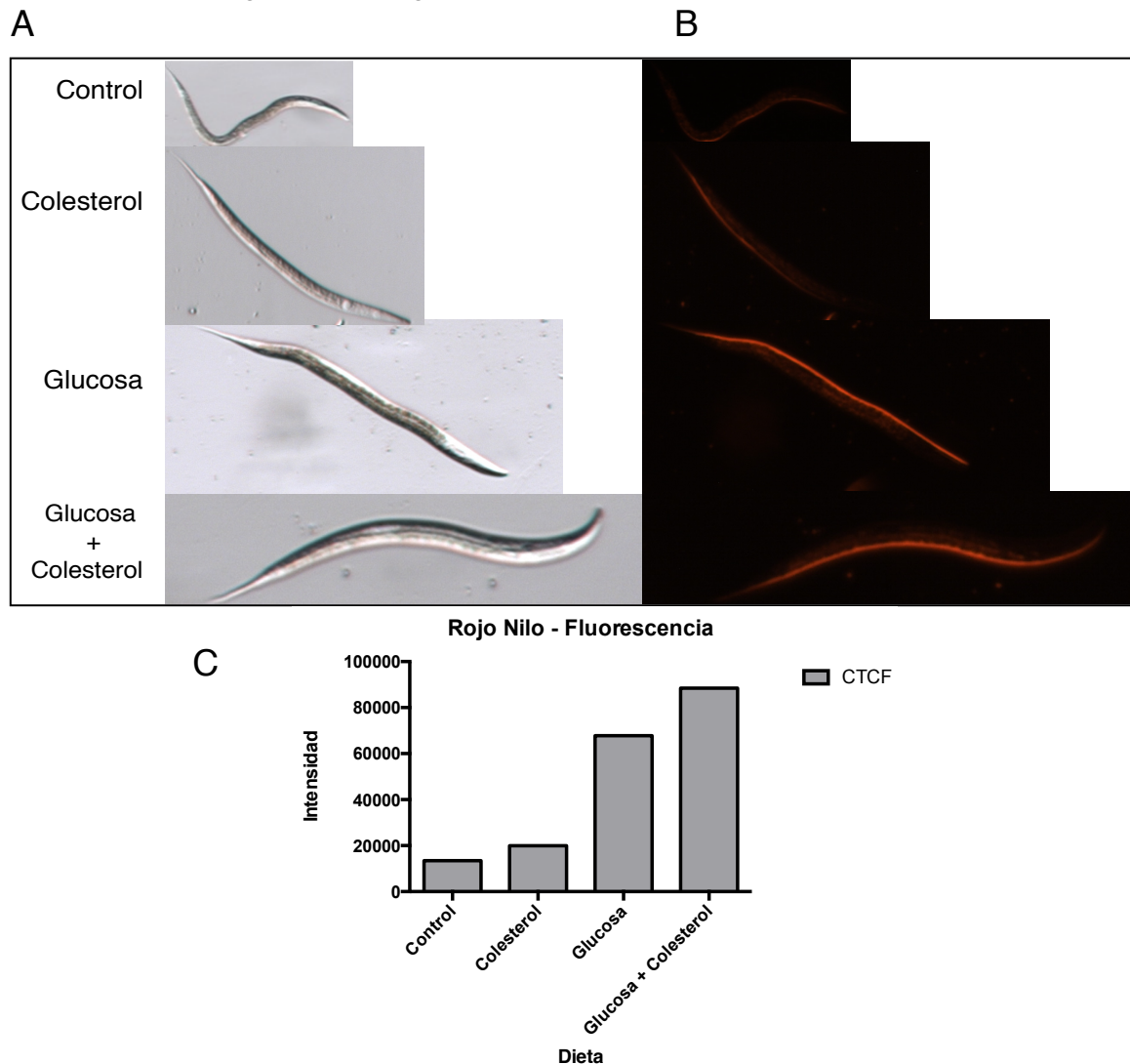


Figura 35. Marcaje *in vivo* con Rojo Nilo. En panel B de la figura se observan fotografías representativas de gusanos sometidos a las dietas de interés teñidos con Rojo Nilo. En el panel A se observa el mismo gusano fotografiado en un campo brillante. En el panel C se muestran los valores obtenidos de CTCF = Densidad integrada - (Área del gusano x fluorescencia media del fondo de la imagen) de una de las imágenes analizadas. Estos valores se obtuvieron para cada condición estudiada con el programa ImageJ64, como se describe en el apéndice, n=3.

También se utilizó al colorante Rojo Nilo para hacer una tinción después de un paso de fijación, mediante esta tinción se buscó evaluar si los lípidos acumulados variaban cuando se sometía a los gusanos a las diferentes dietas, el protocolo utilizado se describe a detalle en el apéndice. El patrón que se obtuvo de las tinciones varía entre una condición y otra como se puede observar la Figura 36.

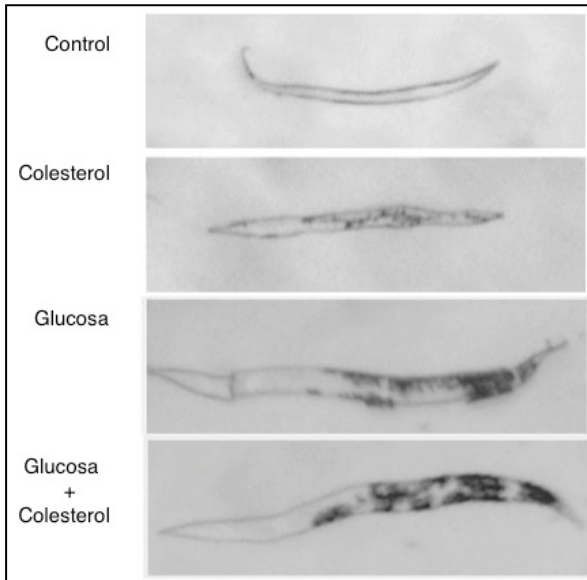


Figura 36. Tinción con Rojo Nilo con un paso previo de fijación. Se observan fotografías representativas de gusanos sometidos a las dietas de interés teñidos con Rojo Nilo después de un paso de fijación. Esta tinción permite observar con mayor detalle la acumulación del colorante, sin embargo, este tipo de imágenes no permiten el estudio a detalle de las estructuras donde se está almacenando el colorante.

En mamíferos, el proceso de convertir el exceso de energía en grasa comienza cuando la insulina induce la translocación del transportador de glucosa, incrementando así los niveles de glucosa intracelulares, se ha reportado que a este proceso le sigue un incremento en los niveles de SREBP-1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein), un factor de transcripción con estructura hélice-giro-hélice-zipper que se transloca al núcleo donde se dimeriza y se une a la secuencia consenso de respuesta a esterol (SRE), contribuyendo así a la expresión de genes que participan en la biosíntesis de ácidos grasos (Foretz et al., 1999; Gerin, Clerbaux, et al., 2010; Raghov et al., 2008). En 2010, fue reportado por Nomura y colaboradores que en los gusanos que se crecen en medios que contienen altos niveles de carbohidratos cambia la expresión de *sbp-1*, un homólogo del factor de transcripción SREBP-1c de mamíferos, el cual facilita la acumulación de grasa. Esto coincide con los resultados que obtuvimos de las tinciones con Negro Sudán y Rojo Nilo (Figura 34, 35 y 36), en donde se observa que los niveles de lípidos incrementan considerablemente en gusanos expuestos a estas dietas altas en glucosa (Nomura et al., 2010).

Raghov y colaboradores reportaron en 2008 que en gusanos con mutaciones (delecciones) en los genes que controlan las vías de síntesis de ácidos grasos se reestablece el tamaño de los gusanos control cuando se exponen a ácido oleico y linoleico, pero no así los niveles de grasa acumulada. Nuestros datos son consistentes con esto pues observamos que no hay diferencia en el almacenamiento de grasas en las dietas altas solamente en colesterol, e incluso, con la poca diferencia observada en el tamaño de los gusanos en las dietas altas solamente en colesterol con respecto a los gusanos control. Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con reportes que indiquen que esta exposición al colesterol induzca la β -oxidación de ácidos grasos (Raghov et al., 2008).

Kim y colaboradores reportaron que la tinción con Negro Sudán correlaciona con los niveles de triglicéridos en un modelo de *C. elegans*. Cuando realizamos el marcaje con Negro Sudán observamos un incremento en la acumulación de colorante en los gusanos sometidos a dietas altas en glucosa y G+C (Kim et al., 2010). Se sabe además que la glucosa estimula la esterificación de ácidos grasos a triglicéridos al generar piruvato y acetil-CoA, lo que correlaciona con el incremento que observamos en la acumulación de lípidos en los gusanos que se someten a dietas que contienen altos niveles de glucosa (Brooks et al., 2009; Foretz et al., 1999).

Es importante mencionar que debido a que la técnica para teñir a los gusanos con Negro Sudán requiere un paso de fijación y lavados con etanol, es propensa a error y puede mostrar inconsistencias, para evitar esto seguimos el protocolo establecido por Tan y colaboradores para hacer la técnica cuantitativa (Tan et al., 2011). A pesar de que puede ser insensible a fenotipos sutiles se ha reportado que es una técnica adecuada para observar fenotipos dramáticos como los que obtuvimos en las dietas altas en glucosa y colesterol (Kim et al., 2010; Strnadova et al., 2009).

Observamos también un incremento en el marcaje *in vivo* con Rojo Nilo en los gusanos sometidos a dietas altas en glucosa y G+C, esto es consistente con los datos que obtuvimos para la tinción con Negro Sudán. El Rojo Nilo ha sido utilizado para marcar gotas lipídicas en células de mamífero. Se ha reportado también que es un marcador de los niveles de ácidos grasos en *C. elegans* (Greenspan, Mayer, & Fowler, 1985b; Nomura et al., 2010). Sin embargo, se ha reportado que no marca adecuadamente la línea germinal, los embriones y la hipodermis. Debido a que estas estructuras pueden almacenar grasa, debemos considerar a nuestros experimentos de marcaje como una primera aproximación pues podrían ser inexactos (O'Rourke et al., 2009).

Se ha reportado un paso previo de fijación en el marcaje con Rojo Nilo mejora el marcaje de lípidos pues ya no requieren ser metabolizados por el gusano (Brooks et al., 2009; Pino, Webster, Carr, & Soukas, 2013). En la Figura 36 se muestra el marcaje que se realizó con Rojo Nilo siguiendo este protocolo, con este marcaje se muestra mejor la distribución del colorante, aunque el tipo de microscopía realizada no permite aún describir a detalle las estructuras en las que se almacenan los lípidos.

En el nemátodo no ha sido fácil observar y caracterizar los niveles de lípidos, cada una de las técnicas que presentamos aporta algo a esta caracterización tomando en cuenta los reportes en los que se utilizaron. Debido a que se mantiene la misma tendencia en las diferentes técnicas, podemos concluir que los niveles de lípidos en los nemátodos incrementan cuando se somete a los gusanos a dietas altas en glucosa y G+C, como ocurre en mamíferos.

Obtención del perfil de expresión del *miR-34-3p*

Se obtuvo el perfil de expresión para el microRNA *miR-34-3p* y *miR-34-5p*. El *miR-34-3p* fue uno de los microRNAs cuyos niveles de expresión cambiaron en condiciones de ayuno pero para el que no se contaba con un perfil de expresión en condiciones de incremento de glucosa, de colesterol o ambas. En la Figura 37 se muestra que los niveles de expresión de este microRNA incrementaron de manera significativa en las dietas con alta glucosa y G+C con respecto al control (Figura 37 panel B). Se obtuvo además el patrón de expresión de este microRNA a lo largo de las diferentes etapas larvarias del gusano, se observó que se encuentra expresado a bajos niveles en todas las etapas y que esta expresión no varía significativamente (Figura 37, panel C). Se obtuvo también el patrón de

expresión del *miR-34-5p* a lo largo de las diferentes etapas larvianas del gusano, el patrón de expresión de este microRNA había sido previamente reportado, se observó, al igual que en estos reportes, que los niveles de expresión de este microRNA incrementan en las diferentes etapas de manera significativa (Figura 37, panel D).

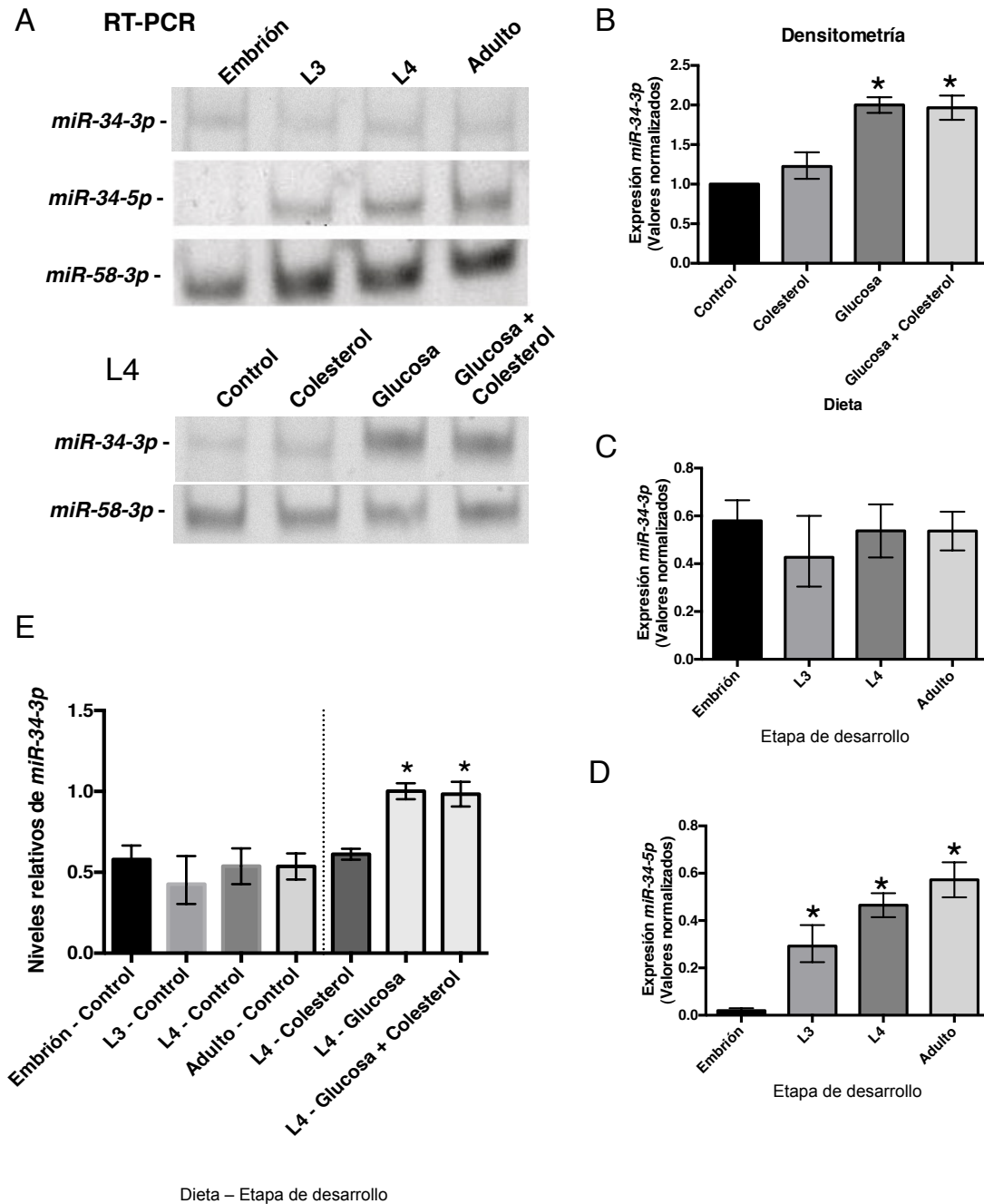


Figura 37. Perfil de expresión del *miR34-3p*. A) Imagen representativa de las RT-PCRs para *miR-34-3p* y *5p* que se realizaron a partir del RNA extraído de cada condición. B) Densitometría de los niveles de expresión del *miR-34-3p* en las diferentes dietas. Los valores fueron normalizados con respecto a la expresión del *miR-58-3p*. * $p < 0.01$ comparando contra el control. $n=3$. C) Densitometría de los niveles de expresión del *miR-34-3p* en las diferentes etapas larvianas. Los niveles de expresión fueron normalizados con respecto a la expresión del *miR-58-3p*. No se

encontraron cambios significativos a lo largo de las diferentes etapas en la expresión de este microRNA; se comparó la media de cada condición con la media de las demás, se muestra el error estándar correspondiente. n=3. D) Densitometría de los niveles de expresión del *miR-34-5p* en las diferentes etapas larvianas. Los niveles de expresión fueron normalizados con respecto a la expresión del *miR-58-3p*. Se encontró que la expresión de este microRNA incrementa significativamente a lo largo de las diferentes etapas; se comparó la media de cada condición con la media de las demás, se muestra el error estándar correspondiente. E) Gráfica que muestra las densitometrías de los paneles B y C de la figura comparadas entre sí. Del lado derecho de la línea punteada se observan los gusanos sometidos a las diferentes dietas, del lado izquierdo se muestra la expresión del *miR-34-3p* a lo largo de las diferentes etapas larvianas. *p < 0.01 comparando la media de cada condición con la media de las demás.

Los niveles de expresión del *miR-34-5p* cambian en el proceso de desarrollo de *C. elegans*. Kato y colaboradores y Lau y colaboradores reportaron el patrón de expresión de este microRNA. Observaron que los niveles de expresión este microRNA van incrementando conforme va avanzando el desarrollo del nemátodo (Figura 23) (Masaomi Kato et al., 2011; Lau et al., 2001). Esto es consistente con nuestros resultados mostrados en el panel D de la Figura 37.

Se tenía el concepto que, durante el procesamiento de los microRNAs, sólo una de las hebras llegaba a formar complejos con las proteínas Argonauta, mientras que la otra, llamada hebra estrella, era degradada. En 2011, Yang y colaboradores demostraron que las hebras estrella también se incorporan a los complejos con las proteínas AGO y así regulan a sus genes blanco (Yang et al., 2011).

Kato y colaboradores encontraron que la expresión de la hebra estrella del microRNA *miR-34*, (*miR-34-3p*) no coincide con la expresión de la hebra más abundante (*miR-34-5p*) pues sus niveles de expresión se mantienen bajos a lo largo del desarrollo del nemátodo (Masaomi Kato et al., 2011). Nuestros de la expresión de este microRNA a lo largo de las diferentes etapas larvianas (Panel C, Figura 37) correlacionan con estos hallazgos.

En estudios previos del laboratorio se mostró que los niveles de expresión del *miR-34-3p* cambian cuando se somete al gusano a condiciones de ayuno. Sus niveles de expresión se incrementan de manera significativa, como se muestra en la Figura 22 (datos no publicados de la Laura García Segura, estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM).

Por esta razón, decidimos evaluar los niveles de expresión de este microRNA en condiciones de altos niveles de glucosa y/o colesterol. Nuestros resultados muestran un incremento en la expresión del microRNA *miR-34-3p* cuando se somete al gusano a condiciones de alta glucosa y G+C (Panel B de la Figura 37). Esto es consistente con un estudio que se realizó en un modelo de ratones obesos en donde se observó que los niveles del *miR-34-3p* se incrementan de manera significativa (Fu et al., 2012). Este estudio es el primero en donde se adjudica una posible función en el metabolismo a este microRNA, ya que solamente había sido relacionado con la respuesta al daño al DNA por radiación.

En este estudio, Fu y colaboradores observaron que este microRNA tiene como blanco un receptor hepático (β KL) cuya señalización a través de ERK/GSK causa un incremento en la síntesis de glucógeno. Nosotros encontramos, mediante un análisis de similitud, que el gen C50F7.10⁶ del nemátodo tiene un 76% de homología (364 de 478 aminoácidos) con el gen *β kl*. Se ha visto además, que en ausencia de glucosa-6-fosfatasa, hay una acumulación de glucosa-6-fosfato en la célula, lo que activa a la glucógeno sintasa y genera el incremento en los niveles de glucógeno en el hígado y riñón de estos ratones obesos (Fu et al., 2012). Esta sería una posible explicación del incremento de los niveles

de *miR-34-3p* en condiciones de glucosa elevada y también una explicación del posible mecanismo en el que *miR-34-3p* pueda estar participando (Panel E, Figura 37). Finalmente, se ha observado que el tratamiento con un anti-miRNA que mantiene los niveles bajos de *miR-34-3p*, restaura la correcta señalización ERK/GSK de este receptor e incluso la respuesta posprandial en ratones obesos (Trajkovski et al., 2011).

Obtención del perfil de expresión del *miR-35-3p*

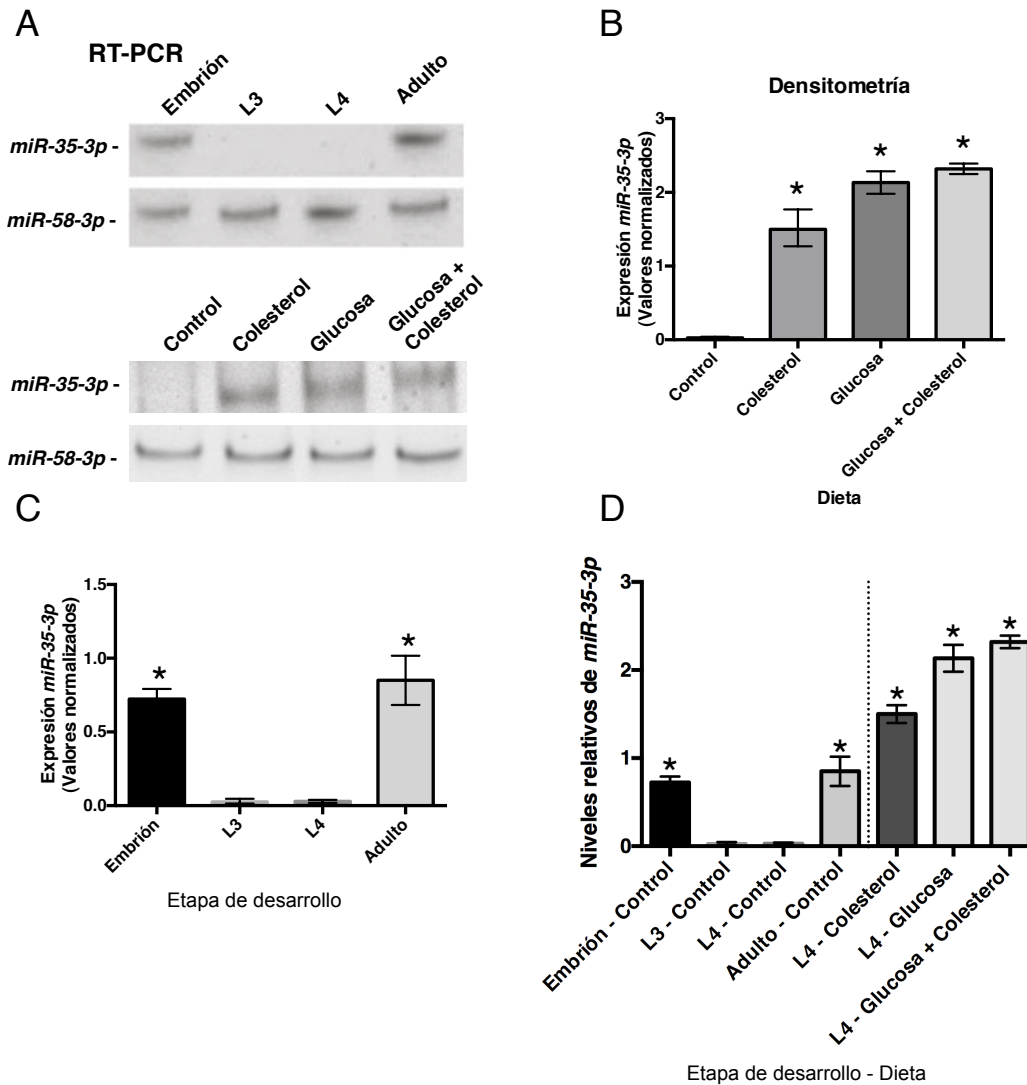


Figura 38. Perfil de expresión de *miR-35-3p*. A) Imagen representativa de las RT-PCRs para *miR-35-3p* que se realizaron a partir del RNA extraído de cada condición. B) Densitometría de las bandas del gel de la parte inferior del panel A. Los niveles de expresión del *miR-35-3p* fueron normalizados con respecto a la expresión del *miR-58-3p*. * $p < 0.01$ comparando contra el control. $n=3$. C) Densitometría de las bandas del gel de la parte superior del panel A. Los niveles de expresión del *miR-35-3p* fueron normalizados con respecto a la expresión del *miR-58-3p*. * $p < 0.01$ comparando la media de cada condición con la media de las demás. $n=3$. D) Gráfica que muestra las densitometrías de los paneles B y C de la figura comparadas entre sí. Del lado derecho de la línea punteada de la gráfica se observa la expresión del *miR-35-3p* en las diferentes dietas, del

lado izquierdo se muestra la expresión del *miR-35-3p* a lo largo de las diferentes etapas larvianas. *p < 0.01 comparando la media de cada condición con la media de las demás.

Además del análisis del fenotipo, se obtuvo el perfil de expresión para el microRNA *miR-35-3p*, uno de los microRNAs cuyos niveles de expresión cambian en condiciones de ayuno pero para el que no se contaba con un perfil de expresión en condiciones de incremento de glucosa, de colesterol o ambas. En la Figura 38 se muestra que para las 3 dietas experimentales, los niveles de expresión de este microRNA aumentaron de manera significativa con respecto al control (panel A y B). Se obtuvo además el patrón de expresión de este microRNA a lo largo de las diferentes etapas larvianas del gusano, y se observó que sólo se encuentra expresado en la etapa adulta y embrionaria (Figura 38 panel C). Sin embargo, cuando se somete a éstos gusanos a una dieta alta en colesterol, glucosa y G+C los niveles de expresión incrementan aún más que su expresión en la etapa adulta y embrionaria (Figura 38, panel D).

El perfil de expresión de este microRNA a lo largo del desarrollo del nemátodo en condiciones control había sido previamente reportado por varios grupos de investigación (Masaomi Kato et al., 2009; Lau et al., 2001; Martinez et al., 2008). Este microRNA se expresa de manera exclusiva en embriones y adultos (Figura 38, panel A y C) lo cual es consistente con estos reportes. Esto, aunado a que la delección del cluster completo causa letalidad en los embriones, sugiere que está implicado en procesos de desarrollo (Alvarez-Saavedra & Horvitz, 2010). Miska y colaboradores reportaron que los distintos microRNAs que forman el cluster al que pertenece *miR-35* tienen una función redundante, pues la falta de cualquiera de ellos no causa un efecto notable en el organismo mientras cuente con los demás (Miska et al., 2007).

Zhang y colaboradores reportaron que los microRNAs que se encuentran en el intestino del nemátodo pueden participar en condiciones de estrés nutricional, como puede ser el ayuno (X. Zhang, Zabinsky, Teng, Cui, & Han, 2011).

La noción de que para poder caracterizar la función de un microRNA, que no tiene función aparente en condiciones normales, se necesite retar a un organismo a condiciones de estrés, no es nueva (I. Lee, Hendrix, Kim, Yoshimoto, & You, 2012; Williams & Mitchell, 2012), lo que hemos caracterizado para el microRNA *miR-35-3p* podría ser una posible implicación del mismo en procesos metabólicos cuando el nemátodo es sometido a dietas altas en glucosa y/o colesterol, ya que, como observamos en el panel A y en el panel B de la Figura 38, los niveles de expresión incrementan de manera significativa en estas condiciones, lo que, aunado a los resultados previos para la condición de ayuno, sugieren una implicación de esta molécula en la regulación del estrés nutricional.

lin-23* y *gld-1

Aún no se tiene evidencia experimental que establezca una conexión entre el *miR-35-3p* y el metabolismo, tampoco se conocen los posibles genes blanco o los mecanismos en los que podría estar participando como ya están descritos para el *miR-34-3p*. Sin embargo, hay un reporte que ha sugerido que los genes *lin-23* y *gld-1* pueden ser blancos de esta molécula (Liu et al., 2011).

En el presente trabajo analizamos las secuencias 3'-UTR de ambos genes; para ambos encontramos sitios de unión para este microRNA. El análisis con el software miRanda con el alineamiento de estas moléculas se muestra a continuación:

gld-1

Cromosoma I *C. elegans*

7694691 -

5' TGAAGCTGCAAGCATTGAACAAGGACTCCGAGAACAATTCGAGAAGGAAACAATGCTGAGAGATGAACAT
GAAGAATTAAGGAAATATATTGATGACGGACTTCAAGAATATACAGCTGATACTTCTAAAATTGAAAAACAGA
AACAACCTTCTTCATCAGCTGCAGCTAAATTTTCATCGCTGAATGCAGAAGATCGTGATGTAGAGCTTTTGAA
ACAAGCTGCTGGAAAAAGTGAAGGGAAATCAAAGCAAAAAGGAGACAGAATTGCTTTTCAGAGCATATGCTCGCA
GGAATCCCAGAAGTGGACCTGGGAATTAGCACTCGTATCACCATATCTTGGAGACTGAAAAGAAAAAACGAT
TCCTTCTTCAAATATCTGCTGCTGAAGCTGCAGGTCTTCCACCACCAATTGAAGAATGTGAAGAATCAAAACC
AAAATATCGAAGACGTTTTCAACAACCAGCGTCGATAAATTTGAGATACACAAGTGTTTTTTATTTATTTTCTG
TTTTAAATAAATTCGATTCATTTTATAAAACTCTGAATTGAAAGTATTCAATTAATTTCTGAAAAGCCTCATGC
AAATCAGCGCACGGCTTAATAGGCGTGGCCAATTCCTGCCGTTTCGCCACCCGTGCGCGCATTTCTGGAACCTT
AAAGGAACATGTTGCACCGCGACGTATGGGTCTCGCAGCGATCGCAAACAGGTATACGGTAAAAGTTTTCGAAA
TTTTAGGACTTCACCTCAAAACTTTTTAGAGTTTTATTTTTTTCGATGCTTTTTGGTTGTTTTATATTTTCGTTT
ATCTAAAATTTTTAGAAATAATTATTTCTATTTGAATATGACCCTTTACATTTTCTCGAATGTTTCATTC
CGAAATTTCTAGTGAATATTTCTGTTAGATAAGCTAGATGAGCGAATCGCCGCAGAGTTAAGCTTATGTGTTAC
GTTATTGAAAAATATATTACTAAGTTTTCTTACAGGTTAACCATCGAAGAATGCCGTCGTGCACCCTCC
AACTTACGGTGTTCGACCCAAGTAAAGCTCTGAATCGCCATCTCGTTTCGTTCCGTTATGACGCCA
ACGTCTCTGGATGGAGACAATAGTCCACGGAAGAGATTCCCCATCATCGACAATGTTCCAGCGGATCGTTGGC
CGTCAACTCGGCGAGACGGATGGGTACGCGAATTTTCATTTTGTTCATCAATTACAGTAATAAAAAATTTTCA
GAGCTCTGTTAGAGCGCCACCACAGCTCGTCTGACGCTATCGACGAACAACAGACACATCATGTCCCCGATT
TCGAGCGCTTACAGTCAAACACCTAATTCGCTTTTGTCCGACGCCATGTTCAATCCAAGAGCAGAAGTATCT
TTTTCCCGACTCTTCTGCAACTCCAATGAGTTATGGAAAATCATCGATGGACAAGAGATGAAAACAATCTCA
TGTCTACTTATTTTTCTGTAATTTCTTTCAGGCTGTCTCTCCAACAGCTACAGAACCAATCGAGGTTGAGGC
AACTGTGAGTACTTGGCTGATCTGGTTAAAGAGAAGAAAACATCTTACGCTCTTTTCTCATATGTTTCAGCAAT
GTTGAACGTTTGTGGATGATGGTACATAACCGCTCTGTGTTCTTACAAGTAATTATTTTTATTTTTAGAAATCG
GTCGTGTCCGCGTGGCTTTGTTCCAAACTGAGTTTCCGAGAGTTGAGCTTCTGAGCCTGCTGGAGACATGAT
TTCGATCACTGAGAAGATTTATGTTCCAAAGAACGAATACCCAGACGTAATTTAACGAATTTCAAGTTTTCGA
ACAATAAAACATTTTCAGTATAACTTCGTCGGTAGAATTTCTCGGCCACGTGGGATGACCGCCAAGCAGCTTG
AGCAGGACACTGGATGCAAGATTATGGTCCGAGGAAAGGGATCAATGCGGGACAAGTCAAAGGTTTGATCTTG
TTACAATTTTTATCTAAAACAAAGTTTTAGTTGTTGAAGGAAAGTGCTCACCGTGGAAAAGGCCAATTTGGGAGCAT
CTCGAAGACGATCTGCACGTTCTTGTGCAATGCGAAGACACTGAGAATCGTGTTACATCAAATTTGCAAGCAG
CACTCGAACAGGTCAAGAAGTTGCTCATTCCGGCTGTGAGTTATATGCTTCGTAAAATCTCTACAATAACCTA
TTTTTCAGCCCCGAGGAACTGACGAGCTGAAGAGAAAACAATTTATGGAATTTGCAATCATCAACGGTACGTAT
CGTCCAATGAAAGTCGCCAAACCCAGCTCGTGTGATGACTGCGAGTTCCCTCTGCTCTCTCCAATCCACTACGTA
GTTCCAGGTCAAGTTTTGATGTCGCCAACTCCTGGATCAGGACTCCCGTCAACGACATTTGGAGGATCGATCTT
GGTAGAACAGTTCCTCAGTTAAGTTTTCATATTTTTAATTTTCAGAGCCCCACTCTCACTGCATCCAACCTTCT
CGGATCTAACGTTCTCGATTACTCGCTTCTGAGCCCCGAGCATGTTTGATTCAATTCAGCTCTCTTCAACTTGCA
AGTGATTTGACGTTCCCGAAGTACCCAACAACCACTTCGTTTGTCAACTCATTCCCTGGTCTTTTCACTTCTG
CATCTTCTTTTGCCAATCAAACAACCAATGTGTCCCCGAGTGGAGCAAGTCCCTCGGCTTCTTTCAGTCAA
CAACACCTCTTTCTAAAGTTTCATATTTATAACTCACACTCCCTTTGTTTTGTTTTCGTTCTCACCATTTTAGG
TTACCATAGAATCATGTGCCATACATCATGTTGCCATTTTTTCCCCCTCTCATCTCCCCCATCTTTATCATGT
CATCAATTTGGTATCTACCATCTCACTCCTTTAGGAATAGCATAACACATACAGTTAGTAATAATTATGTAATGA
GATACCTAATACCATTAATTCCTTTCTGTAATTTAAACTCGCCCTGCTGCTTTTACCATATGCTCTTTGATTT
TTAAGTATCTTTTCCCTTTCTTTCGAGATCTTGAAGAATATTTTAAACATCAGAGAAAAACGGCAGGTGCCCC
GGTAATAACATCTTATCAGGATAACCATTTTGGAGAATACTCATTGATACTTTTATTGATGCAGCTATTTCCCC
TACCATTTCATACCTCGAATGCCAAAGCACCCCTTTATTTTTCTGTGTTATCTTAAACGCTAACCCCTGT
AGAACTTTCCCGTTTGATGTAGTCATCAAAAATTTTTCATCTTTTCTAAAATTTTTAGTAACCTTGAGATTTTA
ATTTTCTTTCCCGTAGTTAGATGTTCAAATCTCACATCCCCATCAAACCAGCCCCAAGTCCCCATCTTAA
ACCCCTACCCCTTCCCAATCTGTCCATTATAATTTTAAAGCACAAAGTCCAAGAGCTAATATTTTTAGCAGTCTT
TCACATTGACCATTTTCTCGGTACCCTGTTTTTGGAGACAAAATTTTGAATTTTGAATTTGAAAATACAGGGCG
AGATAAAAATAATAAAAAATAGTTTTTATTTCAATTTTTTCTTCCAGTTCATGTTTTTAAAACGATTTAAAAGGAAA
CATTAGTTAGAAACATTTTCAATTTCTTCAAATGTTTTCAGTGCAGGGATTCAAATGTTTCCAATCCGAAG
AGGATTTTGTGATAATCCAAGAGTTGATGGAGTTATCGAATTACTCAGTATGTGATGTTCTGTAAAAAAAAT
CGCCAGTTAAAATTTATCAGAA-3'

gld-1 - Secuencia codificante

CCT GTA GAA TCT TCC CGG TT - Secuencia reconocida por *miR-35-3p*

Alineamiento *cel-miR-35-3p/gld-1*

```

3' ugACGAUCAAAAGGUGGGCCACu 5' cel-miR-35-3p
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
5' CCTG TAGAATCTTCCCGGT 3' gld-1

```

lin-23

Cromosoma II *C. elegans*

6371305 - >K10B2.1 spliced + UTR 5'

```

gacattaaATGTCTTCACCGCACCGAGCTTCAACAACCTCAGCAGCTGGCGGACTTATCGTTGACGGAAGGTGA
ACACGATGAGGGCAAACCGCTTTCTATTGACTACCTTCAAGGGCACGAAGGCCTGATCGAGGAAGTATTA
TGGAGTGAACACGAACAGCTCGATTTTATGGACAAAATTGTTTCATCGATTATCACATTATCAGTTGGGAAAAG
TCGACAACCTTTATCAGGCCCATGCTCCAGAGAGATTTTCATTAGTAATTTACCAGCACATCTTGTGCAATTAAT
TCTGTTTAATGTAAACTCGGATTCATTAATAATCTTGCAGAAGAAGTGAGCACAAGCTGGCGATGTGCACTCGCC
CGTGGTCAACATTGGAAGAAATTGATTGAAAAGAATGTTTCAAGTGATTCCTGTGGTGGGGACTTTCTGAAA
AAAGACAATGGGACAAATTCCTGAATATCAGTCGAGACATGTGAGTGCAGCAATCTGTGAAAAAATTCAACTA
CGATGTGAATATTAACCGGGATAAGCTTGATCAGCTCATTTTAATGCATGTCTTCTACAGTAAATTTATATCCA
AAAATCATTTCGAGATATTCATAACATTGACAACAACCTGGAAACGTGGAAACTACAAAATGACTCGAATAAAT
GTCAACTCAGAAAATAGCAAAGGAGTATATTTGCCTTCAATATGACGATGACAAAATTTGTATCTGGTTTGAGGGA
CAACACTATTAATAATTTGGGATAGAAAAGACTACAGCTGCAGATCGAATTCCTTCTGGACATACTGGTCCGGTT
TTATGCCTTCAATATGACAATCGTGTAATAATTTCTGGATCTTCTGATGCCACAGTACGTGTCTGGGATGTCG
AAACTGGAGAGTGCATTAACCGTTAATTCATCATTGTGAAGCTGTTCTTCATCTTCGATTTGCTAATGGAAT
AATGGTAAACATGCTCAAAAGATAGATCGATTGCTGTCTGGGATATGGTTTCGCCACCGGATATCACAATTCGA
AGAGTCTTGTGGTTCATAGAGCAGCTGTAAATGTGCTTGGATTTTGGATGATAGATATATAGTCAGTGCAAGTG
GAGACCGAACTATTAAGGTCTGGTCAATGGATACACTCGAGTTTGTTCGAACATTGGCTGGCCATCGACGAGG
AATTGCATGTCTTCAATATCGTGGACGGCTCGTTGTTTCTGGATCCAGTGATAACACGATTTCGACTATGGGAT
ATTCATTCTGGTGTATGCCTACGTGTTCTTGAAGGCCATGAAGAGCTCGTGCAGTGCATTCGATTTGACGAAA
AACGAATTGTCTCCGGAGCATAACGACGGAAAGATTAAAGTATGGGATCTTCAAGCTGCTCTAGATCCTCGTGC
ATTATCTTCGGAAATATGCCTCTGCTCATTAGTTCAACATACTGGCAGAGTGTTCGGCCTGCAGTTTGATGAT
TTCCAAATTTGTTTCCCTCTTCACATGATGACACTATTCTCATTTGGGACTTTTGGACGCTCCACCCAGTGGGC
TTCCGTCTTCAACAAACAGAGCCACCTCCAGAACTTCCAAACCAAGCTGCTGTGCTCGAGCTCAAATGCT
TTTTGAAATGGCTGCTCGACGAGAAAATTGAGCGACGAGATAGAGAAGTTGTGGAAGAACCTGCATGAGGCCA
CGTGCCAATGCTGCTCGTCGACACAATGCCGATATTGCAGCAGCTGCAGCAGCGGCGGAAGCTGCTAGAGGTG
CCGGGGACAATGATGAATCGTCATCAGAGGAAGATCTGGACAGAGTTGATCAGGTTAATAATCCGAACGTGGC
TGGACCAGCGCCACCGCAACCACACAATCAGAATCATAGAAGGAGGCAACCAAGACCAGAATTGCTGTGAGA
CTTATGCAAGAAATGGCTGCTTTTGACAATATGCGCCGACAACAAAATAATATGGATCACCTGGGCGGAGGCG
ACGTAGACGAAGAGATGCCAGATGGTGGCCATAAaatctacactccttcccattttttttgaatcttact
gatcttcaaccggtgcagaaatcaaccaaaccctctgtaatcttcttctgcatctttccaaaaaagaaagttga
aattcctttgtacagtatcctttttgcatcccccttcccaacttttctctcactattaactgatctgatttcat
gtgataatagtggtgtgtgtgtgtctctgcattctattcatctttctcaatcgacatattggaatatcgcaag
cacaaccctttctttctgtttttgtaaccgcattcgagtcctggttttctgaaactattttttaataact
tcaatcttcaagtcgcatgctttgctgggtgcccattcatccactctcaccattttatcttttcatccc
tcttcccatttctcaacggtttttcttctacggcgacgattctaaatgcttctatccccgcgttttctcacc
gcacattttcaatcgcttccacaaaatctgtttcaataatcgttttcggttcttaatttttctcccccttccat
tgctccaatttcaaatctttttattcgcctcggaatgtgttctgtatagttcgaaatgatataaaciaaa

```

***lin23*- Secuencia codificante**

tactgatcttcaaccggtg - Secuencia reconocida por *miR-35-3p*

Alineamiento *cel-miR-35-3p/lin-23*

```

3' ugACGAUCAAAAGGUGGGCCAC 5' cel-miR-35-3p
   | | | : | | : | | | | | | | |
5' tactgatcttcaaccggtg 3' lin-23
  
```

A pesar de que se encontraron sitios de unión para el microRNA en las regiones 3' UTR de ambos genes, estas uniones no se presentan en la región semilla y habría que mutagenizarlas para poder comprobarlas como sitios de unión de este microRNA. Sin embargo, para tener un acercamiento inicial a la forma en la que la expresión de estos genes está regulada, se obtuvo el perfil de expresión de los mismos. Como se observa en el panel B de la Figura 39. Los niveles de expresión del mensajero de *gld-1* incrementan de manera significativa en gusanos sometidos a una dieta alta en glucosa y a una dieta alta en colesterol y glucosa, pero no así en una dieta donde sólo se incrementaron los niveles de colesterol, como se observa en el panel C de la Figura 39. Los niveles de expresión del mensajero del gen *lin-23* se mantuvieron constantes en las diferentes dietas.

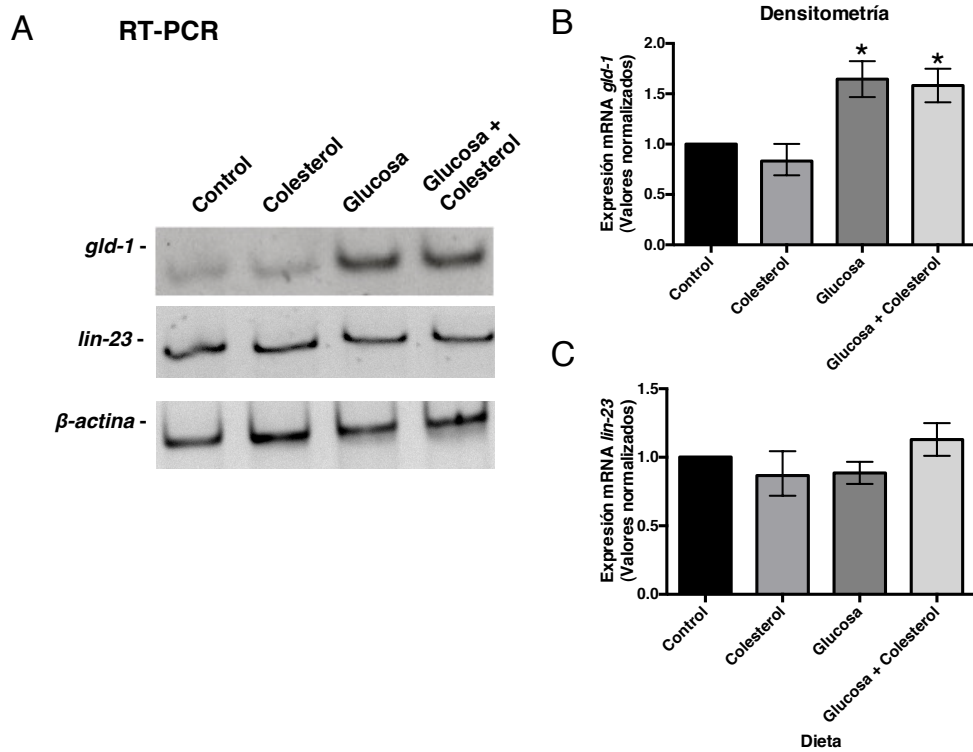


Figura 39. Perfil de expresión del mRNA de los genes *gld-1* y *lin-23*. En el panel A se observan la imagen representativa de las RT-PCRs para *lin-23* y *gld-1*. En el panel B y C se observan graficados los valores obtenidos por medio de una densitometría de las bandas, los niveles de expresión de ambos mensajeros fueron normalizados con respecto a la expresión del mensajero del gen β -actina para cada condición. * $p < 0.01$ comparando contra el control. $n=3$.

Debido a que se detectaron cambios en la expresión del mensajero de *gld-1* en los gusanos sometidos a las diferentes dietas, se decidió también evaluar los niveles de esta proteína, para esto se utilizó a la cepa BS1080 que expresa GLD-1::GFP, proporcionada por el Dr. Tim Schedl del Departamento de Genética de la Universidad de Washington. En primera instancia, se obtuvieron imágenes de la cepa en diferentes etapas tanto para comprobar la presencia de GFP, como para evaluar la expresión de esta proteína en las diferentes etapas larvianas, como se observa en la Figura 40.

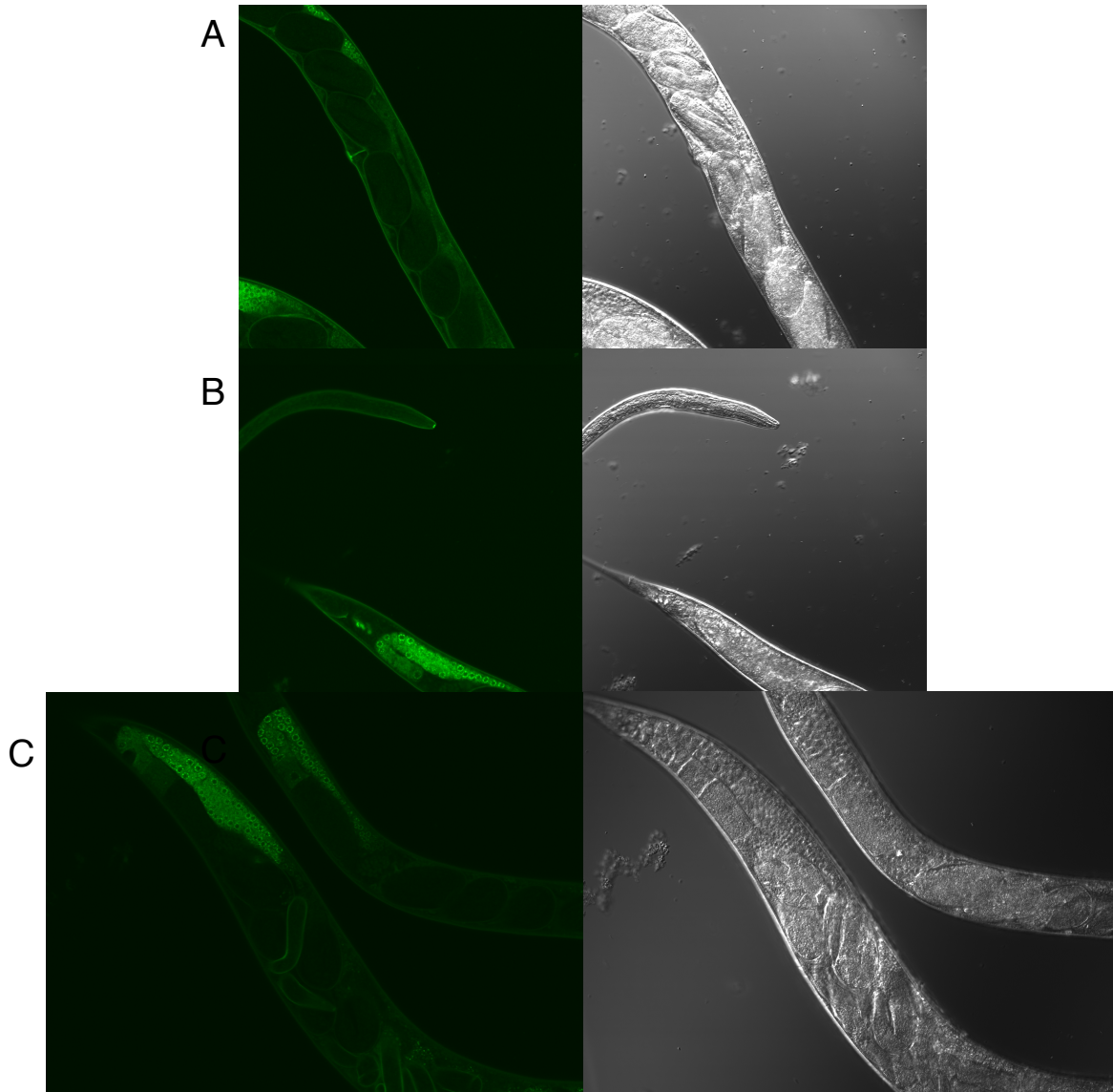


Figura 40. Expresión de la proteína GLD-1 en *C. elegans*. A) No se observa expresión de GLD-1::GFP en embriones. B) En la parte superior de este panel se observa un gusano en la etapa L4, en la cual no se observa expresión de GLD-1::GFP; en la parte inferior se observa un gusano adulto que presenta expresión de la proteína en la gónada. C) La expresión de GLD-1::GFP se encuentra en la gónada de un gusano adulto.

Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de esta proteína mediante Western Blots, como se observa en la Figura 41.

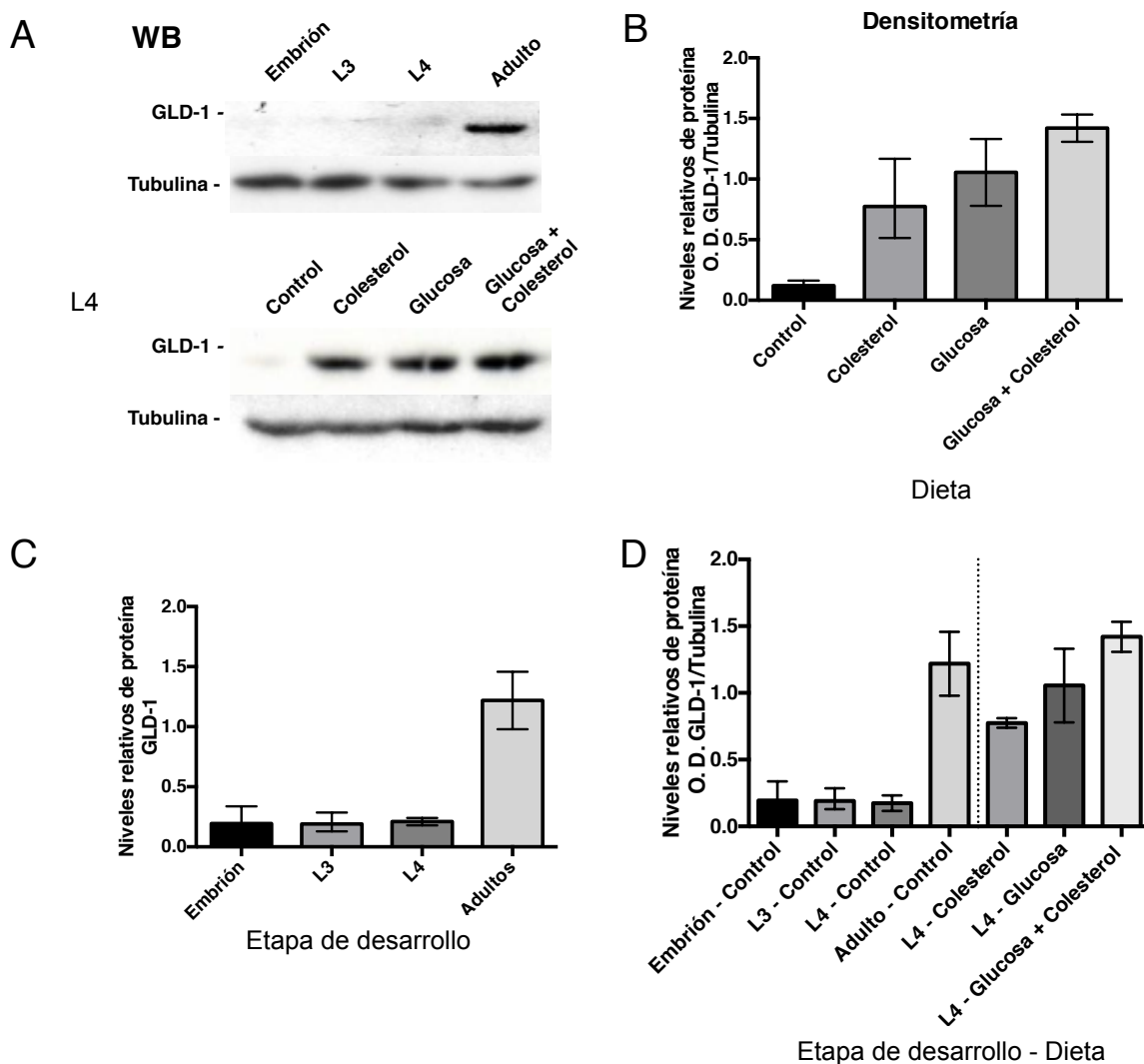


Figura 41. Perfil de expresión de GLD-1 A) Imagen representativa de los Western-blot para GLD-1 que se realizaron a partir extractos de proteína de cada condición, en el apéndice se describe a detalle la técnica, para la detección de GLD-1 se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón α -GFP (1:2500). B) Densitometría de las bandas del gel de la parte inferior del panel A. Los niveles de expresión de GLD-1 fueron normalizados con respecto a la expresión de Tubulina, n=2. C) Densitometría de las bandas del gel de la parte superior del panel A. Los niveles de expresión del GLD-1 fueron normalizados con respecto a la expresión de Tubulina, n=2. D) Gráfica que muestra las densitometrías de los paneles B y C de la figura comparadas entre sí. Del lado derecho de la línea punteada de la gráfica se observa la expresión de la proteína GLD-1 en las diferentes dietas, del lado izquierdo se muestra la expresión de la misma a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo.

Se evaluaron los niveles de proteína GLD-1 porque no se quería descartar que el incremento en el *miR-35-3p* pudiera ejercer un efecto sobre la expresión de la misma, ya que como ya se mencionó, los microRNAs también son capaces de controlar la expresión de sus genes blancos a nivel traduccional (Humphreys et al., 2005; Vasudevan et al., 2007). Para evaluar si había cambios en la expresión de esta proteína en las diferentes dietas, utilizamos una cepa transgénica que contiene GLD-1 fusionada a GFP. Como se muestra en la Figura 41, la expresión de esta proteína incrementa de manera considerable en las dietas experimentales, esto es relevante porque esta proteína regula la expresión de otras, por lo cual podría ayudarnos a dilucidar la participación de esta proteína en el metabolismo, un papel que no se había caracterizado previamente.

En un análisis con el software Aceview de la plataforma NCBI, encontramos una proteína en humano que presenta relación con la proteína GLD-1, esta proteína llamada QKI (encoding quaking, KH domain RNA binding protein) se expresa en distintos tejidos, desde la piel, la placenta, el páncreas, el intestino, hasta el cerebro, esta proteína también regula la traducción de sus mensajeros blanco, y se ha propuesto, de manera muy interesante que participa regulando genes de procesos como la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, procesamiento y transporte de mensajeros y participa incluso en procesos de diferenciación celular (Biedermann et al., 2010; Chénard & Richard, 2008; Klempan, Ernst, Deleva, Labonte, & Turecki, 2009; Noveroske et al., 2002; Saccomanno et al., 1999).

Finalmente, debido a los resultados que observamos en el fenotipo, podemos sugerir que tanto el *miR-34-3p* como el *miR-35-3p* tienen blancos que están implicados en procesos de almacenamiento de lípidos, por lo cual este incremento es relevante en procesos metabólicos, a pesar de que el *miR-35-3p* no está regulando negativamente la expresión del gen *gld-1*. El incremento de la expresión del mismo podría ser también relevante en procesos de metabolismo de carbohidratos y almacenamiento de lípidos, función que no se había caracterizado para este gen.

En resultados previos del laboratorio se evaluaron, mediante RT-PCR, los niveles de expresión de ambos genes, se observó que en condiciones de ayuno la expresión del gen *gld-1* disminuye, lo que correlaciona con el incremento en la expresión del *miR-35-3p*, lo que podría sugerir que está siendo regulado negativamente por este microRNA (Figura 42). Sin embargo, esto no se observó para *lin-23*, lo que podría sugerir que en estas condiciones particulares este gen no es modulado negativamente por *miR-35-3p*.

De manera interesante, cuando caracterizamos los niveles de expresión del mensajero del gen *gld-1* en condiciones de alta glucosa y/o colesterol encontramos un incremento significativo, y no una disminución como se esperaba, en base a los resultados del laboratorio en condiciones de ayuno. Debido a que los niveles de *miR-35-3p* se encuentran incrementados nuestras dietas experimentales de alta glucosa y alto colesterol (Figura 39). Por otro lado, se observa también en la Figura 39 que los niveles de expresión del mensajero del gen *lin-23* se mantienen constantes en estas dietas a pesar del incremento de *miR-35-3p*, esto es consistente con lo previamente descrito para las condiciones de ayuno. El gen *lin-23* tiene una función en la transición G1/S, es un componente del complejo SCF, un complejo de ligasas E3 de ubiquitina y, junto con CYE-1 (ciclina E) y CDC-25.1 (cell division cycle related), regula la transición G1/S pues degradan a reguladores del ciclo celular. La pérdida de *lin-23* provoca hiperplasia intestinal (Hebeisen & Roy, 2008; Liu et al., 2011). Al no observar cambios significativos en la expresión del mensajero de *lin-23* a causa de las diferentes dietas a las que se

sometieron los gusanos (Figura 39), en estos contextos metabólicos el incremento en la expresión de *miR-35-3p* no tiene efecto sobre este gen, a pesar de lo observado previamente por medio de los reporteros (Liu et al., 2011). Lo que demuestra que, a pesar de que *lin-23* y *gld-1* fueron caracterizados como posibles blancos de *miR-35*, incluso en condiciones de ayuno, en nuestro caso no hay evidencia experimental que indique que en condiciones de dietas con niveles elevados de glucosa y colesterol se esté llevando a cabo una regulación negativa, ni de los niveles de mensajero ni de los niveles de proteína.

Finalmente, se ha caracterizado la función de GLD-1, una proteína que se une al RNA y actúa como represor de la traducción previniendo la expresión no regulada de sus genes blanco. Análisis genéticos indican que *gld-1* actúa como supresor tumoral en la línea germinal, lo que significa que participa previniendo la progresión del cáncer mediante la regulación del ciclo celular (Jan et al., 1999). En la Figura 39 mostramos que cuando se somete a los gusanos a una dieta alta en glucosa y/o colesterol hay un incremento significativo en la expresión del mensajero de *gld-1*. En la Figura 43 mostramos un modelo en el que establecemos que la regulación de la expresión de *gld-1* parece escapar los altos niveles de *miR-35-3p*, contrario a lo que sucede en condiciones de ayuno.

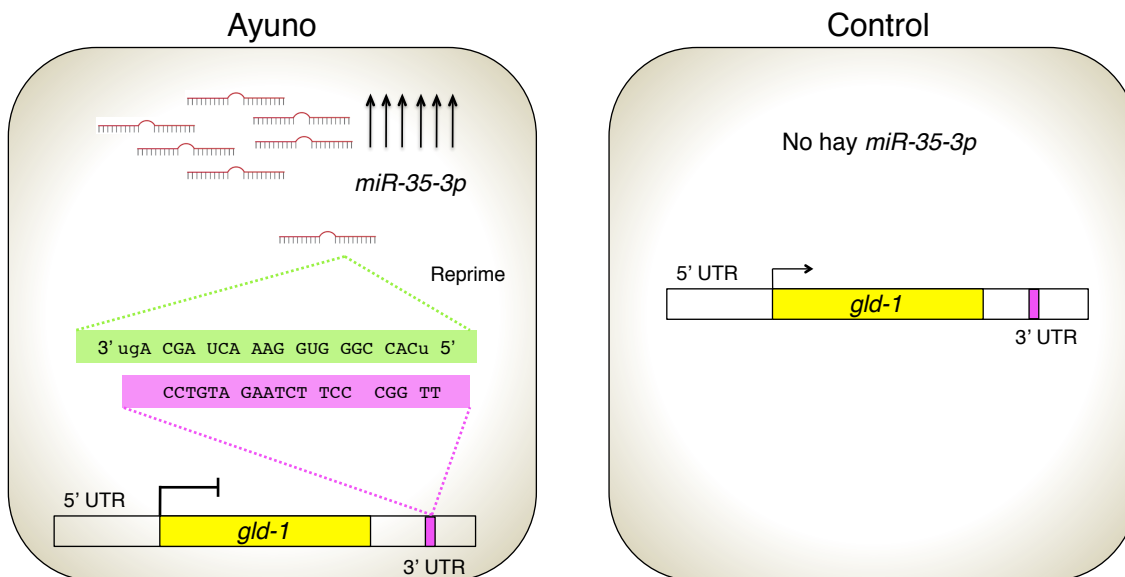


Figura 42. Modelo de la regulación del gen *gld-1* por el microRNA *miR-35-3p* en condiciones control y de ayuno en *C. elegans*. Se muestra en color rosa el sitio de unión para *miR-35-3p* caracterizado en la región 3'-UTR del gen, en verde se muestra la secuencia del microRNA. En ayuno hay un incremento del microRNA y una disminución en la expresión del mensajero del gen *gld-1*, lo que no se observa en condiciones control.

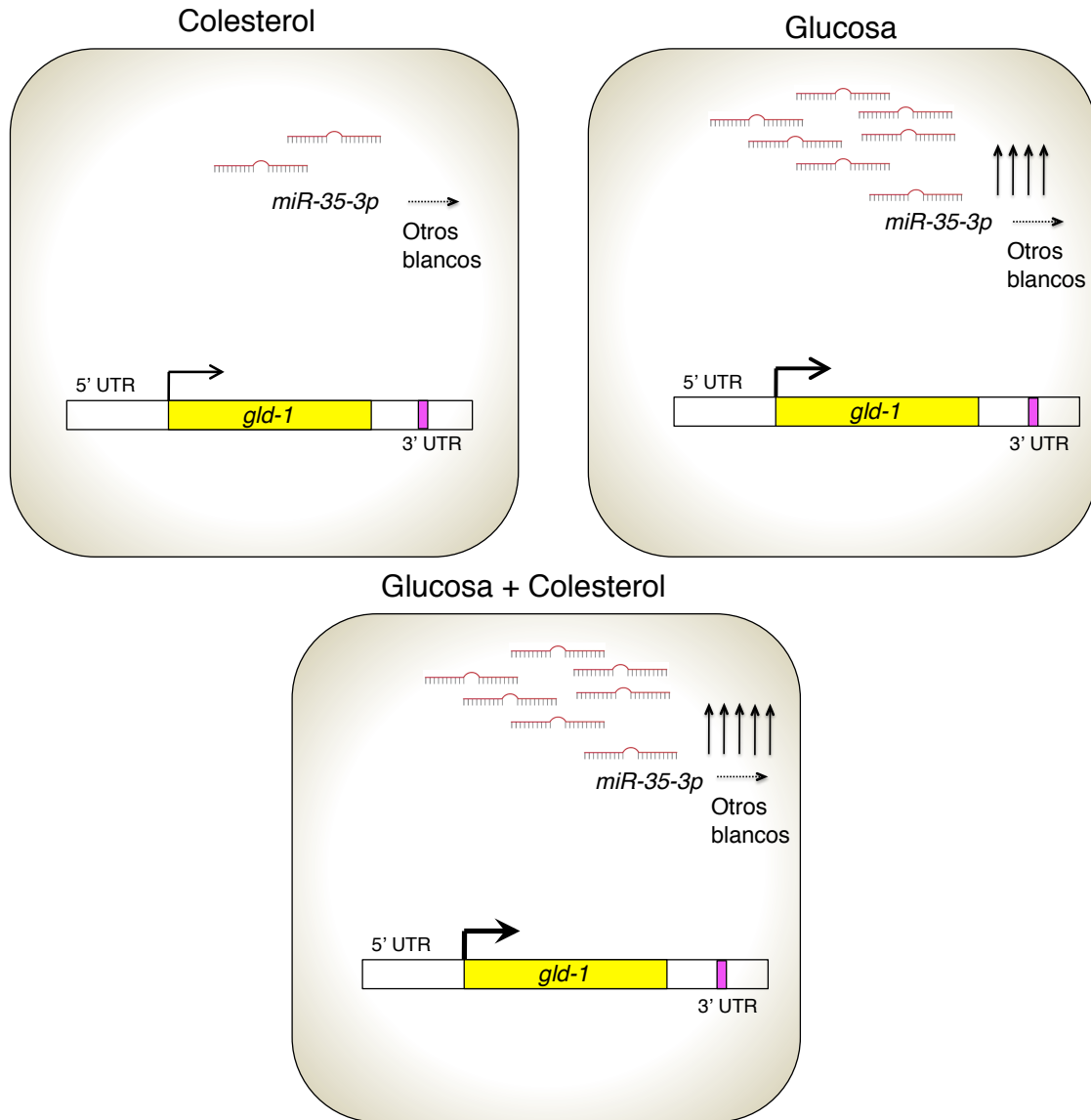


Figura 43. Expresión del gen *gld-1* y del microRNA *miR-35-3p* en condiciones de alto colesterol y/o glucosa. A pesar de que hay un incremento del microRNA como sucede en ayuno, no se observó una disminución en la expresión del mensajero del gen *gld-1*, si no más bien un incremento, por lo que se sugiere que el *miR-35-3p* no ejerce un efecto sobre el gen *gld-1*.

Conclusiones

- Se validó la hipótesis, observamos que una ingesta elevada de glucosa y/o colesterol provocó una expresión diferencial del microRNA *miR-35-3p*, para el caso del microRNA *miR-34-3p* observamos que esta expresión diferencial se observa solamente en las dietas que tienen concentraciones elevadas de glucosa.
- Se evaluó el efecto de las dietas altas en glucosa y/o colesterol sobre la acumulación de lípidos mediante el marcaje de los mismos por medio de tres tinciones diferentes y se observó que una ingesta elevada de glucosa y/o colesterol incrementa la acumulación de lípidos en los nemátodos.
- Se estableció que las dietas altas en glucosa y colesterol provocan un incremento en los niveles del mensajero del gen *gld-1* mientras que los niveles de expresión del mensajero del gen *lin-23* se mantuvieron iguales. Lo que indica que estos genes no están sujetos a regulación negativa por el *miR-35-3p* en condiciones de alta glucosa y colesterol como se ha propuesto que sucede en condiciones de ayuno. Además, se estableció que en las dietas altas en glucosa y colesterol hay un incremento en los niveles de la proteína GLD-1, por lo que se sugiere que esta proteína pudiera participar en procesos metabólicos, lo que aún no ha sido reportado.

Perspectivas

- Identificar blancos para los microRNAs *miR-34* y *miR-35*, para poder establecer la importancia del incremento en sus niveles de expresión causado por las dietas a las que se sometieron los gusanos.
- Identificar blancos para la proteína GLD-1 relacionados con procesos metabólicos, ya que esta función en el metabolismo caracterizada para esta proteína no ha sido dilucidada.

Apéndice

Etapas del desarrollo del nemátodo *C. elegans*

1) *Etapa embrionaria*: Se considera a la etapa de desarrollo que abarca desde la fertilización hasta la eclosión, inicia con una etapa proliferativa que dura aproximadamente 6 h (350 min), de las cuales los primeros 150 min pasan dentro del útero, abarcan la formación del cigoto y la generación de células embrionarias fundadoras AB, E, MS, C y D, que son células de tamaño desigual que darán origen a diferentes lineales celulares, AB contribuirá a la generación del sistema nervioso, la hipodermis y la faringe, E dará origen a las células intestinales, MS a las neuronas, músculo, gónada somática, C a la hipodermis, neuronas y músculo y D a las células musculares (Hope, 1999; Kipreos, 2005). El embrión sale cuando llega a la etapa de gastrulación que abarca los otros 200 minutos y en la cual hay un rearrreglo celular considerable. Al finalizar el proceso proliferativo, el embrión es un esferoide de células organizadas en 3 capas, ectodermo de donde se genera la hipodermis y las neuronas, mesodermo que genera la faringe y el músculo y endodermo que genera la línea germinal y el intestino (Hope, 1999; J. E. . S. E. . W. J. G. . T. N. Sulston, 1983).

Después de estas 6 h inicia el proceso de organogénesis que dura otras 6 h aproximadamente (hasta el momento de la eclosión) y en el cual hay una diferenciación celular que ocurre sin divisiones celulares adicionales, el embrión se elonga al triple de su tamaño gracias a la acción de filamentos de actina y toma forma animal con tejidos y órganos diferenciados, comienza además a moverse un poco dentro de los confines del huevo. Al final de la embriogénesis está establecida la estructura base del animal que ya no va a cambiar en el desarrollo post-embriionario (Begasse & Hyman, 2011).

2) *Desarrollo post-embriionario*: Durante esta etapa el número de núcleos de células somáticas aumenta a 959 en el gusano hermafrodita y 1031 en el macho. La línea germinal prolifera para llenar la gónada mientras ésta se forma; en esta etapa no ocurre un proceso de morfogénesis puesto que todas las estructuras se forman mientras se mantiene la misma estructura que se generó en la embriogénesis. Este proceso inicia cuando la larva se alimenta, 3 h después de la eclosión, pues en presencia de alimento se detienen las divisiones celulares y el animal puede pasar entonces por 4 etapas larvarias hasta llegar a la etapa adulta en patrones que no cambian ni espacial ni temporalmente. Cada célula tiene un destino determinado, sin embargo, si los embriones eclosionan en ausencia de comida su desarrollo se arresta y sobreviven sin alimento de 6 a 10 días (Figura 13) (V Ambros, 2000).

a) *Etapa larvaria L1*: En esta etapa se generan 5 de las 8 clases de motoneuronas que existirán en la etapa adulta, ocurre además una reorganización sináptica. Los precursores de las gónadas somáticas

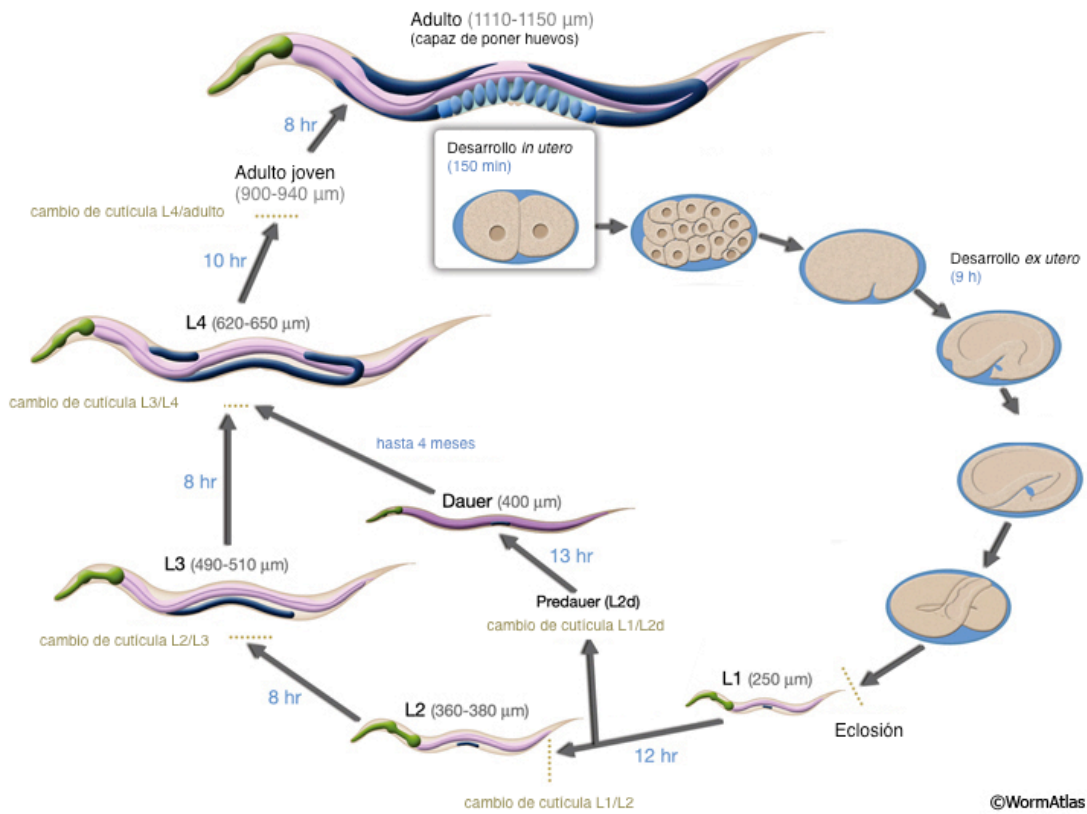
comienzan a producir células, mientras que los precursores de la línea germinal comienzan a dividirse, estas divisiones ocurrirán continuamente hasta la etapa adulta. Al final de esta etapa comienzan a dividirse las células que generarán las estructuras sensoriales posteriores, y se generan dos coelomocitos adicionales en el gusano hermafrodita; los machos se distinguen de los hermafroditas por la localización más posterior de éstos y el tamaño más grande que tienen sus células rectales, así como por la ausencia de neuronas específicas del gusano hermafrodita que sufren muerte celular programada durante la embriogénesis (V Ambros, 2000; J. E. . H. R. H. Sulston, 1977).

- b) *Etapa larvaria L2*: En esta etapa hay pocas divisiones celulares; continúan las divisiones de la línea germinal cuyas células se cuadruplican en número, pero no ocurren divisiones en los linajes de las células de la gónada somática primordial, las células somáticas y las germinales se mezclan hasta el paso de la etapa L2 a L3, donde se establece la organización general de la futura gónada. En el sistema nervioso también se producen cambios ya que se forman dos neuronas ganglionares ventrales (Kimble, 1979).
- c) *Larva Dauer*: Al final de la etapa L2, el gusano puede entrar en un estado alternativo de arresto si las condiciones ambientales no son favorables para que siga su crecimiento. Los factores ambientales como densidad poblacional, ausencia de comida, temperaturas altas, etc., generan señales que llevan al gusano a una etapa de arresto llamada L2d. Este estado es una etapa L2 alternativa en la cual el gusano no envejece, ya que retiene su potencial de seguir su desarrollo y su tiempo de vida posterior no se afecta, no se alimenta y su capacidad de moverse es mínima. El estado Dauer termina cuando el animal encuentra condiciones favorables. Después de 1 h de tener acceso a comida, el gusano sale de esta etapa y 10 h después entra a la etapa larvaria L4. Morfológicamente, los gusanos en Dauer son muy delgados y tienen una cutícula alterada, su cavidad bucal está sellada por un bloque de cutícula y sus células intestinales son más oscuras que las de los animales normales, su gónada queda arrestada en la etapa larvaria L2 (Burnell, Houthoofd, O'Hanlon, & Vanfleteren, 2005; Golden & Riddle, 1984; Swanson & Riddle, 1981).
- d) *Etapa larvaria L3*: Durante esta etapa las células precursoras de las gónadas somáticas producen 143 células que formarán las vainas que a su vez forman a las gónadas anterior y posterior, la espermateca y el útero (Kimble, 1979; J. E. . H. R. H. Sulston, 1977). Se definen los destinos de las células que formarán la vulva, y las células comprometidas comienzan a dividirse para generar las terminales de la vulva. Se forman además los mioblastos que se dividirán para dar origen a 16 células musculares. En el caso del macho, las células precursoras se dividen para generar 53 células somáticas de la gónada que formarán el vaso deferente y la vesícula seminal, estas células además se reorientan y migran hacia la parte posterior en la primera mitad de la etapa L3 y hacia la parte ventral en la segunda mitad. Se generan 6 mioblastos en el gusano macho y se forma su cola por medio de división celular de los blastocitos posteriores. En el caso del gusano hermafrodita, los brazos o segmentos laterales de las gónadas comienzan a

extenderse en direcciones opuestas durante la primera mitad de L3, entonces comienzan a reorientarse en direcciones dorsales. En ambos, los linajes más anteriores contribuyen con células al nervio ventral, los linajes ventrales producen las células “sensilla”. Para el caso del macho que produce solamente esperma, la meiosis comienza durante esta etapa (Euling & Ambros, 1996).

e) *Etapa larvaria L4*: En esta etapa se completa el proceso de la 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 y las células germinales se diferencian en esperma, la producción de esperma se detiene en el pase de L3 a adulto y las células germinales restantes pasan por meiosis y diferenciación para generar exclusivamente ovocitos. Los tejidos de la vulva y útero sufren morfogénesis y las neuronas y los músculos sexuales se asocian a estas estructuras para formar el aparato capaz de poner huevecillos. Se remodela la punta de la cola y se forma la cola del adulto redondeada; los tejidos posteriores se van a mover hacia delante de manera general (J. E. . H. R. H. Sulston, 1977).

3) *Etapa adulta*: 3 d después de la eclosión, el gusano completa su primer ciclo de vida reproductiva. El adulto hermafrodita produce ovocitos por 3 d y después de este periodo fértil el adulto maduro vive de 10 a 15 d adicionales. Un gusano adulto hermafrodita que se auto-fertiliza produce aproximadamente 300 huevecillos debido al número limitado de esperma, si se aparea con un macho el número de progenie puede aumentar hasta 1400. Los machos pueden aparearse con los hermafroditas 6 d después de su última etapa larvaria (Barrière & Félix, 2005). El adulto hermafrodita mide aproximadamente 1 mm de longitud, tiene 959 células somáticas pues 131 células de las 1090 que se generan en el desarrollo larvario sufren una muerte celular programada, de esas 959 células, 302 son neuronas y 95 son células musculares (J. E. . S. E. . W. J. G. . T. N. Sulston, 1983). El adulto macho tiene 1031 células somáticas, 381 de las cuales son neuronas, las neuronas extra con respecto al gusano hermafrodita controlan el comportamiento del apareamiento característico del macho, y aunque tiene más células es más delgado y corto que el gusano hermafrodita pues mide aproximadamente 0.8 mm (Morgan, Crittenden, & Kimble, 2010).



Ciclo de vida del nemátodo *C. elegans*. El tiempo cero corresponde al momento de la fertilización, en azul se indica el tiempo que el animal pasa en cada etapa, los μm en gris indican el tamaño que el animal alcanza en cada etapa (Modificada de Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R., Hall, 2012).

Anexo I

Buffers y soluciones

Buffer TAE 50X

Para 1 litro de buffer:

Tris Base (Promega H5131)	242 g
Ácido acético glacial (JT Baker 9508-02)	57.1 ml
EDTA (Na ₂ EDTA·2H ₂ O) (Amresco 6381-92-6)	37.2 g
Agua desionizada	Aforar a 1 litro

Antes de aforar ajustar el pH a 8.5.

Para preparar la solución TAE 1X, se utilizan 20 ml de este stock y se afora a 1 litro con agua desionizada.

Buffer de Fosfatos

Para 100 ml de buffer 1M, pH 6.0:

Fosfato de potasio dibásico (K ₂ HPO ₄) (JT Baker 3252-01)	17.42 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄) (JT Baker 3246-01)	13.6 g

Al fosfato de potasio dibásico se le agrega poco a poco el monobásico hasta alcanzar el pH deseado (6.0) midiendo en el potenciómetro, se usan aproximadamente 88 ml del monobásico y 12 del dibásico.

PBS 10X

Para 1 litro de solución:

NaCl (JT BAKER 3624-01) 1.37 M	80 g
KCl (JT BAKER 3040) 27 mM	2 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄) (JT Baker 3246-01) 18 mM	2.4 g
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na ₂ HPO ₄) (JT Baker 3804) 100 mM	14.4 g
Agua desionizada	Aforar a 1 litro

Disolver en 800 ml de agua y antes de aforar ajustar el pH a 7.4 con HCl. Esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente. Para preparar la solución PBS 1X, se utilizan 100 ml de este stock 10X y se afora a 1 litro con agua desionizada.

Cloruro de calcio 1M

Para 50 ml de solución a usarse en la preparación de los medios de cultivo:

Cloruro de calcio (CaCl ₂) (Sigma C 4901 500 g)	5.5 g
---	-------

Disolver en agua destilada y aforar a 50 ml.

Sulfato de Magnesio 1M

Para 50 ml de solución a usarse en la preparación de los medios de cultivo:

Sulfato de magnesio (MgSO ₄) (CP Baker 92942 452 g)	6 g
---	-----

Disolver en agua destilada y aforar a 50 ml.

Buffer M9 isotónico

Para 1 litro de buffer:

Na ₂ HPO ₄ (JT BAKER CAT. 3828-01)	6 g
KH ₂ PO (JT BAKER 3246-01)	3 g
NaCl (JT BAKER 3624-01)	5 g
MgSO ₄ (Anhidro J.T BAKER CAT 2506-01)	0.105 g
Agua destilada	Aforar a 1 litro

Pesar todas las sales y disolverlas en 900 ml de agua destilada, una vez disueltas aforar a 1 litro y esterilizar.

Buffer TBE 10X

Para 1 litro de buffer (Tris / Borato / EDTA):

Tris-base 890 mM (Promega Cat. H5131)	108 g
Ácido bórico 890 mM (JT BAKER 0084-01 granular 500 g)	55 g
EDTA (JT BAKER 0105 500 g)	7.4 g
Agua destilada	Aforar a 1 litro

Pesar todo y disolverlo en 700 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 1 litro.

Buffer TBS 10X

Para 500 ml de buffer:

Tris-base 0.2 M (Promega Cat. H5131)	12.1 g
NaCl (JT BAKER 3624-01) 1.5 M	43.83 g
Agua destilada	Aforar a 500 ml

Pesar todo y disolverlo en 300 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 con HCl y aforar a 500 ml.

TBST 1X

Para 2 litros de solución:

TBS 10X	200 ml
Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitane monolaureate) 0.05%	1 ml
Agua destilada	Aforar a 2 litros

Acrilamida al 30%

Para 100 ml de solución:

Acrilamida	28 g
Bis-Acrilamida	2 g

Disolver en 70 ml de agua tratada con DEPC y aforar a 100 ml, filtrar con embudo Millipore y almacenar en un frasco ámbar a 4 °C.

Persulfato de amonio (APS) al 10%

Para 1 ml de solución:

Persulfato de amonio (Sigma P6148 500g)	0.1 g
---	-------

Disolver en 1 ml de agua tratada con DEPC, hacer alícuotas de 70 µl y guardar a -20°C.

Paraformaldehído al 10%

Para 10 ml de solución:

Paraformaldehído	1 g
Buffer M9 isotónico	10 ml

Preparar en campana.

Calentar 10 ml de buffer M9 en una parrilla de calentamiento con un imán de agitación, agregar 1 g de paraformaldehído y dejar en agitación hasta que se disuelva. Dejar enfriar y ajustar el pH con un poco de NaOH 2N, aforar a 10 ml con buffer M9 frío.

Solución de azida de sodio al 10%

Para 10 ml de solución:

Azida de sodio	1 g
Agua destilada	10 ml

Disolver la azida de sodio en el agua mediante agitación con un imán, aforar a 10 ml.

Tratamiento: Los gusanos fueron recolectados en tubos eppendorf de 1.5 ml con 1 ml de Buffer M9, se centrifugaron a 3600 rpm durante un minuto a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 100 µl de solución al 10% de azida de sodio. Para llevar a cabo la medición, se colectaron con una pipeta y se colocaron en una cámara de Neubauer estándar.

Medios de cultivo para *C. elegans*

Nematode Growth Medium (Condiciones Estándar)

Para 250 ml de medio:

Cloruro de Sodio (NaCl, Hycel de México)	0.75 g
Bacto Agar (BD 214010 - 454g)	5 g
Bacto Peptona (BD 211677 - 500g)	0.625 g
Colesterol* (Sigma C 8667 25 g)	0.00125 g (disuelto de 0.25 ml de alcohol etílico)
Cloruro de Calcio 1M	0.25 ml
Sulfato de Magnesio 1M	0.25 ml
Buffer de Fosfatos 1M pH 6.0	6.25 ml
Agua destilada	243 ml

* La concentración final del colesterol en el medio estándar es de 50 µM.

Nematode Growth Medium (Aumento de glucosa)

Para 250 ml de medio:

Cloruro de Sodio	0.75 g
Bacto Agar	5 g
Bacto Peptona	0.625 g
Colesterol	0.00125 g (disuelto de 0.25 ml de alcohol etílico)
Glucosa* (Dextrosa JT Baker 36850 500 g)	1.8 g
Cloruro de Calcio 1M	0.25 ml
Sulfato de Magnesio 1M	0.25 ml
Buffer de Fosfatos 1M pH 6.0	6.25 ml
Agua destilada	241.5 ml

* La concentración final de la glucosa en el medio es de 40 mM.

Nematode Growth Medium (Aumento de colesterol)

Para 250 ml de medio:

Cloruro de Sodio	0.75 g
Bacto Agar	5 g
Bacto Peptona	0.625 g
Colesterol*	0.0965 g (disuelto de 1 ml de alcohol etílico)
Cloruro de Calcio 1M	0.25 ml
Sulfato de Magnesio 1M	0.25 ml
Buffer de Fosfatos 1M pH 6.0	6.25 ml
Agua destilada	242 ml

* La concentración final del colesterol en el medio es de 1 mM.

Nematode Growth Medium (Aumento de glucosa y colesterol)

Para 250 ml de medio:

Cloruro de Sodio	0.75 g
Bacto Agar	5 g
Bacto Peptona	0.625 g
Colesterol*	0.0965 g (disuelto de 1 ml de alcohol etílico)
Glucosa*	1.8 g
Cloruro de Calcio 1M	0.25 ml
Sulfato de Magnesio 1M	0.25 ml
Buffer de Fosfatos 1M pH 6.0	6.25 ml
Agua destilada	241 ml

*La concentración final de la glucosa en el medio es 40 mM y la del colesterol es 1 mM.

Estos medios se esterilizan, los 250 ml se reparten en cajas petri de 60 mm de diámetro estériles, se conservan a 4 °C.

Cuando se vayan a utilizar para sembrar gusanos se preparan colocando 150 µl de bacteria *E. coli* de la cepa OP50 al centro de la caja, ya que el botón de bacterias esté seco los gusanos pueden colocarse encima.

Preparación de *E. coli* OP50

Para 1 litro de medio LB:

Bacto-triptona	10 g
Extracto de bacto-levadura	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	Aforar a 1 litro

Ajustar el pH a 7.5

Para 1 litro de medio LB-agar para repartir en platos:

Bacto-triptona	10 g
Extracto de bacto-levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	Aforar a 1 litro

Ajustar el pH a 7.5, esterilizar y repartir en platos, mantener a 4 °C hasta su uso.

Se parte de un cultivo de 250 ml de la cepa *E. coli* OP50 en medio LB, la bacteria puede obtenerse de glicerol congelados o de los platos de los gusanos previamente utilizados. Este cultivo se usa para aislar colonias en un plato de agar LB. Utilizando una sola colonia de este plato, se inocula en condiciones de esterilidad un matraz con 250 ml de medio LB, se crece toda la noche en agitación a 37 °C. La solución de *E. coli* OP50 puede concentrarse mediante centrifugaciones o utilizarse directamente al colocarse sobre los platos del medio NGM para gusanos, también puede mantenerse a 4°C hasta su uso.

Congelación de gusanos (para extracción de RNA)

Para congelar los cultivos de interés y posteriormente utilizarlos para llevar a cabo la extracción de RNA, se colectaron los gusanos en etapa larvaria L4 con 1 ml de medio M9, se realizó una centrifugación a 3600 rpm durante 1 minuto a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de medio M9, se repitió el paso de centrifugación, y se descartó nuevamente el sobrenadante, el pellet de gusanos obtenido se sumergió en nitrógeno líquido hasta congelarse. Se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Sincronización de gusanos

La sincronización se realiza en gusanos grávidos, una vez que hayan puesto huevos, se espera a que éstos eclosionen y se separan a los gusanos en etapa larvaria L1 de los gusanos grávidos.

Se colectan los gusanos grávidos en 1 ml de buffer M9 se centrifugan a 3500 rpm a 4°C por 1 minuto, se descarta el sobrenadante y se obtiene un botón de gusanos a sincronizar.

Las soluciones que se utilizan para la sincronización deben prepararse el mismo día.

NaOH 1M	0.2 g disueltos en 5 ml de agua estéril
Cloro 5%	2 ml de Cloralex sin diluir

En un tubo cónico de 15 ml se mezclan:

NaOH 1M	2.5 ml
Cloro 5%	2 ml
Agua estéril	0.5 ml

Se realiza un lavado inicial con 0.7 ml de NaOH 1 M, que se agregan al botón de gusanos, se mezcla con vórtex por 10 segundos y se centrifuga a 3600 rpm a 4°C por 30 segundos.

Se hace un segundo lavado con 0.7 ml de NaOH 1 M y 0.7 ml de la mezcla de cloro y NaOH, que se agregan al botón de gusanos, se mezcla todo con vórtex en intervalos de 5 segundos durante 1 minuto y se centrifuga a 3600 rpm a 4°C por 30 segundos. Se obtiene un botón de color amarillo.

Se hace un otro lavado con 0.7 ml de NaOH 1 M y 0.7 ml de la mezcla de cloro y NaOH y antes de centrifugar se observa el tubo al microscopio para verificar que no haya cutículas. Si el botón obtenido en este paso es blanco, se desecha el sobrenadante y se comienzan los lavados con buffer M9, si el botón es amarillo se hace otro lavado con 0.7 ml de NaOH 1 M y 0.7 ml de la mezcla de cloro y NaOH.

El botón de color blanco que contiene a los huevos se lava 5 veces con buffer M9 para retirar el exceso de cloro. Después de los lavados se resuspende en 1.5 ml de buffer M9 y se dejan eclosionar en agitación a 900 rpm a temperatura ambiente durante 12 horas.

Ya que se tienen los gusanos en etapa L1 se colocan en cajas petri preparadas con los medios correspondientes como se describió previamente.

Preparación de placas de agarosa para montaje de los nemátodos

Se prepararon placas de agarosa que dan soporte a los nemátodos y evitan que se aplasten al colocar el cubreobjetos. Se colocó un portaobjetos con una capa de cinta adhesiva, se fundió agarosa al 2% y se colocó una gota en la parte central del cubreobjetos, evitando la formación de burbujas, se colocó otro portaobjetos encima de la gota de agarosa fundida presionando suavemente, se dejó solidificar y se retiró el portaobjetos deslizándolo hacia un lado. Se agregaron 10 µl de azida de sodio a la agarosa y se colocaron a los animales.

Extracción de RNAs pequeños de los gusanos

Se utiliza el kit miRNesy Mini KIT (Cat. No. 217004)

Preparar:

Etanol al 70%	10 ml (utilizar agua tratada con DEPC)
Etanol al 80%	10 ml (utilizar agua tratada con DEPC)

Notas:

- Usar guantes y bata.
- Verificar que los buffers RWT y RPE del kit tengan el volumen requerido de etanol.
- Si hay precipitado en el buffer RWT calentar hasta que se disuelva.
- La cantidad de gusanos no debe ser mayor de 50 mg en un volumen no mayor a los 100 µl.

Procedimiento:

- Calentar termoblock a 37 °C
- Agregar 700 µl de QIAzol reactivo de lisis (tiocianato de guanidina y fenol, reactivo tóxico y corrosivo) a la muestra congelada de gusanos.
- Romper el tejido y homogenizar:
 - ✓ Enfriar a -70 °C sumergiendo en nitrógeno líquido y después llevar a 37 °C, repetir este paso 3 veces.
 - ✓ Agitar en vórtex esta suspensión por 30 segundos y dejar reposar por 30 segundos, repetir este paso 5 veces (esto para romper todos los complejos RNA-proteína).
- Agregar 140µl de cloroformo, tapar y agitar vigorosamente por 15 segundos, dejar reposar 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 rpm a 4 °C por 15 minutos. Después de centrifugar subir la temperatura de la centrifuga pues las centrifugaciones posteriores se realizan a temperatura ambiente.
- Transferir la fase acuosa (fase superior) que contiene al RNA a un tubo nuevo. Calcular el volumen de esta fase acuosa para agregar 1 volumen (~ 350 µl) de etanol al 70%. Mezclar vigorosamente.
- Agregar 500 µl de la mezcla anterior incluyendo cualquier precipitado formado en una columna RNeasy Mini Spin Column, colocada en un tubo para microcentrifuga de 2 ml. Cerrar la tapa de la columna y centrifugar a 10000 rpm por 15 seg. a temperatura ambiente, repetir este paso hasta pasar todo el volumen. Guardar el eluido en un tubo

eppendorf a 4 °C. El eluido de este paso se utilizará para el protocolo de purificación de microRNAs.

- Lavar la columna con 700 µl de buffer RWT, centrifugar a 10,000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente, descartar el eluido de este paso.
- Tratar a la columna con DNAsa:
Hacer otro lavado con Buffer RWT 350 µl. Centrifugar 10,000 rpm 15 seg.
Descartar el eluido de este paso.
Mezclar en un tubo eppendorf lo siguiente:

Buffer DNAsa 10X	8 µl
Agua	71 µl
DNAsa	1 µl

Agregar la mezcla (80 µl) a la columna y dejar reposar por 15 minutos en el termoblock a 30°C. Centrifugar por unos segundos para eluir la solución y descartar el eluido de este paso.

- Agregar 350 µl de Buffer RWT a la columna, centrifugar por 15 segundos a 10,000 rpm, descartar el eluido de este paso.
- Agregar 500 µl de buffer RPE a la columna, centrifugar a 10,000 por 15 segundos a temperatura ambiente. Repetir este paso.
- Secar la membrana de la columna centrifugando a máxima velocidad durante 1 minuto con la tapa de la columna abierta.
- Transferir la columna a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y agregarle 15 µl de agua libre de RNAsas, cerrar la columna y centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm a temperatura ambiente. Repetir este paso para obtener un volumen final del eluido de 30 µl.
- Cuantificar en nanodrop y verificar su integridad en un gel de agarosa al 1 %

Purificación de microRNAs de *C. elegans*

Se utiliza el kit RNeasy MiniElute Cleanup KIT (Cat. No. 74204)

*Se parte del eluido que se guardó del protocolo anterior.

- Agregar 450 µl de etanol al 100% al eluido obtenido en el protocolo anterior, mezclar vigorosamente en vortex .
- Depositar 500 µl de esta muestra en la columna RNeasy MinElute del kit referido, colocar en un tubo eppendorf de 1.5 ml, centrifugar a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Repetir este paso hasta pasar todo el volumen de la muestra. El eluido obtenido de este paso se desecha.
- Lavar la columna con 700 µl de buffer RWT, centrifugar a 10,000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente y descartar el eluido.
- Agregar 500 µl de buffer RPE a la columna, centrifugar a 10,000 por 1 minuto a temperatura ambiente y descartar el eluido.
- Agregar 500 µl de etanol al 80 % a la columna, centrifugar por 2 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente. Descartar el eluido y centrifugar nuevamente por 5 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente.
- Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y estéril, agregar 14 µl de agua libre de RNAsas, y centrifugar para obtener la fracción enriquecida de miRNAs que será usada en las reacciones de RT-PCR.

Preparación de oligonucleótidos para RT (Protocolo Stem-Loop)

Los oligonucleótidos para las reacciones de RT se prepararon según el protocolo Stemp-Loop para RT-qPCR de Martha F. Kramer (Kramer, 2011), brevemente, se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo y estéril 4 μ l del oligonucleótido a utilizar y se sometió al siguiente procedimiento:

Temperatura	Tiempo de incubación
95 °C	10 minutos
Lentamente bajar la temperatura hasta que alcance 75 °C	
75 °C	1 hora
68 °C	1 hora
65 °C	1 hora
62 °C	1 hora
60 °C	5 horas mínimo (se puede dejar toda la noche)

Después de las incubaciones se centrifugó el tubo eppendorf a 10000 rpm durante 1 minuto. El oligonucleótido queda preparado para hacer las diluciones correspondientes a manera que queden a una concentración final de 250 fmol/ml, a utilizar en las reacciones de RT.

RT-PCR

Para los ensayos de transcripción reversa (RT) 4 μ g de RNA total fueron tratados con DNAsa I (Invitrogen), se empleó 1 U de DNAsa por cada μ g de RNA total, en un volumen final de 10 μ l con buffer de reacción 1X. Las muestras se incubaron por 15 min a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, la DNAsa se inactivó al agregar 1 μ l de EDTA 25 mM. Las muestras se calentaron a 65°C por 10 min. Una vez que el RNA quedó libre de DNA se procedió a realizar la transcripción reversa empleando la enzima SuperScript II RT, para llevar a cabo la síntesis de la primera cadena de cDNA se adicionaron en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml nuevo y estéril los siguientes componentes: 2 μ g de RNA total tratado con DNAsa I, 1 μ l de hexámeros al azar y 1 μ l de dNTPs 10 mM, esta mezcla se incubó a 65°C por 5 min y se transfirió a hielo donde se agregaron los demás componentes: Buffer de Reacción 1X, DTT 0.1 M y 1 μ l de la enzima SuperScript II en un volumen final de 20 μ l, los componentes fueron mezclados mediante pipeteo suave y se procedió con el siguiente programa de incubación: 15 min a 16°C, 30 min a 42°C, 15 min a 75°C y, finalmente las muestras se mantuvieron a 4°C. Una vez que se obtuvo el cDNA, éste fue empleado como templado para llevar a cabo las reacciones de PCR.

Se realizaron ensayos de PCR con los cDNAs obtenidos y con oligonucleótidos correspondientes a los miRNAs, *miR-35-3p*, *miR34-3p*, *miR-34-5p* y *miR-58-3p* y a los mensajeros de los genes blanco *gld-1*, *lin-23* y *β -actina* las secuencias de estos oligonucleótidos se encuentran en el Anexo I.

La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

PCR ciclos	<i>gld-1/lin-23</i>	<i>β-actina</i>	<i>miR-34-3p y 5p</i>	<i>miR-35-3p y miR-58-3p</i>
1	5 min - 95°C	5 min - 95°C	5 min - 90°C	5 min - 95°C
30	1 min - 95°C	1 min - 95°C	10 seg - 95°C	15 seg - 90°C
	1 min - 55°C	1 min - 65°C	30 seg - 45°C	30 seg - 45°C
	1 min - 75°C	1 min - 75°C	15 seg - 70°C	15 seg - 70°C
1	5 min - 72°C	5 min - 72°C	5 min - 72°C	5 min - 72°C
Fin de la reacción	4°C	4°C	4°C	4°C

Finalmente, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de acrilamida al 12 % o bien, por medio de geles de agarosa al 1%.

Electroforesis en geles de agarosa (al 1%)

Agarosa (Promega V3125)	0.3 g
Buffer TAE 1X pH 8.5	30 ml

Preparación: Disolver el agar en microondas o plancha de calentamiento. Una vez disuelto vaciarlo en una probeta y agregar TAE 1X para recuperar el volumen perdido en el calentamiento, el volumen final debe ser 30 ml. Esperar a que se enfríe, vaciar en el molde y colocar el peine para crear los pozos donde se colocarán las muestras. Una vez polimerizado se coloca el gel en la cámara electroforética, la cual se llena con buffer TAE 1X, se colocan las muestras en los pozos correspondientes y se corren a un voltaje de 60V durante 1 hora y 30 min.

Electroforesis en geles de acrilamida (al 12%)

Se requiere: Buffer TBE 10 X, Acrilamida al 30%, Persulfato de amonio (APS) al 10%, y TEMED.

Preparación del gel:

Acrilamida 30%	3.2 ml
Buffer TBE 10 X	0.8 ml
APS 10%	70 μ l
Agua desionizada	4 ml

Poner todo en un matraz y agitar con un magneto, por último agregar 8 μ l de TEMED y vaciar en el molde, se coloca el peine que formará los pozos para cargar las muestras correspondientes y se deja polimerizar. Una vez polimerizado se coloca el gel en la cámara electroforética, la cual se llena con buffer TBE 1X, se colocan las muestras en los pozos correspondientes y se corren a un voltaje de 60V durante 2 horas.

Western Blot

Amortiguador de carga:

Tris-HCl 1M (pH 6.8)	0.6 ml
Glicerol 50% v/v	5 ml
SDS 10% w/v	2 ml
Azul de bromofenol 1% w/v	1 ml

Se colectaron 100 gusanos de las diferentes condiciones en 9 μ l de agua, 2.4 μ l de DTT (1M) y 2 μ l de amortiguador de carga. Las muestras se calentaron a 95°C por 5 minutos, se cuantificó la proteína mediante el método de Bradford y se cargaron 4 μ g de proteína en un gel de acrilamida al 12% (Bollag, 1996). El gel se corrió a 100 V. Después de separar las proteínas en el gel de poli(acrilamida), se transfirieron a una membrana de PVDF (BIO-RAD) con un buffer de transferencia durante 1 hora a 100 V. Posteriormente se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en TBST al 0.1% en agitación por 90 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubó con el anticuerpo primario Mouse-Anti GFP (GFP Antibody (B-2): sc-9996) de Santa Cruz en una dilución 1:2500 en TBST 1X a 4°C toda la noche. Al día siguiente, la membrana fue lavada cinco veces con TBST 1X por 10 min y luego incubada durante 90 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) en una dilución 1:5000 en TBST 1X. Por último, cada membrana fue lavada tres veces con TBST 1X por 10 min.

Finalmente se realizó la detección de las proteínas empleando el kit de quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific Pierce), la imagen se capturó mediante un fotodocumentador.

Tinciones

Tinción con Negro Sudán

Fijación

- Recolectar los gusanos a teñir en 1 ml de buffer M9. Centrifugar a 3500 rpm por 1 minuto y descartar el sobrenadante. Repetir este paso 3 veces.
- Incubar a los gusanos 30 minutos a 4°C en 0.9 ml de buffer M9 para excretar la bacteria que se encuentre en el intestino.
- Añadir 100 µl de paraformaldehído al 10% para que quede a una concentración final al 1%, mezclar invirtiendo el tubo.
- Congelar la muestra en hielo seco o con etanol y almacenar a -70 °C.

Tinción

Preparar:

Solución saturada de Negro Sudán

Negro Sudán	1 g
Etanol al 75%	100 ml

Disolver 1 g de negro sudán en 100 ml de etanol al 75%, filtrar el colorante.

Preparar soluciones para el gradiente de etanol:

Etanol al 25%	1.25 ml de etanol + 3.75 ml de agua destilada
Etanol al 50%	2.5 ml de etanol + 2.5 ml de agua destilada
Etanol al 70%	3.5 ml de etanol + 1.5 ml de agua destilada

- Descongelar la muestra en una corriente de agua tibia y congelar nuevamente en hielo seco o con etanol.
- Repetir el ciclo de descongelación y congelación 2 veces más.
- Descongelar e incubar sobre hielo por 10 minutos para dejar que los gusanos se asienten y poder retirar el sobrenadante.
- Agregar 1 ml de buffer M9, centrifugar a 3500 rpm por 1 minuto y retirar el sobrenadante. Repetir este paso 3 veces más.
- Retirar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol al 25%, dejar por 2 minutos.
- Retirar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol al 50%, dejar por 2 minutos.
- Retirar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol al 70%, dejar por 2 minutos.
- Retirar el sobrenadante y agregar 3 volúmenes de la solución saturada de Negro Sudán, incubar por 15 minutos.
- Centrifugar a 3500 rpm por 1 minuto y retirar el sobrenadante.
- Lavar con 1 ml de etanol al 15% durante 1 minuto. Centrifugar a 3500 rpm por 1 minuto y retirar el sobrenadante. Repetir este lavado un total de 4 veces.
- Los gusanos teñidos se montan en un portaobjetos, se fijan con 1 gota de xilol, y 1 gota de permount, se coloca el cubreobjetos y se observan al microscopio o bien, se utilizan para cuantificación por extracción como se describe a continuación.

Extracción del Negro Sudán para cuantificación

Se separaron 100 gusanos previamente teñidos con el protocolo anterior, se colocaron el 100 μ l de etanol al 95% por 3 horas, se midió la absorbancia del extracto a 500 nm (OD_{500}) utilizando un espectrofotómetro (Nano-Drop ND-1000), este protocolo fue reportado previamente por Tan y colaboradores (Tan et al., 2011).

Tinción con Rojo Nilo *in vivo*

Preparar:

Solución Stock Rojo Nilo:

Rojo Nilo	0.0038 g
DMSO	10 ml

Disolver 0.0038 g del colorante en 10 ml de DMSO y mantener a 4 °C.

Para la tinción con Rojo Nilo se preparan platos con Nematode Growth Medium (NGM) como se describió previamente, pero se agrega a cada fórmula 550 μ l de la solución Stock de Rojo Nilo, los medios preparan con el mismo protocolo, esterilizando las soluciones para cada condición, y repartiéndolas en cajas petri de 60 mm de diámetro estériles, también se mantienen a 4 °C. Cuando estas cajas se utilizaron para sembrar gusanos se prepararon igualmente con bacteria *E. coli* OP50 como se describió anteriormente.

Para el análisis de las imágenes se utilizó el archivo ImageJ64, el protocolo que se siguió fue el siguiente:

Se seleccionó manualmente el área a evaluar, se seleccionaron los siguientes parámetros para analizar:

- Área
- Integrated Density
- Mean Gray Value

Se analizaron para el área seleccionada. Después se selecciona un área que no tiene fluorescencia y que será tomada como background y se analizan los mismos valores.

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la fluorescencia total corregida (CTCF)

$CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Área del gusano fluorescente} \times \text{Fluorescencia media del Background})$.

Se graficaron los valores obtenidos en el programa de análisis estadístico GraphPad Prism 6.0 para ver si son significativamente diferentes.

Tinción con Rojo Nilo (fijación)

Preparar:

Solución Stock Rojo Nilo:

Rojo Nilo	25 mg
Acetona 100%	50 ml

Disolver 25 mg del colorante en 50 ml de DMSO y mantener la solución a temperatura ambiente protegiéndola de la luz, puede mantenerse meses.

Preparar inmediatamente antes de usar:

500 ml de solución para tinción Rojo Nilo:

Solución Stock Rojo Nilo	3 ml
--------------------------	------

Isopropanol 40% v/v	Aforar a 500 ml
---------------------	-----------------

Mantener la solución a temperatura ambiente protegiéndola de la luz.

El siguiente protocolo se basa en el procedimiento reportado por Soukas y colaboradores (Pino et al., 2013).

- Colectar los gusanos a teñir de los platos de cada una de las condiciones con 1 ml de Buffer M9 en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Centrifugar a 500 rpm por 1 minuto, retirar el sobrenadante.
- Agregar 150 μ l de PBS con 0.01% Tritón X-100 al botón de gusanos. Mezclar mediante pipeteo suave.
- Centrifugar a 500 rpm por 1 minuto y retirar el sobrenadante, dejando ~ 25 μ l de líquido y el botón de gusanos al fondo del tubo.
- Agregar 150 μ l de 40% isopropanol a cada tubo y mezclar. Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- Centrifugar los tubos a 500 rpm por 1 minuto. Retirar el sobrenadante dejando ~ 25 μ l de 40% isopropanol + gusanos.
- Agregar 150 μ l de la Solución para tinción de Rojo Nilo preparada inmediatamente antes de usarse (6 μ l Solución Stock Rojo Nilo en 1 ml de 40% isopropanol). Cerrar el tubo y sellar con un poco de parafilm, dejar incubando en oscuridad por al menos 2 horas.
- Centrifugar a 500 rpm por 1 minuto y retirar el sobrenadante, dejando ~ 25 μ l de solución de tinción + gusanos.
- Agregar 150 μ l de PBS con 0.01% de Tritón X-100 a cada tubo. Incubar en oscuridad 30 minutos.
- Centrifugar a 500 rpm por 1 minuto, retirar el sobrenadante, dejando ~ 10 μ l PBS con 0.01% de Tritón + gusanos.
- Colocar los 10 μ l de PBS con 0.01% de Tritón + gusanos en un portaobjetos, con cuidado de no tocar a los gusanos, retirar los 10 μ l de PBS con 0.01% de Tritón de la placa.
- Observar al microscopio en un campo luminoso o con un filtro fluorescente GFP/FITC.

Anexo II

Secuencias de los oligonucleótidos

1) RTCEL 35 (para amplificación del *miR-35-3p*) RT

Secuencia 5'→ 3'

5' - gtt ggc tct ggt gca ggg tcc gag gta ttc gca cca gag cca aca
ctg ct - 3'

Longitud: 50 nt
Coef : 532. 4
Vol : 500 µl
Conc: 228 µg/µl
PM: 16252.00
A₍₂₆₀₎: 0.737
OD's totales: 34.62
C+G (%): 60
Tm₁: 80°C
Tm₂: 160°C
picomol/µl: 140.58

2) FCEL 35 (para amplificación del *miR-35-3p*) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - gcg gcg gtc acc ggg tgg aaa ct - 3'

Longitud: 23 nt
Coef : 251.5
Vol : 500 µl
Conc: 2.65 µg/µl
PM: 7504.6
A₍₂₆₀₎: 0.568
OD's totales: 40.12
C+G (%): 69.56
Tm₁: 73.95 °C
Tm₂: 78 °C
Picomol/µl: 352

3) RTCEL 34 (para amplificación del *miR-34-5p*) RT

Secuencia 5'→ 3'

5' - gtt ggc tct ggt gca ggg tcc gag gta ttc gca cca gag cca acc
aac cag - 3'

Longitud: 51 nt
Coef : 551.8
Vol : 500 µl
Conc: 2.38 µg/µl
PM: 16576.20
A₍₂₆₀₎: 0.778
OD's totales: 35.99
C+G (%): 60.78
Tm₁: 80.42 °C
Tm₂: 164 °C
picomol/µl: 143.31

4) FCEL 34 (para amplificación del *miR-34-5p*) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - gcg gcg gag gca gtg tgg tta g - 3'

Longitud: 22 nt
Coef : 246.9
Vol : 500 µl
Conc: 2.58 µg/µl
PM: 7269.40
A₍₂₆₀₎: 0.545
OD's totales: 39.08
C+G (%): 68.18
Tm₁: 72.73 °C
Tm₂: 74 °C
Picomol/µl: 354.85

5) R-34-3p (para amplificación del *miR-34-3p*) RT

Secuencia 5'→ 3'

5' - gtt ggc tct ggt gca ggg tcc gag gta ttc gca cca gag cca acg
ggt gg - 3'

Longitud: 50 nt
Coef : 540.2
Vol : 500 µl
Conc: 1.40 µg/µl
PM: 16373
A₍₂₆₀₎: 88.722
OD's totales: 21.15
C+G (%): 64.00
Tm₁: 81.36 °C
Tm₂: 164.00 °C
Picomol/µl: 85.27

6) F-34-3p (para amplificación del *miR-34-3p*) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - gcg gcg gac ggc tac ctt cac tg - 3'

Longitud: 23 nt
Coef : 236.7
Vol : 500 μ l
Conc: 2.45 μ g/ μ l
PM: 7415.60
A₍₂₆₀₎: 103.44
OD's totales: 37.09
C+G (%): 69.56
Tm₁: 73.98 °C
Tm₂: 78 °C
Picomol/ μ l: 330.12

7) RTCEL 58 (para amplificación del *miR-58-3p*) RT

Secuencia 5'→ 3'

5' - gtt ggc tct ggt gca ggg tcc gag gta ttc gca cca gag cca aca
ttg cc - 3'

Longitud: 50 nt
Coef : 532.4
Vol : 500 μ l
Conc: 1.58 μ g/ μ l
PM: 16252
A₍₂₆₀₎: 0.51
OD's totales: 23.95
C+G (%): 60.00
Tm₁: 80.00 °C
Tm₂: 160.00 °C
Picomol/ μ l: 97.28

8) FCEL 58 (para amplificación del *miR-58-3p*) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - gcg gcg gtg aga tcg ttc agt ac - 3'

Longitud: 23 nt
Coef : 250.9
Vol : 500 μ l
Conc: 2.04 μ g/ μ l
PM: 7494.60
A₍₂₆₀₎: 0.437
OD's totales: 30.87
C+G (%): 60.87
Tm₁: 71.02 °C
Tm₂: 74.00 °C
Picomol/ μ l: 271.84

9) LIN23-fw (para amplificación del mensajero *lin-23*) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - tgt tcc gcc tgc agt ttg a - 3'

Longitud: 19 nt
Coef : 191.7
Vol : 500 µl
Conc: 0.17 µg/µl
PM: 6091.80
A₍₂₆₀₎: 0.034
OD's totales: 2.55
C+G (%): 52.63
Tm₁: 64.61 °C
Tm₂: 58 °C
Picomol/µl: 27.64

10) LIN23-rev (para amplificación del mensajero *lin-23*) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - gtc caa aaa gtc cca aat gag aa - 3'

Longitud: 23 nt
Coef : 280.4
Vol : 500 µl
Conc: 2.38 µg/µl
PM: 7432.6
A₍₂₆₀₎: 0.510
OD's totales: 36.02
C+G (%): 39.13
Tm₁: 63.63 °C
Tm₂: 64 °C
Picomol/µl: 319.89

11) GLD-fw (para amplificación del mensajero *gld-1*) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - gga aag tgc tca ccg tgg aa - 3'

Longitud: 20 nt
Coef : 231.9
Vol : 500 µl
Conc: 0.18 µg/µl
PM: 6514
A₍₂₆₀₎: 0.037
OD's totales: 2.73
C+G (%): 55
Tm₁: 66.45 °C
Tm₂: 62 °C
Picomol/µl: 27.71

12) GLD-rev (para amplificación del mensajero *gld-1*) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - tgt tcg agt gct gct tgc a - 3'

Longitud: 19 nt
Coef : 196.1
Vol : 500 μ l
Conc: 2.36 μ g/ μ l
PM: 6131.80
A₍₂₆₀₎: 0.476
OD's totales: 35.72
C+G (%): 52.63
Tm₁: 64.61 °C
Tm₂: 58 °C
Picomol/ μ l: 384.46

13) ACT-fw (para amplificación del mensajero β -actina) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - ccg tga aaa gat gac cca aat c - 3'

Longitud: 22 nt
Coef : 257.2
Vol : 500 μ l
Conc: 3.77 μ g/ μ l
PM: 7078.40
A₍₂₆₀₎: 0.796
OD's totales: 57.08
C+G (%): 45.45
Tm₁: 65 °C
Tm₂: 64 °C
Picomol/ μ l: 532.25

14) ACT-rev (para amplificación del mensajero β -actina) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - ggt acg tcc gga agc gta ga - 3'

Longitud: 20 nt
Coef : 228.4
Vol : 500 μ l
Conc: 2.35 μ g/ μ l
PM: 6530
A₍₂₆₀₎: 0.481
OD's totales: 35.55
C+G (%): 60
Tm₁: 68.15 °C
Tm₂: 64 °C
Picomol/ μ l: 359.34

15) URP (para amplificación universal de los miRNAs) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - gtg cag ggt ccg agg t - 3'

Longitud: 16 nt
Coef : 175.1
Vol : 500 µl
Conc: 1.8 µg/µl
PM: 5233.20
A₍₂₆₀₎: 0.347
OD's totales: 27.25
C+G (%): 68.75
Tm₁: 66.19 °C
Tm₂: 54 °C
Picomol/µl: 343.63

16) 5srRNA-fw (para amplificación del rRNA 5S) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - cga cca tat cac gtt gaa tcg acg c - 3'

Longitud: 25 nt
Coef : 271.8
Vol : 500 µl
Conc: 1.24 µg/µl
PM: 8019.00
A₍₂₆₀₎: 0.542
OD's totales: 18.86
C+G (%): 52.00
Tm₁: 69.38 °C
Tm₂: 76 °C
Picomol/µl: 155.19

17) 5srRNA-rev (para amplificación del rRNA 5S) PCR

Secuencia 5'→ 3'

5' - agg att ccc agg ccg tct ccg - 3'

Longitud: 21 nt
Coef : 213.1
Vol : 500 µl
Conc: 1.35 µg/µl
PM: 6723.2
A₍₂₆₀₎: 0.552
OD's totales: 20.4
C+G (%): 66.67
Tm₁: 71.36 °C
Tm₂: 70 °C
Picomol/µl: 200.26

Anexo III - Análisis Estadístico

Análisis estadísticos de los datos obtenidos realizados en GraphPad Prism 6.0 c. Se muestra la prueba realizada y el error correspondiente, indicando el p valor para cada caso.

Evaluación fenotípica

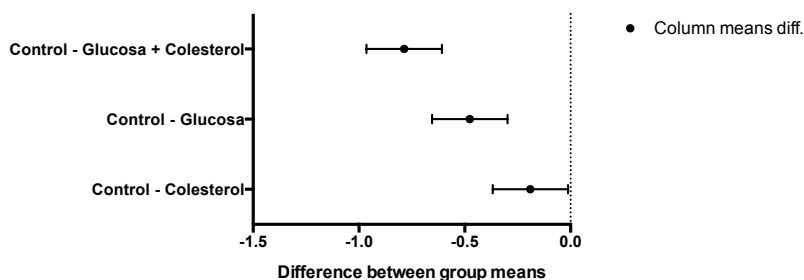
Tamaño de los gusanos

A) Comparación de cada dieta contra la condición control mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.05$

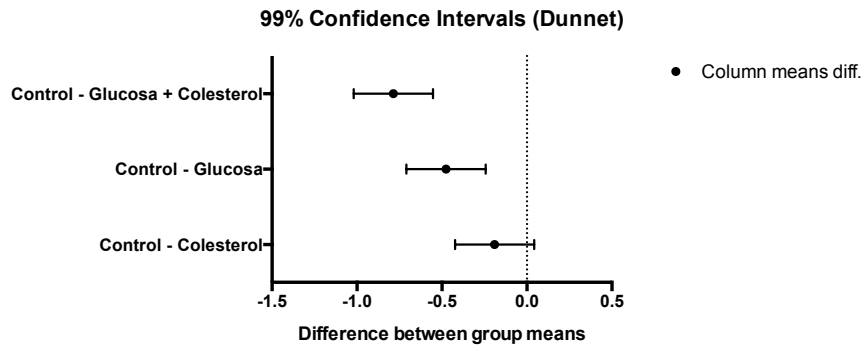
Ordinary one-way ANOVA		A	B	C	D	E	F	G	H
Multiple comparisons		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.05							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	-0.190	-0.368 to -0.0118	Yes	*	0.0357			
8	Control vs. Glucosa	-0.476	-0.654 to -0.298	Yes	****	< 0.0001			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-0.786	-0.964 to -0.608	Yes	****	< 0.0001			

95% Confidence Intervals (Dunnett)



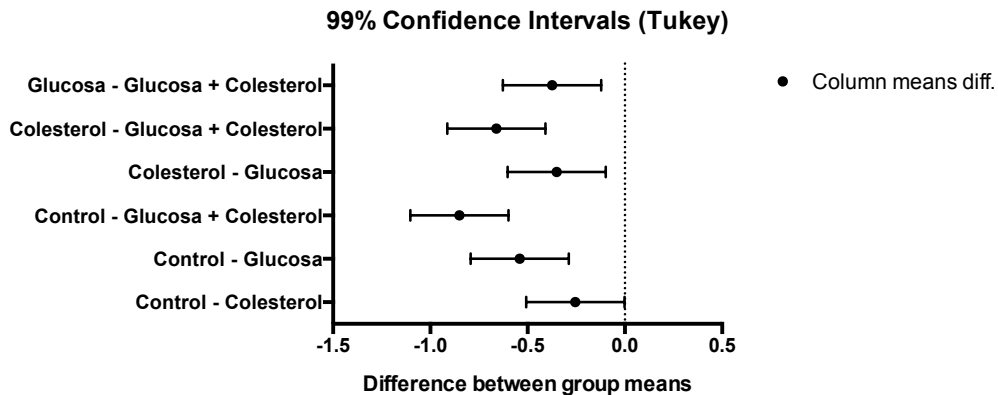
$p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA		A	B	C	D	E	F	G	H
Multiple comparisons		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	-0.190	-0.423 to 0.0431	No	*	0.0357			
8	Control vs. Glucosa	-0.476	-0.709 to -0.243	Yes	****	< 0.0001			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-0.786	-1.02 to -0.553	Yes	****	< 0.0001			



B) Comparación de la media de cada dieta contra la media de las demás mediante la prueba ANOVA. $p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	6							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	-0.190	-0.442 to 0.0624	No	ns	0.0601			
8	Control vs. Glucosa	-0.476	-0.728 to -0.224	Yes	****	< 0.0001			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-0.786	-1.04 to -0.534	Yes	****	< 0.0001			
10	Colesterol vs. Glucosa	-0.286	-0.538 to -0.0336	Yes	**	0.0037			
11	Colesterol vs. Glucosa + Colesterol	-0.596	-0.848 to -0.344	Yes	****	< 0.0001			
12	Glucosa vs. Glucosa + Colesterol	-0.310	-0.562 to -0.0576	Yes	**	0.0018			
13									
14									
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
16									
17	Control vs. Colesterol	0.926	1.12	-0.190	0.0687	5	5	3.91	16
18	Control vs. Glucosa	0.926	1.40	-0.476	0.0687	5	5	9.79	16
19	Control vs. Glucosa + Colesterol	0.926	1.71	-0.786	0.0687	5	5	16.2	16
20	Colesterol vs. Glucosa	1.12	1.40	-0.286	0.0687	5	5	5.88	16
21	Colesterol vs. Glucosa + Colesterol	1.12	1.71	-0.596	0.0687	5	5	12.3	16
22	Glucosa vs. Glucosa + Colesterol	1.40	1.71	-0.310	0.0687	5	5	6.38	16



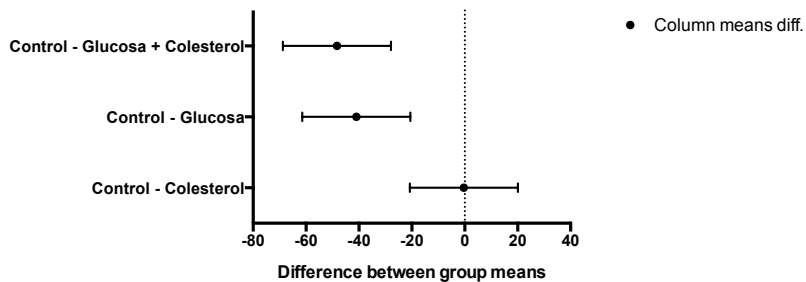
Puesta de huevos

Comparación de cada dieta contra la condición control mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA		A	B	C	D	E	F	G	H
Multiple comparisons		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	-0.333	-20.8 to 20.1	No	ns	0.9999			
8	Control vs. Glucosa	-41.0	-61.5 to -20.5	Yes	***	0.0001			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-48.3	-68.8 to -27.9	Yes	****	< 0.0001			
10									
11									
12	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
13									
14	Control vs. Colesterol	47.0	47.3	-0.333	5.11	3	3	0.0652	8
15	Control vs. Glucosa	47.0	88.0	-41.0	5.11	3	3	8.02	8
16	Control vs. Glucosa + Colesterol	47.0	95.3	-48.3	5.11	3	3	9.46	8

99% Confidence Intervals (Dunnett)



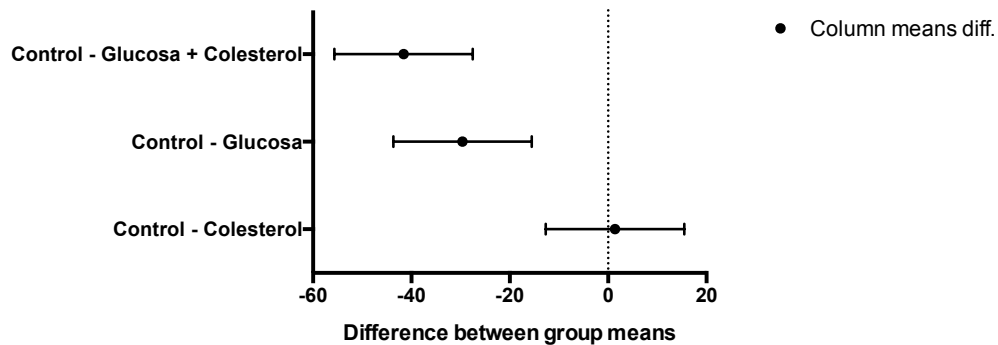
Tinción Negro Sudán

Comparación de cada dieta contra la condición control mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	1.40	-12.7 to 15.5	No	ns	0.9739			
8	Control vs. Glucosa	-29.6	-43.7 to -15.5	Yes	****	< 0.0001			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-41.6	-55.7 to -27.5	Yes	****	< 0.0001			
10									
11									
12	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
13									
14	Control vs. Colesterol	31.6	30.2	1.40	4.15	5	5	0.337	16
15	Control vs. Glucosa	31.6	61.2	-29.6	4.15	5	5	7.13	16
16	Control vs. Glucosa + Colesterol	31.6	73.2	-41.6	4.15	5	5	10.0	16

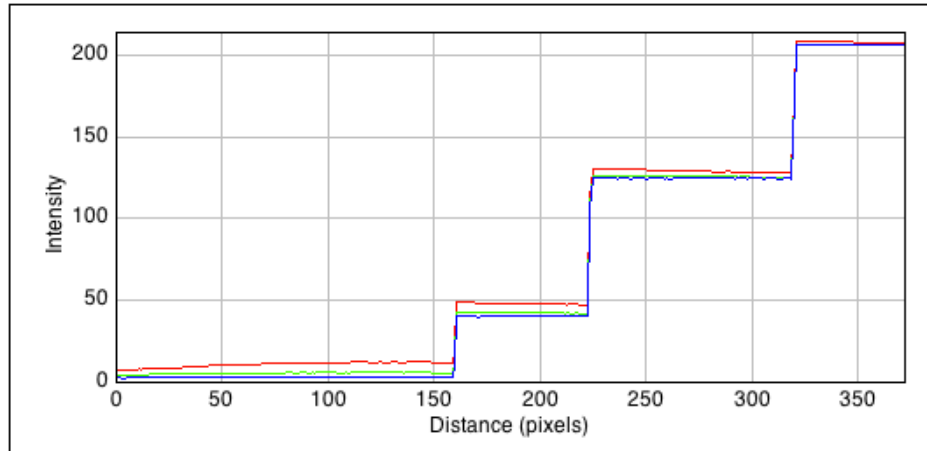
99% Confidence Intervals (Dunnet)



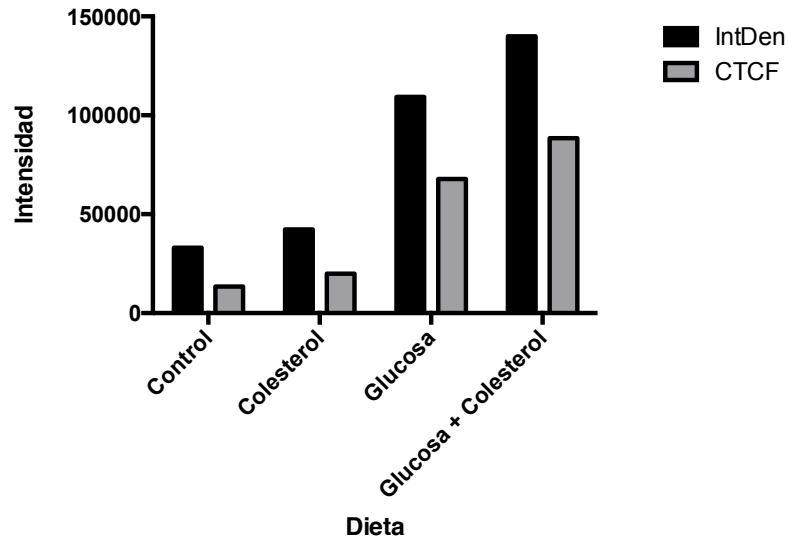
Marcaje *in vivo* con Rojo Nilo

Para analizar la fluorescencia de cada imagen se utilizó el programa ImageJ64.

	Área	Media	Integrated De	CTCF
Control	3487	7.787	33008	13494.748
Colesterol	3999	10.581	42315	19936.596
Glucosa	7427	14.72	109356	67794.508
Glucosa + Col	9198	15.212	139921	88448.992
Background C	466	3.298	1537	
Background C	596	5.978	3563	
Background G	407	6.113	2488	
Background G	768	6.995	5372	
Background average		5.596		



Rojo Nilo - Fluorescencia



Perfiles microRNAs

miR-35-3p

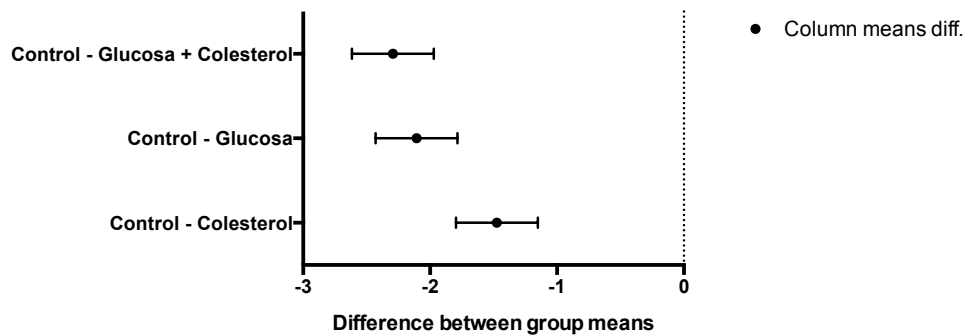
A) Densitometría de gusanos L4 en las diferentes dietas

Comparación de cada dieta contra la condición control mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	-1.47	-1.80 to -1.15	Yes	****	< 0.0001			
8	Control vs. Glucosa	-2.11	-2.43 to -1.78	Yes	****	< 0.0001			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-2.29	-2.62 to -1.97	Yes	****	< 0.0001			
10									
11									
12	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
13									
14	Control vs. Colesterol	0.0267	1.50	-1.47	0.0804	3	3	18.3	8
15	Control vs. Glucosa	0.0267	2.13	-2.11	0.0804	3	3	26.2	8
16	Control vs. Glucosa + Colesterol	0.0267	2.32	-2.29	0.0804	3	3	28.5	8

99% Confidence Intervals (Dunnet)



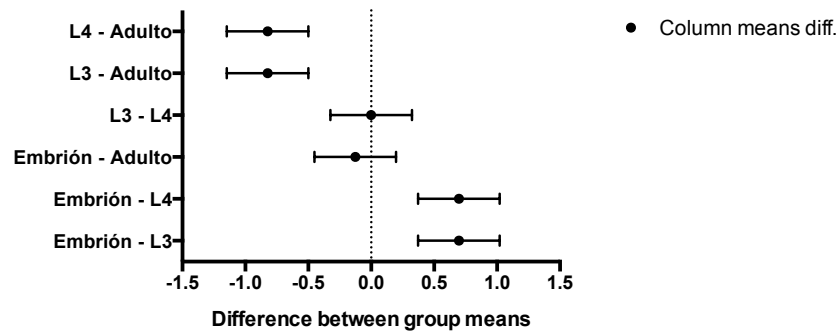
B) Densitometría Etapas Larvarias.

Comparación de la media de cada etapa contra la media de las demás mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	6							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Embrión vs. L3	0.697	0.373 to 1.02	Yes	****	< 0.0001			
8	Embrión vs. L4	0.697	0.373 to 1.02	Yes	****	< 0.0001			
9	Embrión vs. Adulto	-0.127	-0.450 to 0.197	No	ns	0.3748			
10	L3 vs. L4	0.0	-0.323 to 0.323	No	ns	> 0.9999			
11	L3 vs. Adulto	-0.823	-1.15 to -0.500	Yes	****	< 0.0001			
12	L4 vs. Adulto	-0.823	-1.15 to -0.500	Yes	****	< 0.0001			
13									
14									
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
16									
17	Embrión vs. L3	0.723	0.0267	0.697	0.0737	3	3	13.4	8
18	Embrión vs. L4	0.723	0.0267	0.697	0.0737	3	3	13.4	8
19	Embrión vs. Adulto	0.723	0.850	-0.127	0.0737	3	3	2.43	8
20	L3 vs. L4	0.0267	0.0267	0.0	0.0737	3	3	0.0	8
21	L3 vs. Adulto	0.0267	0.850	-0.823	0.0737	3	3	15.8	8
22	L4 vs. Adulto	0.0267	0.850	-0.823	0.0737	3	3	15.8	8

99% Confidence Intervals (Tukey)



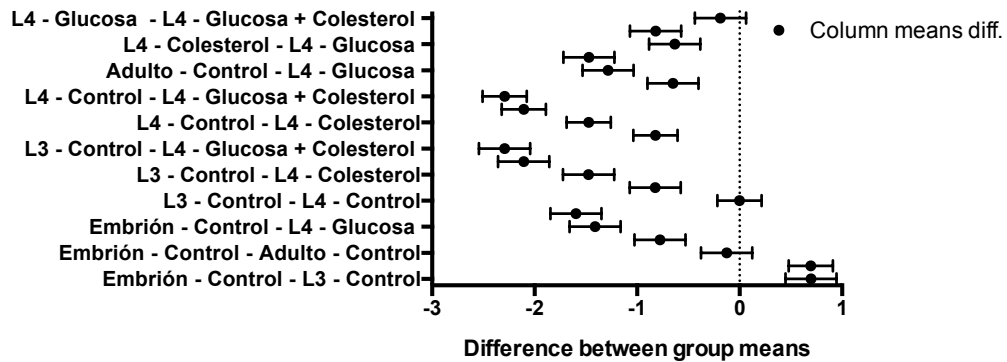
C) Gráfica Dieta-Etapas

Comparación de la media de cada condición contra la media de las demás mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.05$

Ordinary one-way ANOVA		A	B	C	D	E
Multiple comparisons		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6						
7	Embrión - Control vs. L3 - Control	0.697	0.448 to 0.946	Yes	****	< 0.0001
8	Embrión - Control vs. L4 - Control	0.695	0.479 to 0.911	Yes	****	< 0.0001
9	Embrión - Control vs. Adulto - Control	-0.127	-0.376 to 0.122	No	ns	0.6297
10	Embrión - Control vs. L4 - Colesterol	-0.777	-1.03 to -0.528	Yes	****	< 0.0001
11	Embrión - Control vs. L4 - Glucosa	-1.41	-1.66 to -1.16	Yes	****	< 0.0001
12	Embrión - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-1.60	-1.85 to -1.35	Yes	****	< 0.0001
13	L3 - Control vs. L4 - Control	-0.00167	-0.217 to 0.214	No	ns	> 0.9999
14	L3 - Control vs. Adulto - Control	-0.823	-1.07 to -0.574	Yes	****	< 0.0001
15	L3 - Control vs. L4 - Colesterol	-1.47	-1.72 to -1.22	Yes	****	< 0.0001
16	L3 - Control vs. L4 - Glucosa	-2.11	-2.36 to -1.86	Yes	****	< 0.0001
17	L3 - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-2.29	-2.54 to -2.04	Yes	****	< 0.0001
18	L4 - Control vs. Adulto - Control	-0.822	-1.04 to -0.606	Yes	****	< 0.0001
19	L4 - Control vs. L4 - Colesterol	-1.47	-1.69 to -1.26	Yes	****	< 0.0001
20	L4 - Control vs. L4 - Glucosa	-2.11	-2.32 to -1.89	Yes	****	< 0.0001
21	L4 - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-2.29	-2.51 to -2.08	Yes	****	< 0.0001
22	Adulto - Control vs. L4 - Colesterol	-0.650	-0.899 to -0.401	Yes	****	< 0.0001
23	Adulto - Control vs. L4 - Glucosa	-1.28	-1.53 to -1.03	Yes	****	< 0.0001
24	Adulto - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-1.47	-1.72 to -1.22	Yes	****	< 0.0001
25	L4 - Colesterol vs. L4 - Glucosa	-0.633	-0.882 to -0.384	Yes	****	< 0.0001
26	L4 - Colesterol vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-0.820	-1.07 to -0.571	Yes	****	< 0.0001
27	L4 - Glucosa vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-0.187	-0.436 to 0.0624	No	ns	0.2217

95% Confidence Intervals (Tukey)



miR-34-3p y *5p*

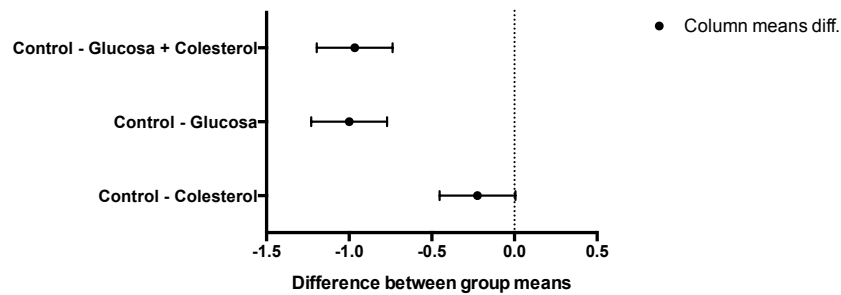
A) Densitometría de gusanos L4 en las diferentes dietas *miR-34-3p*.

Comparación de cada dieta contra la condición control mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.05$

Ordinary one-way ANOVA		A	B	C	D	E	F	G	H
Multiple comparisons		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.05							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	-0.223	-0.452 to 0.00574	No	ns	0.0556			
8	Control vs. Glucosa	-1.00	-1.23 to -0.771	Yes	****	< 0.0001			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-0.967	-1.20 to -0.738	Yes	****	< 0.0001			
10									
11									
12	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
13									
14	Control vs. Colesterol	1.00	1.22	-0.223	0.0795	3	3	2.81	8
15	Control vs. Glucosa	1.00	2.00	-1.00	0.0795	3	3	12.6	8
16	Control vs. Glucosa + Colesterol	1.00	1.97	-0.967	0.0795	3	3	12.2	8

95% Confidence Intervals (Dunnett)



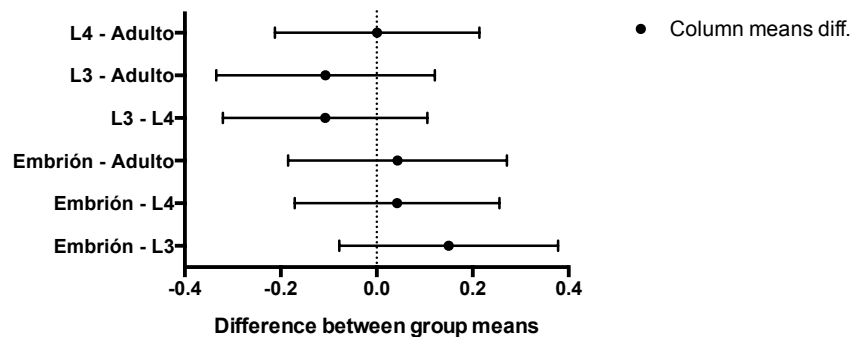
B) Densitometría *miR-34-3p* en las diferentes etapas larvarias.

Comparación de la media de cada dieta contra las de las demás mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.05$

Ordinary one-way ANOVA		A	B	C	D	E	F	G	H
Multiple comparisons		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	6							
3	Alpha	0.05							
4									
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Embrión vs. L3	0.150	-0.0779 to 0.378	No	ns	0.2383			
8	Embrión vs. L4	0.0425	-0.171 to 0.256	No	ns	0.9223			
9	Embrión vs. Adulto	0.0433	-0.185 to 0.271	No	ns	0.9315			
10	L3 vs. L4	-0.108	-0.321 to 0.106	No	ns	0.4378			
11	L3 vs. Adulto	-0.107	-0.335 to 0.121	No	ns	0.4964			
12	L4 vs. Adulto	0.000833	-0.212 to 0.214	No	ns	> 0.9999			
13									
14									
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
16									
17	Embrión vs. L3	0.580	0.430	0.150	0.0730	3	3	2.91	9
18	Embrión vs. L4	0.580	0.538	0.0425	0.0683	3	4	0.880	9
19	Embrión vs. Adulto	0.580	0.537	0.0433	0.0730	3	3	0.839	9
20	L3 vs. L4	0.430	0.538	-0.108	0.0683	3	4	2.23	9
21	L3 vs. Adulto	0.430	0.537	-0.107	0.0730	3	3	2.07	9
22	L4 vs. Adulto	0.538	0.537	0.000833	0.0683	4	3	0.0173	9

95% Confidence Intervals (Tukey)



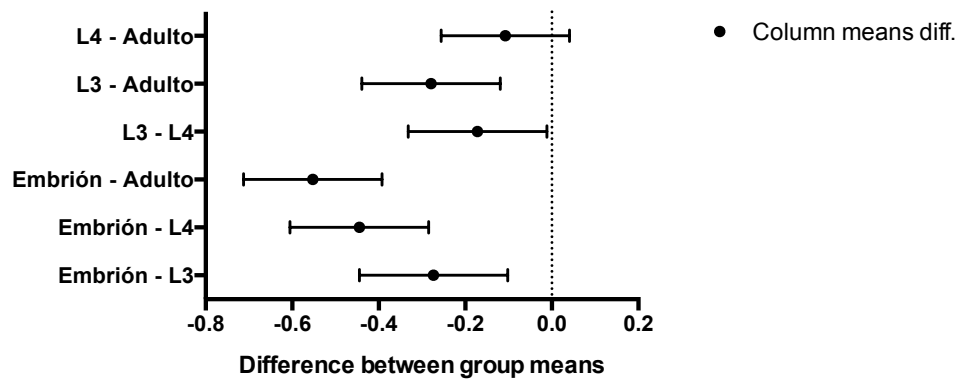
C) Densitometría *miR-34-5p* en las diferentes etapas larvarias.

Comparación de la media de cada dieta contra las de las demás mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2	Number of comparisons per family	6							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Embrión vs. L3	-0.273	-0.445 to -0.102	Yes	***	0.0003			
8	Embrión vs. L4	-0.445	-0.605 to -0.285	Yes	****	< 0.0001			
9	Embrión vs. Adulto	-0.553	-0.713 to -0.392	Yes	****	< 0.0001			
10	L3 vs. L4	-0.172	-0.332 to -0.0115	Yes	**	0.0064			
11	L3 vs. Adulto	-0.279	-0.439 to -0.119	Yes	***	0.0002			
12	L4 vs. Adulto	-0.108	-0.256 to 0.0408	No	ns	0.0589			
13									
14									
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
16									
17	Embrión vs. L3	0.020	0.293	-0.273	0.0420	3	3	9.21	10
18	Embrión vs. L4	0.020	0.465	-0.445	0.0393	3	4	16.0	10
19	Embrión vs. Adulto	0.020	0.573	-0.553	0.0393	3	4	19.9	10
20	L3 vs. L4	0.293	0.465	-0.172	0.0393	3	4	6.18	10
21	L3 vs. Adulto	0.293	0.573	-0.279	0.0393	3	4	10.1	10
22	L4 vs. Adulto	0.465	0.573	-0.108	0.0364	4	4	4.18	10

99% Confidence Intervals (Tukey)



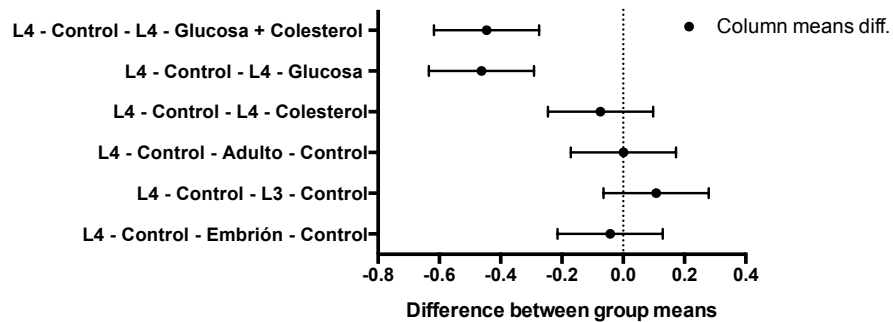
D) Gráfica Dieta-Etapas *miR-34-3p*

Comparación de la media de cada condición contra la media de las demás mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.05$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
1	Number of families	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2	Number of comparisons per family	6							
3	Alpha	0.05							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	L4 - Control vs. Embrión - Control	-0.0425	-0.214 to 0.129	No	ns	0.9476			
8	L4 - Control vs. L3 - Control	0.108	-0.0642 to 0.279	No	ns	0.3238			
9	L4 - Control vs. Adulto - Control	0.000833	-0.171 to 0.173	No	ns	> 0.9999			
10	L4 - Control vs. L4 - Colesterol	-0.0742	-0.246 to 0.0975	No	ns	0.6601			
11	L4 - Control vs. L4 - Glucosa	-0.463	-0.634 to -0.291	Yes	****	< 0.0001			
12	L4 - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-0.446	-0.618 to -0.274	Yes	****	< 0.0001			
13									
14									
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
16									
17	L4 - Control vs. Embrión - Control	0.538	0.580	-0.0425	0.0595	4	3	0.715	15
18	L4 - Control vs. L3 - Control	0.538	0.430	0.108	0.0595	4	3	1.81	15
19	L4 - Control vs. Adulto - Control	0.538	0.537	0.000833	0.0595	4	3	0.0140	15
20	L4 - Control vs. L4 - Colesterol	0.538	0.612	-0.0742	0.0595	4	3	1.25	15
21	L4 - Control vs. L4 - Glucosa	0.538	1.00	-0.463	0.0595	4	3	7.78	15
22	L4 - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	0.538	0.983	-0.446	0.0595	4	3	7.50	15

95% Confidence Intervals (Dunnet)



Perfiles mRNAs

gld-1

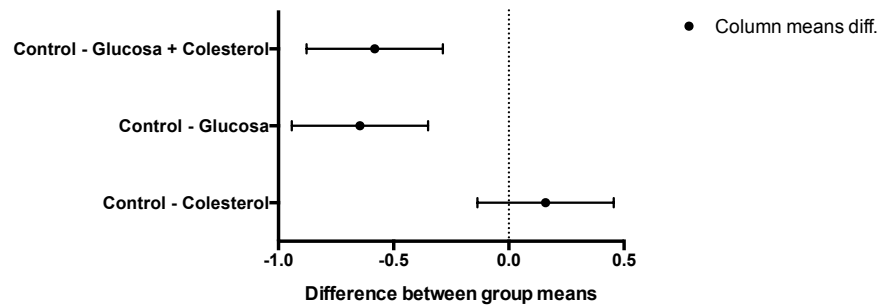
A) Densitometría de las diferentes dietas

Comparación de cada dieta contra la condición control mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	0.160	-0.136 to 0.455	No	ns	0.2006			
8	Control vs. Glucosa	-0.646	-0.942 to -0.350	Yes	****	< 0.0001			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-0.582	-0.878 to -0.286	Yes	****	< 0.0001			
10									
11									
12	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
13									
14	Control vs. Colesterol	1.00	0.840	0.160	0.0873	5	5	1.83	16
15	Control vs. Glucosa	1.00	1.65	-0.646	0.0873	5	5	7.40	16
16	Control vs. Glucosa + Colesterol	1.00	1.58	-0.582	0.0873	5	5	6.67	16

99% Confidence Intervals (Dunnet)



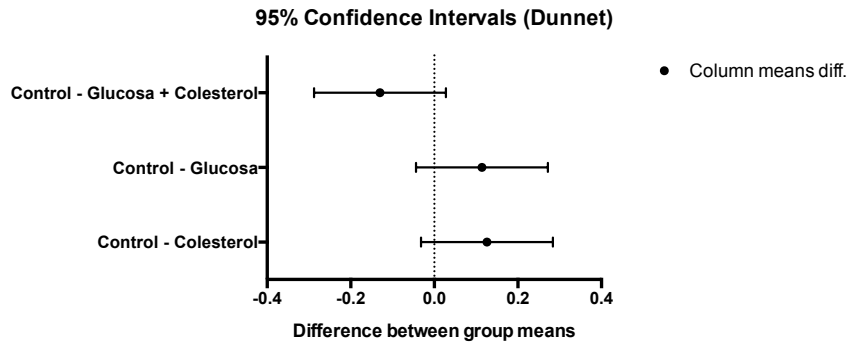
lin-23

A) Densitometría de las diferentes dietas

Comparación de cada dieta contra la condición control mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.05$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.05							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	0.126	-0.0316 to 0.284	No	ns	0.1320			
8	Control vs. Glucosa	0.114	-0.0436 to 0.272	No	ns	0.1857			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-0.130	-0.288 to 0.0276	No	ns	0.1174			
10									
11									
12	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
13									
14	Control vs. Colesterol	1.00	0.874	0.126	0.0608	5	5	2.07	16
15	Control vs. Glucosa	1.00	0.886	0.114	0.0608	5	5	1.88	16
16	Control vs. Glucosa + Colesterol	1.00	1.13	-0.130	0.0608	5	5	2.14	16

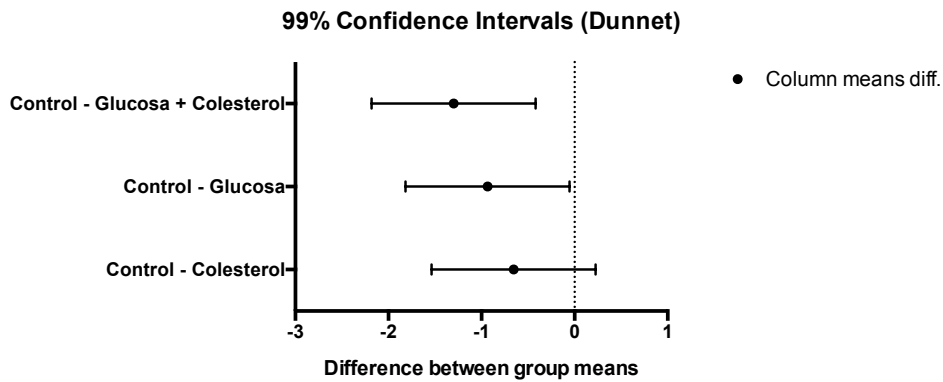


A) Densitometría de las diferentes dietas

Comparación de cada dieta contra la condición control mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	-0.655	-1.54 to 0.226	No	*	0.0281			
8	Control vs. Glucosa	-0.935	-1.82 to -0.0542	Yes	**	0.0080			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-1.30	-2.18 to -0.419	Yes	**	0.0023			
10									
11									
12	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
13									
14	Control vs. Colesterol	0.120	0.775	-0.655	0.152	2	2	4.32	4
15	Control vs. Glucosa	0.120	1.06	-0.935	0.152	2	2	6.17	4
16	Control vs. Glucosa + Colesterol	0.120	1.42	-1.30	0.152	2	2	8.58	4



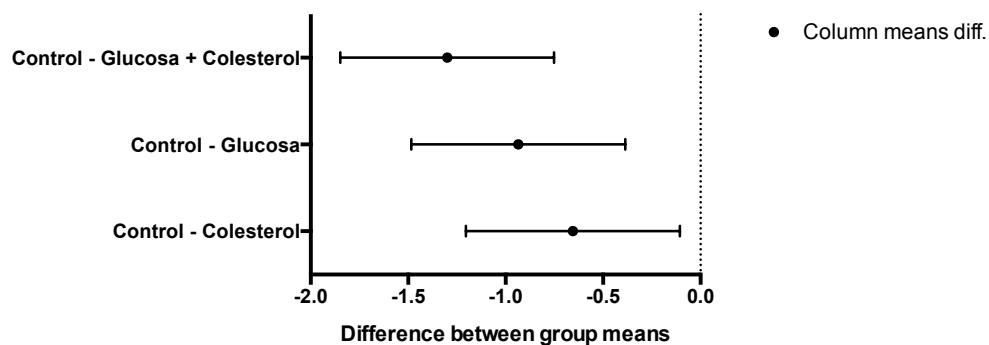
B) Densitometría de las diferentes dietas

Comparación de cada dieta contra la condición control mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.05$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.05							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Control vs. Colesterol	-0.655	-1.20 to -0.107	Yes	*	0.0281			
8	Control vs. Glucosa	-0.935	-1.48 to -0.387	Yes	**	0.0080			
9	Control vs. Glucosa + Colesterol	-1.30	-1.85 to -0.752	Yes	**	0.0023			
10									
11									
12	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
13									
14	Control vs. Colesterol	0.120	0.775	-0.655	0.152	2	2	4.32	4
15	Control vs. Glucosa	0.120	1.06	-0.935	0.152	2	2	6.17	4
16	Control vs. Glucosa + Colesterol	0.120	1.42	-1.30	0.152	2	2	8.58	4

95% Confidence Intervals (Dunnett)



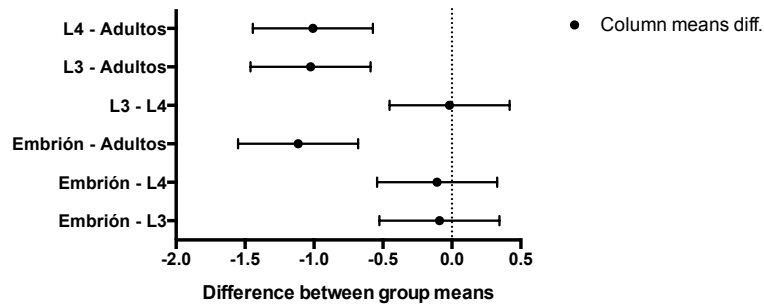
C) Densitometría de las diferentes etapas larvarias

Comparación de la media de cada etapa contra la media de las demás mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E	F	G	H
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Data Set-G	Data Set-H
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	6							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	Embrión vs. L3	-0.090	-0.526 to 0.346	No	ns	0.8021			
8	Embrión vs. L4	-0.107	-0.543 to 0.329	No	ns	0.7117			
9	Embrión vs. Adultos	-1.12	-1.55 to -0.679	Yes	****	< 0.0001			
10	L3 vs. L4	-0.017	-0.453 to 0.419	No	ns	0.9981			
11	L3 vs. Adultos	-1.03	-1.46 to -0.589	Yes	****	< 0.0001			
12	L4 vs. Adultos	-1.01	-1.44 to -0.572	Yes	****	< 0.0001			
13									
14									
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
16									
17	Embrión vs. L3	0.103	0.193	-0.090	0.0993	3	3	1.28	8
18	Embrión vs. L4	0.103	0.210	-0.107	0.0993	3	3	1.52	8
19	Embrión vs. Adultos	0.103	1.22	-1.12	0.0993	3	3	15.9	8
20	L3 vs. L4	0.193	0.210	-0.017	0.0993	3	3	0.242	8
21	L3 vs. Adultos	0.193	1.22	-1.03	0.0993	3	3	14.6	8
22	L4 vs. Adultos	0.210	1.22	-1.01	0.0993	3	3	14.4	8

99% Confidence Intervals (Tukey)



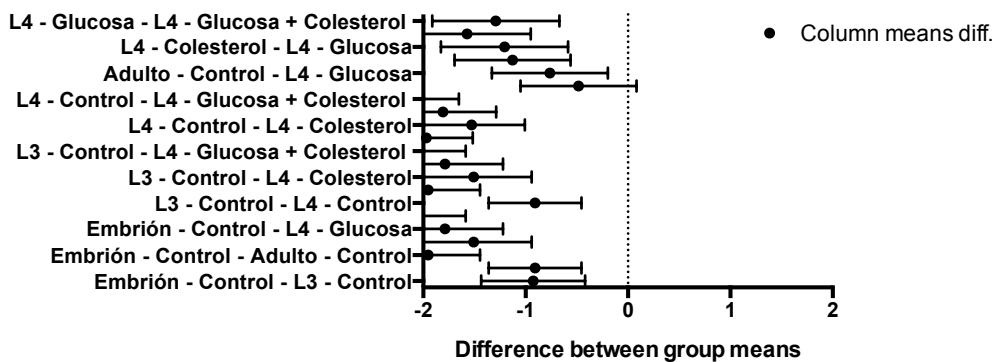
D) Gráfica dieta - etapas

Comparación de la media de cada etapa contra la media de las demás mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.01$

Ordinary one-way ANOVA		A	B	C	D	E
Multiple comparisons		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6						
7	Embrión - Control vs. L3 - Control	0.0	-0.507 to 0.507	No	ns	> 0.9999
8	Embrión - Control vs. L4 - Control	0.0191	-0.434 to 0.473	No	ns	> 0.9999
9	Embrión - Control vs. Adulto - Control	-1.03	-1.53 to -0.518	Yes	****	< 0.0001
10	Embrión - Control vs. L4 - Colesterol	-0.582	-1.15 to -0.0149	Yes	**	0.0082
11	Embrión - Control vs. L4 - Glucosa	-0.862	-1.43 to -0.295	Yes	***	0.0002
12	Embrión - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-1.23	-1.79 to -0.660	Yes	****	< 0.0001
13	L3 - Control vs. L4 - Control	0.0191	-0.434 to 0.473	No	ns	> 0.9999
14	L3 - Control vs. Adulto - Control	-1.03	-1.53 to -0.518	Yes	****	< 0.0001
15	L3 - Control vs. L4 - Colesterol	-0.582	-1.15 to -0.0149	Yes	**	0.0082
16	L3 - Control vs. L4 - Glucosa	-0.862	-1.43 to -0.295	Yes	***	0.0002
17	L3 - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-1.23	-1.79 to -0.660	Yes	****	< 0.0001
18	L4 - Control vs. Adulto - Control	-1.04	-1.50 to -0.591	Yes	****	< 0.0001
19	L4 - Control vs. L4 - Colesterol	-0.601	-1.12 to -0.0814	Yes	**	0.0031
20	L4 - Control vs. L4 - Glucosa	-0.881	-1.40 to -0.361	Yes	****	< 0.0001
21	L4 - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-1.25	-1.77 to -0.726	Yes	****	< 0.0001
22	Adulto - Control vs. L4 - Colesterol	0.443	-0.123 to 1.01	No	ns	0.0525
23	Adulto - Control vs. L4 - Glucosa	0.163	-0.403 to 0.730	No	ns	0.8572
24	Adulto - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-0.202	-0.768 to 0.365	No	ns	0.7086
25	L4 - Colesterol vs. L4 - Glucosa	-0.280	-0.901 to 0.341	No	ns	0.4715
26	L4 - Colesterol vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-0.645	-1.27 to -0.0242	Yes	**	0.0074
27	L4 - Glucosa vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-0.365	-0.986 to 0.256	No	ns	0.2106

99% Confidence Intervals (Tukey)



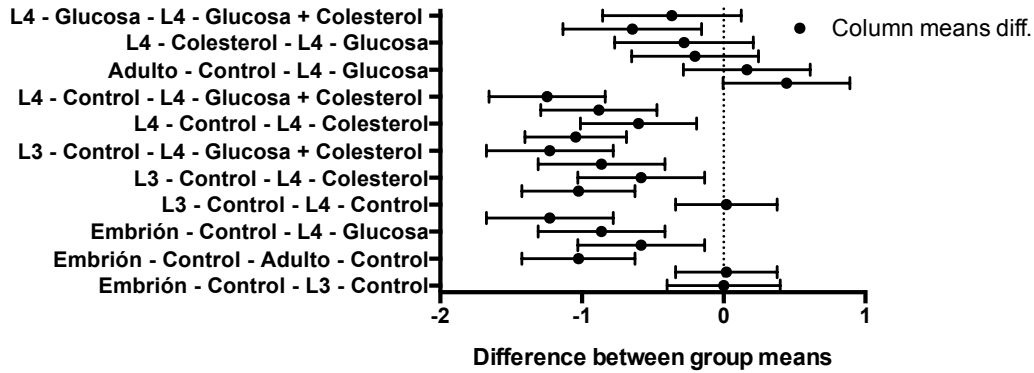
E) Gráfica dieta - etapas

Comparación de la media de cada etapa contra la media de las demás mediante la prueba ANOVA.

$p < 0.05$

Ordinary one-way ANOVA		A	B	C	D	E
Multiple comparisons		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6						
7	Embrión - Control vs. L3 - Control	0.0	-0.400 to 0.400	No	ns	> 0.9999
8	Embrión - Control vs. L4 - Control	0.0191	-0.339 to 0.377	No	ns	> 0.9999
9	Embrión - Control vs. Adulto - Control	-1.03	-1.42 to -0.625	Yes	****	< 0.0001
10	Embrión - Control vs. L4 - Colesterol	-0.582	-1.03 to -0.135	Yes	**	0.0082
11	Embrión - Control vs. L4 - Glucosa	-0.862	-1.31 to -0.415	Yes	***	0.0002
12	Embrión - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-1.23	-1.67 to -0.780	Yes	****	< 0.0001
13	L3 - Control vs. L4 - Control	0.0191	-0.339 to 0.377	No	ns	> 0.9999
14	L3 - Control vs. Adulto - Control	-1.03	-1.42 to -0.625	Yes	****	< 0.0001
15	L3 - Control vs. L4 - Colesterol	-0.582	-1.03 to -0.135	Yes	**	0.0082
16	L3 - Control vs. L4 - Glucosa	-0.862	-1.31 to -0.415	Yes	***	0.0002
17	L3 - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-1.23	-1.67 to -0.780	Yes	****	< 0.0001
18	L4 - Control vs. Adulto - Control	-1.04	-1.40 to -0.686	Yes	****	< 0.0001
19	L4 - Control vs. L4 - Colesterol	-0.601	-1.01 to -0.191	Yes	**	0.0031
20	L4 - Control vs. L4 - Glucosa	-0.881	-1.29 to -0.471	Yes	****	< 0.0001
21	L4 - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-1.25	-1.66 to -0.836	Yes	****	< 0.0001
22	Adulto - Control vs. L4 - Colesterol	0.443	-0.00371 to 0.890	No	ns	0.0525
23	Adulto - Control vs. L4 - Glucosa	0.163	-0.284 to 0.610	No	ns	0.8572
24	Adulto - Control vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-0.202	-0.649 to 0.245	No	ns	0.7086
25	L4 - Colesterol vs. L4 - Glucosa	-0.280	-0.770 to 0.210	No	ns	0.4715
26	L4 - Colesterol vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-0.645	-1.13 to -0.155	Yes	**	0.0074
27	L4 - Glucosa vs. L4 - Glucosa + Colesterol	-0.365	-0.855 to 0.125	No	ns	0.2106

95% Confidence Intervals (Tukey)



Bibliografia

- Aarnio, V., Lehtonen, M., Storvik, M., Callaway, J. C., Lakso, M., & Wong, G. (2011). *Caenorhabditis elegans* mutants predict regulation of fatty acids and endocannabinoids by the CYP-35A gene family. *Frontiers in Pharmacology*. doi:10.3389/fphar.2011.00012.
- Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R., Hall, D. H. (2012). Wormatlas. <http://www.wormatlas.org>. Retrieved September 7, 2012, from <http://wormatlas.org/>
- Alvarez-Saavedra, E., & Horvitz, H. R. (2010). Many families of *C. elegans* microRNAs are not essential for development or viability. *Current Biology: CB*, 20(4), 367–73. doi:10.1016/j.cub.2009.12.051
- Amaral, P. P., & Mattick, J. S. (2008). Noncoding RNA in development. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 19(7-8), 454–92. doi:10.1007/s00335-008-9136-7
- Ambros, V. (2000). Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(4), 428–33.
- Ambros, Victor. (2010). MicroRNAs: genetically sensitized worms reveal new secrets. *Current Biology*, 20 (14), R598–600. doi:10.1016/j.cub.2010.05.054
- Anderson, P., & Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences*, 33 (3), 141–50. doi:10.1016/j.tibs.2007.12.003
- Angulo, P. (2007). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition Reviews*, 65(6), 57–63. doi:10.1301/nr.2007.jun.S57
- Antebi, A., Yeh, W. H., Tait, D., Hedgecock, E. M., & Riddle, D. L. (2000). daf-12 encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*. *Genes & Development*, 14(12), 1512–27.
- Aravin, A. a, Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., et al. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Developmental Cell*, 5(2), 337–50.
- Artyukhin, A. B., & Avery, L. (2012). Artifacts in L1 starvation assay. *The Worm Breeder's Gazette*, 19 (2), 13–14.
- Ashrafi, K. (2007). Obesity and the regulation of fat metabolism. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1–20. doi:10.1895/wormbook.1.130.1
- Ashrafi, K., Chang, F. Y., Watts, J. L., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., & Ruvkun, G. (2003). Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*, 421(6920), 268–72. doi:10.1038/nature01279
- Auwerx, J., & Staels, B. (1998). Leptin. *Lancet*, 351(9104), 737–42. doi:10.1016/S0140-6736(97)06348-4
- Avery, L. (1993). The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 133(4), 897–917.
- Avery, L., & Horvitz, H. R. (1990). Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Experimental Zoology*, 253(3), 263–70. doi:10.1002/jez.1402530305
- Avery, Leon, & You, Y.-J. (2012). *C. elegans* feeding. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1–23. doi:10.1895/wormbook.1.150.1
- Bai, S., Nasser, M. W., Wang, B., Hsu, S.-H., Datta, J., Kutay, H., Yadav, A., et al. (2009). MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(46), 32015–27. doi:10.1074/jbc.M109.016774
- Barouk, N., Ravier, M. a, Loder, M. K., Hill, E. V, Bounacer, A., Scharfmann, R., Rutter, G. a, et al. (2007). MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19575–88. doi:10.1074/jbc.M611841200
- Barrière, A., & Félix, M.-A. (2005). Natural variation and population genetics of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1–19. doi:10.1895/wormbook.1.43.1
- Bartel, D. P., Lee, R., & Feinbaum, R. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function genomics: the miRNA genes, 116, 281–297.
- Bayliss High, O. B. (1981). The histochemical versatility of Sudan Black, *Acta histochemica*, 24, 247–55.
- Begasse, M. L., & Hyman, A. A. (2011). Cell cycle in development. (J. Z. Kubiak, Ed.) *Cell*, 53, 109–133. doi:10.1007/978-3-642-19065-0
- Beuck, C., Szymczynna, B. R., Kerkow, D. E., Carmel, A. B., Columbus, L., Stanfield, R. L., & Williamson, J. R. (2010). Structure of the GLD-1 homodimerization domain: insights into STAR protein-mediated translational regulation. *Structure*, 18 (3), 377–89. doi:10.1016/j.str.2009.12.016
- Biedermann, B., Hotz, H.-R., & Ciosk, R. (2010). The Quaking family of RNA-binding proteins: coordinators of the cell cycle and differentiation. *Cell Cycle*, 9 (10), 1929–33.
- Bollag, D. (1996). *Protein methods*. (Foreing Language Study, Ed.) (p. 415). Wiley-Liss.

- Bonilla, E., & Prella, a. (1987). Application of Nile blue and Nile red, two fluorescent probes, for detection of lipid droplets in human skeletal muscle. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *35* (5), 619–621. doi:10.1177/35.5.3559182
- Boron, W., & Boulpaep, E. L. (2005). *Medical Physiology* (2nd ed., p. 1344). Elsevier Saunders.
- Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P., & Pasquinelli, A. M. Y. E. (2004). Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts, 1586–1594. doi:10.1261/rna.7122604.the
- Branicky, R., Desjardins, D., Liu, J.-L., & Hekimi, S. (2010). Lipid transport and signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *239* (5), 1365–77. doi:10.1002/dvdy.22234
- Braun, J. E., Huntzinger, E., Fauser, M., & Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Molecular Cell*, *44*(1), 120–33. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.007
- Brenner, J. L., Jasiewicz, K. L., Fahley, A. F., Kemp, B. J., & Abbott, A. L. (2010). Loss of individual microRNAs causes mutant phenotypes in sensitized genetic backgrounds in *C. elegans*. *Current Biology*, *20*(14), 1321–5. doi:10.1016/j.cub.2010.05.062
- Britton, J. S., Lockwood, W. K., Li, L., Cohen, S. M., & Edgar, B. A. (2002). *Drosophila's* insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Developmental Cell*, *2*(2), 239–49.
- Brooks, K. K., Liang, B., & Watts, J. L. (2009). The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*. *PLoS one*, *4*(10), e7545. doi:10.1371/journal.pone.0007545
- Brown, T. (2005). BODIPY dyes. *ATDBio Ltd*. ATDBio Ltd.
- Burnell, A. M., Houthoofd, K., O'Hanlon, K., & Vanfleteren, J. R. (2005). Alternate metabolism during the dauer stage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, *40*(11), 850–6. doi:10.1016/j.exger.2005.09.006
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642–55. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035
- Castro, P. V., Khare, S., Young, B. D., & Clarke, S. G. (2012). *Caenorhabditis elegans* battling starvation stress: low levels of ethanol prolong lifespan in L1 larvae. *PLoS one*, *7*(1), e29984. doi:10.1371/journal.pone.0029984
- Cech, T. R. (2010). The RNA world in context. *RNA Worlds* (pp. 9–13). Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.1101/cshperspect.a006742
- Chalfie, M., Horvitz, H. R., & Sulston, J. E. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*, *24*(April), 59–69.
- Chen, T., Damaj, B. B., Herrera, C., Lasko, P., & Richard, S. (1997). Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(10), 5707–18.
- Chénard, C. A., & Richard, S. (2008). New implications for the QUAKING RNA binding protein in human disease. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(2), 233–42. doi:10.1002/jnr.21485
- Chiang, S. H., & MacDougald, O. a. (2003). Will fatty worms help cure human obesity?. *Trends in Genetics*, *19*(10), 523–5. doi:10.1016/j.tig.2003.08.002
- Choi, S. S. (2011). High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. *Nutrition Research and Practice*, *5*(3), 214–8. doi:10.4162/nrp.2011.5.3.214
- Conlon, I., & Raff, M. (1999). Size control in animal development review. *Cell*, *96*, 235–244.
- Cummings, D. E., & Schwartz, M. W. (2003). Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annual Review of Medicine*, *54*(5), 453–71. doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152403
- Cutter, A. D., Dey, A., & Murray, R. L. (2009). Evolution of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Molecular Biology and Evolution*, *26*(6), 1199–234. doi:10.1093/molbev/msp048
- De Lencastre, A., Pincus, Z., Zhou, K., Kato, M., Lee, S. S., & Slack, F. J. (2010). MicroRNAs both promote and antagonize longevity in *C. elegans*. *Current Biology*, *20*(24), 2159–68. doi:10.1016/j.cub.2010.11.015
- De Santa, F., Barozzi, I., Mietton, F., Ghisletti, S., Polletti, S., Tusi, B. K., Muller, H., et al. (2010). A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS biology*, *8*(5), e1000384. doi:10.1371/journal.pbio.1000384
- Desvergne, B., Michalik, L., & Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiology Reviews*, *86*, 465–514. doi:10.1152/physrev.00025.2005.
- Driscoll M, K. J. (1997). *Mechanotransduction, C. elegans* II. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Elle, Ida C, Olsen, L. C. B., Mosbech, M., Rødkær, S. V., Pultz, D., Boelt S. G. & Fredens, J., (2008). *C. elegans*: a model for understanding lipid accumulation. *Lipid Insights*, *1*, 13–21.

- Elle, Ida Coordt, Olsen, L. C. B., Pultz, D., Rødkaer, S. V., & Faergeman, N. J. (2010). Something worth dyeing for: molecular tools for the dissection of lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Letters*, *584*(11), 2183–93. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.046
- Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V, Sun, Y., et al. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(50), 52361–5. doi:10.1074/jbc.C400438200
- Esguerra, J. L. S., Bolmeson, C., Cilio, C. M., & Eliasson, L. (2011). Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets of non-obese type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rat. *PLoS one*, *6*(4), e18613. doi:10.1371/journal.pone.0018613
- Eulalio, A. N. A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J. A. N., Fauser, M., & Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA (New York, N.Y.)*, *15*, 21–32. doi:10.1261/rna.1399509.3
- Euling, S., & Ambros, V. (1996). Reversal of cell fate determination in *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Development*, *122*(8), 2507–15.
- Fire, A., et al. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(February), 806–811.
- Flynt, A. S., Thatcher, E. J., Burkewitz, K., Li, N., Liu, Y., & Patton, J. G. (2009). miR-8 microRNAs regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos. *The Journal of Cell Biology*, *185*(1), 115–27. doi:10.1083/jcb.200807026
- Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Lièvre, X., Berthelie-Lubrano, C., et al. (1999). ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(5), 3760–8.
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., et al. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, *39*(8), 1033–7. doi:10.1038/ng2079
- Frank, J. J., Tas, J., & Frederiks, W. M. (1981). A model study of the Sudan Black B staining of lipids. *Acta Histochemica*, *24*, 257–8.
- Fu, T., Choi, S.-E., Kim, D.-H., Seok, S., Suino-Powell, K. M., Xu, H. E., & Kemper, J. K. (2012). Aberrantly elevated microRNA-34a in obesity attenuates hepatic responses to FGF19 by targeting a membrane coreceptor β -Klotho. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(40), 16137–42. doi:10.1073/pnas.1205951109
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., & Shinohara, Y. (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochemistry and Cell Biology*, *130*(2), 263–79. doi:10.1007/s00418-008-0449-0
- Gaudet, D., Signorovitch, J., Swallow, E., Fan, L., Tremblay, K., Brisson, D., Meyers, C., et al. (2013). Medical resource use and costs associated with chylomicronemia. *Journal of Medical Economics*, *16*(5), 657–66. doi:10.3111/13696998.2013.779277
- Gerin, I., Bommer, G. T., McCoin, C. S., Sousa, K. M., Krishnan, V., & MacDougald, O. a. (2010). Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, *299*(2), E198–206. doi:10.1152/ajpendo.00179.2010
- Gerin, I., Clerbaux, L.-A., Haumont, O., Lanthier, N., Das, A. K., Burant, C. F., Leclercq, I. a, et al. (2010). Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(44), 33652–61. doi:10.1074/jbc.M110.152090
- Gerstein, M. B., Lu, Z. J., Van Nostrand, E. L., Cheng, C., Arshinoff, B. I., Liu, T., Yip, K. Y., et al. (2010). Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. *Science*, *330*(6012), 1775–87. doi:10.1126/science.1196914
- Gocz, P. M., & Freeman, D. a. (1994). Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 Leydig tumor cells. *Cytometry*, *17*(2), 151–8. doi:10.1002/cyto.990170207
- Golden, J. W., & Riddle, D. L. (1984). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental Biology*, *102*(2), 368–78.
- Gomez, T. A., Banfield, K. L., Trogler, D. M., & Clarke, S. G. (2007). The L-isoaspartyl-O-methyltransferase in *Caenorhabditis elegans* larval longevity and autophagy. *Developmental Biology*, *303* (2), 493–500.
- Grad, Y., Aach, J., Hayes, G. D., Reinhart, B. J., Church, G. M., Ruvkun, G., & Kim, J. (2003). Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs. *Molecular Cell*, *11*(5), 1253–63.
- Grant, B., & Hirsh, D. (1999). Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(12), 4311–4326.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985a). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, *100*(3), 965–73.

- Greiss, S., Schumacher, B., Grandien, K., Rothblatt, J., & Gartner, A. (2008). Transcriptional profiling in *C. elegans* suggests DNA damage dependent apoptosis as an ancient function of the p53 family. *BMC genomics*, *9*, 334. doi:10.1186/1471-2164-9-334
- Grewal, S. (2010). RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Current Opinions on Genetic Development*, *20*(2), 134–141. doi:10.1016/j.gde.2010.02.003.RNAi-dependent
- Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*, *27*(1), 91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., et al. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans*. *Developmental Timing*, *106*, 23–34.
- Guenther, B., Markku, L. (2004). Lipids and glucose in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *27*(9), 2253–2259.
- Han, J., Kim, D., & Morris, K. V. (2007). Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(30), 12422–7. doi:10.1073/pnas.0701635104
- He, A., Zhu, L., Gupta, N., Chang, Y., & Fang, F. (2007). Overexpression of microribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology* *21*(11), 2785–94. doi:10.1210/me.2007-0167
- Hebeisen, M., & Roy, R. (2008). CDC-25.1 stability is regulated by distinct domains to restrict cell division during embryogenesis in *C. elegans*. *Development*, *135*(7), 1259–69. doi:10.1242/dev.014969
- Heilbronn, L. K., De Jonge, L., Frisard, M. I., DeLany, J. P., Larson-Meyer, D. E., Rood, J., Nguyen, T., et al. (2006). Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, *295*(13), 1539–48. doi:10.1001/jama.295.13.1539
- Hellerer, T., Axäng, C., Brackmann, C., Hillertz, P., Pilon, M., & Enejder, A. (2007). Monitoring of lipid storage in *Caenorhabditis elegans* using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(37), 14658–63. doi:10.1073/pnas.0703594104
- Hillgartner, F. B., Salati, L. M., & Goodridge, A. G. (1995). Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiological Reviews*, *75*(1), 47–76.
- Hirsch, D., Stahl, A., & Lodish, H. F. (1998). A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(15), 8625–9.
- Hofacker, I. L. (2004). RNA secondary structure analysis using the Vienna RNA package. *Current Protocols in Bioinformatics*. Chapter 12, Unit 12.2. doi:10.1002/0471250953.bi1202s04
- Hope, I. I. A. (1999). *C. elegans: A practical approach* (p. 304). Oxford University Press, USA.
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K., & Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(47), 16961–6. doi:10.1073/pnas.0506482102
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews. Genetics*, *12*(2), 99–110. doi:10.1038/nrg2936
- Iain Johnson, M. T. Z. S. (2011). BODIPY dye series. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* (11th ed., p. 14). Invitrogen.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(2), 113–27. doi:10.1038/nrm2838
- Jan, E., Motzny, C. K., Graves, L. E., & Goodwin, E. B. (1999). The STAR protein, GLD-1, is a translational regulator of sexual identity in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal*, *18*(1), 258–69. doi:10.1093/emboj/18.1.258
- Jequier, E., & Tappy, L. (1999). Regulation of body weight in humans. *Physiology Reviews*, *79*(2), 451–480.
- Kaikkonen, M. U., Lam, M. T. Y., & Glass, C. K. (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Research*, *90*(3), 430–40. doi:10.1093/cvr/cvr097
- Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Dutttagupta, R., Willingham, A. T., Stadler, P. F., et al. (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*, *316*(5830), 1484–8. doi:10.1126/science.1138341
- Karbiener, M., Fischer, C., Nowitsch, S., Opriessnig, P., Papak, C., Ailhaud, G., Dani, C., et al. (2009). microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *390*(2), 247–51. doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.098

- Kato, M., Paranjape, T., Ullrich, R., Nallur, S., Gillespie, E., Keane, K., Weidhaas, J. B., et al. (2009). The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response *in vivo* in *C. elegans* and *in vitro* in human breast cancer cells. *Oncogene*, *28*(25), 2419–2424. doi:10.1038/onc.2009.106.
- Kato, Masaomi, Chen, X., Inukai, S., Zhao, H., & Slack, F. J. (2011). Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in *C. elegans*. *RNA*, *17* (10), 1804–20. doi:10.1261/rna.2714411
- Kato, Masaomi, De Lencastre, A., Pincus, Z., & Slack, F. J. (2009). Dynamic expression of small non-coding RNAs, including novel microRNAs and piRNAs/21U-RNAs, during *Caenorhabditis elegans* development. *Genome Biology*, *10*(5), R54. doi:10.1186/gb-2009-10-5-r54
- Katz, J., Wals, P. a, & Lee, W. N. (1991). Determination of pathways of glycogen synthesis and the dilution of the three-carbon pool with [U-13C]glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(6), 2103–7.
- Kenyon, C. (1988). The nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, *240*(4858), 1448–53.
- Kim, H. M., Do, C.-H., & Lee, D. H. (2010). Characterization of taurine as anti-obesity agent in *C. elegans*. *Journal of Biomedical Science*, S33. doi:10.1186/1423-0127-17-S1-S33
- Kimble, J. . H. D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, *70*, 396–417.
- Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., & Ruvkun, G. (1997). daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *277*(5328), 942–6.
- Kinkel, A. D., Fernyhough, M. E., Helterline, D. L., Vierck, J. L., Oberg, K. S., Vance, T. J., Hausman, G. J., et al. (2004). Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology*, *46*(1), 49–56. doi:10.1007/s10616-004-3903-4
- Kipreos, E. T. (2005). *C. elegans* cell cycles: invariance and stem cell divisions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *6*(10), 766–76. doi:10.1038/nrm1738
- Klapper, M., Ehmke, M., Palgunow, D., Böhme, M., Matthäus, C., Bergner, G., Dietzek, B., et al. (2011). Fluorescence-based fixative and vital staining of lipid droplets in *Caenorhabditis elegans* reveal fat stores using microscopy and flow cytometry approaches. *Journal of Lipid Research*, *52* (6), 1281–93. doi:10.1194/jlr.D011940
- Klempan, T. A., Ernst, C., Deleva, V., Labonte, B., & Turecki, G. (2009). Characterization of QKI gene expression, genetics, and epigenetics in suicide victims with major depressive disorder. *Biological Psychiatry*, *66*(9), 824–31. doi:10.1016/j.biopsych.2009.05.010
- Koretsky, A. P. (1995). Insights into cellular energy metabolism from transgenic mice. *Physiology Reviews*, *75*(4), 667–688.
- Kramer, M. F. (2011). STEM-LOOP RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols of Molecular Biology*, *5*(10), 1–22. doi:10.1002/0471142727.mb1510s95.STEM-LOOP
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(9), 597–610. doi:10.1038/nrg2843
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs *in vivo* with “antagomirs”. *Nature*, *438*(7068), 685–9. doi:10.1038/nature04303
- Kültz, D. (2003). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *Journal of Experimental Biology*, *206*(18), 3119–3124. doi:10.1242/jeb.00549
- Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, *67*, 225–57. doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635
- Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., et al. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes, *1*, 908–917. doi:10.1101/gad.1640708.lineage
- Lakowski, B., & Hekimi, S. (1998). The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(22), 13091–6.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5543), 858–62. doi:10.1126/science.1065062
- Le, T. T., Duren, H. M., Slipchenko, M. N., Hu, C.-D., & Cheng, J.-X. (2010). Label-free quantitative analysis of lipid metabolism in living *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Lipid Research*, *51*(3), 672–7. doi:10.1194/jlr.D000638
- Lee, C. (1999). Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*, *285*(5432), 1390–1393. doi:10.1126/science.285.5432.1390
- Lee, E. K., Lee, M. J., Abdelmohsen, K., Kim, W., Kim, M. M., Srikantan, S. & Martindale, J. L. (2011). miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(4), 626–38. doi:10.1128/MCB.00894-10

- Lee, E.-Y., Shim, Y.-H., Chitwood, D. J., Hwang, S. B., Lee, J., & Paik, Y.-K. (2005). Cholesterol-producing transgenic *Caenorhabditis elegans* lives longer due to newly acquired enhanced stress resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *328* (4), 929–36. doi:10.1016/j.bbrc.2005.01.050
- Lee, I., Hendrix, A., Kim, J., Yoshimoto, J., & You, Y.-J. (2012). Metabolic rate regulates L1 longevity in *C. elegans*. *PLoS One*, *7*(9), e44720. doi:10.1371/journal.pone.0044720
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843–54.
- Lee, S., Murphy, C., & Kenyon, C. (2009). Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metabolism*, *10*(5), 379–91. doi:10.1016/j.cmet.2009.10.003
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, *21*(17), 4663–70.
- Leung, A. K. L., Calabrese, J. M., & Sharp, P. A. (2006). Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(48), 18125–30. doi:10.1073/pnas.0608845103
- Leung, A. K. L., & Sharp, P. a. (2007). microRNAs: a safeguard against turmoil?, *Cell*, *130*(4), 581–5. doi:10.1016/j.cell.2007.08.010
- Leung, A. K. L., & Sharp, P. a. (2010). MicroRNA functions in stress responses. *Molecular Cell*, *40*(2), 205–15. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.027
- Lewis, A. P., & Jopling, C. L. (2010). Regulation and biological function of the liver-specific miR-122. *Biochemical Society Transactions*, *38*(6), 1553–7. doi:10.1042/BST0381553
- Li, W.-Q., Chen, C., Xu, M.-D., Guo, J., Li, Y.-M., Xia, Q.-M., Liu, H.-M., et al. (2011). The rno-miR-34 family is upregulated and targets ACSL1 in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *The FEBS Journal*, *278*(9), 1522–32. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08075.x
- Li, X., Cassidy, J., Reinke, C., Fischboeck, S., & Carthew, R. A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development, *Faculty Publications* (2009).
- Lim, L. P., Lau, N. C., Weinstein, E. G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M. W., Burge, C. B., et al. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development*, *17*(8), 991–1008. doi:10.1101/gad.1074403
- Liu, M., Liu, P., Zhang, L., Cai, Q., Gao, G., Zhang, W., Zhu, Z., et al. (2011). mir-35 is involved in intestine cell G1/S transition and germ cell proliferation in *C. elegans*. *Cell Research*, *21*(11), 1605–18. doi:10.1038/cr.2011.102
- Lovis, P., Roggli, E., Laybutt, D. R., Gattesco, S., Yang, J., Widmann, C., Abderrahmani, A., et al. (2008). Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *DIABETES*, *57*, (2728–2736. doi:10.2337/db07-1252.P.L.
- Lu, H., Buchan, R. J., & Cook, S. a. (2010). MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovascular Research*, *86*(3), 410–20. doi:10.1093/cvr/cvq010
- Mak, H. Y. (2012). Lipid droplets as fat storage organelles in *Caenorhabditis elegans*: thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. *Journal of Lipid Research*, *53* (1), 28–33. doi:10.1194/jlr.R021006
- Mak, H. Y., Nelson, L. S., Basson, M., Johnson, C. D., & Ruvkun, G. (2006). Polygenic control of *Caenorhabditis elegans* fat storage. *Nature Genetics*, *38*(3), 363–8. doi:10.1038/ng1739
- Malik, V. S., Schulze, M. B., & Hu, F. B. (2006). Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(2), 274–88.
- Martinelli, R., Nardelli, C., Pilone, V., Buonomo, T., Liguori, R., Castanò, I., Buono, P., et al. (2010). miR-519d overexpression is associated with human obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *18*(11), 2170–6. doi:10.1038/oby.2009.474
- Martinez, N. J., Ow, M. C., Reece-hoyes, J. S., Barrasa, M. I., Ambros, V. R., & Walhout, A. J. M. (2008). Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity. *Genome Research*, *18*, 2005–2015. doi:10.1101/gr.083055.108.4
- Massirer, K. B., Perez, S. G., Mondol, V., & Pasquinelli, A. E. (2012). The miR-35-41 family of microRNAs regulates RNAi sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, *8* (3), e1002536. doi:10.1371/journal.pgen.1002536
- Matter, N., Herrlich, P., & König, H. (2002). Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature*, *420*(6916), 691–5. doi:10.1038/nature01153
- McGhee, J. D. (2007). The *C. elegans* intestine. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1–36. doi:10.1895/wormbook.1.133.1

- McGhee, J. D., Sleumer, M. C., Bilenky, M., Wong, K., McKay, S. J., Goszczynski, B., Tian, H., et al. (2007). The ELT-2 GATA-factor and the global regulation of transcription in the *C. elegans* intestine. *Developmental Biology*, *302*(2), 627–45. doi:10.1016/j.ydbio.2006.10.024
- McKay, R. M., McKay, J. P., Avery, L., & Graff, J. M. (2003). *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Developmental Cell*, *4*(1), 131–42.
- Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Abbott, A. L., Lau, N. C., Hellman, A. B., McGonagle, S. M., Bartel, D. P., et al. (2007). Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genetics*, *3*(12), e215. doi:10.1371/journal.pgen.0030215
- Mobbs, C. H. P. R. (2010). *Body composition and aging* (p. 197). Karger Publishers.
- Moerman DG, F. A. (1997). Muscle: structure, function, and development. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Morgan, D. E., Crittenden, S. L., & Kimble, J. (2010). The *C. elegans* adult male germline: stem cells and sexual dimorphism. *Developmental Biology*, *346*(2), 204–14. doi:10.1016/j.ydbio.2010.07.022
- Morris, K. V., Santoso, S., Turner, A.-M., Pastori, C., & Hawkins, P. G. (2008). Bidirectional transcription directs both transcriptional gene activation and suppression in human cells. *PLoS Genetics*, *4* (11), e1000258. doi:10.1371/journal.pgen.1000258
- Mortensen, R. D., Serra, M., Steitz, J. a, & Vasudevan, S. (2011). Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(20), 8281–6. doi:10.1073/pnas.1105401108
- Mukhopadhyay, A., Deplancke, B., Walhout, A. J. M., & Tissenbaum, H. A. (2005). *C. elegans tubby* regulates life span and fat storage by two independent mechanisms. *Cell Metabolism*, *2*(1), 35–42. doi:10.1016/j.cmet.2005.06.004
- Mullaney, B. C., & Ashrafi, K. (2009). *C. elegans* fat storage and metabolic regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *1791*(6), 474–478. doi:10.1016/j.bbali.2008.12.013.C
- Mullaney, B. C., Blind, R. D., Lemieux, G. a, Perez, C. L., Elle, I. C., Faergeman, N. J. & Van Gilst, M. R. (2010). Regulation of *C. elegans* fat uptake and storage by acyl-CoA synthase-3 is dependent on NR5A family nuclear hormone receptor nhr-25. *Cell Metabolism*, *12*(4), 398–410. doi:10.1016/j.cmet.2010.08.013
- Muñoz, M. J., & Riddle, D. L. (2003). Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity. *Genetics*, *163* (1), 171–80.
- Neilson, J. R., & Sharp, P. a. (2008). Small RNA regulators of gene expression. *Cell*, *134*(6), 899–902. doi:10.1016/j.cell.2008.09.006
- Nomura, T., Horikawa, M., Shimamura, S., Hashimoto, T., & Sakamoto, K. (2010). Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* is mediated by SREBP homolog SBP-1. *Genes & Nutrition*, *5* (1), 17–27. doi:10.1007/s12263-009-0157-y
- Noveroske, J. K., Lai, L., Gaussin, V., Northrop, J. L., Nakamura, H., Hirschi, K. K., & Justice, M. J. (2002). Quaking is essential for blood vessel development. *Genesis*, *32* (3), 218–30.
- O'Rourke, E. J., Soukas, A. a, Carr, C. E., & Ruvkun, G. (2009). *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. *Cell Metabolism*, *10* (5), 430–5. doi:10.1016/j.cmet.2009.10.002
- OMS | Diabetes. (2012). *World Health Organization Journal*, *312* (Nota descriptiva).
- OMS | Obesidad y sobrepeso. (2012). *World Health Organization Journal*, *311* (Nota descriptiva).
- Onken, B., & Driscoll, M. (2010). Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One*, *5* (1), e8758. doi:10.1371/journal.pone.0008758
- Ørom, U. A., Derrien, T., Beringer, M., Gumireddy, K., Gardini, A., Bussotti, G. & Lai, F. (2010). Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell*, *143*(1), 46–58. doi:10.1016/j.cell.2010.09.001
- Ørom, U. A., Nielsen, F. C., & Lund, A. H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular Cell*, *30* (4), 460–71. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.001
- Parker, S., Walker, D. S., Ly, S., & Baylis, H. A. (2009). Caveolin-2 is required for apical lipid trafficking and suppresses basolateral recycling defects in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology Of the Cell*, *20*, 1763–1771. doi:10.1091/mbc.E08
- Partridge, L. (2011). Some highlights of research on aging with invertebrates, 2010. *Aging Cell*, *10*(1), 5–9. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00649.x
- Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(4), 271–82. doi:10.1038/nrg3162

- Petersen, C. P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., & Sharp, P. a. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell*, *21*(4), 533–42. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.031
- Pfüller, U., Franz, H., & Preiss, A. (1977). Sudan Black B: chemical structure and histochemistry of the blue main components. *Histochemistry*, *54*(3), 237–50.
- Pillai, R. S. (2005). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?. *RNA*, *11* (12), 1753–61. doi:10.1261/rna.2248605
- Pino, E. C., Webster, C. M., Carr, C. E., & Soukas, A. A. (2013). Biochemical and high throughput microscopic assessment of fat mass in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (73), e50180. doi:10.3791/50180
- Plaisance, V., Abderrahmani, A., Perret-Menoud, V., Jacquemin, P., Lemaigre, F., & Regazzi, R. (2006). MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(37), 26932–42. doi:10.1074/jbc.M601225200
- Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, *136*(4), 629–41. doi:10.1016/j.cell.2009.02.006
- Porporato, P. E., Dhup, S., Dadhich, R. K., Copetti, T., & Sonveaux, P. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology*, *49*. doi:10.3389/fphar.2011.00049
- Poy, M. N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., Zavolan, M., et al. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(14), 5813–8. doi:10.1073/pnas.0810550106
- Pullen, T. J., Da Silva Xavier, G., Kelsey, G., & Rutter, G. a. (2011). miR-29a and miR-29b contribute to pancreatic beta-cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (Mct1). *Molecular and Cellular Biology*, *31*(15), 3182–94. doi:10.1128/MCB.01433-10
- Quiling Wu (2010). Expression of the Argonaute protein Piwl2 and piRNAs in adult mouse mesenchymal stem cells. *Biophysical Reviews*, *396* (4), 915–920. doi:10.1016/j.bbr.2010.05.022.Expression
- Raghow, R., Yellaturu, C., Deng, X., Park, E. a, & Elam, M. B. (2008). SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *19* (2), 65–73. doi:10.1016/j.tem.2007.10.009
- Rayner, K. J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M. L., Tamehiro, N., Fisher, E. a, et al. (2010). MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*, *328*(5985), 1570–3. doi:10.1126/science.1189862
- Rehwinkel, J. A. N., Behm-ansmant, I., Gatfield, D., & Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1: DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, *11*, 1640–1647. doi:10.1261/rna.2191905.van
- Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, et al. (1997). The biological model. *C. elegans II. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.* (p. Section I, The Biological Model.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Robenek, H., Hofnagel, O., Buers, I., Robenek, M. J., Troyer, D., & Severs, N. J. (2006). Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *Journal of Cell Science*, *119* (Pt 20), 4215–24. doi:10.1242/jcs.03191
- Rottiers, V., & Näär, A. M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *13*(4), 239–50. doi:10.1038/nrm3313
- Rourke, E. J. O., Soukas, A. A., Carr, C. E., & Ruvkun, G. (2009). Supplemental data *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. *Cell Metabolism*, *10*.
- Ryder, S. P., & Williamson, J. R. (2004). Specificity of the STAR / GSG domain protein Qk1 : Implications for the regulation of myelination. *RNA*, *10*, 1449–1458. doi:10.1261/rna.7780504.cross
- Saccomanno, L., Loushin, C., Jan, E., Punkay, E., Artzt, K., & Goodwin, E. B. (1999). The STAR protein QKI-6 is a translational repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(22), 12605–10.
- Salway, J. (2004). *Metabolism at a glance. Wiley* (3rd ed.). Wiley.
- Satouchi, K., Hirano, K., Sakaguchi, M., Takehara, H., & Matsuura, F. (1993). Phospholipids from the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lipids*, *28*(9), 837–840. doi:10.1007/BF02536239
- Scheckel, C., Gaidatzis, D., Wright, J. E., & Ciosk, R. (2012). Genome-wide analysis of GLD-1-mediated mRNA regulation suggests a role in mRNA storage. *PLoS Genetics*, *8*(5), e1002742. doi:10.1371/journal.pgen.1002742
- Schlotterer, A., Kukudov, G., Bozorgmehr, F., Hutter, H., Du, X., Oikonomou, D., Ibrahim, Y., et al. (2009). *C. elegans* as a model for the study of high glucose-mediated life span reduction. *DIABETES*, *58*, 2450–2456. doi:10.2337/db09-0567.A.S.

- Schmitter, D., Filkowski, J., Sewer, A., Pillai, R. S., Oakeley, E. J., Zavolan, M., Svoboda, P., et al. (2006). Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Research*, 34(17), 4801–15. doi:10.1093/nar/gkl646
- Schroeder, L. K., Kremer, S., Kramer, M. J., Currie, E., Kwan, E., Watts, J. L., Lawrenson, A. L., et al. (2007). Function of the *Caenorhabditis elegans* ABC transporter PGP-2 in the biogenesis of a lysosome-related fat storage organelle. *Molecular Biology of the Cell*, 18(3), 995–1008. doi:10.1091/mbc.E06-08-0685
- Schulz, T. J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., & Ristow, M. (2007). Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metabolism*, 6(4), 280–93. doi:10.1016/j.cmet.2007.08.011
- Schwarz, E. M. (2005). Genomic classification of protein-coding gene families. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1–23. doi:10.1895/wormbook.1.29.1
- Sebastiani, G., Vendrame, F., & Dotta, F. (2011). MicroRNAs as new tools for exploring type 1 diabetes: relevance for immunomodulation and transplantation therapy. *TPS*, 43 (1), 330–332. doi:10.1016/j.transproceed.2010.09.104
- Seidel, H. S., & Kimble, J. (2011). The oogenic germline starvation response in *C. elegans*. *PloS one*, 6(12), e28074. doi:10.1371/journal.pone.0028074
- Shaw, W. R., Armisen, J., Lehrbach, N. J., & Miska, E. A. (2010). The conserved miR-51 microRNA family is redundantly required for embryonic development and pharynx attachment in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 185(3), 897–905. doi:10.1534/genetics.110.117515
- Simon, D. J., Madison, J. M., Conery, A. L., Thompson, K. L., Soskis, M., Ruvkun, G. B., Kaplan, J. M., et al. (2008). The microRNA miR-1 regulates a MEF-2 dependent retrograde signal at neuromuscular junctions. *Cell*, 133(5), 903–915. doi:10.1016/j.cell.2008.04.035
- So, S., Miyahara, K., & Ohshima, Y. (2011). Control of body size in *C. elegans* dependent on food and insulin/IGF-1 signal. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 16 (6), 639–51. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01514.x
- Soukas, A. A., Kane, E. A., Carr, C. E., Melo, J. A., & Ruvkun, G. (2009). Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans*, 496–511. doi:10.1101/gad.1775409.2004
- Spieth, J., Nettleton, M., Zucker-Aprison, E., Lea, K., & Blumenthal, T. (1991). Vitellogenin motifs conserved in nematodes and vertebrates. *Journal of Molecular Evolution*, 32 (5), 429–38.
- Stern, D. (2003). Body-size control: how an insect knows it has grown enough. *Current Biology*, 13(7), R267–R269. doi:10.1016/S0960-9822(03)00197-0
- Strnadova, M., Jirsova, Z., Klusonova, P., & Republic, C. (2009). Occurrence of lipids in the liver of the hypertriglyceridemic rats. *Biomedical Paper of Medical Faculty*, 153(1), 37–40.
- Sulston, J. E. . H. R. H. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 56, 110–156.
- Sulston, J. E. . S. E. . W. J. G. . T. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 100, 64-119.
- Sun, T., Fu, M., Bookout, A. L., Kliever, S. a, & Mangelsdorf, D. J. (2009). MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Molecular Endocrinology*, 23 (6), 925–31. doi:10.1210/me.2008-0298
- Swanson, M. M., & Riddle, D. L. (1981). Critical periods in the development of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva. *Developmental Biology*, 84 (1), 27–40.
- Tan, K. T., Luo, S.-C., Ho, W.-Z., & Lee, Y.-H. (2011). Insulin/IGF-1 receptor signaling enhances biosynthetic activity and fat mobilization in the initial phase of starvation in adult male *C. elegans*. *Cell metabolism*, 14(3), 390–402. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.019
- Tas, J., Frederiks, W. M., & Frank, J. J. (1980). A new approach to the staining of lipids with Sudan Black B: a study by means of polyacrylamide model films containing liposomes. *Acta Histochemica*. 21, 123–9.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., & Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44507–12. doi:10.1074/jbc.M207712200
- Trajkovski, M., Hausser, J., Soutschek, J., Bhat, B., Akin, A., Zavolan, M. & Heim, M. H. (2011). MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*, 474(7353), 649–53. doi:10.1038/nature10112
- Trent, C., Tsuing, N., & Horvitz, H. R. (1983). Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 104(4), 619–47.
- Valdes, V. J., Athie, A., Salinas, L. S., Navarro, R. E., & Vaca, L. (2012). CUP-1 is a novel protein involved in dietary cholesterol uptake in *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 7(3), e33962. doi:10.1371/journal.pone.0033962

- Van Gilst, M. R., Hadjivassiliou, H., & Yamamoto, K. R. (2005). A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(38), 13496–501. doi:10.1073/pnas.0506234102
- Van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J., & Olson, E. N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, *316* (5824), 575–9. doi:10.1126/science.1139089
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. a. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, *318*(5858), 1931–4. doi:10.1126/science.1149460
- Voinnet, O. (2002). RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(5), 444–451. doi:10.1016/S1369-5266(02)00291-1
- Vora, M. (2011). MicroRNA modulation of *C. elegans* dietary restriction and longevity. University of Medicine and Dentistry of New Jersey Reviews.
- Walker, G., & Houthoofd, K. (2005). Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mechanisms of Ageing and Development*, *126* (9), 929–37. doi:10.1016/j.mad.2005.03.014
- Wallis, J. G., Watts, J. L., & Browse, J. (2002). Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(9), 467–473. doi:10.1016/S0968-0004(02)02168-0
- Wang, X., Zhao, Y., Wong, K., Ehlers, P., Kohara, Y., Jones, S. J., Marra, M. a, et al. (2009). Identification of genes expressed in the hermaphrodite germ line of *C. elegans* using SAGE. *BMC genomics*, *10*, 213. doi:10.1186/1471-2164-10-213
- Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L., & Longo, V. D. (2008). Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genetics*, *4*(1), e13. doi:10.1371/journal.pgen.0040013
- Weidhaas, J. B., Babar, I., Nallur, S. M., Trang, P., Roush, S., Boehm, M. & Gillespie, E. (2007). MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Research*, *67* (23), 11111–6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2858
- Williams, M. D., & Mitchell, G. M. (2012). MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Experimental Diabetes Research*, *2012*, 484696. doi:10.1155/2012/484696
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H., & Spector, D. L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes & Development*, *23*(13), 1494–504. doi:10.1101/gad.1800909
- Wong, M. Y. W., Yu, Y., Walsh, W. R., & Yang, J.-L. (2011). microRNA-34 family and treatment of cancers with mutant or wild-type p53 (review). *International Journal of Oncology*, *38* (5), 1189–95. doi:10.3892/ijo.2011.970
- Wood, W. B. (1988). The nematode *Caenorhabditis Elegans* (p. 667). Cold Spring Harbor Laboratory.
- World Health Statistics Annual 2011. (2011). *Report of the World Health Organization Journal, Geneva*, *18* (Suppl. 1), S46–S55.
- Wright, J. E., Gaidatzis, D., Senften, M., Farley, B. M., Westhof, E., Ryder, S. P., & Ciosk, R. (2011). A quantitative RNA code for mRNA target selection by the germline fate determinant GLD-1. *The EMBO Journal*, *30*(3), 533–45. doi:10.1038/emboj.2010.334
- Wu, L., & Burgess, K. (2008). A new synthesis of symmetric boraindacene (BODIPY), 4933–4935. doi:10.1039/b810503k
- Xu, X.-M., & Wang, D.-Y. (2009). Physiological and molecular control of lipid accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *Progress in Physiology*, *40*(2), 129–34.
- Yang, J.-S., Phillips, M. D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A. C. & Chen, K. C. (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*, *17* (2), 312–26. doi:10.1261/rna.2537911
- Yen, K., Le, T. T., Bansal, A., Narasimhan, S. D., Cheng, J.-X., & Tissenbaum, H. (2010). A comparative study of fat storage quantitation in nematode *Caenorhabditis elegans* using label and label-free methods. *PLoS One*, *5*(9). doi:10.1371/journal.pone.0012810
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs service Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, 3011–3016. doi:10.1101/gad.1158803
- Zhang, S. O., Trimble, R., Guo, F., & Mak, H. Y. (2010). Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in *C. elegans*. *BMC Cell Biology*, *11*(1), 96. doi:10.1186/1471-2121-11-96
- Zhang, S., Williams, C. J., Wormington, M., Stevens, a, & Peltz, S. W. (1999). Monitoring mRNA decapping activity. *Methods*, *17* (1), 46–51. doi:10.1006/meth.1998.0706
- Zhang, X., Zabinsky, R., Teng, Y., Cui, M., & Han, M. (2011). microRNAs play critical roles in the survival and recovery of *Caenorhabditis elegans* from starvation-induced L1 diapause. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108* (44), 17997–8002. doi:10.1073/pnas.1105982108

- Zhao, H., Liu, G., Wang, Q., Ding, L., Cai, H., Jiang, H., & Xin, Z. (2007). Effect of ghrelin on human endothelial cells apoptosis induced by high glucose. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3), 677–81. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.021
- Zhao, Z., Boyle, T. J., Liu, Z., Murray, J. I., Wood, W. B., & Waterston, R. H. (2010). A negative regulatory loop between microRNA and Hox gene controls posterior identities in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, 6(9), 12. doi:10.1371/journal.pgen.1001089
- Zorio, D. A., Cheng, N. N., Blumenthal, T., & Spieth, J. (1994). Operons as a common form of chromosomal organization in *C. elegans*. *Nature*, 372 (6503), 270–2. doi:10.1038/372270a0