



UNIVERSIDAD NACIONAL AUT. N OMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**El factor transcripcional MXL-3/MAX regula el
metabolismo de lípidos en respuesta a una
dieta hipercalórica en *C. elegans***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:
FANNY MEJÍA MARTÍNEZ**

**ASESOR:
DR. DANIEL D. ORTEGA CUELLAR**

**CO-ASESOR
DR. ANTONIO VELÁZQUEZ ARELLANO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mi mamá Francisca, gracias a ti, a tu apoyo, impulso y comprensión es que he logrado esta meta.

Especialmente a Dieguito, sé que soy la hermana más mala que puedes tener, pero quiero que logres muchas cosas, te quiero.

A Adriana, siempre has sido el mejor ejemplo para mí, siempre dedicada, siempre paciente, gracias hermana.

A mis abuelitos José y Silvina, gracias por siempre brindarme sabios consejos, cuidarme, apoyarme y por todos los valores que me han enseñado e inculcado, los quiero mucho.

A Pablito, te adelantaste primo pero siempre te llevo en el corazón.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Daniel Ortega Cuellar del Laboratorio de Nutrición Experimental en el Instituto Nacional de Pediatría, en colaboración con la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Éste trabajo fue subvencionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-CB 2012/221953), además durante la realización del mismo también conté con una beca CONACyT nivel I (233774).

Al banco de cepas *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) de la Universidad de Minnesota por habernos proporcionado las cepas con las cuales se realizó el presente trabajo.

Agradezco sinceramente a mi asesor de tesis, Dr. Daniel Ortega Cuellar por haberme aceptado como alumna, confiar en mí para realizar este trabajo, además por su apoyo, paciencia y motivación.

Al Dr. Antonio Velázquez y al M. en C. Alain Hernández por haberme recibido en la UGN.

A Liz, por haberme enseñado a trabajar con el modelo, además de haberme apoyado para realizar y analizar los experimentos y por compartirme de su conocimiento.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM por la formación académica que me brindó durante la Licenciatura.

A los miembros de jurado: Dr. Antonio Velázquez Arellano, Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz, Q. Arcadia Hernández Beltrán, M. en C. Nydia Berenice González Angeles y Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García por todos sus comentarios y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

A mi familia, principalmente mi tío Fernando, gracias por escucharme y estar para mí siempre que lo necesito, gracias por regañarme y darme ánimos también cuando es necesario. A mi tío Víctor y mi primo Abraham.

A mis amigos, Anahí, Ana Pauly, Yahir, Luisito, Ricardo... y todos los que me distinguieron con su amistad durante la carrera y que siguen siendo mis amigos.

A Mau, gracias por siempre apoyarme y motivarme cuando lo he necesitado además de ayudarme cuando estoy en aprietos, no solo al realizar este trabajo sino todos los días. Te agradezco enormemente que compartas tu vida conmigo.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Índice de figuras | 3 |
| Abreviaturas | 4 |
| 1. Resumen | 6 |
| 2. Introducción | 7 |
| 2.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo para estudiar la obesidad | 9 |
| 2.2. Los lípidos como fuente de energía en los mamíferos y <i>C. elegans</i> | 11 |
| 2.2.1. Síntesis y almacenamiento de lípidos en mamíferos y <i>C. elegans</i> , una breve descripción | 14 |
| 2.2.2. Catabolismo de lípidos en mamíferos y <i>C. elegans</i> | 17 |
| 2.3. Regulación transcripcional del metabolismo de lípidos en organismos superiores | 20 |
| 2.3.1. Los factores transcripcionales MAX/MYC en la regulación de lípidos | 22 |
| 2.4. Regulación transcripcional del metabolismo de lípidos <i>C. elegans</i> | 25 |
| 2.5. Alteraciones inducidas por glucosa en <i>C. elegans</i> | 27 |
| 2.6. La metformina reduce los niveles de lípidos | 28 |
| 3. Justificación | 31 |
| 4. Hipótesis | 32 |
| 5. Objetivo general | 32 |
| 6. Objetivos particulares | 32 |
| 7. Materiales y métodos | 33 |
| 7.1. Cultivo de <i>C. elegans</i> | 33 |
| 7.2. Sincronización de nematodos | 34 |
| 7.3. Preparación de medios experimentales | 35 |
| 7.4. Extracción de RNA total | 36 |
| 7.5. Retrotranscripción (RNA→cDNA) | 37 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 7.6. | Determinación de la expresión genética por qPCR | 37 |
| 7.7. | Fijación de nematodos | 38 |
| 7.8. | Tinción de Lípidos con ORO | 39 |
| 7.9. | Tinción de núcleos con DAPI | 39 |
| 7.10. | Análisis de fluorescencia por Microscopía confocal | 40 |
| 7.11. | Análisis estadístico..... | 40 |
| 8. | Resultados..... | 41 |
| 8.1. | MXL-3 promueve la acumulación de lípidos en <i>C. elegans</i> por la exposición a elevadas concentraciones de glucosa | 41 |
| 8.2. | La metformina disminuye la acumulación de lípidos a través de MXL-3..... | 42 |
| 8.3. | MXL-3 regula la síntesis de lípidos a través de SBP-1 | 43 |
| 8.4. | Regulación de genes lipogénicos dependientes de SPB-1 a través de MXL-3..... | 48 |
| 8.5. | MXL-3 media la movilización lipídica a través de lipasas lisosomales | 50 |
| 9. | Discusión..... | 52 |
| 10. | Conclusión..... | 58 |
| 11. | Referencias..... | 60 |
| Anexo | | 72 |
| | Tabla 1. Componentes del medio NGM-lite | 72 |
| | Tabla 3. Componentes del medio LB | 72 |
| | Tabla 4. Componentes del buffer M9 | 73 |
| | Tabla 5. Componentes del buffer de lisis | 73 |
| | Tabla 8. Buffers para fijación nematodos | 74 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo de vida del nematodo <i>C. elegans</i> a 22°C. | 11 |
| Figura 2. Vías y elementos reguladores del metabolismo de lípidos conservados entre <i>C. elegans</i> y mamíferos. | 13 |
| Figura 3. Representación esquemática para la síntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos (TAG) a partir de glucosa en mamíferos. | 15 |
| Figura 4. Representación esquemática de la vía de síntesis de lípidos en <i>C. elegans</i> | 16 |
| Figura 5. Estructuras celulares que almacenan lípidos en <i>C. elegans</i> | 17 |
| Figura 6. Representación esquemática de la β -Oxidación de lípidos en mamíferos. | 18 |
| Figura 7. Representación del modelo de β -Oxidación de lípidos en <i>C. elegans</i> | 19 |
| Figura 8. Interacciones entre los miembros de la familia MYC. | 23 |
| Figura 9. Representación del modelo de Activación farmacológica de AMPK por metformina. | 29 |
| Figura 10. La activación de AMPK reduce el contenido de lípidos. | 30 |
| Figura 11. Diseño experimental. | 33 |
| Figura 12. El contenido de lípidos cambia en respuesta a glucosa y metformina a través de MXL-3. | 43 |
| Figura 13. Efecto del exceso de glucosa y metformina sobre la expresión de <i>mxl-3</i> | 44 |
| Figura 14. Localización subcelular de MXL-3 en respuesta a glucosa y metformina. | 46 |
| Figura 15. La expresión de <i>sbp-1</i> es alterada por glucosa y metformina y es dependiente de MXL-3. | 47 |
| Figura 16. Expresión de genes lipogénicos modulados por la glucosa a través de MXL-3. | 49 |
| Figura 17. La expresión de las lipasas lisosomales <i>lipl-1</i> y <i>lipl-3</i> es alterada por glucosa y metformina. | 51 |
| Figura 18. Modelo de acción de MXL-3 sobre la acumulación de lípidos. | 59 |

Abreviaturas

ACC Acetil CoA carboxilasa

ACL Citrato Liasa

ACO Acetil CoA Oxidasa

ACS Acetil CoA Sintetasa

ATGL Triacilglicerol Lipasa

ATP Adenosina Trifosfato

ChREBP Proteína de unión al elemento de respuesta a Carbohidratos

CPT Carnitina Palmitoil transferasa

DAGL Diacilglicerol Lipasa

DNA Ácido desoxirribonucleico

ECH Enoil CoA hidratasa

ELO Elongasa de ácidos grasos en *C. elegans*

Elovl5 Elongasa de ácidos grasos en mamíferos

FAS Sintasa de ácidos grasos en mamíferos

FASN-1 Sintasa de ácidos grasos en *C. elegans*

FAT Desaturasa de ácidos grasos en *C. elegans*

FFA Ácidos grasos libres

G6P Glucosa-6-fosfato

GFP Proteína verde fluorescente

GK Glucocinasa

GLUT Transportador de glucosa

GPAT Glicerol 3- Fosfato aciltransferasa

LCFA Ácidos grasos de cadena larga

LD Gota de lípido (Lipid droplet)

LDH Lactato deshidrogenasa

LRO Organelo asociado a Lisosoma

MAX Factor X Asociado a MYC

MCAD Deshidrogenasa acetil CoA de cadena media

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido

NHR Receptor Hormonal Nuclear

PC Piruvato carboxilasa

PDC Piruvato deshidrogenasa-carboxilasa

PFK Fosfofructocinasa

PK Piruvato cinasa

POD-2 Acetil CoA carboxilasa en *C. elegans*

PPAR Receptores activados por proliferadores de peroxisoma

RNA Ácido ribonucléico

ROS Especies Reactivas de Oxígeno

SBP-1 Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroles en *C. elegans*

SCD Esteroil CoaA deshidrogenasa

SREBP Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroles

TAG Triacilglicérido

VLDL Lipoproteína de muy baja densidad

1. Resumen

El incremento de la obesidad y sus comorbilidades, plantea un enorme desafío para la salud en todo el mundo. Una característica de la obesidad, es la disrupción de la homeostasis energética que resulta en el detrimento de la calidad de vida de los individuos que la padecen. Por lo tanto entender y dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a ésta patología puede ser una vía para desarrollar estrategias terapéuticas que prevenga la mortalidad de la población cada vez más obesa. Debido a que la obesidad altera la fisiología de todo el organismo, se requieren modelos animales para estudiar los efectos del aumento de la adiposidad. El nematodo *Caenorhabditis elegans*, un organismo considerado como sencillo, que tiene características genéticas y fisiológicas que permiten realizar investigación en obesidad, se creció en condiciones que mimetizan a la obesidad de los mamíferos. Los resultados indican que en respuesta a glucosa, el factor de transcripción MXL-3 (Max-like 3) se activa para generar un aumento generalizado de lípidos a través de la inducción de genes que controlan la síntesis de lípidos de novo, como son: el factor transcripcional SBP-1, las enzimas pod-2 y fasn-1. Además, que el tratamiento con el fármaco metformina bloquea la actividad de MXL-3 que produce una concomitante disminución de los lípidos almacenados por la alta glucosa. En suma, este trabajo propone un mecanismo de regulación dirigido por MXL-3, el cual podría ser empleado como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas con la obesidad.

2. Introducción

La obesidad constituye un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades que se consideran de gran importancia para la salud pública como la diabetes mellitus tipo II, enfermedades cardíacas, la hipertensión, el síndrome metabólico y diversas formas de cáncer, entre otras. La obesidad se define por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una acumulación anormal o excesiva de grasa que es perjudicial para la salud. El incremento de la obesidad, se debe en parte, al estilo de vida que tienen las personas que viven principalmente en zonas urbanas con poca actividad física y con un elevado consumo hipercalórico. Actualmente, se considera que la obesidad afecta a cerca del 12% de la población mundial, y su prevalencia ha tenido un crecimiento alarmante al estimarse que, en conjunto con el sobrepeso, causa alrededor de 3.4 millones de muertes al año en todo el mundo (Ng et al., 2014; Rippe & Angelopoulos, 2016).

De acuerdo con un informe reciente, el mundo ha transitado de ser uno donde la prevalencia de desnutrición era más del doble que la obesidad, a otro en el que la obesidad se incrementó considerablemente (Di Cesare et al., 2016). De hecho, se estima que el peso de la población mundial aumentó en promedio 1.5 kilogramos (por persona) por cada década transcurrida y que en el año 2014, ya había el triple de hombres y el doble de mujeres obesas respecto a 1975, periodo que abarcó el estudio (Di Cesare et al., 2016). El mismo reporte indica que el estado actual de la prevalencia de la obesidad entre mujeres y hombres mexicanos también es preocupante. En 2014, México ya ocupaba el sexto lugar del ranking mundial de mujeres y hombres más obesos en el mundo, siendo de 13.9 millones para mujeres y de 8.9 millones de hombres con

obesidad, que representa el 3.7% y el 3.3% respectivamente, de la población mundial con obesidad (Di Cesare et al., 2016). Estimaciones futuras sugieren que para el año 2050 la población afectada por sobrepeso, obesidad o diabetes tipo II en todo el mundo será de aproximadamente 366 millones de personas. Tan sólo en América Latina se estima que la prevalencia de diabetes y obesidad crezca del 14% a un 20% (Ng et al., 2014; Rippe & Angelopoulos, 2016). Para México, las expectativas sobre obesidad para el año 2050 presentan una marcada tendencia a incrementar, al estimarse que aumentará alrededor de un 88% de la población total, al considerar un incremento de 34% de personas con sobrepeso y 54% con obesidad (Rtveladze et al., 2014).

Como es de esperarse, el alarmante incremento de éste problema de salud pública ha llamado la atención de numerosos grupos de investigación alrededor del mundo, que se han enfocado en tratar de dilucidar y comprender los mecanismos celulares involucrados en la génesis de esta patología; y que eventualmente encuentren alternativas de tratamiento o incluso de prevención que eviten el decaimiento de la salud, así como el colapso económico de los sistemas de salud de los países con altos índices de obesidad. Como consecuencia de esta búsqueda incesante, diversos investigadores han realizado estudios en organismos modelo para tratar de explicar los efectos deletéreos de éstas patologías relacionadas con el metabolismo energético, como la obesidad. Dentro de los modelos de investigación, se ha propuesto al nematodo *Caenorhabditis elegans*, un organismo considerado como sencillo, que tiene características genéticas y algunas fisiológicas que permiten realizar investigación en obesidad y los resultados que se obtengan se puedan extrapolar y comparar con los obtenidos en otros organismos, como los mamíferos (Jones & Ashrafi, 2009).

2.1. *Caenorhabditis elegans* como modelo para estudiar la obesidad

El nematodo *Caenorhabditis elegans* fue introducido como modelo de estudio en 1963 por Sydney Brenner (Brenner, 1974; Felix & Braendle, 2010). *C. elegans* se considera como un organismo innovador de investigación que permite explorar diversas áreas de la biología moderna como el metabolismo, el desarrollo, la neurobiología y el comportamiento. *C. elegans* es un organismo transparente, no parásito, de vida libre, que suele habitar en suelos húmedos y templados en todo el mundo. Un animal adulto mide alrededor de 1 mm de longitud, es de fácil manipulación y se puede cultivar a gran escala en incubadoras de laboratorio con espacios reducidos (Hope, 1999). Su ciclo de vida es corto, en condiciones de cultivo estándar es de aproximadamente 3 días a 20 °C desde que es embrión hasta la adultez, y durante su crecimiento presenta diversas etapas de desarrollo que inicia con una fase embrionaria, seguido de cuatro estadios juveniles (llamados L1 a L4), hasta alcanzar la etapa adulta (**Figura 1**) (Felix & Braendle, 2010; Hope, 1999).

En el laboratorio, *C. elegans* se cultiva sobre una superficie de agar nutritivo contenido en cajas de Petri y se alimenta con la bacteria no patógena *Escherichia coli* auxótrofa de uracilo, OP50-1 (Hope, 1999). Se pueden desarrollar y reproducir a una amplia gama de temperaturas, sin embargo, por debajo de 8 °C su desarrollo se detiene y por arriba de los 27 °C se vuelven estériles, por lo que la temperatura óptima para su cultivo y experimentación es de 20 °C (Corsi, Wightman, & Chalfie, 2015). Los nematodos en

cultivo pueden encontrarse como hermafroditas o machos, prevaleciendo en la población los organismos hermafroditas (auto-fertilización) y solo un 0.2% son machos (Corsi et al., 2015). Un nematodo adulto cuenta con un número invariable de 959 células somáticas, ésta característica permite a los investigadores rastrear *in vivo* el destino de cada célula mediante marcadores específicos desde la fertilización y hasta la edad adulta (Corsi et al., 2015; Hope, 1999).

C. elegans fue el primer organismo multicelular al que se le secuenció su genoma por completo, lo que ha permitido identificar muchos genes relacionados con el desarrollo celular y el metabolismo intermediario, estableciéndose que la mayoría de las vías metabólicas y los mecanismos de regulación para el metabolismo de lípidos y carbohidratos, entre muchas otras, están conservadas a través de la evolución (Corsi et al., 2015; Felix & Braendle, 2010). En conjunto, estas cualidades genéticas y experimentales permitieron posicionar a *C. elegans* como un organismo modelo de excelencia para llevar a cabo estudios de vanguardia, que permiten avances en el conocimiento bioquímico de organismos más complejos como los mamíferos.

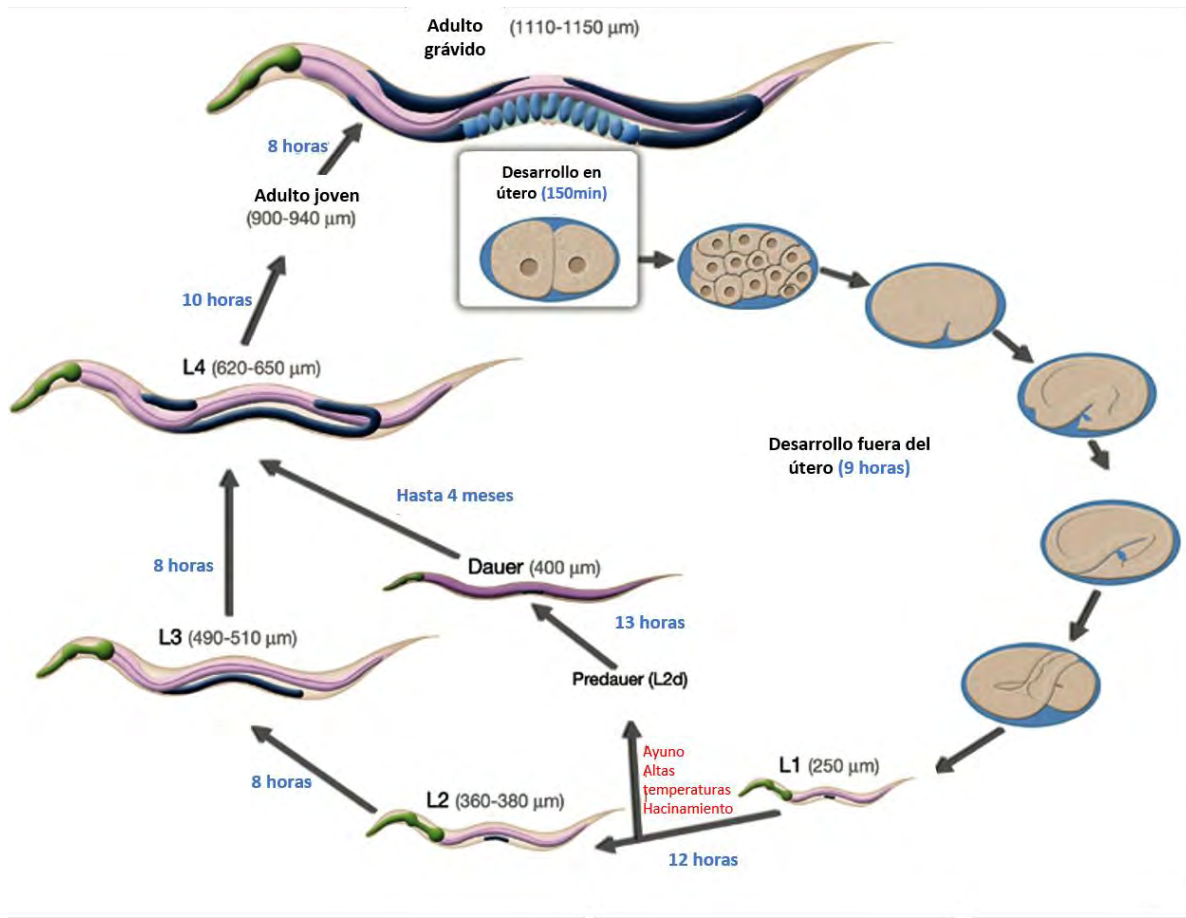


Figura 1. Ciclo de vida del nematodo *C. elegans* a 22°C. En azul se indica el tiempo que transcurre entre cada etapa de desarrollo, junto a cada etapa se indica la longitud que alcanza el nematodo en μm . (Imagen tomada de *C. elegans* Atlas, (Hall & Altun, 2008))

2.2. Los lípidos como fuente de energía en los mamíferos y *C. elegans*

Para sobrevivir todos los organismos deben equilibrar el consumo y la utilización de energía, y los lípidos son una fuente importante de energía que se encuentra almacenada. Una de las familias más importantes de los lípidos está representada por los ácidos grasos, que desempeñan funciones muy importantes tanto en el metabolismo energético como en la estructura de las membranas celulares, además de ser precursores de moléculas involucrados en diversos procesos biológicos que incluyen a

las hormonas esteroideas, las vitaminas y los ácidos biliares (Nelson & Cox, 2005). Algunos lípidos de importancia clínica que se encuentran en muestras de plasma humano incluyen al colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos, glucolípidos, ácidos grasos y triacilglicéridos (TAGs). En los mamíferos, se estima que entre el 5% y 25% del total de su peso corporal es debido a los lípidos y que hasta el 90% de éstos se encuentran en forma de TAGs (Choe, Huh, Hwang, Kim, & Kim, 2016). Los TAGs se almacenan principalmente en el tejido adiposo cuya función básica es suministrar energía a otros órganos en forma de ácidos grasos libres (FFA). Los lípidos se sintetizan y se metabolizan continuamente por las células para mantener su homeostasis, sin embargo cuando ésta se desregula, pueden desarrollarse varias patologías como la obesidad y la diabetes mellitus tipo II (Choe et al., 2016; Rui, 2014).

Mediante determinación bioquímica en *C. elegans*, se ha determinado que el contenido de sus lípidos están principalmente en forma de TAGs y que aproximadamente entre el 40 y el 55% provienen de la dieta (Ashrafi, 2006; Tanaka et al., 1996). Es de destacar que muchos de los genes, proteínas y vías relacionadas con el metabolismo de lípidos están altamente conservadas entre *C. elegans* y mamíferos, que comprenden desde reguladores del sistema nervioso que modulan el metabolismo de los lípidos, hasta aquellas que alteran el comportamiento y el patrón de su alimentación (Jones & Ashrafi, 2009). Los reguladores del almacenamiento de lípidos actúan directamente en los tejidos que contienen los principales depósitos de lípidos en el organismo, que incluyen a las células intestinales e hipodérmicas, porque aunque el nematodo no cuenta con un tejido adiposo específico, si tiene células que desempeñan la función del tejido adiposo de mamífero (Lemieux & Ashrafi, 2015). Existen también sistemas transportadores de

lípidos entre células y tejidos (Jones & Ashrafi, 2009) (**Figura 2**). Análisis genéticos han sugerido que *C. elegans* tiene alrededor de 471 genes relacionados con lípidos y que poco más del 50% (aproximadamente 237 genes) están conservados con los humanos y de éstos, 71 genes se han asociado con enfermedades humanas (Witting & Schmitt-Kopplin, 2016). Aunque el nematodo es auxótrofo de colesterol, y por lo tanto requiere de su aporte vía la dieta para su viabilidad (Ashrafi, 2007), *C. elegans* si es capaz de sintetizar una gran cantidad de lípidos que incluyen a los ácidos grasos saturados, mono y poli-insaturados que pueden ser modificados por las enzimas elongasas y desaturasas de ácidos grasos (Srinivasan, 2015), además su perfil puede variar de acuerdo de la disponibilidad de nutrientes. Dietas ricas en glucosa o ácidos grasos los aumenta hasta en un 70% (Deline, Vrablik, & Watts, 2013; Moreno-Arriola, El Hafidi, Ortega-Cuellar, & Carvajal, 2016).

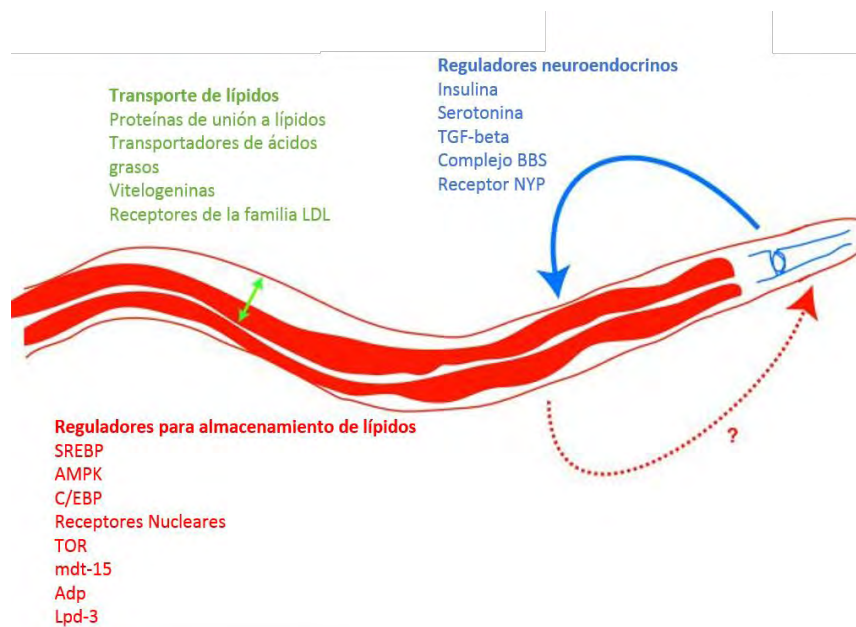


Figura 2. Vías y elementos reguladores del metabolismo de lípidos conservados entre *C. elegans* y mamíferos. En azul, los reguladores del sistema nervioso, en rojo los reguladores para almacenamiento de lípidos y en verde los transportadores de lípidos entre células y tejidos. (Imagen tomada de (Jones & Ashrafi, 2009))

2.2.1. Síntesis y almacenamiento de lípidos en mamíferos y *C. elegans*, una breve descripción

En mamíferos los lípidos de almacenamiento tienen dos orígenes, uno exógeno proveniente de la dieta y el endógeno, donde los ácidos grasos resultan de la síntesis *de novo* y de la oxidación de los lípidos almacenados. La síntesis lipídica *de novo* se inicia con una molécula de acetil-CoA; la cual es usada como sustrato para formar malonil-CoA a través de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC1). Posteriormente el malonil-CoA junto con el NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido) son utilizados como precursores para la síntesis de ácido palmítico (ácido graso saturado de 16 carbonos) por la enzima sintasa de ácidos grasos (FAS) (Srinivasan, 2015). El acetil-CoA es un precursor para la síntesis de lípidos o lipogénesis y por lo tanto la producción de ácidos grasos libres (FFA) (**Figura 3**). Después de una ingesta, la enzima glucocinasa hepática (GK) se induce por acción de la vía de la insulina para promover la síntesis de acetil-CoA que es sustrato para sintetizar ácidos grasos (Dentin et al., 2004; Rui, 2014). Los ácidos grasos que se producen vía lipogénesis se convierten a TAGs y subsecuentemente se transportan como VLDLs para almacenarse en tejido adiposo.

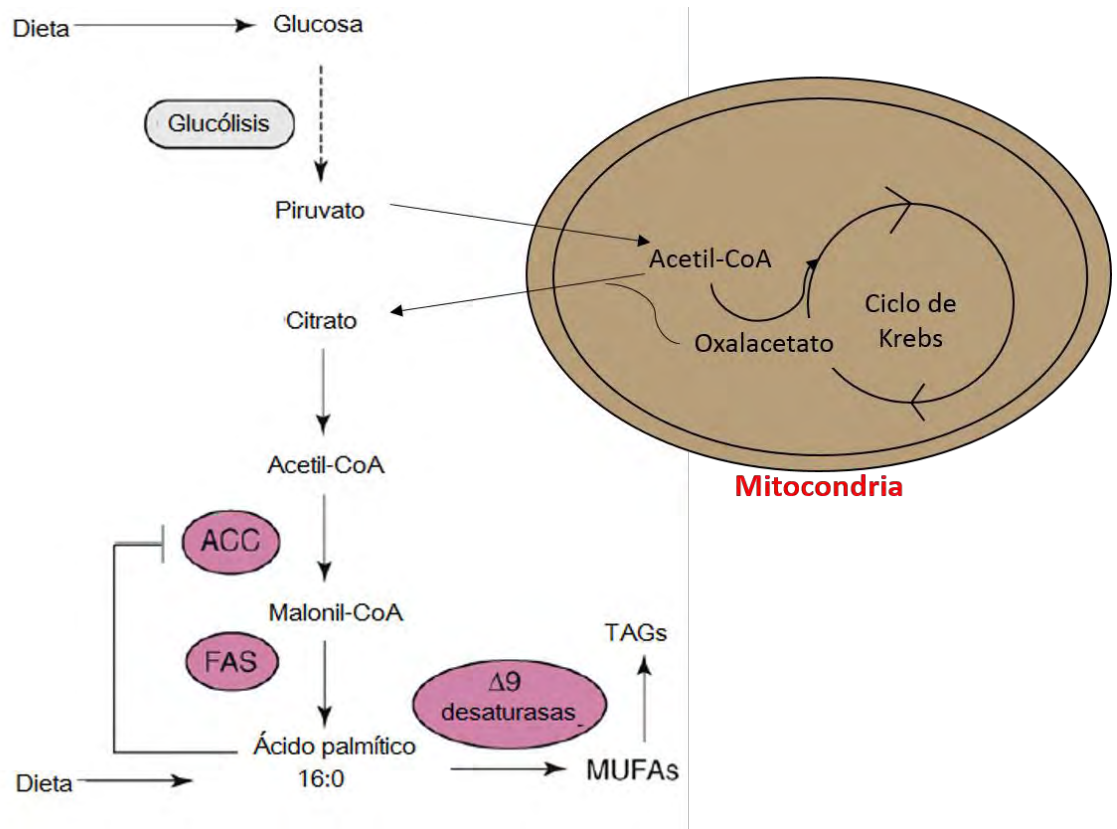


Figura 4. Representación esquemática de la vía de síntesis de lípidos en *C. elegans*. Similar a los mamíferos, la dieta aporta ácidos grasos y precursores lipogénicos como la glucosa. (Imagen tomada de (Watts, 2009))

En el nematodo, los lípidos almacenados se encuentran principalmente en dos estructuras: las gotas de lípidos (LD) y en organelos asociados a los lisosomas (LRO). La composición de las LD de *C. elegans* es similar a la encontrada en otras especies, están delimitadas por una monocapa de fosfolípidos y contienen diversas proteínas, mientras que los LRO son estructuras subcelulares que comparten algunas características con los endosomas/lisosomas pero su función y morfología pueden ser distintas (**Figura 5**) (Marks, Heijnen, & Raposo, 2013).

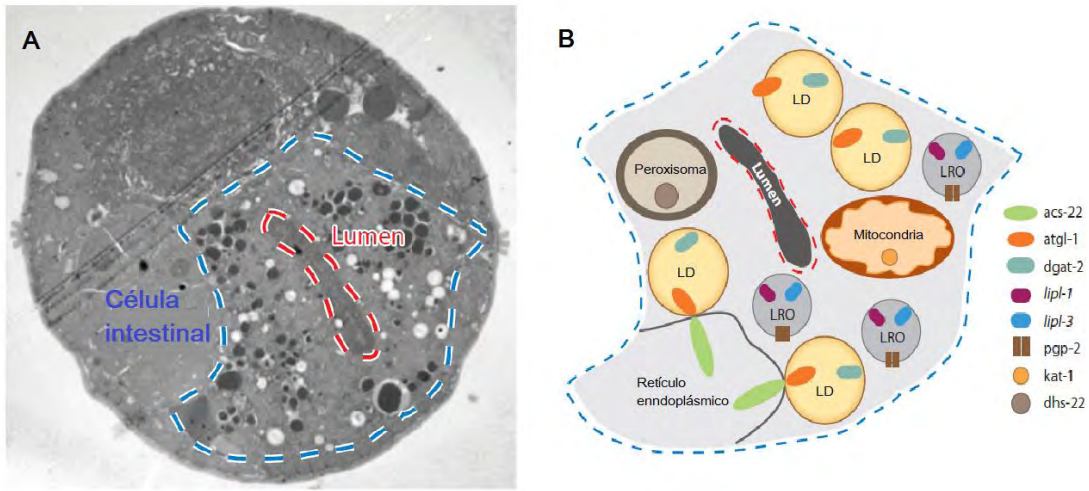


Figura 5. Estructuras celulares que almacenan lípidos en *C. elegans*. A) Corte transversal de un nematodo silvestre adulto donde se delimita una célula intestinal en azul y el lumen intestinal en rojo. Imagen por microscopía electrónica de transmisión, con un aumento de 1450X. B) Modelo que representa componentes reguladores de lípidos en *C. elegans* de una célula intestinal. Gotas de lípidos (LD) y organelos relacionados con lisosomas (LRO). (Imagen tomada de (Srinivasan, 2015))

2.2.2. Catabolismo de lípidos en mamíferos y *C. elegans*

Fisiológicamente, cualquier organismo debe ser capaz de regular la producción, utilización y almacenamiento de energía. El catabolismo o utilización de lípidos inicia con la movilización de los lípidos almacenados a través de la hidrólisis de los TAGs, que conlleva a la liberación de los ácidos grasos y glicerol, mediante la acción de enzimas lipasas. Los ácidos grasos liberados son esterificados con la coenzima A (CoA), generando ácidos grasos libres-CoA (FA-CoA) los cuales son internalizados a la mitocondria mediante una transferasa de ácidos grasos, la carnitina palmitoil-transferasa

I y II (CPT-I y CPT-II), que es la primera proteína limitante de β -oxidación. La β -oxidación es un proceso mediante el cual se obtiene energía a partir de ácidos grasos que se lleva a cabo en la mitocondria y en el peroxisoma (Rui, 2014). Una vez que llegan los ácidos grasos a la matriz mitocondrial, éstos sufren hidrólisis cíclica y cada ciclo genera una molécula de acetil-CoA que es destinado a la producción de ATP (**Figura 6**).

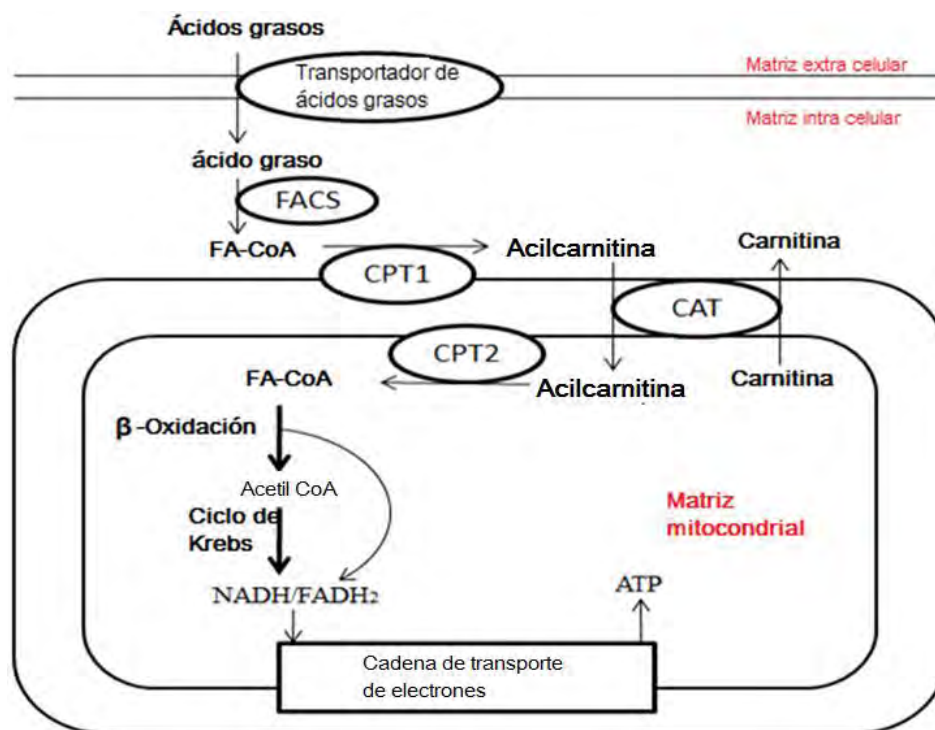


Figura 6. Representación esquemática de la β -Oxidación de lípidos en mamíferos. Los ácidos grasos transportados a la matriz mitocondrial son oxidados y los productos de la β -oxidación son empleados como sustratos del ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones para producir ATP.

El proceso de β -oxidación de ácidos grasos en *C. elegans* se lleva a cabo de la misma manera que en mamíferos, siendo un proceso conservado en la evolución, y que está destinado a la producción de energía. Brevemente, los ácidos grasos se obtienen mediante un proceso de hidrólisis de lípidos o lipólisis, en el primer paso de la lipólisis se produce la liberación de los ácidos grasos del glicerol mediante la acción de enzimas lipasas neutras como la ATGL (Triacil Glicerol Lipasa), la DAGTL (Diacil Glicerol Lipasa) y de lipasas lisosomales como LIPL-1 y LIPL-3, entre otras para posteriormente ser hidrolizados por la β -oxidación (Srinivasan, 2015), (**Figura 7**).

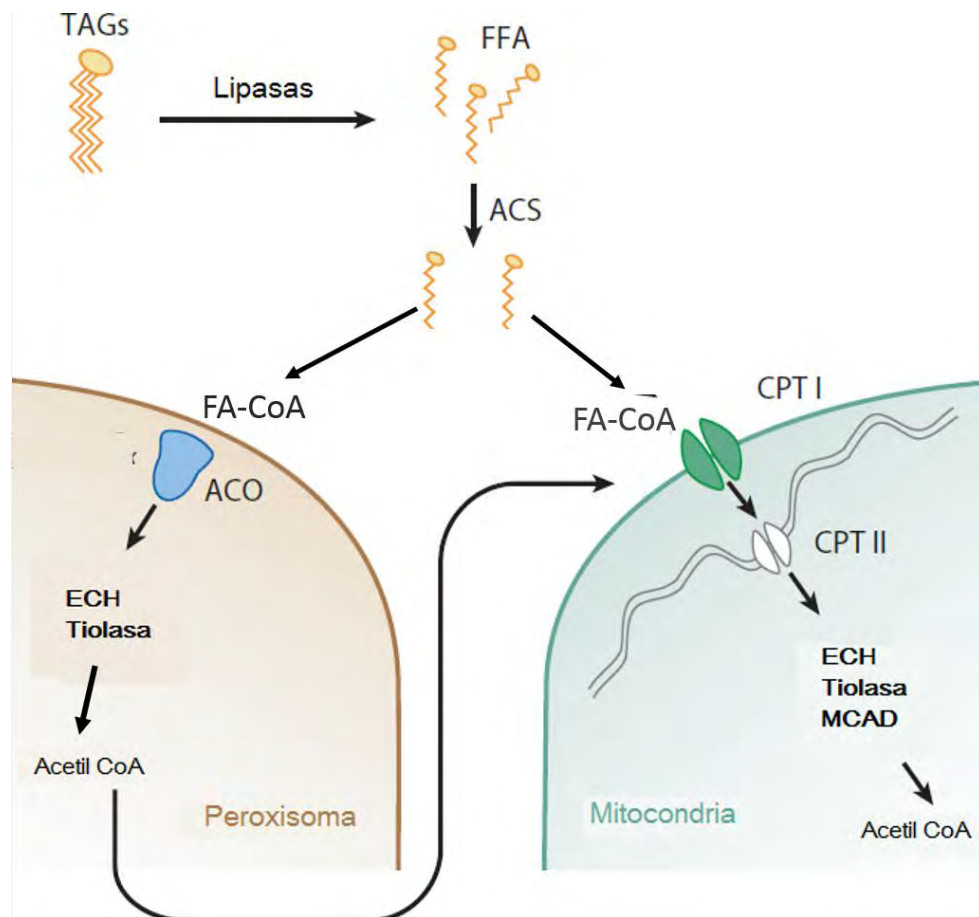


Figura 7. Representación del modelo de β -Oxidación de lípidos en *C. elegans*. Los ácidos grasos liberados del glicerol, por acción de las enzimas lipasas, son internalizados y oxidados para producir moléculas de Acetil CoA que serán utilizadas por el ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones para producir ATP. (Imagen tomada de (Srinivasan, 2015))

2.3. Regulación transcripcional del metabolismo de lípidos en organismos superiores

Los factores de transcripción son esenciales para la regulación de la expresión génica de procesos celulares vitales. Por lo tanto, la red de interacciones entre las proteínas y el DNA son fundamentales para la regulación celular apropiada. El metabolismo de lípidos como todo proceso celular, es regulado por diversos factores transcripcionales al intervenir en pasos críticos en el control de vías que conducen a su síntesis y utilización **(Figura 2)**. Por ejemplo, existen reguladores transcripcionales que modulan genes de vías como la glucólisis y la lipogénesis, así como de aquellos implicados en la absorción, tráfico y almacenamiento de lípidos (Rui, 2014).

Los receptores PPARs (Receptores activados por proliferadores peroxisomales), pertenecen a la superfamilia de receptores hormonales nucleares (NHR), estas proteínas son factores de transcripción que no solo tienen capacidad de unirse al DNA y regular la expresión de genes, sino también tienen función como receptores intracelulares de moléculas de unión a lípidos. La activación de los PPARs conduce a la modificación de la expresión de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos, glucosa y homeostasis de insulina. (Monsalve, Pyarasani, Delgado-Lopez, & Moore-Carrasco, 2013). Se han identificado tres subtipos de proteínas PPARs: el PPAR α , PPAR β y PPAR γ , cada subtipo desempeña una función específica. El PPAR γ está relacionado con la diferenciación y funcionamiento de los adipocitos al promover la acumulación de lípidos, el PPAR α se ha descrito como un modulador crítico en el síndrome metabólico. Los genes sobre los que tiene un efecto positivo son aquellos implicados en la absorción, unión y oxidación de ácidos grasos, así como de algunos que participan en el ensamblaje

de lipoproteínas y el transporte de los lípidos. Finalmente, el PPAR β que es de expresión ubicua, estimula la sensibilidad a insulina (Cabarcas, Hurt, & Farrar, 2010; Monsalve et al., 2013; Varga, Czimmerer, & Nagy, 2011).

Otro factor transcripcional importante en la regulación del metabolismo de lípidos, es la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos, ChREBP; éste factor pertenece a la superfamilia de proteínas MYC que al heterodimerizarse adquiere la función de factor transcripcional (Collier et al., 2007). Específicamente, ChREBP es importante para la transcripción de la enzima glucolítica piruvato cinasa hepática (*L-PK*) y de manera sinérgica con la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c (SREBP-1c), estimulan la transcripción de genes lipogénicos en respuesta a glucosa e insulina, como la ATP citrato liasa (*ACL*), las acetil-CoA carboxilasa 1 y 2 (*ACC1* y *ACC2*), la sintasa de ácidos grasos (*FAS*), y la esteroil-CoA desaturasa 1 (*SCD1*) (Benhamed et al., 2012; Iizuka, Bruick, Liang, Horton, & Uyeda, 2004; Stoeckman, Ma, & Towle, 2004).

Por otra parte, la familia de proteínas SREBPs también se encuentra involucrada en la regulación transcripcional del metabolismo de lípidos y está conformada por tres isoformas: el SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP2, las cuales pertenecen a una familia de factores de transcripción que se sintetizan como proteínas membranales en el retículo endoplásmico y que contienen un motivo cremallera de leucina básica en forma de hélice-loop-hélice (bHLH-Zip) (Sato, 2010). El SREBP1c, es la isoforma que se expresa predominante y ubicuamente en todos los tejidos. Éste factor controla la expresión de genes para la síntesis ácidos grasos, responde a la acción de la insulina y es esencial para la utilización y almacenamiento de glucosa como fuente de energía, al dar inicio al

programa lipogénico mediante la estimulación de la transcripción de los genes que codifican para las proteínas ACC1 y ACC2, FAS, SCD1 y SCD2, la ATP citrato liasa (ACL), la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) entre otras (Shimano, 2001). El SREBP-1a es idéntico a SREBP-1c excepto por los dominios de transactivación ubicados en el amino terminal y su expresión es tejido específico. El SREBP-2 está involucrado en la regulación del metabolismo de colesterol (Eberle, Hegarty, Bossard, Ferre, & Fougère, 2004; Ferre & Fougère, 2007; Sato, 2010; Shimano, 2001). Debido a estas y otras evidencias, se han propuesto a los factores de transcripción SREBPs como reguladores maestros de la homeostasis de lípidos.

2.3.1. Los factores transcripcionales MAX/MYC en la regulación de lípidos

El nombre de la familia MYC proviene del nombre en inglés myelocytomatosis leukemia (MYC), contiene factores de transcripción que son importantes reguladores de crecimiento celular, la proliferación y el metabolismo energético (Zornig & Evan, 1996). Los miembros de la familia MYC cumplen tres requisitos importantes: en primer lugar, todos contienen un dominio proteico de unión al DNA conocido como cremallera de leucina básica en forma de hélice-loop-hélice (bHLH-Zip). Este dominio incorpora las proteínas dimerizadas con el DNA en una sola unidad funcional (Solomon, Amati, & Land, 1993). Segundo, los miembros de la familia MYC pueden hetero-, y en algunos casos, homodimerizar a través de la región bHLHZIP. Sin embargo, la interacción entre los miembros de la familia es limitada, creando pares modulares capaces de activar o reprimir la transcripción genética (**Figura 8**). En tercer lugar, todos los pares

heterodiméricos dentro de la familia MYC muestran preferencia por secuencias CANNTG del DNA conocido como cajas E (Adhikary & Eilers, 2005).

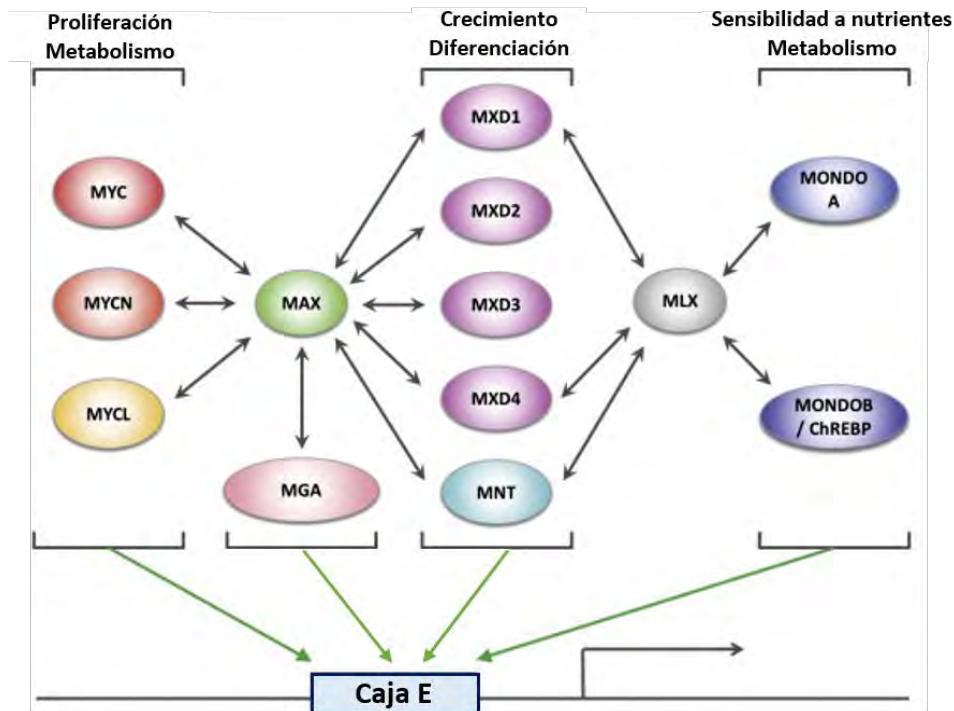


Figura 8. Interacciones entre los miembros de la familia MYC. La imagen muestra las interacciones entre los miembros de la familia MYC, las flechas indican los pares heterodiméricos que se forman para actuar como factor transcripcional reconociendo cajas E (Imagen tomada de (Diolaiti, McFerrin, Carroll, & Eisenman, 2015)).

La familia MYC incluye tres importantes oncogenes, c-Myc, L- Myc y N-Myc. Esta familia de factores transcripcionales fue descubierta debido a la proteína MAX (Proteína Asociada a MYC) que heterodimeriza con MYC, es decir; en respuesta a diversas señales celulares, MYC se une con la proteína MAX para funcionar como factor transcripcional heterodimérico. Subsecuentemente, el complejo MAX/MYC se une a secuencias específicas de DNA para modular la expresión de diversos genes blanco (Grandori, Cowley, James, & Eisenman, 2000; Zeller, Jegga, Aronow, O'Donnell, & Dang,

2003). Es de resaltar que las interacciones heterodiméricas entre los dominios bHLHZ de las proteínas MAX y MYC son sorprendentes en términos de su especificidad y la conservación a través de la evolución (Conacci-Sorrell, McFerrin, & Eisenman, 2014).

MYC es regulado a nivel transcripcional y postraduccional. Está bien documentado que la sobreexpresión de MYC contribuye a la transformación maligna de varios linajes celulares, siendo dicho factor marcador de diversos tipos de cáncer en humanos (Vita & Henriksson, 2006). Se ha demostrado que MYC funciona en circunstancias donde la cromatina este abierta y pueda para unirse a las cajas E y potenciar la actividad del genoma (Nie et al., 2012).

El factor transcripcional MAX, es una fosfoproteína que se expresa ubicuamente y es susceptible de fosforilación en los residuos de serina (Ser 1 y 10), vía la proteína cinasa de casina II, impidiendo la formación de heterodímeros y la concomitante unión a la caja E (E-box). La función celular de MAX es muy importante porque a través de éste se puede controlar la vía MAX/MYC. Se ha establecido que mutaciones del gen MAX contribuye a diversas neoplasias y exagera los efectos negativos de diversos tumores (Comino-Mendez et al., 2011). Otras, evidencias indican que existe una co-ubicación en el DNA del factor MAX con MYC, indicando que la unión a las cajas E ocurre en la forma de heterodímero MAX/MYC para regular directamente cientos de genes que codifican para proteínas importantes, entre muchas otras, del metabolismo intermediario como glucólisis, ciclo de Krebs y la síntesis de lípidos (Lin et al., 2012). Algunas enzimas involucradas en la glucólisis, como la piruvato cinasa, la hexocinasa 2 y la lactato deshidrogenasa (LDH) son moduladas por el complejo MAX/MYC, específicamente la LDH es un blanco directo del complejo MAX/MYC que se une a las dos cajas E en el

promotor del gen de la enzima (Rimpi & Nilsson, 2007). Además, éste heterocomplejo también activa la expresión de enzimas relacionadas al metabolismo de lípidos como la ACC, la FAS y SCD (Morrish et al., 2010).

En suma, el heterocomplejo MAX-MYC es capaz de activar el metabolismo celular y promover la remodelación global de la cromatina promoviendo que el metabolismo de glucosa y los carbonos derivados de ésta sean utilizados para la biosíntesis de lípidos e incrementar el flujo metabólico de estas vías biosintéticas (Morrish et al., 2010).

2.4. Regulación transcripcional del metabolismo de lípidos *C. elegans*

Como en mamíferos, los cambios en la demanda energética producen respuestas transcripcionales que modifican el metabolismo de lípidos, es así que el balance entre almacenamiento y utilización también son regulados por una gran variedad de complejos transcripcionales en *C. elegans*. Como se mencionó antes, se ha observado que *C. elegans* tiene múltiples genes relacionados con el control del metabolismo de lípidos y muchos de éstos están conservados entre mamíferos y el nematodo (Witting & Schmitt-Kopplin, 2016).

En *C. elegans* se han encontrado 284 genes que codifican para proteínas de la familia NHR (receptores hormonales nucleares), y 15 de éstos se encuentran conservados en mamíferos. Recientemente se describió al NHR-49 (ortólogo funcional de PPAR α de mamíferos) como un regulador clave en el metabolismo energético al modular la transcripción de al menos 13 genes involucrados en metabolismo de lípidos, entre los

cuales se encuentran aquellos para la β -oxidación como la *acs-2* (sintetasa de Acetil-CoA) y *ech-1* (enoil CoA hidratasa), y *fat-7* y *fat-5* involucrados en la desaturación de ácidos grasos, entre otros (Atherton, Jones, Malik, Miska, & Griffin, 2008; Mullaney & Ashrafi, 2009; Van Gilst, Hadjivassiliou, Jolly, & Yamamoto, 2005). Otro componente importante para la transcripción de diversos genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos es el factor transcripcional MDT-15, que actúa como un co-activador que puede interactuar con NHR-49 para modular el metabolismo energético, sin embargo; también puede modificar la expresión de genes de manera independiente (Taubert, Van Gilst, Hansen, & Yamamoto, 2006).

SREBP en mamíferos se ha descrito como el regulador maestro de la síntesis de lípidos, cuyo ortólogo en el nematodo es SBP-1 (Nomura, Horikawa, Shimamura, Hashimoto, & Sakamoto, 2010). En el nematodo, el SBP-1 regula transcripcionalmente genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos, incluyendo a la *elo-2* (elongasa-2), *fat-2* (desaturasa 2) y *fat-5* (desaturasa-5) además de la regulación transcripcional de *fasn-1*, *pod-2* y *acs-2*. Por lo tanto, en *C. elegans* SBP-1 tiene un papel fundamental en la regulación del metabolismo de lípidos. Además, se ha descrito que MDT-15 puede funcionar como co-activador de SBP-1 (D. Lee et al., 2015; Nomura et al., 2010).

Por otra parte, *C. elegans* también posee reguladores transcripcionales de la familia MYC con función similar a los mamíferos (McFerrin & Atchley, 2011). En *C. elegans* están representados por cuatro integrantes: el MML-1, ortólogo a MYC y MONDO de mamíferos; el MXL-2, ortólogo a la proteína MAX-like (MLX), MXL-3 que es ortólogo a MAX y el MDL-1, ortólogo a MAD. MML-1 es la única proteína en *C. elegans* que

funcionalmente es similar a MYC y MONDO de mamíferos (McFerrin & Atchley, 2011; Pickett, Breen, & Ayer, 2007).

En el caso particular del ortólogo a MAX, denominado MXL-3, funciona como un homodímero y participa directamente en la regulación de genes involucrados en el metabolismo energético (Johnson et al., 2014). MXL-3 se encuentra directamente relacionado a lipólisis mediada por el proceso autofágico (O'Rourke & Ruvkun, 2013). Se ha descrito que MXL-3 tiene actividad transcripcional represora para las lipasas lisosomales *lipl-1* y *lipl-3* necesarias para el correcto balance de lípidos en el organismo. Sin embargo, es importante mencionar que a la fecha no se han realizado las investigaciones suficientes que establezcan la participación de MXL-3 sobre el control del metabolismo lipídico y energético y su impacto a nivel sistémico (Johnson et al., 2014; O'Rourke & Ruvkun, 2013).

2.5. Alteraciones inducidas por glucosa en *C. elegans*

La glucosa es una de las principales fuentes de energía para la mayor parte de los organismos. El abuso de su consumo provoca alteraciones que se ven reflejadas en el origen de diversas enfermedades metabólicas como la diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico (Ng et al., 2014).

En *C. elegans* la sobreexposición a este carbohidrato afecta su metabolismo y provoca un aumento en la síntesis de ácidos grasos además de una marcada reducción de su

longevidad (Di Cesare et al., 2016; Rippe & Angelopoulos, 2016; Schlotterer et al., 2009). Algunas otras consecuencias derivadas de la exposición a glucosa son disminución en la embriogénesis debido a señales serotoninérgicas (Teshiba, Miyahara, & Takeya, 2016) y un significativo aumento del nivel de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que forman parte de una cascada de señalización que afectan negativamente a la glioxilasa-1, la enzima más importante en eliminar al compuesto metilglioxal y que es un precursor de los Productos finales de la Glicación Avanzada (Advanced Glycation End Products, AGEs). Específicamente, el aumento de los AGEs, reduce la actividad de la glioxilasa-1, y concomitantemente incrementa la formación de ROS que impactan negativamente sobre la función neuronal y con ello la disminución de la longevidad (Schlotterer et al., 2009; Teshiba et al., 2016).

2.6. La metformina reduce los niveles de lípidos

La metformina es un fármaco derivado de la guanidina ampliamente empleado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II, ya que disminuye tanto la glucosa basal como la glucosa postprandial en plasma (Hawley, Gadalla, Olsen, & Hardie, 2002). A nivel celular, la metformina inhibe la producción de glucosa hepática y favorece la utilización de lípidos promoviendo la reducción de peso (Gong, Goswami, Giacomini, Altman, & Klein, 2012). Si bien, los mecanismos moleculares que subyacen la actividad de la metformina son complejos, y a la fecha no se han dilucidado completamente, se ha descrito como un mecanismo principal la activación de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), debido a la inhibición transitoria del complejo I mitocondrial de la cadena respiratoria que produce una disminución en el estado de energía (Viollet et al., 2012) (**Figura 9**).

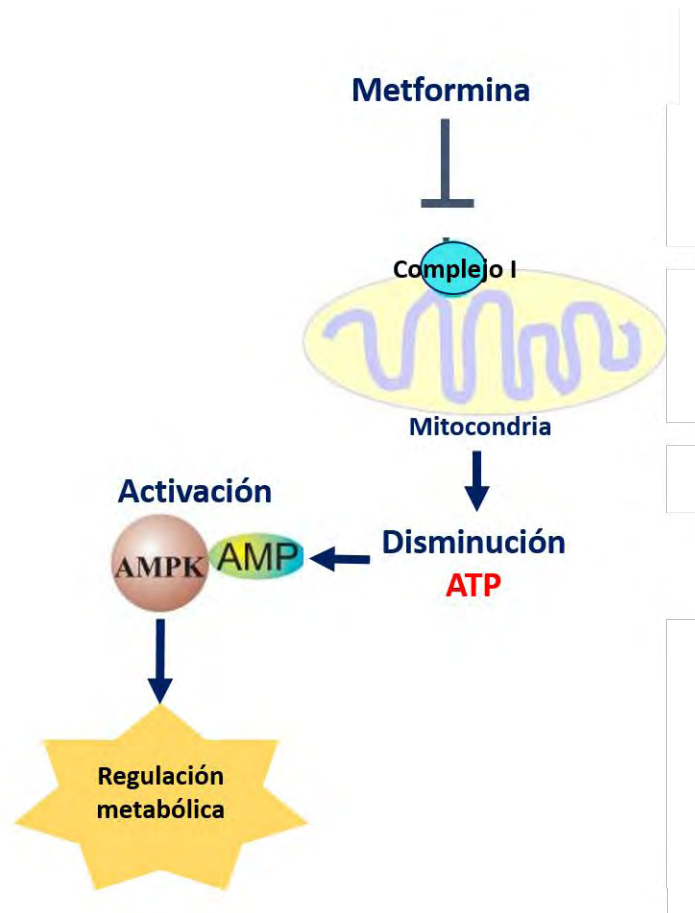


Figura 9. Representación del modelo de Activación farmacológica de AMPK por metformina. La metformina inhibe al complejo I mitocondrial provocando una disminución en los niveles de ATP que inducen la activación de AMPK (Imagen tomada de (Zhou, Zhang, & Marcus, 2014)).

La AMPK, es una enzima considerada el sensor energético celular capaz de inactivar vías metabólicas que consumen energía (ATP) y activar aquellas que ayuden a conservarlo, a través de la fosforilación de sus proteínas blanco. Una de las principales vías reguladas a través de la AMPK es la vía de síntesis de ácidos grasos, por inhibición de la actividad de la ACC y FAS, mientras que por otra parte activa la de β -oxidación para generar energía (Lage, Dieguez, Vidal-Puig, & Lopez, 2008) **(Figura 10)**. Singularmente, en el nematodo se ha observado que la metformina favorece el aumento

de la longevidad, además también induce la activación del ortólogo de AMPK, la AAK-2, y genera una disminución en los lípidos de almacén, provocando un estado similar a una restricción dietética (Cabreiro et al., 2013; Moreno-Arriola et al., 2016; Onken & Driscoll, 2010).

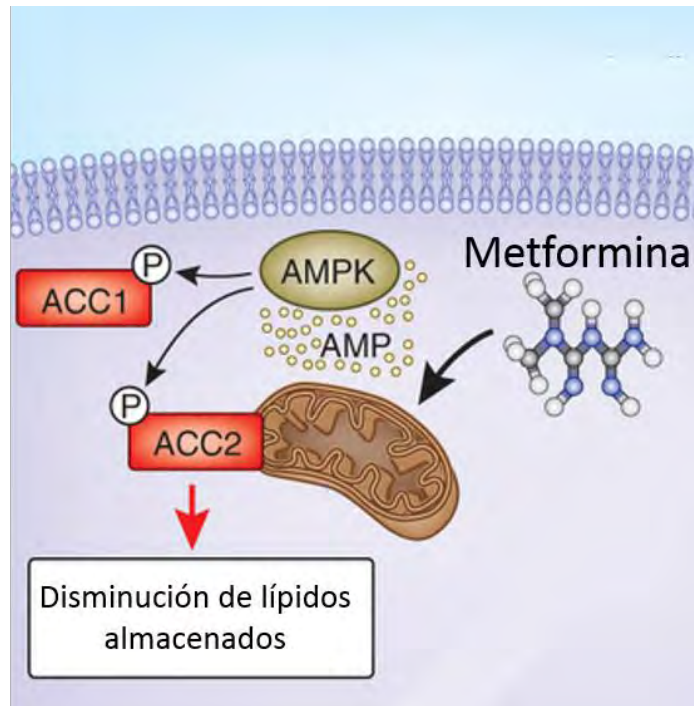


Figura 10. La activación de AMPK reduce el contenido de lípidos. La activación de la AMPK por metformina fosforila e inhibe la acetil-CoA carboxilasa que reduce los sustratos para síntesis de lípidos *de novo* (Imagen tomada de (Shaw, 2013)).

3. Justificación

La acumulación excesiva de lípidos juega un papel determinante en el desarrollo de diversas patologías como la obesidad y la diabetes mellitus tipo II. Estas enfermedades afectan de manera muy importante la calidad de vida de la persona y generan un incremento considerable en los gastos gubernamentales enfocados a su tratamiento, por lo tanto, investigar y desarrollar nuevas estrategias que lleven a la prevención y el tratamiento resulta prioritario. Por tal motivo, en esta investigación se propone estudiar con mayor profundidad los mecanismos moleculares y celulares asociados a la acumulación de lípidos derivados de una dieta rica en carbohidratos.

4. Hipótesis

El incremento de lípidos promovidos por una dieta alta en glucosa en *Caenorhabditis elegans* esta modulada por el factor transcripcional MXL-3/MAX alterando su síntesis y degradación.

5. Objetivo general

Evaluar el mecanismo de regulación del factor transcripcional MXL-3/MAX sobre el metabolismo de los lípidos promovidos por una dieta alta en glucosa en el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

6. Objetivos particulares

- o Evaluar el efecto de la dieta alta en glucosa sobre la acumulación de lípidos en *C. elegans*.
- o Evaluar que una dieta alta en glucosa modula la actividad del factor transcripcional MXL-3.
- o Evaluar el efecto de la Metformina sobre la acumulación de lípidos.
- o Determinar la participación de MXL-3 en la inhibición de acumulación de lípidos por administración con Metformina

7. Materiales y métodos

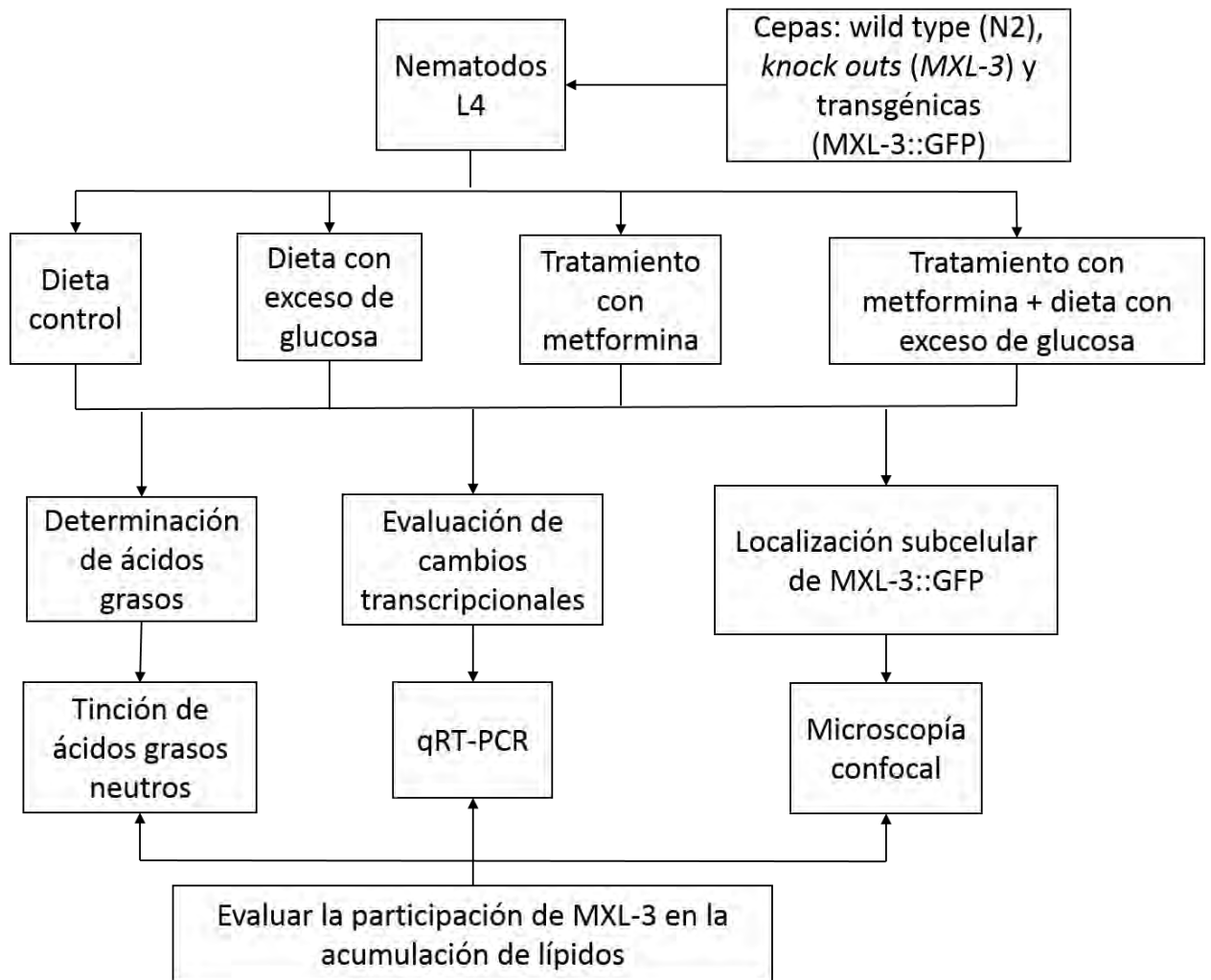


Figura 11. Diseño experimental. En el esquema se muestra de forma general procedimiento empleado para obtener los resultados.

7.1. Cultivo de *C. elegans*

En el presente trabajo se emplearon las siguientes cepas de *C. elegans*: la tipo silvestre (N2), la RB1588 ($\Delta mxl-3$ mutante por delección de 955 pares de bases, *ok1947*), la UL1439 (MXL-3::GFP, tiene fusionada la proteína GFP al promotor del gen *mxl-3*) y la

VC1886 ($\Delta sbp-1$ mutación por delección de 1315 pares de bases *ok2363*), todas proporcionadas por el banco de cepas *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) de la Universidad de Minnesota. Todas las cepas se cultivaron bajo condiciones de crecimiento estándar, sobre placas de agar NGM-lite (Nematode Growth Medium) (Anexo) a 20°C y alimentadas con *Escherichia coli* OP50-1, previamente cultivada en medio líquido LB (Luria Bertani) (Anexo) a 37°C/12h. (Brenner, 1974; Stiernagle, 2006)

7.2. Sincronización de nematodos

Para obtener poblaciones de nematodos homogéneas en el mismo estadio larval, se recolectaron nematodos adultos grávidos empleando buffer M9 (Anexo) y se lavaron con la misma solución para eliminar el exceso de bacteria. Posteriormente, los nematodos se lisaron, para obtener los embriones, al adicionar 300 μ L de NaClO comercial y 150 μ L de una solución de NaOH 5N. La suspensión se agitó constantemente en vórtex durante 3 min. La suspensión se centrifugó inmediatamente y el pellet resultante se lavó 3 veces con buffer M9. Los embriones obtenidos fueron colocados en una caja petri estéril con 3 mL de buffer M9 y se colocaron en agitación orbital constante a 7-9 rpm durante toda la noche para favorecer su eclosión y así obtener poblaciones homogéneas de nematodos en el estadio larval L1. Para todos los experimentos descritos se emplearon nematodos sincronizados en L1 cultivados en placas de agar NGM-lite hasta estadio L4, posteriormente se cambiaron a los medios experimentales que se describen a continuación.

7.3. Preparación de medios experimentales

Las condiciones de experimentación empleadas fueron: nematodos crecidos en NGM-lite control, el suplementado con glucosa 100 mM (SIGMA G6152) (Schlotterer et al., 2009), metformina 50 mM (SIGMA D1509599) (Moreno-Arriola et al., 2016) y por último la condición con glucosa 100 mM + metformina 50 mM. Todos los medios empleados se suplementaron con 5-fluoro-2 'desoxiuridina (FUDR, SIGMA F0503) para evitar el desarrollo de nuevas larvas y mantener homogénea las poblaciones de nematodos experimentales (Sutphin & Kaeberlein, 2009). Los medios se prepararon como sigue: al agar NGM-lite estéril a una temperatura no mayor a 60 °C, se adicionó el FUDR a una concentración final de 49.5 µM disuelto en M9 estéril y a éste se le adicionó la metformina (50 mM, concentración final) previamente disuelta en M9 estéril. Posteriormente, el agar se dispensó en cajas de Petri estériles y se dejó solidificar a temperatura ambiente. La glucosa (100 mM) se adicionó sobre NGM-lite sólido 24 horas antes de exponer los nematodos al experimento. Los nematodos L4 se crecieron por 24 horas en estas condiciones a 20 °C y se alimentaron con *E. coli* OP50-1. A finalizar el periodo de tratamiento, los nematodos se recolectaron y lavaron con buffer M9 frío para eliminar el exceso de bacteria y se centrifugaron a 6000 rpm por 1 min y el pellet se congeló en Nitrógeno líquido y se almacenó inmediatamente a -70 °C hasta su utilización.

7.4. Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total se siguió el protocolo descrito por Kien Ly *et. al* para el cual se emplearon los pellets de nematodos almacenados a -70 °C (Ly, Reid, & Snell, 2015). Brevemente, al pellet de nematodos provenientes de cada condición experimental, se les adicionó 100 µL de buffer de lisis (Anexo) suplementado con proteinasa K (Boehringer Mannheim 1000-144) a una concentración de 2 mg/mL. Las muestras se incubaron a 65 °C/10 min, posteriormente se inactivó la enzima a 85 °C/1 min. La extracción del RNA se inició al adicionar 300 µL de Trizol LS Reagent (Ambion 10296028) y se incubó 5 min/temperatura ambiente, enseguida se añadieron 80 µL de cloroformo (SIGMA C-2432) y se agitó suavemente e incubó 3 min/temperatura ambiente. Terminado este tiempo, la muestra fue centrifugada a 11171.74 rpm/15 min/4 °C. A la fase acuosa se le adicionaron 200 µL de isopropanol (SIGMA I9516) y se incubó 10 min/temperatura ambiente, la muestra fue centrifugada a 11171.74 rpm /15 min/4 °C. Al pellet obtenido se le realizaron 3 lavados consecutivos con etanol 75 % frío. El RNA total obtenido fue resuspendido en agua estéril libre de RNAsas y cuantificado espectrofotométricamente. El RNA con absorbancias entre 1.8-2.0 y de 2.0-2.2 (a longitudes de onda de 260/280 y de 260/230, respectivamente) se emplearon para la retrotranscripción a cDNA.

7.5. Retrotranscripción (RNA→cDNA)

Teniendo como molde la cadena de RNA total se empleó la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen 28025-013) para sintetizar DNA complementario (cDNA). La reacción se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, al tubo de reacción se le adicionaron Random primers (250 ng), Mix dNTP 10 mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) y se incubó a 65 °C/5 min. Posteriormente se adicionó el Buffer 5X y DTT (0.1 M) y se incubó por 2 min/37 °C. Finalmente se adicionó la enzima M-MLV RT (200 Unidades) incubando 10 min/25 °C, 50 min/37 °C y 15 min/70 °C. El cDNA obtenido se empleó para los análisis de expresión mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o qPCR.

7.6. Determinación de la expresión genética por qPCR

Para la medición de la expresión de los genes de nuestro interés, a las muestras de cDNA se les adicionó 5 µL de Master mix (Thermo Scientific #K 0261), 3 µL de agua estéril libre de RNAsas, 0.5 µL de la sonda del gen de interés, 1 µL de sonda 18sRNA (4319413E) y 1 µL de cDNA, cada reacción se realizó en un volumen final de 10 µL. Para cada muestra se realizaron determinaciones por triplicado. Los genes evaluados fueron: *mxl-3* (Ce02502898), *sbp-1* (Ce02453004), *lipl-1* (Ce02483362), *lipl-3* (Ce02470373), *fasn-1* (Ce02411650), *pod-2* (Ce02427721), *fat-2* (Ce24699363), *fat-5* (Ce0248493), *fat-7* (Ce02977066) de Applied Biosystems (TaqMan®). La reacción de qPCR se realizó bajo las condiciones estándar empleando el equipo StepOnePlus™

Real-Time PCR System mediante el StepOne™ Software v2.2. El nivel de mRNA fue normalizado al del gen endógeno Eukaryotic 18s rRNA (4319413E). Los resultados obtenidos se analizaron mediante el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) comúnmente conocido como el "Delta Delta CT" ($\Delta\Delta CT$) (Livak & Schmittgen, 2001), que hace una estimación de la amplificación del gen de la condición problema respecto a la expresión del gen de referencia y el gen en la condición control.

7.7. Fijación de nematodos

Para evaluar a los nematodos mediante la microscopia confocal, primero se realizó la fijación con paraformaldehído empleando el método descrito por Ed Harlow *et. al.* (Harlow & Lane, 2006). Para este fin, los nematodos provenientes de los tratamientos requeridos se recolectaron con buffer M9 frío y se realizaron al menos tres lavados hasta eliminar el exceso de bacteria. Posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X/0.05 % TritonX-100, y se les añadió buffer de fijación preparado en fresco (Anexo) y Paraformaldehído 4% en PBS 1X, se realizaron dos ciclos de congelación/descongelación en Nitrógeno líquido/Baño maría 60 °C, seguidamente se incubaron a 4 °C/24 horas. Terminado el tiempo de incubación, los nematodos se lavaron con buffer y se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora, después se lavaron con PBS 1X/0.05 % TritonX-100. Se adicionó 0.03 % H₂O₂ en 20 mM de Borato de Sodio e incubaron por 15 min. Las muestras se lavaron tres veces con PBS 1X/0.05 % TritonX-100 y se colocaron sobre portaobjetos preparados con agarosa 2 % para ser analizados.

7.8. Tinción de Lípidos con ORO

Para evaluar sumicuantitativamente la cantidad de lípidos acumulados en los nematodos *in vivo*, se realizó una tinción de lípidos neutros empleando Rojo Oleoso O (ORO, SIGMA-ALDRICH O0625). El colorante fue preparado en Isopropanol al 60 % a una concentración de 50 mg/mL. Posteriormente la solución fue filtrada y a los nematodos se les adicionó la solución ORO/Isopropanol y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente los nematodos fueron lavados con PBS 1X tres veces para eliminar el exceso de colorante. Los nematodos teñidos se colocaron en porta objetos preparados con agarosa 2 % para su observación en microscopio confocal.

7.9. Tinción de núcleos con DAPI

Los núcleos celulares pueden ser observados fácilmente mediante la tinción con 4, 6-dimidina-2-phenylidole dihydrochloride (DAPI, SIGMA D8417). Se preparó una solución stock de 20 mg/mL en agua bidestilada, el reactivo y la solución stock fueron almacenados a -4° C protegidos de la luz. A los nematodos fijados se les adicionaron 10 µL de la solución stock (DAPI 20 mg/mL) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min protegidos de la luz, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1X y se

colocaron en portaobjetos preparados con agarosa 2 % para ser observados en el microscopio confocal.

7.10. Análisis de fluorescencia por Microscopía confocal

Se empleó el microscopio confocal FlowView TM 1000 de Olympus® para observar las muestras de nematodos fijados y teñidos, se establecieron las condiciones de fluorescencia en cada objetivo. En cada muestra se evaluaron al menos 10 nematodos individuales en los objetivos de 60X y 100X.

7.11. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados al menos con tres repeticiones. Se utilizó la prueba de ANOVA de una cola con post-test de Bonferroni para identificar las diferencias significativas entre los datos pareados entre los diferentes grupos. Los datos se expresan como medias de las muestras \pm error estándar. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$.

8. Resultados

8.1. MXL-3 promueve la acumulación de lípidos en *C. elegans* por la exposición a elevadas concentraciones de glucosa

Para investigar si en *C. elegans* el factor transcripcional MXL-3 participa en el aumento de lípidos a causa de un exceso de glucosa en la dieta, se realizó un análisis semicuantitativo determinando la cantidad de los lípidos mediante la tinción con el colorante Rojo Oleoso O (ORO). Para este fin, los nematodos de la cepa silvestre N2 y de la cepa mutante del gen *mxl-3* (con una delección de 955 pares de bases), se expusieron a una dieta que contenía 100 mM de glucosa durante 24 horas.

Consistente con reportes anteriores (Moreno-Arriola et al., 2016), se encontró que los nematodos N2 tienen aumentada la cantidad de lípidos neutros (visualizados como gotas de lípidos por ORO), es decir la intensidad de la tinción de ORO por exposición a exceso de glucosa, aumentó significativamente en comparación a la condición control (**Figura 12 A**). En el presente trabajo también se determinó si la acumulación de lípidos por el exceso de glucosa estaba influenciada por el factor transcripcional MXL-3. Los resultados muestran que la pérdida de la función de MXL-3, a través de una mutación en la cepa RB1588 (*mxl-3/ok1947*), redujo significativamente la tinción con ORO en comparación con la cepa tipo silvestre N2 cuando se alimentaron sólo con *E. coli* OP50-1 (**Figura 12 A y 12 B**), sugiriendo un papel importante de MXL-3 en la homeostasis de lípidos en condiciones basales. Particularmente, en la cepa carente de MXL-3 (*mxl-3/ok1947*) no se observó el aumento en la concentración de lípidos como

ocurre con la dieta excedente de glucosa (**Figura 12 B**). En suma, estos resultados indican que el factor transcripcional MXL-3 media la acumulación de lípidos en respuesta a altas concentraciones de glucosa.

8.2. La metformina disminuye la acumulación de lípidos a través de MXL-3

La metformina, es un fármaco de prescripción médica para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II y obesidad; sus efectos benéficos, en parte se deben a la disminución en la concentración de lípidos almacenados (Shaw, 2013).

Para evaluar si la metformina evita la acumulación de lípidos dependientes de las altas concentraciones de glucosa, los nematodos de la cepa N2 fueron expuestos simultáneamente a glucosa 100 mM y metformina 50 mM durante 24 horas. Se encontró que durante la coadministración de metformina-glucosa, la metformina impide significativamente el almacenamiento de lípidos aún en presencia de un exceso de glucosa (**Figura 12 A**). Por otra parte, para los nematodos con pérdida del factor transcripcional MXL-3, la metformina fue incapaz de disminuir el contenido de lípidos como ocurre para los N2 (**Figura 12 B**). En conjunto, los datos indican que MXL-3 participa en el almacenamiento de lípidos en respuesta a un excedente de glucosa en la dieta y que para su disminución por metformina se requiere en gran parte del factor transcripcional MXL-3.

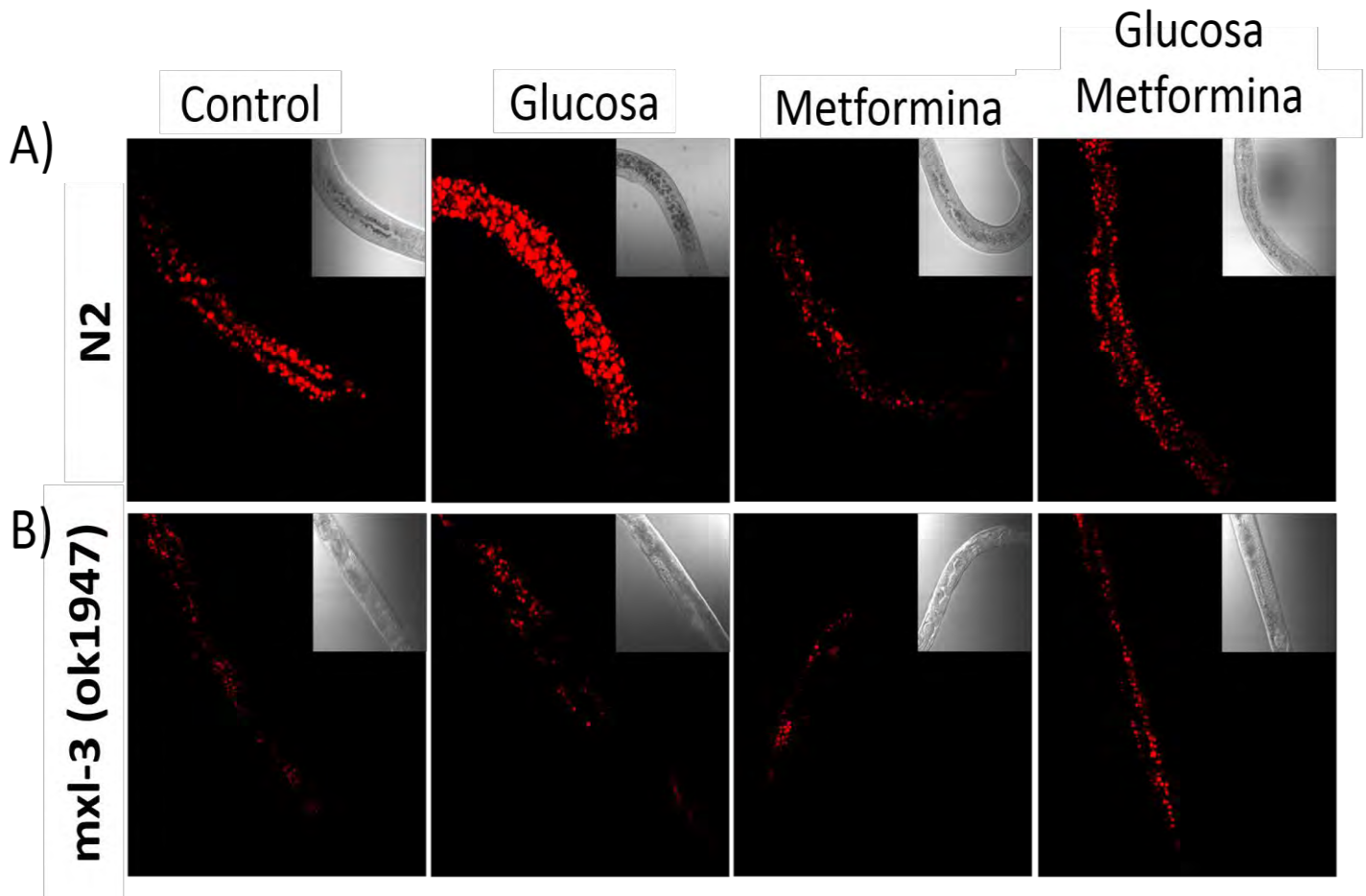


Figura 12. El contenido de lípidos cambia en respuesta a glucosa y metformina a través de MXL-3. A) Nematodos tipo silvestre N2, B) Nematodos carentes del factor transcripcional MXL-3. La tinción con el colorante Rojo Oleoso O (ORO) indica el contenido de lípidos almacenados en el nematodo.

8.3. MXL-3 regula la síntesis de lípidos a través de SBP-1

La síntesis de ácidos grasos ocurre por la incorporación de carbonos derivados de la glucosa a las cadenas de ácidos grasos. El factor transcripcional SBP-1 (SREBP-1c en mamíferos) es un factor clave para la síntesis de lípidos, a través de la inducción de genes lipogénicos (Eberle et al., 2004). En un estudio masivo previo, en el que se evaluó la actividad de diversos factores transcripcionales, se encontró que MXL-3 regula

positivamente la expresión de SBP-1 (MacNeil et al., 2015), lo que sugiere que en presencia de glucosa, MXL-3 podría modular la síntesis de lípidos a nivel transcripcional a través de SBP-1. Para poder establecer una posible relación entre ambos factores transcripcionales, se midió el nivel de expresión del mRNA de *mxl-3* en condiciones de exceso de glucosa. Como se muestra en la **(Figura 13)**, los resultados indican una marcada sobre expresión del mRNA de *mxl-3* en nematodos silvestres N2 posterior a la exposición de glucosa por 24 horas, en comparación con los nematodos cultivados bajo condiciones estándar. Asimismo, aunque no fue estadísticamente significativa, la expresión de *mxl-3* con metformina tiende a disminuir mientras que impide su aumento en la coadministración con glucosa **(Figura 13)**. Estos resultados sugieren un aumento en la actividad de éste factor transcripcional debido al incremento en la abundancia de su mRNA y que metformina podría inhibir su inducción.

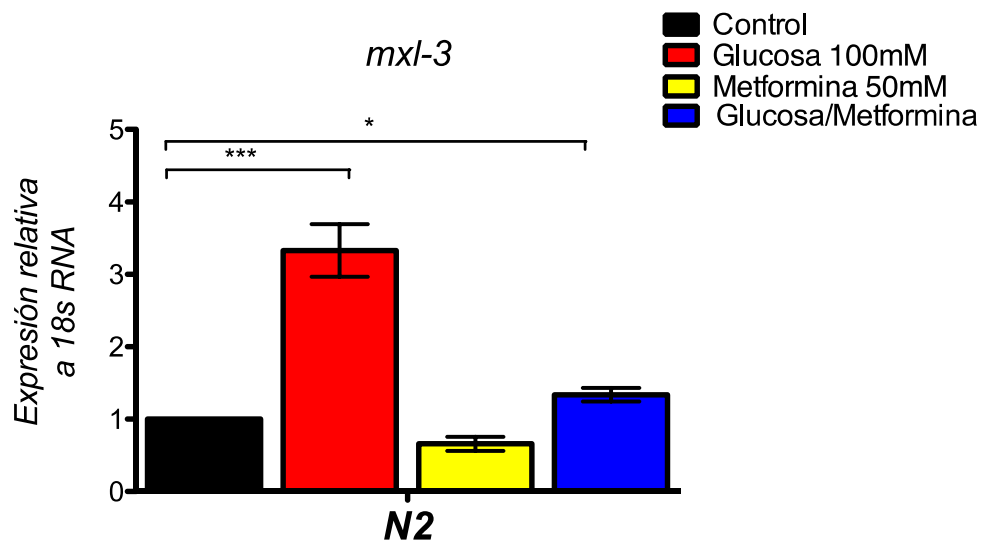


Figura 13. Efecto del exceso de glucosa y metformina sobre la expresión de *mxl-3*. Nematodos N2 expuestos a 100 mM de glucosa, 50 mM de metformina y la mezcla de ambas (glucosa/metformina, 100 mM y 50 mM respectivamente) por 24 horas. ANOVA de una cola con post test de Bonferroni, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$. Software GraphPad Prism 5.

Anteriormente se ha demostrado que MXL-3 puede cambiar su localización subcelular entre el citoplasma y el núcleo en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y que su localización está íntimamente ligada con su actividad (O'Rourke & Ruvkun, 2013), por lo tanto; es plausible hipotetizar que la administración de glucosa afecta su localización celular. Para analizar si el exceso de glucosa promueve un desplazamiento núcleo-citoplasma de MXL-3, se cultivaron nematodos transgénicos que tienen fusionada al factor MXL-3 la proteína verde fluorescente (GFP) (MXL-3::GFP, cepa UL1485) en condiciones control y de alta glucosa por 24 horas. Los resultados mostraron que el exceso de glucosa provoca una importante acumulación de MXL-3::GFP en el núcleo en comparación con el grupo control, sugiriendo que la glucosa favorece la entrada del factor transcripcional a los núcleos y posiblemente aumenta su actividad reguladora **(Figura 14)**. En concordancia con su nivel de expresión, MXL-3::GFP también altera su ubicación nucleo-citoplasmática con metformina, excluyéndolo casi en su totalidad del núcleo y la adición de glucosa-metformina biparticiona su ubicación de manera similar al control **(Figura 14)**.

Debido a la acumulación nuclear de MXL-3::GFP por la glucosa, se evaluó si el desplazamiento núcleo-citoplasma es necesario para aumentar la actividad MXL-3 y, por tanto, modificar la expresión de su gen blanco sugerido, *sbp-1*. Los resultados indican que similar a como ocurre con MXL-3 y en línea con hallazgos previos, la alta concentración de glucosa incrementa marcadamente la expresión del mRNA de SBP-1 en nematodos N2 **(Figura 15)**.

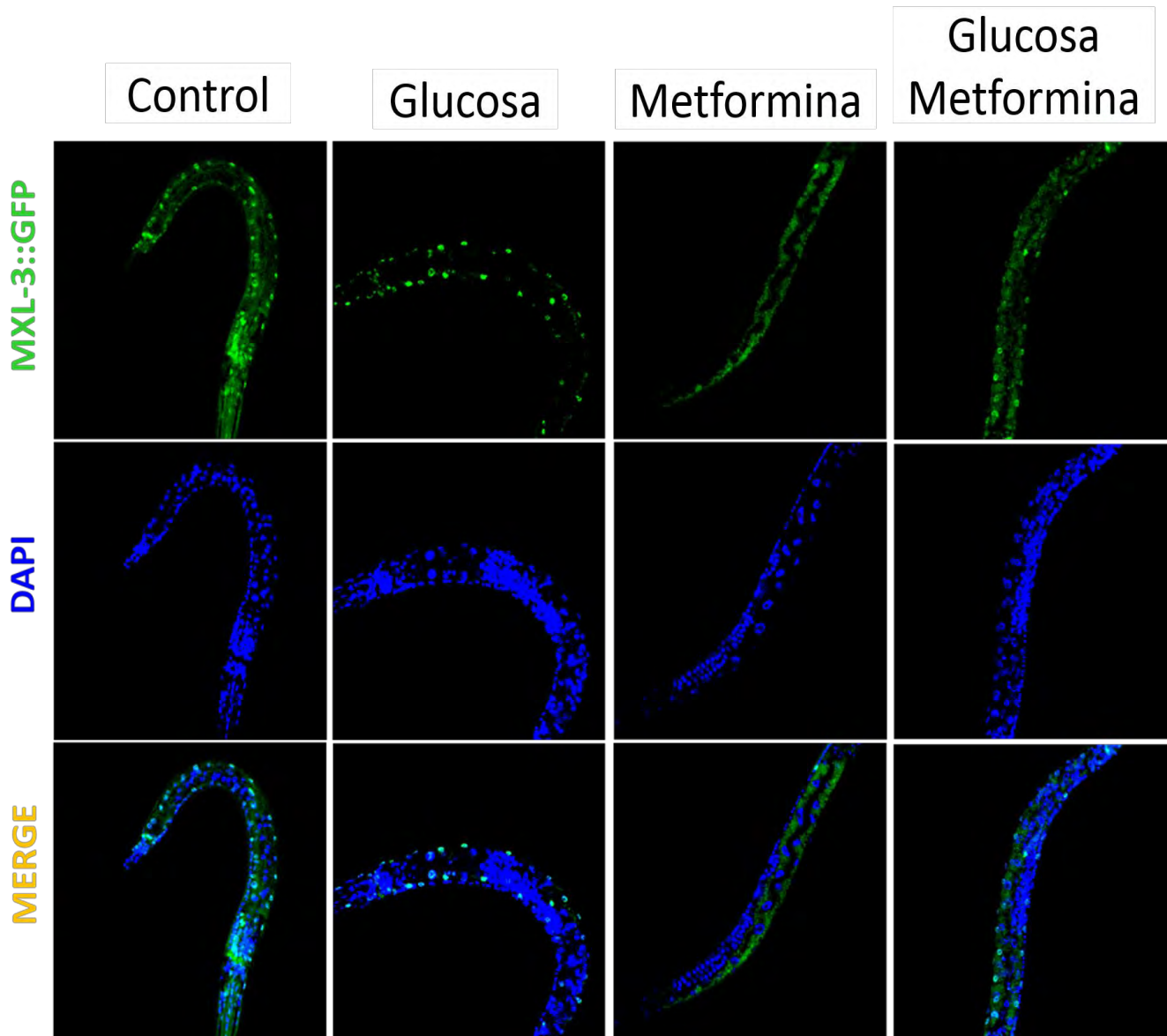


Figura 14. Localización subcelular de MXL-3 en respuesta a glucosa y metformina. La glucosa promueve la localización nuclear de MXL-3, mientras que la metformina lo excluye. En verde se muestra a MXL-3::GFP, en azul a los núcleos teñidos con DAPI y en cian el empalme de ambos.

Para establecer con mayor precisión si el aumento de la expresión de *sbp-1* por glucosa, es en parte debido al incremento de MXL-3, se determinó el nivel de expresión del mRNA de *sbp-1* en la cepa mutante de *mxl-3* (*ok1947*) tratada con exceso de glucosa. Los

resultados obtenidos evidencian que MXL-3 es necesario para la completa expresión de *sbp-1*, porque en la cepa mutante de *mxl-3* con exceso de glucosa no se activó la expresión de *sbp-1* (Figura 15).

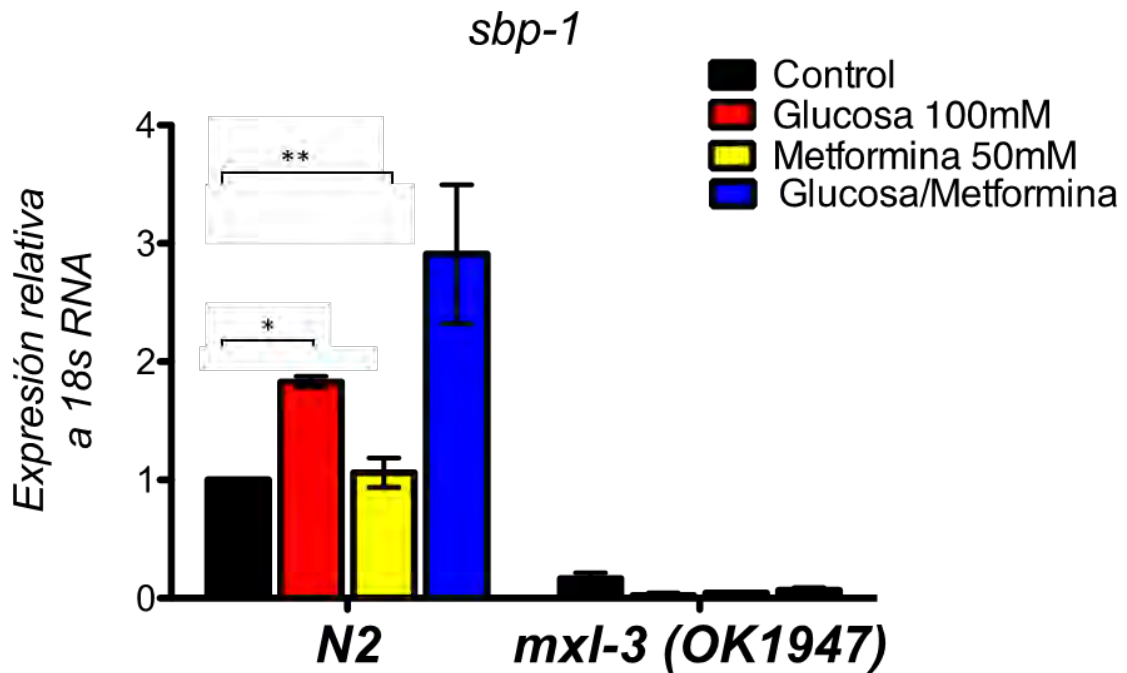


Figura 15. La expresión de *sbp-1* es alterada por glucosa y metformina y es dependiente de MXL-3. Nematodos N2 y *mxl-3* (*ok1947*) expuestos a 100 mM de glucosa, 50 mM de metformina y la mezcla de ambas (glucosa/metformina, 100 mM y 50 mM respectivamente) por 24 horas. ANOVA de una cola con post test de Bonferroni, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$. Software GraphPad Prism 5.

8.4. Regulación de genes lipogénicos dependientes de SPB-1 a través de MXL-3

C. elegans tiene una vía conservada para la síntesis de ácidos grasos a través SBP-1 (Nomura et al., 2010). Este factor transcripcional regula la expresión de genes lipogénicos, tales como acetil-CoA carboxilasa (*pod-2*), sintasa de ácidos grasos (*fasn-1*) y esteroil-CoA desaturasas (*fat-2*, *5*, *7*) (Nomura et al., 2010), además como se mostró anteriormente, la expresión de *sbp-1* es dependiente de MXL-3 (**Figura 15**).

Para determinar si el exceso de glucosa afecta la expresión de éstos genes en *C. elegans* (*pod-2*, *fasn-1*, *fat-2*, *fat-5* y *fat-7*), y si MXL-3 participa en su regulación al modular a SBP-1, se determinó su expresión en nematodos N2 y en la cepa mutante de *mxl-3* (*ok1947*) expuestos a un exceso de glucosa y metformina durante 24 horas. Consistente con los reportes anteriores (D. Lee et al., 2015; Nomura et al., 2010), los datos obtenidos muestran que los cinco genes fueron regulados en respuesta a la alta glucosa en los animales N2, mientras que la metformina inhibió la incrementada expresión en la mayoría de los genes, excepto para *fat-5* y *fat-7* (**Figura 16**). Por el contrario, en los nematodos de la cepa mutante de *mxl-3* (*ok1947*), no se observó el aumento en la expresión de los genes *fasn-1*, *fat-2* y *pod-2* sometidos a las mismas condiciones experimentales, lo que sugiere que MXL-3 es importante para promover la expresión de éstos genes y posiblemente la síntesis de lípidos (**Figura 16**). Finalmente, las desaturasas *fat-5* y *fat-7*, que participan en la desaturación de ácidos grasos para generar ácidos grasos insaturados, mostraron aumentada la expresión aún en la ausencia de MXL-3 y es similar al tratamiento con metformina (**Figura 16**), sugiriendo que otros reguladores podrían ser

los responsables de estos hallazgos. Los resultados obtenidos, sugieren que MXL-3 podría tener un papel importante previamente no identificado sobre el metabolismo de los lípidos después de una exposición a un exceso de glucosa.

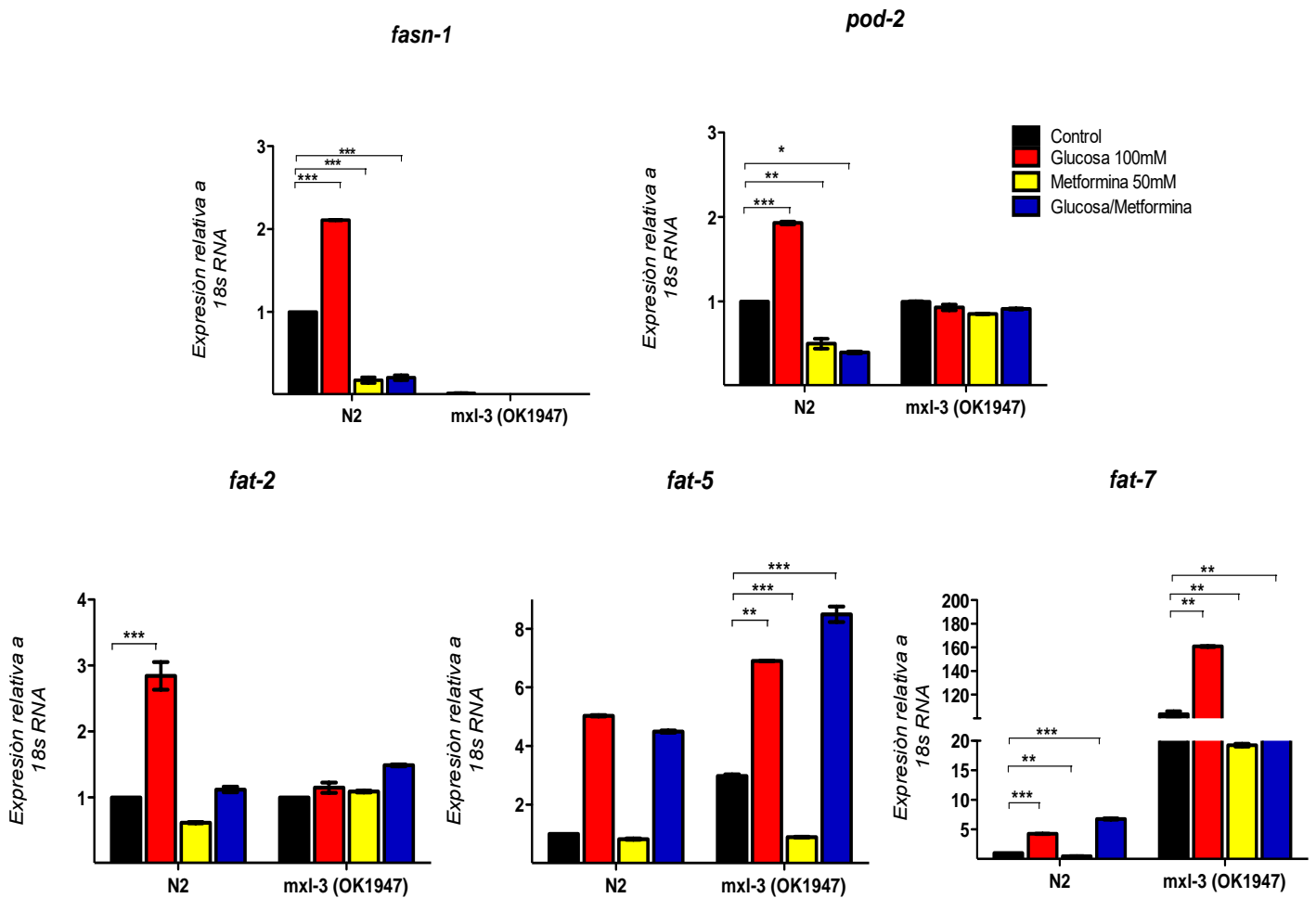


Figura 16. Expresión de genes lipogénicos modulados por la glucosa a través de MXL-3. Nematodos N2, *mxl-3* (ok1947) y *sbp-1* (ok2363) expuestos a glucosa 100mM, Metformina 50mM y glucosa/Metformina por 24 horas. Nivel de expresión de *fasn-1*, *pod-2*, *fat-2*, *fat-5* y *fat-7* realizado por qPCR. ANOVA de una cola con post test de Bonferroni, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$. Software GraphPad Prism 5.

8.5. MXL-3 media la movilización lipídica a través de lipasas lisosomales

La lipólisis intracelular de los TAGs es realizada principalmente por las lipasas neutras y ácidas en *C. elegans* (O'Rourke & Ruvkun, 2013). Previamente se ha demostrado que dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, MXL-3 regula negativamente específicamente a las lipasas lisosomales *lipl-1* y *lipl-3*, que son esenciales para la degradación de lípidos de almacén a través de la lipofagia (O'Rourke & Ruvkun, 2013). Por esta razón, fue evaluada la expresión de *lipl-1* y *lipl-3*. Como se mostró anteriormente, la expresión de *mxl-3* fue regulada por la alta glucosa y metformina (**Figura 12**). Consistente con la función inhibidora de MXL-3 sobre *lipl-1* y *lipl-3*, y desde que la glucosa aumenta su localización nuclear con alta glucosa (**Figura 13**), la expresión de las lipasas disminuyó significativamente; mientras que tuvo un efecto contrario en el tratamiento con metformina al incrementar la expresión de ambos genes (**Figura 16**). Inesperadamente, la glucosa-metformina no aumentó la expresión de *lipl-3* como sí ocurrió para *lipl-1* (**Figura 16**). Similar con lo ya reportado (O'Rourke & Ruvkun, 2013), la mutación de *mxl-3* desreprime a *lipl-1* en todas las condiciones experimentales evaluadas en éste trabajo, al exhibir un aumento en la expresión del su RNA mensajero (**Figura 16**), sin embargo, esto no ocurre para la *lipl-3*. Éste resultado aunado hecho de que la administración de glucosa-metformina no altera su expresión, sugiere que otro elemento aún desconocido podría estar regulando la expresión genética de *lipl-3*.

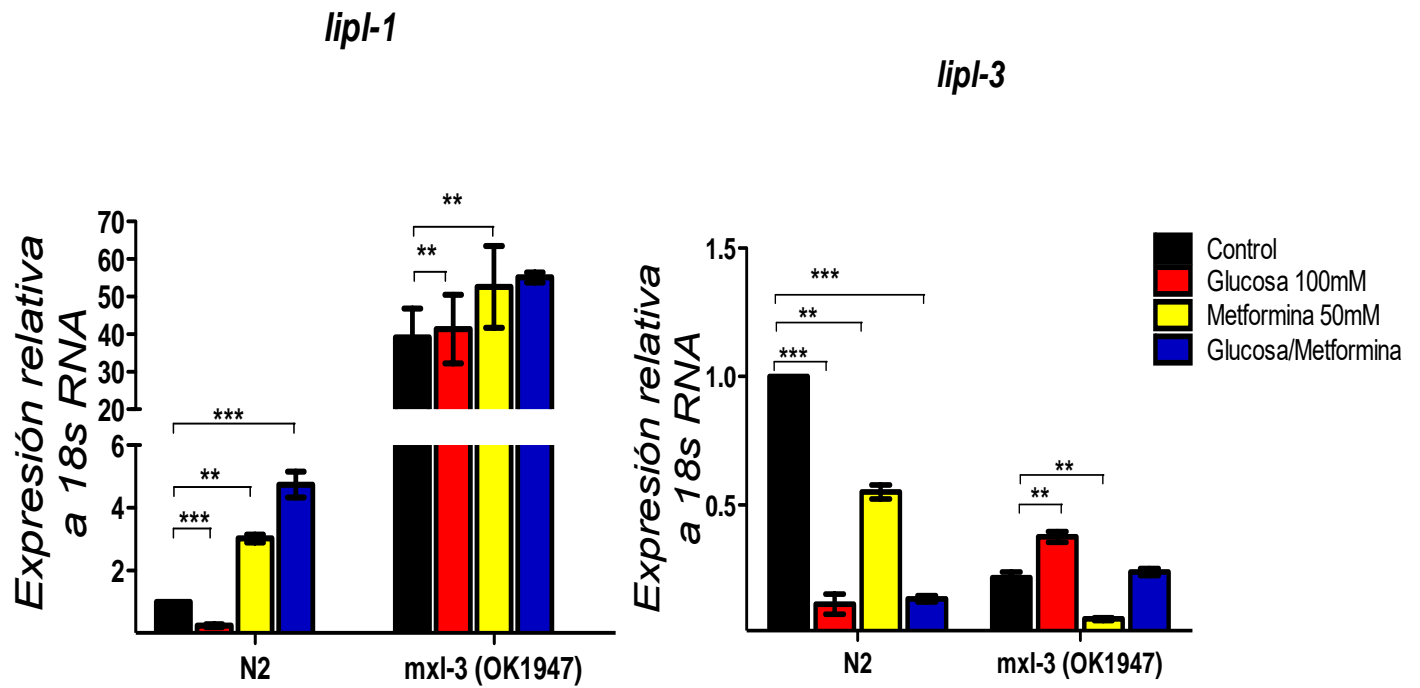


Figura 17. La expresión de las lipasas lisosomales *lip1-1* y *lip1-3* es alterada por glucosa y metformina. Nematodos N2 expuestos a 100 mM de glucosa, 50 mM de metformina y la mezcla de ambas (glucosa/metformina, 100 mM y 50 mM respectivamente) por 24 horas. ANOVA de una cola con post test de Bonferroni, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$. Software GraphPad Prism 5.

9. Discusión

El metabolismo de la glucosa es un proceso fundamental para la obtención de energía en forma de ATP, sin embargo; su desregulación desencadena enfermedades metabólicas tales como la obesidad y la diabetes. Los resultados de éste trabajo sugieren una importante función, previamente no descrita del factor transcripcional MXL-3, al coordinar transcripcionalmente una respuesta adaptativa a concentraciones elevadas de glucosa modulando el metabolismo de lípidos en *C. elegans*.

La familia de los factores MYC, está compuesta de factores transcripcionales tipo cremallera de leucina básica en forma de hélice-bucle-hélice (bHLHZip) que son importantes reguladores de varias funciones biológicas como: el crecimiento celular, la proliferación y el metabolismo energético (Zornig & Evan, 1996). *C. elegans* posee 42 factores de transcripción de bHLHZip, que incluyen una red de interacción entre diferentes miembros de MYC (Pickett et al., 2007). Dicha red está compuesta por cuatro genes, que cuentan con su ortólogo en mamíferos, el *mml-1* (que es similar a MYC y MONDO), el *mxl-2* (MLX), el *mxl-3* (MAX) y el *mdl-1* (MAD) (Johnson et al., 2014).

De forma similar a los homólogos de mamíferos, los miembros de la red de interacción MYC de *C. elegans* forman heterodímeros obligados que se unen a una serie de secuencias llamadas caja E (E-box, CANNTG) para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco (McFerrin & Atchley, 2011). El factor transcripcional MXL-3 que codifica para un ortólogo de MAX (McFerrin & Atchley, 2011; Pickett et al., 2007), no es capaz de heterodimerizar, como si ocurre en mamíferos, ya que no interactúa con los otros miembros como MYC, MONDO o MAD en *C. elegans*, lo que implica que las funciones

MXL-3 son distintas a la red de interacción MYC-MONDO/MAD de mamíferos (Grandori et al., 2000).

En mamíferos, una característica unificada del factor transcripcional MAX, es su función como regulador de la transcripción en respuesta a glucosa. Específicamente, el heterocomplejo MAX/MYC se une a cajas E presentes en genes relacionados al metabolismo de glucosa, entre otros (Collier et al., 2007). De hecho, se ha evidenciado que células pancreáticas que se expusieron a elevadas concentraciones de glucosa, aumenta tanto la expresión del gen *MAX*, así como su asociación con MYC para activar genes glucolíticos, entre los que se encuentran la lactato deshidrogenasa (*LDH*), la piruvato cinasa hepática (*L-PK*) y la piruvato deshidrogenasa (*PDK-1*). Es de resaltar que estos factores transcripcionales también incrementaron la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos como la acetil-CoA carboxilasa (*ACC*), la sintasa de ácidos grasos (*FASN*) y la esteroil-CoA desaturasa (*SCD*) (Collier et al., 2007).

Como homodímero, el factor transcripcional MXL-3, es capaz de regular negativamente la expresión de enzimas que degradan lípidos en los lisosomas en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (O'Rourke & Ruvkun, 2013). Bajo esta premisa, hipotetizamos que MXL-3 podría estar involucrado en el control de la acumulación de lípidos mediada por la glucosa. Como fue demostrado por O'Rourke *et al*, MXL-3 puede alterar su ubicación subcelular en respuesta a nutrientes, es decir; cuando existe una escasez de éstos, MXL-3 se localiza principalmente en el citoplasma y sus genes blanco (*lip1-1* y *lip1-3*) son des-reprimidos para facilitar eficientemente la degradación de lípidos (O'Rourke & Ruvkun, 2013). Adicionalmente, los resultados en éste trabajo obtenidos

mostraron que la ubicación intracelular de MXL-3 cambia en respuesta a la glucosa. En los nematodos expuestos a altas concentraciones de glucosa por 24 horas, MXL-3, que lleva a la proteína verde fluorescente unida e indica su localización celular *in vivo* (MXL-3::GFP), se ubicó principalmente en el núcleo; este resultado es reminiscente a lo observado con el heterocomplejo MAX-MYC de mamíferos. Lo que indica que la glucosa activa eficientemente a MXL-3 y reprime a las lipasas lisosomales. Consistente con la ubicación nuclear de MXL-3 por glucosa, los resultados mostraron una disminución de la expresión de los genes *lip1-1* y *lip-3*, lo que apoya a la hipótesis de que el exceso de glucosa promueve la translocación nuclear de MXL-3 y la represión de enzimas que modulan la hidrólisis de lípidos, por lo tanto al estar reprimidas, el nematodo tiene aumentada la acumulación de lípidos. Este hallazgo sugiere que el ortólogo evolutivamente conservado en mamíferos MAX, podría tener un importante rol en la generación de enfermedades metabólicas como la obesidad, y que plausiblemente podría ser considerado como una proteína blanco de terapias farmacológicas. En otros estudios se propone que MXL-3 funciona en coordinación con otro factor transcripcional, el HLH-30 cuya función es independiente de otras vías de señalización que controlan el metabolismo de lípidos y la longevidad como la vía de la de insulina (Monsalve et al., 2013), reforzando la idea de que MXL-3/MAX, podría ser un regulador del metabolismo energético cuya regulación genética es diferente de la vía de insulina y que podría explicar por qué durante la resistencia a insulina, los organismos siguen teniendo excesiva acumulación de lípidos.

La metformina, es un fármaco comúnmente recetado en todo el mundo para tratar enfermedades metabólicas como la diabetes y obesidad. Un estudio realizado por

nuestro grupo, evidenció que la metformina disminuye la concentración de lípidos en *C. elegans* y el grupo de Onken *et al.* demostró que en éste organismo la metformina produce un tipo de restricción dietaría (Moreno-Arriola *et al.*, 2016; Onken & Driscoll, 2010). Los resultados aquí presentados, evidenciaron que la metformina también es capaz de modular la ubicación de MXL-3 excluyéndolo del núcleo y sugieren que éste fármaco disminuye los lípidos de almacén en *C. elegans* vía la inhibición de la función de MXL-3. Este resultado es congruente con el descubrimiento de que la mutación de MXL-3 evita que la metformina disminuya el contenido de lípidos tal como ocurre en los animales tipo silvestre N2. Los resultados obtenidos son consistentes con los reportes previos de O'Rourke *et al.*, donde demuestra que la restricción dietética provoca la exclusión nuclear de MXL-3, y debido a que la metformina mimetiza la restricción dietética, es plausible sugerir que la disminución de los lípidos por metformina se deba en gran medida al factor transcripcional MXL-3, un mecanismo de control metabólico desconocido hasta antes de éste trabajo.

En publicaciones recientes, se reportó que MXL-3 puede alterar la ubicación celular de DAF-16/FOXO, un factor transcripcional que se transloca al núcleo para regular la expresión de genes que modulan el metabolismo de lípidos. En abundancia de nutrientes DAF-16 se localiza principalmente en el citoplasma, sin embargo, la pérdida de MXL-3 promueve su translocación nuclear (Gruner *et al.*, 2016), indicando una relación entre ambos factores transcripcionales durante un estrés metabólico. DAF-16 activa la expresión de la subunidad reguladora gamma de la AMPK (Chen *et al.*, 2013; Tullet *et al.*, 2014), una cinasa heterotrimérica crítica que mantiene la homeostasis energética en condiciones de baja energía (por ejemplo en un ayuno o por activación farmacológica

con metformina) a través del aumento de la oxidación de lípidos (β -oxidación). Además, DAF-16 es fosforilado y activado por AMPK (Chen et al., 2013), indicando la presencia de un “circuito” de retroalimentación positiva. DAF-16 también es capaz de modular otros elementos reguladores, dentro de los que se encuentra al factor transcripcional NHR-49, que al activarlo favorece el metabolismo oxidativo de lípidos (Ratnappan et al., 2014). En conjunto, basados en la información hasta hoy conocida y en la generada en este trabajo, es plausible sugerir que la metformina al activar a la AMPK, aún en presencia de altas concentraciones de glucosa, podría inhibir la activación de MXL-3 que conlleve a la translocación de DAF-16 y active transcripcionalmente a NHR-49 que finalmente active genes indispensables para la β -oxidación y desaturación ácidos grasos desencadenando una la disminución sistémica del contenido de lípidos aunado a la desinhibición de las lipasas ácidas y favoreciendo la movilización y utilización de los lípidos almacenados.

En mamíferos las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs), son factores transcripcionales que controlan el metabolismo de lípidos (Eberle et al., 2004). La dieta alta en carbohidratos activa a los SREBPs que inducen la regulación de genes lipogénicos como *ACC*, *FAS* y *SCD1* (Shimano, 2001). En *C. elegans* el ortólogo de SREBPs, *SBP-1*, también controla el metabolismo de lípidos a través de un mecanismo conservado a los mamíferos (Nomura et al., 2010). En un estudio de análisis masivo de diversos factores transcripcionales se reveló que MXL-3 puede regular positivamente a *spb-1* (MacNeil et al., 2015). Basados en esta observación, hipotetizamos que el aumento del contenido lipídico en *C. elegans* podría estar influenciado por MXL-3 a través de *SBP-1*. Los resultados de este trabajo confirman que el exceso de glucosa aumenta la expresión de *spb-1* y de algunos de genes lipogénicos

blanco tales como *pod-2* y *fasn-1*, sin embargo en nematodos que carecen del factor transcripcional MXL-3, su expresión se observó significativamente reducida, sugiriendo que MXL-3 modula el acúmulo de lípidos por exposición a glucosa conformando un eje regulador que comprenden los factores transcripcionales MXL-3 y SBP-1 no contemplado previamente en la regulación metabólica.

10. Conclusión

Esta investigación muestra que el exceso de glucosa promueve la síntesis de lípidos e inhibe la lipólisis por la activación del factor transcripcional MXL-3. La activación de MXL-3 regula negativamente a genes *lip1-1* y *lip1-3*, que codifican para enzimas que activan la lipólisis lisosomal, también llamada lipofagia, y al estar inactivadas provocan la acumulación de lípidos. Mientras que la metformina ejerce efectos contrarios al excluir del núcleo a MXL-3 y así evitar la represión de la lipofagia, además de impedir la expresión de SBP-1 y de sus genes blanco que controlan la síntesis de lípidos (**Figura 18**). Éste hallazgo podría representar una plausible alternativa al mecanismo de acción de la metformina.

En base al presente trabajo se propone al factor transcripcional MXL-3 como un posible mediador de los efectos deletéreos producidos por la excesiva concentración de glucosa, que representa un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas a los desórdenes energéticos por el consumo excesivo de calorías, tal como la diabetes y la obesidad.

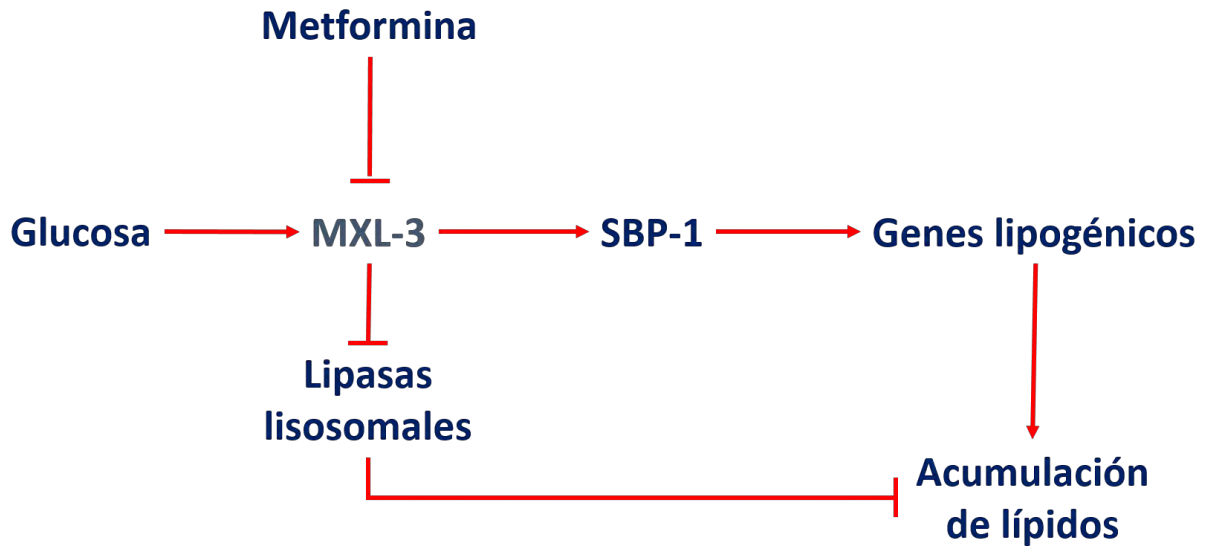


Figura 18. Modelo de acción de MXL-3 sobre la acumulación de lípidos. Concentraciones elevadas de glucosa, promueve la síntesis y activación de MXL-3, que a través de SBP-1, aumenta la síntesis de lípidos. Activación de MXL-3 promueve la inhibición de las lipasas lisosomales que degradan lípidos almacenados y por ende el aumento en los lípidos de almacén. El tratamiento con metformina bloquea estos efectos al inhibir a MXL-3.

11. Referencias

- Adhikary, S., & Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8), 635-645. doi: 10.1038/nrm1703
- Ashrafi, K. (2006). Mapping out starvation responses. *Cell Metab*, 3(4), 235-236. doi: 10.1016/j.cmet.2006.03.002
- Ashrafi, K. (2007). Obesity and the regulation of fat metabolism. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *WormBook*, 1-20. doi: 10.1895/wormbook.1.130.1
- Atherton, H. J., Jones, O. A., Malik, S., Miska, E. A., & Griffin, J. L. (2008). A comparative metabolomic study of NHR-49 in *Caenorhabditis elegans* and PPAR-alpha in the mouse. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Febs Letters*, 582(12), 1661-1666. doi: 10.1016/j.febslet.2008.04.020
- Benhamed, F., Denechaud, P. D., Lemoine, M., Robichon, C., Moldes, M., Bertrand-Michel, J., . . . Postic, C. (2012). The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. [Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Invest*, 122(6), 2176-2194. doi: 10.1172/JCI41636
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94.
- Cabarcas, S. M., Hurt, E. M., & Farrar, W. L. (2010). Defining the molecular nexus of cancer, type 2 diabetes and cardiovascular disease. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, N.I.H., Intramural Review]. *Curr Mol Med*, 10(8), 744-755.

- Cabreiro, F., Au, C., Leung, K. Y., Vergara-Irigaray, N., Cocheme, H. M., Noori, T., Gems, D. (2013). Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell*, 153(1), 228-239. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.035
- Collier, J. J., Zhang, P. L., Pedersen, K. B., Burke, S. J., Haycock, J. W., & Scott, D. K. (2007). c-Myc and ChREBP regulate glucose-mediated expression of the L-type pyruvate kinase gene in INS-1-derived 832/13 cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(1), E48-E56. doi: 10.1152/ajpendo.00357.2006
- Comino-Mendez, I., Gracia-Aznarez, F. J., Schiavi, F., Landa, I., Leandro-Garcia, L. J., Leton, R., . . . Cascon, A. (2011). Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Genet*, 43(7), 663-667. doi: 10.1038/ng.861
- Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L., & Eisenman, R. N. (2014). An overview of MYC and its interactome. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(1), a014357. doi: 10.1101/cshperspect.a014357
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans* (vol 200, pg 387, 2015). *Genetics*, 201(1), 339-339.
- Chen, D., Li, P. W., Goldstein, B. A., Cai, W., Thomas, E. L., Chen, F., Kapahi, P. (2013). Germline signaling mediates the synergistically prolonged longevity produced by double mutations in *daf-2* and *rsk-1* in *C. elegans*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Rep*, 5(6), 1600-1610. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.018

- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. [Review]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 7, 30. doi: 10.3389/fendo.2016.00030
- Deline, M. L., Vrablik, T. L., & Watts, J. L. (2013). Dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids in *Caenorhabditis elegans*. [Research Support, N.I.H., Extramural Video-Audio Media]. *J Vis Exp*(81). doi: 10.3791/50879
- Dentin, R., Pegorier, J. P., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferre, P., Fauveau, V., Postic, C. (2004). Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20314-20326. doi: 10.1074/jbc.M312475200
- Di Cesare, M., Bentham, J., Stevens, G. A., Zhou, B., Danaei, G., Lu, Y., NCD, N. R. F. C. (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*, 387(10026), 1377-1396.
- Diolaiti, D., McFerrin, L., Carroll, P. A., & Eisenman, R. N. (2015). Functional interactions among members of the MAX and MLX transcriptional network during oncogenesis. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Biochim Biophys Acta*, 1849(5), 484-500. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.05.016
- Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., & Fofelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. [Review]. *Biochimie*, 86(11), 839-848. doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.018
- Felix, M. A., & Braendle, C. (2010). The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 20(22), R965-R969. doi: DOI 10.1016/j.cub.2010.09.050
- Ferre, P., & Fofelle, F. (2007). SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: Clinical perspective. *Hormone Research*, 68(2), 72-82. doi: 10.1159/000100426

- Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K. M., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2012). Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Pharmacogenet Genomics*, 22(11), 820-827. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283559b22
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., & Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 653-699. doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.653
- Gruner, M., Grubbs, J., McDonagh, A., Valdes, D., Winbush, A., & van der Linden, A. M. (2016). Cell-Autonomous and Non-Cell-Autonomous Regulation of a Feeding State-Dependent Chemoreceptor Gene via MEF-2 and bHLH Transcription Factors. *PLoS Genet*, 12(8), e1006237. doi: 10.1371/journal.pgen.1006237
- Hall, D. H., & Altun, Z. F. (2008). *C. elegans Atlas*. New York: Cold Spring Harbor.
- Harlow, E., & Lane, D. (2006). Fixing Caenorhabditis elegans in Paraformaldehyde. *CSH Protoc*, 2006(4). doi: 10.1101/pdb.prot4522
- Hawley, S. A., Gadalla, A. E., Olsen, G. S., & Hardie, D. G. (2002). The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, 51(8), 2420-2425.
- Hope, I. A. (1999). *C. elegans: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press, Oxford.
- Iizuka, K., Bruick, R. K., Liang, G., Horton, J. D., & Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7281-7286. doi: 10.1073/pnas.0401516101

- Johnson, D. W., Llop, J. R., Farrell, S. F., Yuan, J., Stolzenburg, L. R., & Samuelson, A. V. (2014). The *Caenorhabditis elegans* Myc-Mondo/Mad complexes integrate diverse longevity signals. [Research Support, American Recovery and Reinvestment Act Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS Genet*, *10*(4), e1004278. doi: 10.1371/journal.pgen.1004278
- Jones, K. T., & Ashrafi, K. (2009). *Caenorhabditis elegans* as an emerging model for studying the basic biology of obesity. *Disease Models & Mechanisms*, *2*(5-6), 224-229. doi: 10.1242/dmm.001933
- Lage, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., & Lopez, M. (2008). AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Trends Mol Med*, *14*(12), 539-549. doi: 10.1016/j.molmed.2008.09.007
- Lee, D., Jeong, D. E., Son, H. G., Yamaoka, Y., Kim, H., Seo, K., Lee, S. J. (2015). SREBP and MDT-15 protect *C. elegans* from glucose-induced accelerated aging by preventing accumulation of saturated fat. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Genes Dev*, *29*(23), 2490-2503. doi: 10.1101/gad.266304.115
- Lee, K. Z., Kniazeva, M., Han, M., Pujol, N., & Ewbank, J. J. (2010). The fatty acid synthase *fasn-1* acts upstream of WNK and Ste20/GCK-VI kinases to modulate antimicrobial peptide expression in *C. elegans* epidermis. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Virulence*, *1*(3), 113-122. doi: 10.4161/viru.1.3.10974
- Lemieux, G. A., & Ashrafi, K. (2015). Insights and challenges in using *C. elegans* for investigation of fat metabolism. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *50*(1), 69-84. doi: 10.3109/10409238.2014.959890
- Li, Y., & Paik, Y. K. (2011). A potential role for fatty acid biosynthesis genes during molting and cuticle formation in *Caenorhabditis elegans*. *Bmb Reports*, *44*(4), 285-290. doi: 10.5483/BMBRep.2011.44.4.285

- Lin, C. Y., Loven, J., Rahl, P. B., Paranal, R. M., Burge, C. B., Bradner, J. E., Young, R. A. (2012). Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell*, 151(1), 56-67. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.026
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Ly, K., Reid, S. J., & Snell, R. G. (2015). Rapid RNA analysis of individual *Caenorhabditis elegans*. *MethodsX*, 2, 59-63. doi: 10.1016/j.mex.2015.02.002
- MacNeil, L. T., Pons, C., Arda, H. E., Giese, G. E., Myers, C. L., & Walhout, A. J. (2015). Transcription Factor Activity Mapping of a Tissue-Specific in vivo Gene Regulatory Network. *Cell Syst*, 1(2), 152-162. doi: 10.1016/j.cels.2015.08.003
- Marks, M. S., Heijnen, H. F., & Raposo, G. (2013). Lysosome-related organelles: unusual compartments become mainstream. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Curr Opin Cell Biol*, 25(4), 495-505. doi: 10.1016/j.ceb.2013.04.008
- McFerrin, L. G., & Atchley, W. R. (2011). Evolution of the Max and Mlx networks in animals. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Genome Biol Evol*, 3, 915-937. doi: 10.1093/gbe/evr082
- Monsalve, F. A., Pyarasani, R. D., Delgado-Lopez, F., & Moore-Carrasco, R. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. [Review]. *Mediators Inflamm*, 2013, 549627. doi: 10.1155/2013/549627

- Moreno-Arriola, E., El Hafidi, M., Ortega-Cuellar, D., & Carvajal, K. (2016). AMP-Activated Protein Kinase Regulates Oxidative Metabolism in *Caenorhabditis elegans* through the NHR-49 and MDT-15 Transcriptional Regulators. *PLoS One*, *11*(1). doi: ARTN e0148089 10.1371/journal.pone.0148089
- Morrish, F., Noonan, J., Perez-Olsen, C., Gafken, P. R., Fitzgibbon, M., Kelleher, J., Hockenbery, D. (2010). Myc-dependent mitochondrial generation of acetyl-CoA contributes to fatty acid biosynthesis and histone acetylation during cell cycle entry. *J Biol Chem*, *285*(47), 36267-36274. doi: 10.1074/jbc.M110.141606
- Mullaney, B. C., & Ashrafi, K. (2009). *C. elegans* fat storage and metabolic regulation. [Review]. *Biochim Biophys Acta*, *1791*(6), 474-478. doi: 10.1016/j.bbaliip.2008.12.013
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). New York: W. H. Freeman and Company.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Gakidou, E. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Lancet*, *384*(9945), 766-781. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8
- Nie, Z. Q., Hu, G. Q., Wei, G., Cui, K. R., Yamane, A., Resch, W., Levens, D. (2012). c-Myc Is a Universal Amplifier of Expressed Genes in Lymphocytes and Embryonic Stem Cells. *Cell*, *151*(1), 68-79. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.033
- Nomura, T., Horikawa, M., Shimamura, S., Hashimoto, T., & Sakamoto, K. (2010). Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* is mediated by SREBP homolog SBP-1. *Genes and Nutrition*, *5*(1), 17-27. doi: 10.1007/s12263-009-0157-y

- O'Rourke, E. J., & Ruvkun, G. (2013). MXL-3 and HLH-30 transcriptionally link lipolysis and autophagy to nutrient availability. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Cell Biol*, 15(6), 668-676. doi: 10.1038/ncb2741
- 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. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS One*, 5(1), e8758. doi: 10.1371/journal.pone.0008758
- Pickett, C. L., Breen, K. T., & Ayer, D. E. (2007). A *C. elegans* Myc-like network cooperates with semaphorin and Wnt signaling pathways to control cell migration. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Dev Biol*, 310(2), 226-239. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.07.034
- Ratnappan, R., Amrit, F. R., Chen, S. W., Gill, H., Holden, K., Ward, J., Ghazi, A. (2014). Germline signals deploy NHR-49 to modulate fatty-acid beta-oxidation and desaturation in somatic tissues of *C. elegans*. *PLoS Genet*, 10(12), e1004829. doi: 10.1371/journal.pgen.1004829
- Rimpi, S., & Nilsson, J. A. (2007). Metabolic enzymes regulated by the Myc oncogene are possible targets for chemotherapy or chemoprevention. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 2), 305-310. doi: 10.1042/BST0350305
- Rippe, J. M., & Angelopoulos, T. J. (2016). Sugars, obesity, and cardiovascular disease: results from recent randomized control trials. *Eur J Nutr*. doi: 10.1007/s00394-016-1257-2

- Rtveladze, K., Marsh, T., Barquera, S., Sanchez Romero, L. M., Levy, D., Melendez, G., . . . Brown, M. (2014). Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Public Health Nutr*, *17*(1), 233-239. doi: 10.1017/S1368980013000086
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Compr Physiol*, *4*(1), 177-197. doi: 10.1002/cphy.c130024
- Sato, R. (2010). Sterol metabolism and SREBP activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *501*(2), 177-181. doi: 10.1016/j.abb.2010.06.004
- Schlotterer, A., Kukudov, G., Bozorgmehr, F., Hutter, H., Du, X., Oikonomou, D., Morcos, M. (2009). *C. elegans* as model for the study of high glucose- mediated life span reduction. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, *58*(11), 2450-2456. doi: 10.2337/db09-0567
- Shaw, R. J. (2013). Metformin trims fats to restore insulin sensitivity. [Comment News]. *Nat Med*, *19*(12), 1570-1572. doi: 10.1038/nm.3414
- Shimano, H. (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Progress in Lipid Research*, *40*(6), 439-452. doi: Doi 10.1016/S0163-7827(01)00010-8
- Solomon, D. L., Amati, B., & Land, H. (1993). Distinct DNA binding preferences for the c-Myc/Max and Max/Max dimers. *Nucleic Acids Res*, *21*(23), 5372-5376.
- Srinivasan, S. (2015). Regulation of body fat in *Caenorhabditis elegans*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Annu Rev Physiol*, *77*, 161-178. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071704
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. [Review]. *WormBook*, 1-11. doi: 10.1895/wormbook.1.101.1

- Stoeckman, A. K., Ma, L., & Towle, H. C. (2004). Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 15662-15669. doi: 10.1074/jbc.M311301200
- Sutphin, G. L., & Kaerberlein, M. (2009). Measuring *Caenorhabditis elegans* life span on solid media. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Video-Audio Media]. *J Vis Exp*(27). doi: 10.3791/1152
- Tanaka, T., Ikita, K., Ashida, T., Motoyama, Y., Yamaguchi, Y., & Satouchi, K. (1996). Effects of growth temperature on the fatty acid composition of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lipids*, 31(11), 1173-1178.
- Taubert, S., Van Gilst, M. R., Hansen, M., & Yamamoto, K. R. (2006). A Mediator subunit, MDT-15, integrates regulation of fatty acid metabolism by NHR-49-dependent and -independent pathways in *C. elegans*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Genes Dev*, 20(9), 1137-1149. doi: 10.1101/gad.1395406
- Teshiba, E., Miyahara, K., & Takeya, H. (2016). Glucose-induced abnormal egg-laying rate in *Caenorhabditis elegans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 80(7), 1436-1439. doi: 10.1080/09168451.2016.1158634
- Tullet, J. M., Araiz, C., Sanders, M. J., Au, C., Benedetto, A., Papatheodorou, I., Gems, D. (2014). DAF-16/FoxO directly regulates an atypical AMP-activated protein kinase gamma isoform to mediate the effects of insulin/IGF-1 signaling on aging in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 10(2), e1004109. doi: 10.1371/journal.pgen.1004109

- Van Gilst, M. R., Hadjivassiliou, H., Jolly, A., & Yamamoto, K. R. (2005). Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *PLoS Biol*, 3(2), e53. doi: 10.1371/journal.pbio.0030053
- Varga, T., Czimmerer, Z., & Nagy, L. (2011). PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1812(8), 1007-1022. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.02.014
- Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Clin Sci (Lond)*, 122(6), 253-270. doi: 10.1042/CS20110386
- Vita, M., & Henriksson, M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Semin Cancer Biol*, 16(4), 318-330. doi: 10.1016/j.semcancer.2006.07.015
- Watts, J. L. (2009). Fat synthesis and adiposity regulation in *Caenorhabditis elegans*. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Trends Endocrinol Metab*, 20(2), 58-65. doi: 10.1016/j.tem.2008.11.002
- Witting, M., & Schmitt-Kopplin, P. (2016). The *Caenorhabditis elegans* lipidome: A primer for lipid analysis in *Caenorhabditis elegans*. [Review]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 589, 27-37. doi: 10.1016/j.abb.2015.06.003
- Zeller, K. I., Jegga, A. G., Aronow, B. J., O'Donnell, K. A., & Dang, C. V. (2003). An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Genome Biol*, 4(10), R69. doi: 10.1186/gb-2003-4-10-r69

Zhou, W., Zhang, J., & Marcus, A. I. (2014). LKB1 Tumor Suppressor: Therapeutic Opportunities Knock when LKB1 Is Inactivated. *Genes Dis*, 1(1), 64-74. doi: 10.1016/j.gendis.2014.06.002

Zornig, M., & Evan, G. I. (1996). Cell cycle: on target with Myc. *Curr Biol*, 6(12), 1553-1556.

Anexo

Tabla 1. Componentes del medio NGM-lite

| | |
|---------------------------------|----------|
| NaCl | 2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 3 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 g |
| COLESTEROL | 0.0085 g |
| Agar | 30 g |
| dH ₂ O | 1 L |

Tabla 3. Componentes del medio LB

| MEDIO LÍQUIDO | |
|----------------------|------|
| Triptona | 10 g |
| Extracto de levadura | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| dH ₂ O | 1 L |
| MEDIO SÓLIDO | |
| Agar | 15 g |

Tabla 4. Componentes del buffer M9

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Na ₂ HPO ₄ | 6 g |
| KH ₂ PO ₄ | 3 g |
| NaCl | 5 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.25 g |
| dH ₂ O | 1 L |

Tabla 5. Componentes del buffer de lisis

| | |
|------------------------|---------------|
| Tris 5 mM pH8 | 78.8 mg |
| Tritón x-100 (0.5%) | 500 µL |
| Tween 20 (0.5%) | 500 µL |
| EDTA (0.25mM) | 50 µL |
| dH ₂ O | c.b.p. 100 mL |

Tabla 8. Buffers para fijación nematodos

| | | |
|--|-------------------------------------|--------------|
| Buffer de fijación Volumen 1 mL | EGTA 20 mM pH=8 | 20 μ L |
| | Metanol 50 % | 500 μ L |
| | PBS 10X | 100 μ L |
| | dH ₂ O | 380 μ L |
| | | |
| PBS 1X/0.05 % Tritón X-100 Volumen 50 mL | Tritón X-100 10 % | 250 μ L |
| | PBS 1X | 49.75 mL |
| | | |
| Buffer Lavado 1 % | DTT (Dithiothreitol) 1 M | 400 μ L |
| | Borato de sodio 20 mM pH=9.6 | 1590 μ L |
| | Tritón X-100 10 % | 100 μ L |
| | | |
| Paraformaldehído 4 % Volumen 50 mL | Paraformaldehído | 2 g |
| | NaOH 1 M | 0.5 mL |
| | dH ₂ O | 25 mL |
| | $\Delta \approx 60^{\circ}\text{C}$ | |
| | PBS 10X | 5 mL |
| | pH= 7.4/NaCl 1 N | |