



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES
DAF-16/FOXO Y SKN-1/NRF2 EN LA RESISTENCIA AL ESTRÉS
NUTRICIONAL PROVOCADO POR EL AYUNO DE 12 HORAS
EN EL NEMÁTODO *CAENORHABDITIS ELEGANS*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A :

JOCELYNN HUERTA BRIGIDO



DIRECTOR DE TESIS:
DOCTOR JUAN MIRANDA RÍOS

2017

Ciudad Universitaria, CDMX



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.

Hoja de Datos del Jurado

1.- Datos del alumno

| | |
|---|-------------|
| Apellido paterno | Huerta |
| Apellido materno | Brigido |
| Nombre(s) | Jocelynn |
| Teléfono | 15-39-00-84 |
| Universidad Nacional Autónoma de México | |
| Facultad de Ciencias | |
| Carrera | Biología |
| Número de cuenta | 31020048-8 |

2.- Datos del tutor

| | |
|------------------|---------|
| Grado | Dr. |
| Nombres(s) | Juan |
| Apellido paterno | Miranda |
| Apellido materno | Ríos |

3.- Datos del sinodal, Presidente

| | |
|------------------|-------------|
| Grado | Dr. |
| Nombres(s) | Luis Felipe |
| Apellido paterno | Jiménez |
| Apellido materno | García |

4.- Datos del sinodal, Vocal

| | |
|------------------|--------------|
| Grado | M. en C. |
| Nombres(s) | Laura Silvia |
| Apellido paterno | Salinas |
| Apellido materno | Velázquez |

5.- Datos del sinodal, Suplente 1

| | |
|------------------|--------------|
| Grado | M. en C. |
| Nombres(s) | Alfonso José |
| Apellido paterno | Vilchis |
| Apellido materno | Peluyera |

6.- Datos del sinodal, Suplente 2 (cotutor)

| | |
|------------------|-----------|
| Grado | Ing. |
| Nombres(s) | Jonathan |
| Apellido paterno | Alcántar |
| Apellido materno | Fernández |

7.- Datos del trabajo escrito

| | |
|---------------|--|
| Título | Participación de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf2 en la resistencia al estrés nutricional provocado por el ayuno de 12 horas en el nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i> |
|---------------|--|

Número de páginas:

101 p

Año:

2017

*Nadie tiene derecho a decirme qué puedo lograr
o qué no puedo lograr.*

Amna Al Haddad

Índice

| | |
|--|---------|
| 1. Resumen | pág. 4 |
| 2. Introducción | |
| I. Organismo modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> | pág. 5 |
| II. Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> | pág. 6 |
| III. Metabolismo del nemátodo | pág. 9 |
| i. Metabolismo a lo largo del ciclo de vida de <i>C. elegans</i> | pág. 10 |
| ii. Vía de señalización de la insulina (IIS) | pág. 11 |
| iii. Factores externos que influyen el metabolismo | pág. 14 |
| A. Temperatura | pág. 14 |
| B. Estrés osmótico | pág. 15 |
| C. Restricción de alimento | pág. 16 |
| IV. Modelos de Restricción calórica/dietética y ayuno | pág. 18 |
| i. DAF-16/FOXO | pág. 20 |
| ii. SKN-1/Nrf | pág. 21 |
| iii. RHEB-1/GTPasa | pág. 22 |
| V. Estrés oxidante | pág. 23 |
| i. Radicales libres | pág. 23 |
| ii. Superóxido dismutasa (SOD) | pág. 24 |
| iii. Catalasa (CAT) | pág. 24 |
| VI. Metabolismo de xenobióticos | pág. 25 |
| i. Ciclo de glutatión | pág. 26 |
| ii. γ -glutamylcisteína sintetasa 1 (GCS-1) | pág. 27 |
| iii. glutatión-S-transferasa 4 (GST-4) | pág. 28 |
| iv. peroxidación lipídica | pág. 28 |
| 3. Pregunta | pág. 30 |
| 4. Objetivos | pág. 30 |
| 5. Justificación | pág. 31 |
| 6. Hipótesis | pág. 31 |
| 7. Metodología | |
| I. Cepas y cultivo | pág. 32 |
| II. Sincronización de cepas | pág. 32 |
| III. Ensayos de ayuno | pág. 32 |
| IV. Silenciamiento de genes por RNAi | pág. 33 |

| | | |
|-------|--|---------|
| V. | Ensayos de longevidad | pág. 34 |
| VI. | Obtención de muestras de nemátodos L4 | pág. 34 |
| VII. | Extracción de RNA de <i>C. elegans</i> con Trizol | pág. 34 |
| VIII. | Retrotranscripción (RT) | pág. 35 |
| IX. | Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) | pág. 35 |
| X. | Electroforesis en geles de poliacrilamida para la visualización de productos de PCR | pág. 35 |
| XI. | Extracción de proteínas totales de <i>C. elegans</i> | pág. 36 |
| XII. | Extracción de proteínas citoplásmicas y nucleares | pág. 37 |
| XIII. | Slot-Blot y Western Blot | pág. 37 |
| XIV. | Actividades enzimáticas | pág. 38 |
| | i. Actividad de catalasa | pág. 38 |
| | ii. Actividad de Superóxido dismutasa | pág. 38 |
| XV. | Determinación de peroxidación lipídica | pág. 38 |
| XVI. | Ensayos de translocalización nuclear de SKN-1B | pág. 39 |
| | i. Montaje de laminillas | pág. 39 |
| | ii. Microscopía de fluorescencia | pág. 39 |
| | iii. Cuantificación de GFP | pág. 39 |
| XVII. | Análisis estadístico | pág. 39 |
| 8. | Resultados | |
| | I. Efecto del ayuno de 12 horas en la esperanza de vida del nemátodo y el papel de DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf en su regulación | pág. 40 |
| | II. Estrés y daño oxidante provocado por el ayuno de 12 horas en <i>C. elegans</i> | pág. 45 |
| | a. Actividad de Catalasa | pág. 46 |
| | b. Actividad de Superóxido dismutasa | pág. 48 |
| | c. Peroxidación lipídica (lipoperoxidación) | pág. 49 |
| | III. Cambios en la expresión de componentes de la vía de señalización de la insulina (IIS) y la vía p38 MAPK provocados por el ayuno | pág. 51 |
| | IV. Actividad de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf bajo condiciones de 12 horas de ayuno | pág. 56 |
| | a. Localización nuclear de DAF-16/FOXO | pág. 56 |
| | b. Cuantificación de fluorescencia en nemátodos <i>skn-1::GFP (LD1)</i> y translocación de SKN-1b al núcleo | pág. 57 |

| | |
|---|---------|
| 9. Discusión | |
| i. Efecto del ayuno de 12 horas en la esperanza de vida del nemátodo y el papel de DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf en su regulación | pág. 59 |
| ii. Estrés y daño oxidante provocado por el ayuno de 12 horas en <i>C. elegans</i> | pág. 62 |
| iii. Cambios en la expresión de componentes de la vía de señalización de la insulina, la vía p38 MAPK y la actividad de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf bajo condiciones de 12 horas de ayuno en el estadio L4 | pág. 64 |
| 10. Conclusiones | pág. 68 |
| 11. Perspectivas | pág. 69 |
| 12. Referencias | pág. 70 |
| 13. Anexos | pág. 76 |

1. Resumen

La restricción calórica (RC) y el ayuno intermitente (AI) se han visto involucrados en el incremento de la esperanza de vida del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, sin embargo es importante resaltar que hasta el momento todos los trabajos tanto de RC como de AI se han implementado como regímenes crónicos, es decir, a lo largo de todo el ciclo de vida del nemátodo, por lo que en este trabajo se llevó a cabo un régimen agudo, ya que el nemátodo fue sometido a un periodo de 12 horas de ayuno en el estadio larvario L4, el cual permitió observar que estos nemátodos disminuyen su esperanza de vida al ser sometido a ayuno. Por otro lado, poco se sabe acerca de los mecanismos que producen esta respuesta, sin embargo se ha relacionado con la actividad de factores transcripcionales como DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf, los cuales se han descrito como reguladores de la esperanza de vida del nemátodo. Ahora bien, contrario a lo que se creía, la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) tienden a incrementar en el régimen de 12 horas de ayuno implementado en el laboratorio, evidenciando que dicho ayuno en *C. elegans* sugiere la presencia de estrés oxidante y posiblemente el incremento de ROS.

En consecuencia, proponemos que el estrés oxidante generado por el ayuno de 12 horas en el nemátodo, desencadena la activación de factores transcripcionales como DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf, para contender y regular la esperanza de vida de *Caenorhabditis elegans*.

2. Introducción

I. Organismo modelo *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un nemátodo pequeño de 1 - 1,5 mm de largo, de vida libre que se encuentra en la mayor parte del mundo y que sobrevive alimentándose de bacterias. En la actualidad se ha perfilado como un organismo modelo para la investigación biológica en muchos campos, como lo es la genómica, biología celular, neurociencia y actualmente como modelo de envejecimiento (3, 4) debido principalmente a que es un organismo multicelular, posee un cuerpo transparente (Figura 1), presenta un ciclo de vida corto (aproximadamente 2-3 semanas) y es de fácil propagación en condiciones de laboratorio, además de que *C. elegans* fue el primer organismo multicelular y el segundo eucarionte, sólo detrás de *Saccharomyces cerevisiae*, del que se obtuvo la secuencia completa de su genoma, el cual tiene 100 Mb (The *C. elegans* Sequencing Consortium), compartiendo con el humano alrededor del 60-80% de genes (5).

Desde su introducción a principios de 1970, el nemátodo *C. elegans* ha sido utilizado como una plataforma para la investigación biológica y la formación e implementación de nuevas tecnologías, ya que *Caenorhabditis elegans* ha surgido como un poderoso sistema de estudio en aspectos moleculares y celulares de enfermedades humanas *in vivo* debido a que presenta muchas características en común con los humanos, como lo es el desarrollo de músculos, nervios y el tracto digestivo, así como la producción de espermatozoides y huevos (cigotos) (6).

Se ha estimado que cerca del 42% de genes relacionados con enfermedades en el humano tienen un ortólogo en el genoma del nemátodo (5), múltiples vías de señalización fundamentales para la regulación de la esperanza de vida, la apoptosis y el comportamiento se encuentran conservadas entre el nemátodo y los mamíferos; la más notable es la vía de señalización de la insulina, por sus siglas en inglés IIS (insulin/insulin-like growth factor IGF), quien involucra al factor transcripcional DAF-16/FOXO un regulador clave de los cambios en la esperanza de vida en respuesta a estímulos ambientales y gonadales (4, 7), además de genes asociados a la enfermedad de Parkinson, atrofia muscular, cáncer, entre muchos otros (5). Por lo anterior la homología entre *C. elegans* y el humano, tanto en las vías metabólicas como en regulación de las mismas, lo hacen un modelo de investigación adecuado para el estudio del estrés nutricional, ya que en el laboratorio *C. elegans* puede estar sujeto a una amplia variedad de condiciones de estrés, como bajos niveles de oxígeno, altas o bajas temperaturas y privación de nutrientes, afectando su metabolismo y desarrollo.

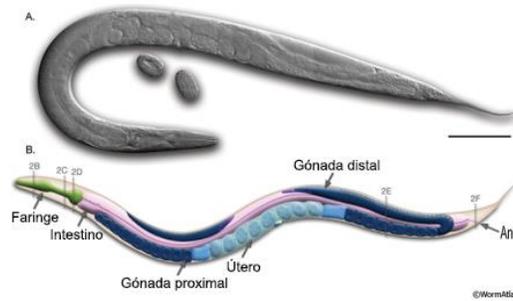


Figura 1. Morfología del nemátodo *Caenorhabditis elegans*. A) Microscopía de Normarski o microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), B) Estructuras anatómicas del nemátodo adulto. Modificado de: WormAtlas.

II. Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans se encuentra formado por 959 células somáticas, de las cuales 302 corresponden a neuronas, posee cinco pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales, por lo que la proporción entre cromosomas sexuales y autosomas determinan el sexo. Existen dos sexos hermafroditas (XX) y machos (XO), siendo así que los machos se presentan en menor cantidad ~0.1%. En la etapa adulta un solo hermafrodita llega a poner ~300 huevecillos por autofecundación bajo condiciones normales, debido al número limitado de espermatozoides, en cambio si la fecundación se llevó a cabo por un macho la progenie tiende a incrementar hasta ~1400 huevecillos (5, 8).

Similar al de otros nemátodos, su ciclo de vida es corto, en condiciones estándar a 20°C le toma 3.5 días llegar hasta la etapa adulta. El ciclo de vida de *C. elegans* consta de una etapa embrionaria, 4 etapas larvarias (L1-L4) y una etapa adulta, donde el fin de cada etapa larvaria está marcado por un cambio de cutícula debido a que se sintetiza una nueva para cada etapa mientras que la vieja se pierde, durante estos cambios los movimientos de la faringe cesan y el nemátodo entra en letargo (Figura 2) (9).

A lo largo de las etapas larvarias se han descrito dos momentos importantes, donde el nemátodo puede entrar en etapas alternativas a las que se desarrollan normalmente. Esto sucede si los nemátodos llegan a eclosionar en ausencia de alimento, hipoxia, altas temperaturas o sobrepoblación, por lo que son capaces de entrar en una etapa alternativa llamada *diapausia L1* en donde frenan su desarrollo mientras que se enfrentan a escasez de alimento, sin embargo los nemátodos pueden salir de este arresto cuando las condiciones ambientales mejoran (Figura 3).

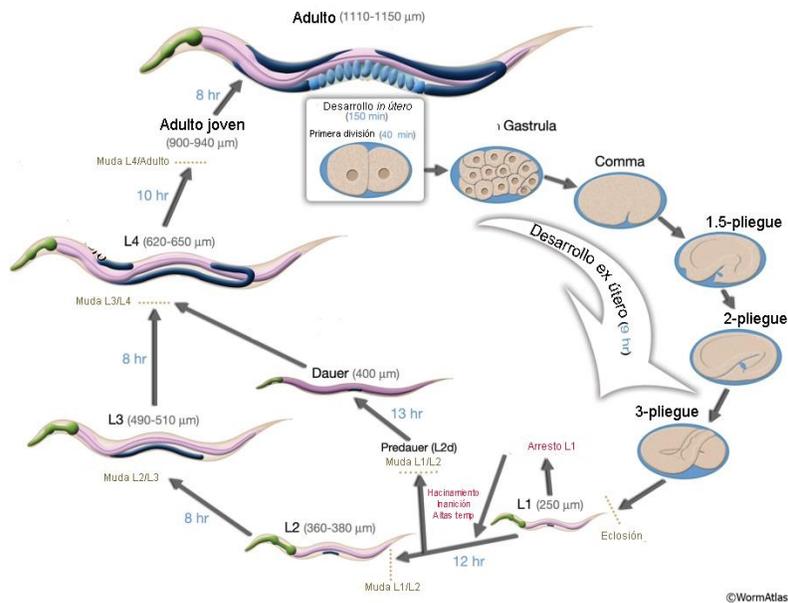


Figura 2. Ciclo de vida del nemátodo *C. elegans* a 22°C, se observa en azul el tiempo que el animal pasa en cada etapa y en color gris el tamaño del nemátodo en cada uno de los estadios. Modificado de: WormAtlas.

Por otra parte a finales de la etapa L1 si las condiciones son adversas (falta de alimento, sobrepoblación, temperaturas extremas, etc.), los nemátodos entran a la etapa alternativa *dauer*, ya que los factores ambientales generan señales que produce cambios morfológicos en el nemátodo, por lo que se detiene su desarrollo, las larvas no se alimentan y presentan poco movimiento, presentan una disminución en la respiración y una reducción en el consumo de ATP, no envejecen, sin embargo son altamente resistentes a condiciones extremas. El estado *dauer* termina cuando el animal encuentra condiciones favorables, después de 1 hora de tener acceso a comida, el gusano sale de esta etapa y 10 horas después entra a la etapa larvaria L4 (Figura 2). Morfológicamente, los gusanos en etapa *dauer* son muy delgados, presentan una cutícula alterada, su cavidad bucal y anal se encuentran selladas por un bloque de cutícula y sus células intestinales son más oscuras que las de los animales normales, además de que su gónada queda arrestada (Figura 3).

Durante las etapas L2 y L3 el nemátodo continúa su crecimiento, en la primera se observan pocas divisiones celulares y hay una separación de células germinales en dos poblaciones, anterior y posterior, mientras que en L3 se establece el destino de las células que formarán parte de la vulva, espermateca y gónadas (3, 10), las células germinales proximales entran en la profase meiótica y, a medida que continúa el desarrollo, una mayor cantidad de células germinales entran en dicha fase. Finalmente, durante las etapas L3 y L4 se produce la espermateca y el útero, guiados por las células de la punta distal (DTC), cada brazo gonadal crece y se alarga para formar una estructura en U.

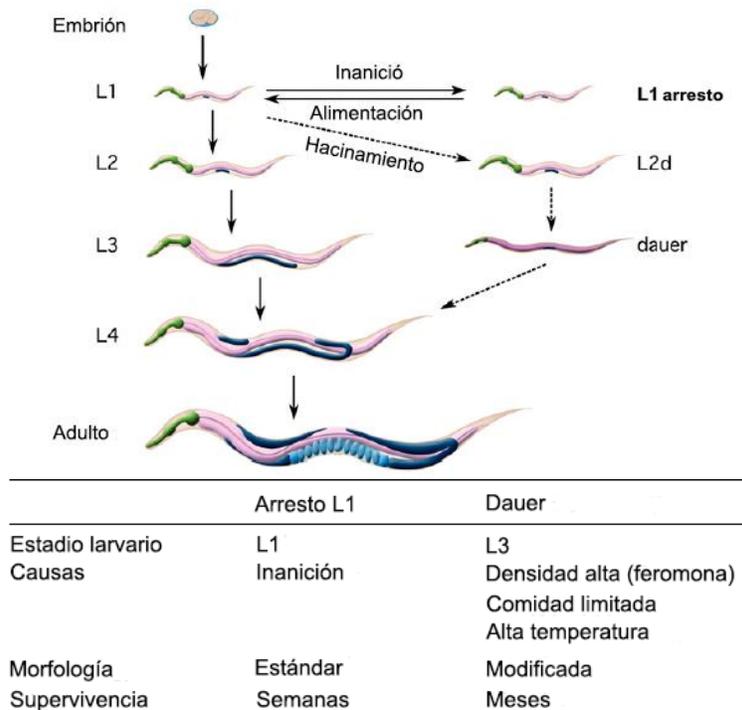


Figura 3. Comparación entre la diapausa L1 y el arresto dauer en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Modificado de: Baugh L. Ryan (2013) Genetics Vol. 194, 539–555.

En cuanto a la etapa larvaria L4, en esta se completa el proceso de gonadogénesis, los brazos distales de la gónada continúan su migración a través de los músculos dorsales y completan su trayectoria cuando el gusano L4 cambia su cutícula y pasa a la etapa adulta. En esta etapa comienza la meiosis de la línea germinal en los brazos proximales de la gónada y las células germinales se diferencian en esperma, la producción de esperma se detiene en el pase de L3 a adulto y las células germinales restantes pasan por meiosis y diferenciación para generar exclusivamente ovocitos, los tejidos de la vulva y útero sufren morfogénesis y las neuronas y músculos sexuales se asocian a estas estructuras para formar un aparato capaz de poner huevecillos (Figura 4).

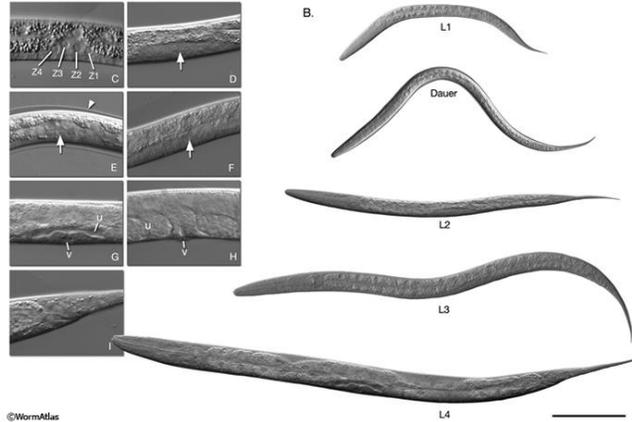


Figura 4. Etapas larvianas del desarrollo obtenidas por microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), vista lateral izquierda. Del lado izquierdo: Tamaño de la vulva a lo largo del ciclo de vida de *C. elegans* B) Etapas larvianas L1, larva dauer, L2, L3 y L4. Modificado de: WormAtlas.

III. Metabolismo del nemátodo

El metabolismo comprende todo el conjunto de reacciones químicas que se producen en un organismo vivo que le permiten reproducirse, desarrollarse, mantener su estructura y responder a cambios en el medio ambiente. Estas reacciones químicas forman una intrincada red de vías y ciclos en los que el flujo de productos de reacción (metabolitos) está determinado por muchos mecanismos reguladores. El metabolismo se subdivide en catabolismo, descomposición de moléculas complejas y anabolismo, procesos relacionados con la síntesis de sustancias orgánicas complejas (11).

Las estimaciones recientes para el último antepasado común de vertebrados y nemátodos oscilan entre 800 millones y más de mil millones de años atrás, desde entonces los nemátodos han desarrollado una gran variedad de historias de vida incluyendo el parasitismo de animales y plantas, y la capacidad de vivir en ambientes hostiles, por lo que es concebible que las vías metabólicas eucariotas conservadas se encuentren en nemátodos bacterívoros de vida libre como *Caenorhabditis elegans*, que vive en condiciones principalmente templada, puesto que la red metabólica intermediaria está bien conservada entre eucariotas, y las principales vías metabólicas encontradas en organismos heterotróficos también están presentes en *C. elegans* (11, 12).

En el nemátodo se encuentran conservadas las principales vías metabólicas de flujo, síntesis, almacenamiento, utilización de azúcares y grasas, en las que se incluyen la síntesis, elongación y desnaturalización de ácidos grasos, β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos, glucólisis, gluconeogénesis, metabolismo de aminoácidos y cadena de transporte de electrones, ya que bases de datos como Wormbase, Reactome y KEGG muestran que en *C. elegans* se han encontrado ortólogos para la mayoría de las enzimas implicadas en las principales vías de metabolismo intermedio (Figura 5). Sin embargo *C.*

C. elegans puede utilizar vías de señalización alternativas bajo distintas condiciones de desarrollo y/o ambientales, además de todas las vías pertenecientes al metabolismo intermediario, por ejemplo bajo condiciones de inanición en estadios juveniles se induce el ciclo del glioxilato (11).

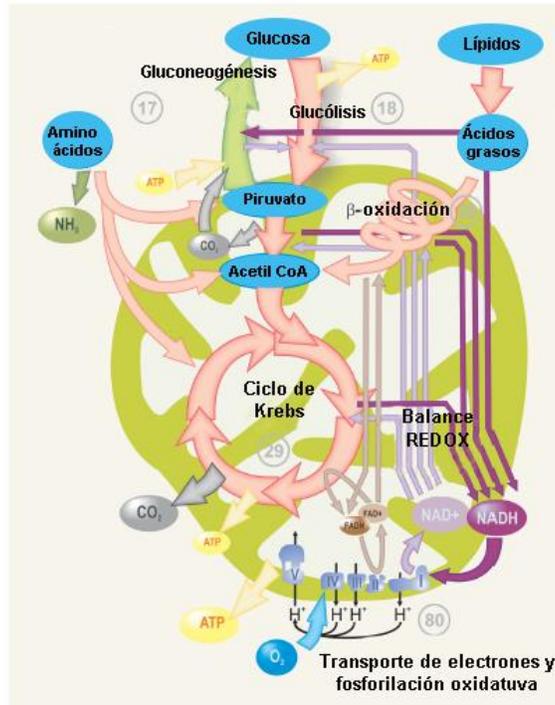


Figura 5. Principales vías de señalización que se encuentran conservadas en *C. elegans*. En gris se observa el número de ortólogos que se han observado en dichas vías. Modificado de: Braeckman et al. (2009) WormBook .

i. Metabolismo a lo largo del ciclo de vida de *C. elegans*

La tasa metabólica medida como oxígeno consumido o calor producido por unidad de tiempo y normalizada a contenido de proteína, muestra una regulación dependiente del ciclo de vida, ya que es más alta en larvas L1 que en huevos en desarrollo y alcanza los valores más altos en larvas L2-L4, seguida de una pronunciada disminución a medida que los gusanos alcanzan la edad adulta, y finalmente la tasa metabólica disminuye gradualmente a medida que los gusanos atraviesan esta etapa final del ciclo de vida hacia la senescencia (13, 14), ya que el movimiento representa aproximadamente el 37% del gasto energético total de las larvas L4 por lo que esta fracción disminuye hasta el 25% en los animales adultos.

A pesar del corto ciclo de vida de *C. elegans*, éste muestra claros signos morfológicos y de comportamiento relacionados con el envejecimiento, ya que a pesar de que los perfiles transcripcionales y de traducción no cambian drásticamente durante el proceso de envejecimiento en el nemátodo silvestre (N2), muchos parámetros metabólicos disminuyen abruptamente con la edad y esto se refleja en la disminución de las tasas de transcripción y

traducción a través del tiempo. Varios parámetros bioquímicos y fisiológicos, como el consumo de oxígeno, la generación de calor, los niveles de ATP, las relaciones ATP/AMP, el potencial de la tasa de producción de superóxido, la capacidad de biorreducción y la producción de amoníaco han sido monitoreados y se ha observado una declinación exponencial durante la vida adulta de *C. elegans* (13, 14). Por otra parte, las larvas *dauer* deben metabolizar macronutrientes almacenados, principalmente lípidos pero también glucógeno y trehalosa, y suprimir las actividades metabólicas que consumen energía, por lo que los *dauers* consumen menos oxígeno en comparación con otros estadios juveniles y producen menos calor, consistente con una reducción general de la tasa metabólica, lo cual parece ser causado por la reducción en la actividad de las enzimas implicadas en los ciclos glicolítico, gluconeogénico, ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) y vías de fosforilación oxidativa (11).

ii. Vía de señalización de la insulina (IIS)

La vía de señalización de la insulina/IGF-1 (IIS) en *Caenorhabditis elegans* conecta los niveles de nutrientes al metabolismo, crecimiento, desarrollo, longevidad y comportamiento. Además, el papel de la IIS en la conexión de las funciones de todo el sistema (como el crecimiento, la reproducción, resistencia al estrés y el envejecimiento) con el estado nutricional se conserva y es importante (7), por lo que el uso del sistema de *C. elegans* que es genéticamente manejable, ha sido valioso para estudiar la función de IIS, dando muchos conocimientos importantes sobre las funciones, la regulación y los productos de esta vía de señalización (15). La observación de que mutaciones en los componentes de la IIS producen efectos en la longevidad, permitió el descubrimiento de que dichos componentes de la vía de señalización de la insulina en *C. elegans* tienen un ortólogo en la vía de señalización de la insulina de mamíferos, por lo que se estableció la conservación evolutiva de los componentes de la IIS en los metazoos, proporcionando ideas fundamentales sobre el papel del IIS en el control de la esperanza de vida de los organismos. Por otro lado este hallazgo dio a conocer a *C. elegans* como un potencial sistema experimental para estudiar la vía IIS, ya que podría conducir a nuevos descubrimientos sobre la vía de señalización de la insulina en mamíferos (15).

La vía IIS incluye péptidos similares a la insulina (ILPs), un receptor tirosina quinasa DAF-2, que comparte una identidad de aminoácidos mayor del 35% con el receptor de insulina humana (IGF-1) y una cascada de señalización río abajo que afecta al factor de transcripción DAF-16/FOXO. Dicha vía se encuentra regulada por los ligandos peptídicos similares a la insulina que se unen al receptor transmembranal de insulina DAF-2, quien controla la actividad de una cascada conservada de fosfoinositol-3-quinasa (PI3K)/AGE-1, las quinasas serina/treonina PDK-1, AKT-1 y AKT-2, y el blanco de estas quinasas, culminan en la regulación del factor transcripcional DAF-16/FOXO (Figura 6) quien regula la mayoría de las funciones de esta vía (15-17).

Las insulinas son pequeñas hormonas peptídicas con diversos y amplios papeles en la regulación de múltiples aspectos de la fisiología animal; en el cerebro, la insulina actúa sobre una compleja red de neuronas en el núcleo arqueado hipotalámico y afecta a los estados de alimentación, además de su papel clásico en la regulación de los niveles de glucosa, la insulina también regula la longevidad, el desarrollo animal y las funciones neuronales (18).

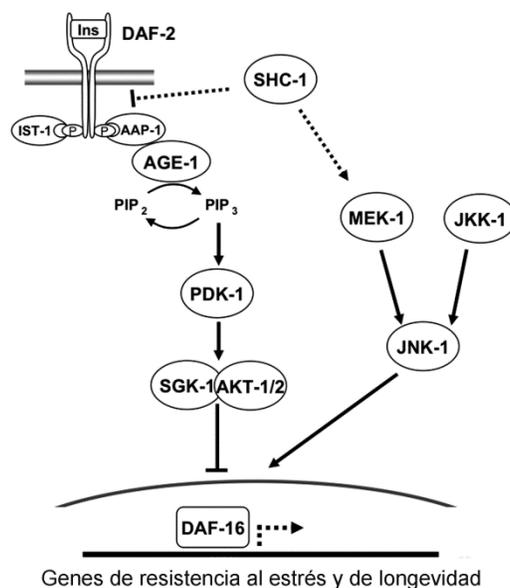


Figura 6. Vía de señalización de la insulina, donde la IIS se encuentra activa bajo condiciones normales y se observa la cadena de fosforilación. Modificado de: Neumann Haefelin et al. (2008) *Genes and Development* 22:2721–2735.

El genoma humano codifica 10 péptidos similares a la insulina (incluyendo a la insulina), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) y relaxinas, mientras que *Drosophila melanogaster* tiene ocho péptidos similares a la insulina, o DILPs y de manera sorprendente, el genoma de *C. elegans* codifica 40 genes similares a insulina o ILPs (19).

Caenorhabditis elegans probablemente utiliza 40 insulinas para lograr tanto la especificidad como la redundancia y así mantener la aptitud física en un entorno adverso, ya que el número total posible de combinaciones en diferentes conjuntos, por ejemplo con tres, cuatro o incluso más ILPs, es inmenso y potencialmente proporciona al animal un amplio y flexible repertorio de posibilidades para reconocer y responder apropiadamente a muchos estímulos ambientales (19). En el contexto del desarrollo, los péptidos de la superfamilia de insulina en el nemátodo regulan la proliferación neuronal, la supervivencia y la proliferación de neuritas, además, la señalización de la insulina modula los circuitos neuronales e influye en su producción, medida por el comportamiento y la actividad neuronal (18).

Cabe señalar que en nemátodos hermafroditas, 36 de los 40 péptidos de insulina se expresan en seis tipos principales de tejido: sistema nervioso, músculo, tejido reproductor, epitelios, intestino y celomocitos (Figura 7). Por otra parte, la distribución de los ILPs en *C. elegans* corresponde con la abundancia de la proteína DAF-2, que se expresa en niveles muy altos en las neuronas que se localizan en el anillo nervioso, específicamente en las células secretoras XXX, en la sección del cerebro del nemátodo (Figura 8); además el alto nivel de DAF-2 en el anillo nervioso es consistente con el hallazgo de que el sitio principal de acción de la señalización de *daf-2* se encuentra en las neuronas y que concuerda con los análisis que demuestran que la actividad de *daf-2* se requiere principalmente en las neuronas para regular la longevidad (16, 18, 19).

Finalmente, la evidencia genética sugiere que bajo condiciones ambientales óptimas, la vía de señalización de DAF-2 se activa para desencadenar el desarrollo reproductivo y el metabolismo rápido, así como una esperanza de vida relativamente corta de 2-3 semanas.

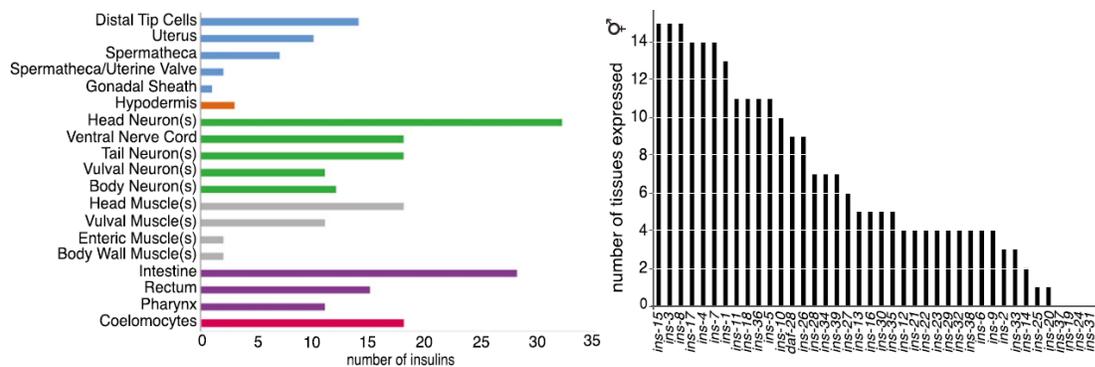


Figura 7. Relación entre los péptidos de insulina (ILPs) y los tejidos del nemátodo *C. elegans* bajo condiciones normales. Izquierda) Número de ILPs por tipo celular. Derecha) Número de tipos celulares por péptido de insulina. Modificado de: A. Ritter et al./ *Genome Research* 23 (2013) 954-965.

Sin embargo, se ha determinado que la vía de señalización de la insulina es regulada por factores ambientales, tal es el caso de la alimentación, ya que la abundancia de DAF-2 en nemátodos sometidos a condiciones de inanición vs nemátodos bien alimentados de la cepa silvestre (N2), demuestra que los niveles de proteína DAF-2 disminuyen dramáticamente en nemátodos cultivados en ausencia de alimento durante 24 h en comparación con animales bien alimentados, lo que sugiere que la abundancia de DAF-2 está acoplada al estado nutricional y que por tanto la señalización DAF-2 en el anillo nervioso de *C. elegans* puede controlar de forma similar el metabolismo y la alimentación como parte de su función para regular la diapausa y el envejecimiento (7, 16).

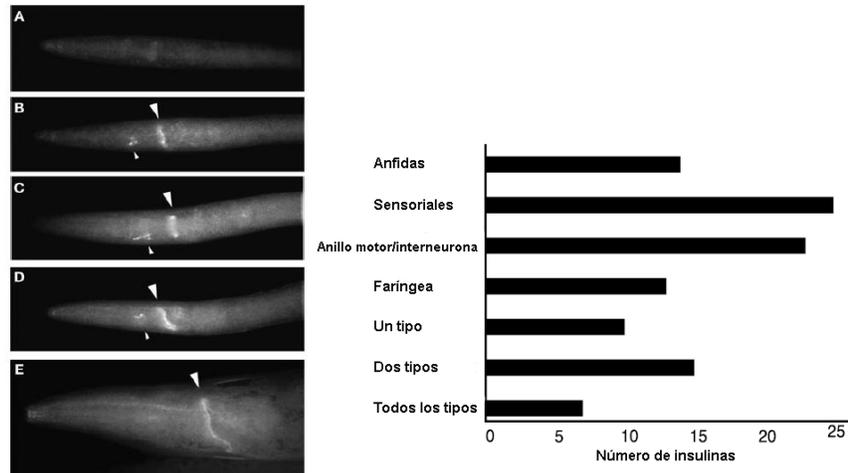


Figura 8. Expresión del receptor de insulina DAF-2 y de los péptidos de insulina en las neuronas del nemátodo. Izquierda) Expresión de la proteína DAF-2 en el anillo nervioso a lo largo del desarrollo, (A) estadio L1 temprano, (B) L1 medio, (C) L2, (D) L4, (E) adulto. Derecha) Número de insulinas en tres tipos de neuronas: sensoriales, moto/interneuronas y faríngeas. La columna de expresión *Amphid* (de anfólisis), muestra ILPs que su expresión se superpone. Modificado de: K.D. Kimura et al. (2011), A. Ritter et al. *Genome Research* 23 (2013) 954-965

iii. Factores externos que influyen el metabolismo

Existen muchas intersecciones dentro de la red metabólica del nemátodo, por lo que el flujo de metabolitos puede ser desviado hacia una dirección específica según la necesidad del organismo en ese momento particular; dichos cambios metabólicos pueden ocurrir instantáneamente, como respuesta a los entornos cambiantes (fluctuaciones en los factores bióticos y abióticos), o de manera más lenta a lo largo del ciclo de vida de *C. elegans*, ya que existen múltiples cambios metabólicos que acompañan al proceso de envejecimiento del nemátodo. Por ello surgen patrones metabólicos distintos debido a cambios en la temperatura, la restricción de alimento, privación de oxígeno o estrés osmótico, que se han definido como los principales factores externos que influyen el metabolismo de *Caenorhabditis elegans* (11).

A. Temperatura

La esperanza de vida de *C. elegans* se encuentra inversamente relacionada con la temperatura ambiental, mientras que el desarrollo y la tasa metabólica muestran una correlación positiva; dichas características son típicas de los organismos exotérmicos y aunque se podría esperar que reflejen solo un proceso termodinámico, es bien sabido que las reacciones enzimáticas muestran velocidades más rápidas a temperaturas elevadas (20).

Por otra parte, la observación de que muchos animales mueren antes a medida que aumenta la temperatura ha llevado a la hipótesis de que existe una "tasa de vida". De acuerdo con esta hipótesis, se ha encontrado que las curvas de muerte de la población

dependen de la temperatura (9, 21), cabe señalar que esto ocurre en nemátodos que son crecidos en medio NGM, puesto que siempre mueren antes a medida que la temperatura incrementa (Figura 9). A pesar de que no se conoce el porqué de esta respuesta, la explicación más simple es que la toxicidad de *Escherichia coli* depende de la temperatura, ya que se ha observado que conforme incrementa la temperatura *E. coli* coloniza de manera más rápida el intestino y la faringe del nemátodo cuando las bacterias se encuentran vivas, por lo que al proliferar las bacterias producen una toxina que puede matar a los nemátodos, sin embargo, una explicación alternativa es que el fracaso de los procesos bioquímicos críticos que son dependientes de la temperatura, subyace a la muerte en *C. elegans* (9, 11, 21).

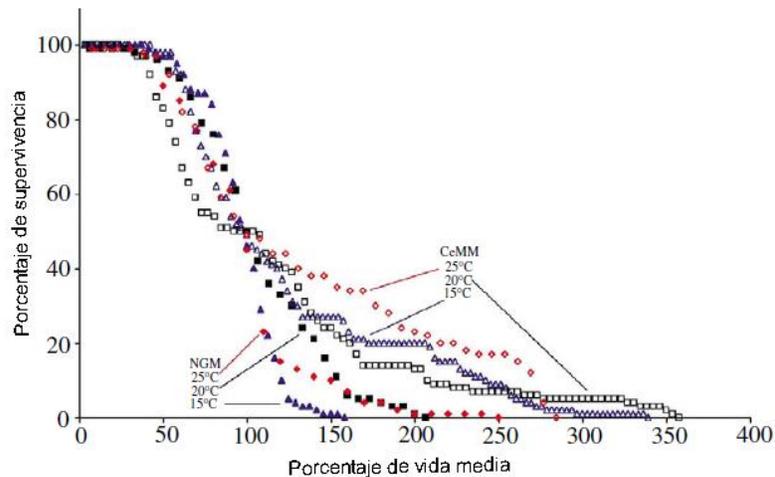


Figura 9. Gráfico de la esperanza de vida (en porcentaje) de *C. elegans* a diferentes temperaturas de crecimiento (15, 20 y 25°C) en medio NGM (símbolos rellenos) y medio CeMM, (símbolos sin relleno) y se observa que en el primer medio conforme incrementa la temperatura disminuye la esperanza de vida. Modificado de: N. J. Szewczyk et al. (2006).

B. Estrés osmótico

Los nematodos del suelo y de agua dulce son hiperosmóticos a su medio ambiente normal por lo que al estar expuestos a fluctuaciones repentinas en la osmolaridad externa deben ser capaces de montar mecanismos osmorreguladores eficientes. En este caso en *C. elegans* se ha observado que sobrevive fácilmente y se adapta al crecimiento en medios que contienen de 21-500 mM de NaCl, ajustando principalmente la concentración celular de glicerol, ya que el estrés hipertónico induce la expresión de GPDH (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) quien media la acumulación de glicerol, por lo que *gpdh-1* incrementa su expresión durante un tiempo prolongado, mientras que *gpdh-2* presenta un incremento débil y transitorio en su expresión (11).

Los mecanismos por los cuales los nemátodos censan el estrés osmótico y producen una respuesta osmorreguladora son bastante complejos. Sin embargo, se cree que tanto la alteración de la cutícula como el daño de las proteínas inducen la actividad de genes osmoprotectores como *osm-7*, *osm-11* y varios genes *dpy* que controlan la integridad de la

cutícula e incrementan la síntesis de glicerol en respuesta al estrés osmótico (22). En todo el genoma de *Caenorhabditis elegans* se identificaron 122 genes que suprimen la respuesta de estrés osmótico en condiciones normales. Por otra parte también se ha visto que la señalización defectuosa de la vía de señalización de la insulina/IGF también contribuye a la resistencia a estrés hipertónico, incrementando el nivel intracelular de trehalosa y activando genes que protegen o reparan el daño de proteínas inducido por el estrés osmótico (11, 22).

C. Restricción de alimento

Aproximadamente hace 83 años, se descubrió que la reducción de la ingesta dietética sin llegar a la inanición incrementa sustancialmente la esperanza de vida de las ratas. A este régimen o tratamiento se le denomina restricción dietética (RD) o restricción calórica (RC), y desde entonces se han observado efectos similares en una amplia gama de especies, desde organismos simples como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, así como a una amplia gama de mamíferos, incluyendo ratones, perros y posiblemente monos Rhesus (3, 23). Si bien los efectos de la DR sobre la longevidad están muy conservados entre las especies animales, no hay garantía de que los mecanismos biológicos implicados sean los mismos, ya que posiblemente los efectos de la RC sobre el envejecimiento en diferentes grupos de animales reflejen una evolución convergente, que involucra diferentes mecanismos en diferentes taxones (3).

Se ha observado que los niveles de RC que maximizan la longevidad también resultan en una menor fertilidad, por lo que se ha sugerido que esta respuesta a la RC representa una adaptación para aumentar la aptitud dada la disponibilidad de alimentos variables (3, 23, 24). Sin embargo la cantidad de RC y la edad a la que la ocurre la reducción en la ingesta de calorías, influye en la magnitud de los cambios observados, ya que se ha confirmado que se incrementa constantemente la esperanza de vida cuando la disponibilidad de nutrientes cae entre el 30% y el 75% de la suplementación calórica normal, dependiendo de cada especie (23).

Por otra parte, el mecanismo por el cual la RC incrementa la esperanza de vida continúa poco claro, sin embargo, una hipótesis ampliamente aceptada es que la RC atenúa el daño oxidante, ya que la restricción de nutrientes reduce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y resulta en una disminución en la tasa metabólica (propuesta basada en la Teoría de radicales libres de Harman) (24, 25). Sin embargo Houthoofd y sus colaboradores demostraron que no existe un efecto hipometabólico cuando los nemátodos son sometidos a restricción calórica y/o dietética, probando esto en tres protocolos de restricción calórica (RC): dilución bacteriana en cultivo líquido, cultivo líquido axénico y el uso de mutantes *eat*, que al comer producen defectos en el bombeo faríngeo y que por tanto conducen a una reducción en la absorción de alimentos, produciendo fenotipos de RC, es decir, los

nemátodos presentan una apariencia hambrienta, reducción del tamaño de progenie y un incremento en la esperanza de vida. Tanto en condiciones normales como en RC la tasa metabólica se mantiene sin cambios y en algunos casos esta se incrementó en nemátodos sometidos a RC, lo que indica que la restricción de alimento no actúa disminuyendo la tasa metabólica (1). A primera vista, el hecho de no reducir el gasto energético cuando los alimentos son escasos puede parecer un desperdicio, sin embargo una explicación posible es que hay un incremento en la necesidad de síntesis de *novo* de compuestos que de otra manera son adecuadamente suministrados por los alimentos (11, 24).

También se ha considerado que la restricción de nutrientes reduce la producción de ROS al disminuir la tasa metabólica, y debido a que la cadena de transporte de electrones mitocondrial se considera como la principal fuente de producción de ROS a nivel de los complejos I y III, donde los electrones pueden filtrarse al oxígeno molecular y generar un radical superóxido (O⁻), se ha especulado que la respiración y la producción de ROS están positivamente correlacionadas, sin embargo, la electroquímica sugiere lo contrario, es decir, es más probable que debido a la RC se incremente la producción de ROS, ya que al incrementar el potencial de membrana, más electrones tienden a filtrarse a medida que la velocidad de reducción de oxígeno por el complejo IV disminuye (1, 26).

A pesar de que no se sabe si los animales que son sometidos a RC producen más ROS, los experimentos realizados por Houthoofd demostraron que las actividades de SOD y catalasa incrementaron en los tres protocolos de RC (Figura 10), mientras que el cultivo axénico mejoró de manera efectiva la resistencia al estrés térmico y oxidativo, sin embargo, estos últimos efectos pueden ser parte de un programa complejo de preservación de la longevidad, el cual puede ser inducido por una serie de condiciones desfavorables, incluyendo la RC, en lugar ser una respuesta específica por el aumento de ROS (1, 11, 26)

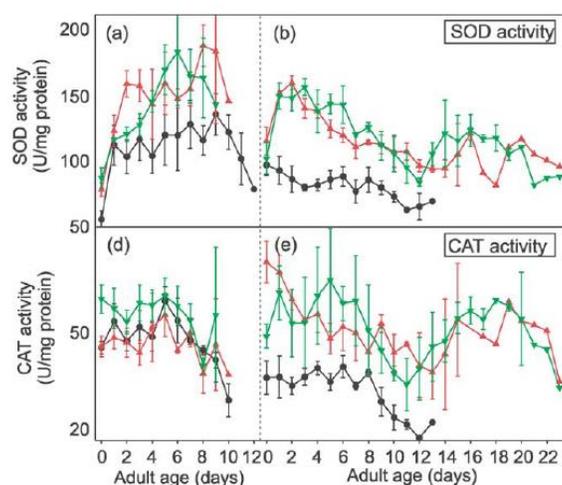


Figura 10. Niveles de la actividad de las enzimas de defensa (SOD y CAT) ante estrés oxidante en nemátodos que fueron sometidos a Restricción calórica. (a,b,c) Actividad de SOD, (d,e,f) Actividad de Catalasa. Línea negra- N2, línea roja y verde- mutantes *eat-2*. En ambas gráficas se observa una tendencia a incrementar la actividad de dichas enzimas bajo condiciones de restricción calórica comparado con el silvestre N2. Modificado de : K. Houthoofd et al. (2002).

IV. Modelos de Restricción calórica y/o dietética y ayuno

En cuanto al estudio de la restricción calórica (RC) en *Caenorhabditis elegans* es complicado debido a que en condiciones de estándar de laboratorio *Escherichia coli* es su única fuente de alimento y la reducción de calorías sin cambiar el suplemento de ingredientes particulares no es posible, por ello se han implementado diferentes métodos de RC a lo largo de todo el ciclo de vida del nemátodo (restricción crónica), que se dividen en tres grandes clases: 1) reducción en la ingesta de *E. coli* (mutantes de la faringe *eat* y dilución del alimento), 2) reducción en la ingesta de nutrientes específicos y 3) reemplazo de bacterias por un medio sintético como fuente de alimento (24). Por otro lado en mamíferos existen dos regímenes de RC: el ayuno intermitente (AI) y la restricción calórica crónica; en el caso del AI el alimento es proveído *ad libitum* tanto para el grupo control como para los grupos experimentales, sin embargo los grupos experimentales están sujetos a periodos de ayuno; en este punto cabe señalar que el AI no ha sido establecido en organismos modelo de invertebrados (27).

Debido a lo anterior, la nutrición de los nemátodos en el laboratorio se encuentra basada principalmente en cepas de *E. coli*, por lo que el estado metabólico de restricción calórica se obtiene generalmente al diluir estas bacterias o reducir la capacidad de los nemátodos para alimentarse, así como también la reducción de las vías de transporte de nutrientes (23). En cuanto a la dilución de bacterias, una reducción de la densidad bacteriana de 10 veces da como resultado un incremento del 60% en la esperanza de vida, mientras que una dilución bacteriana más alta puede extender la esperanza de vida de los nemátodos hasta en un 150% (Figura 11a); mientras que las mutaciones en genes que afectan a la mecánica de alimentación (por ejemplo, *eat-2* que causa un defecto en el bombeo faríngeo) aumentan la esperanza de vida de *Caenorhabditis elegans* en aproximadamente un 30-60% (23, 24).

En las mutaciones *eat* inductoras de RC, recientemente se ha demostrado que *eat-2* codifica una subunidad nicotínica del receptor de acetilcolina, por lo que dichas mutaciones causan defectos neuronales y musculares que perjudican el bombeo de la faringe, resultando en crecimiento lento y una apariencia hambrienta (fenotipo *eat*), además se encontró que una serie de estas mutantes exhiben mayor longevidad, por ejemplo, *eat-1* (*ad427*), *eat-2* (*ad1116*) y *eat-6* (*ad467*) se observó que incrementan la esperanza de vida en un 33, 57 y 37% respectivamente (Figura 11b). Sin embargo, en muchos otros laboratorios se observó poco o ningún aumento en la esperanza de vida de dichas cepas mutantes (3).

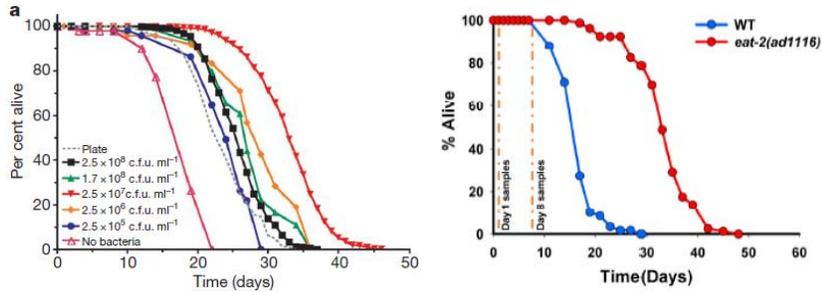


Figura 11. Modelos de restricción calórica (RC) en el nemátodo. A) Dilución de alimento a lo largo de todo el ciclo de vida. B) Mutantes eat, específicamente mutante eat-2 (ad1116). Modificado de: N. Bishop and L. Guarente (2007) Nature.

En un régimen de ayuno intermitente (AI), que aún no se ha establecido en invertebrados, el alimento se suministra *ad libitum* a los grupos control y experimental, pero el grupo experimental se somete a períodos de ayuno. En *Caenorhabditis elegans* se han reportado dos regímenes de AI, el primero es un ayuno de día alterno y el segundo un ayuno cada 2 días (Figura 12), donde se encontró que los nemátodos aumentaron su esperanza de vida en un 40% y un 57%, respectivamente (27)

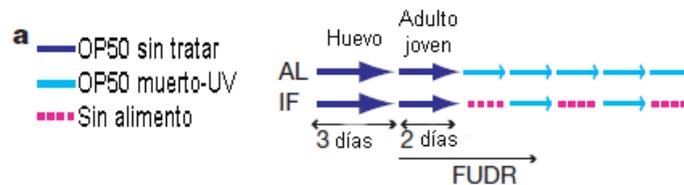


Figura 12. Modelo de Ayuno intermitente (AI), probado por primera vez en *Caenorhabditis elegans*. Modificado de: S. Honjoh et al. (2009).

Finalmente, los mayores incrementos en la esperanza de vida de *C. elegans* producidos por RC, se observan utilizando un medio líquido estéril semi-definido (sin *E. coli*), denominado medio axénico (ninguna otra especie presente), por lo cual el cultivo axénico da como resultado un aumento del 50-80% en la esperanza de vida de *C. elegans*, con respecto a las condiciones de cultivo monoxénico, además de mostrar que este efecto es altamente reproducible. Sin embargo se ha discutido si realmente el cultivo de nemátodos en medio axénico produce efectos en la esperanza de vida debido a la RC, ya que el medio es rico en proteínas, minerales, carbohidratos y vitaminas (3, 21).

Por esta razón se encuentra bien documentado que la restricción de alimentos puede aumentar sustancialmente la esperanza de vida de *Caenorhabditis elegans*, y que los factores de transcripción DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf median este efecto bajo diferentes regímenes de RC y RHEB-1 bajo condiciones de AI (3, 24, 27-30). Dicha restricción activa a SKN-1 en ambas neuronas ASI, quienes desencadenan una respuesta para aumentar la actividad metabólica (31), mientras que PHA-4 incrementa la transcripción de varios genes superóxido dismutasa (*sod*). Sin embargo, los mecanismos precisos que subyacen en el fenotipo de longevidad son en gran parte desconocidos, aunque también se

ha visto involucrada la vía de señalización TOR, así como la autofagia (27). El papel de DAF-16/FOXO, SKN-1/Nrf y RHEB-1 se explican a continuación.

i. DAF-16/FOXO

DAF-16 es un miembro de la familia FOXO (factores de transcripción de Forkhead), que son los principales reguladores del crecimiento, el metabolismo, las respuestas al estrés, el control del ciclo celular y la longevidad en muchos organismos. El locus genómico de *daf-16* codifica ocho transcritos distintos, de los cuales se predice que dos de estos (*daf-16e* y *daf-16g*) codifican proteínas que carecen de un dominio de unión al ADN, mientras que los seis restantes mRNAs comprenden tres grupos de transcritos conocidos como *daf-16a*, *daf-16b* y *daf-16d/f/h* que se transcriben a partir de tres promotores distintos y que codifican proteínas con diferentes extremos NH₂-terminales (Figura 13) (15, 32).

El factor de transcripción de *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO, es controlado por la actividad del receptor de insulina DAF-2, reprimiendo la actividad de DAF-16 mediante fosforilación y retención citoplasmática, por lo que la reducción en la vía de señalización de la insulina (IIS) incrementa la resistencia al estrés y la longevidad, efectos para los que se requiere a la proteína DAF-16/FOXO. Por otro lado, DAF-16 regula genes que intervienen en diversos procesos principalmente en señalización y regulación génica (quinasas, fosfatasa y factores de transcripción), lo que sugiere que DAF-16 funciona como un punto central dentro de una sub-red reguladora de genes (32). Por otra parte, se ha observado que las mutantes *eat* viven más tiempo debido a la restricción calórica y que a su vez este incremento en su esperanza de vida es dependiente de *daf-16* (33).

DAF-16/FOXO regula positivamente la expresión de muchos genes cuyos productos proteicos combaten diversas formas de estrés, como el estrés oxidativo a través de la superóxido dismutasa (*sod-3*), la catalasa (*ctl-1*, 2) y glutatión-S-transferasa (*gst-4*); resistencia a metales pesados a través de la metalotioneína (*mtl-1*); termotolerancia y proteotoxicidad a través de proteínas pequeñas de choque térmico (*hsp-16*, *hsp-12.6*); estrés hipertónico a través de enzimas biosintéticas de trehalosa y estrés oxidativo mitocondrial (22, 32, 34).

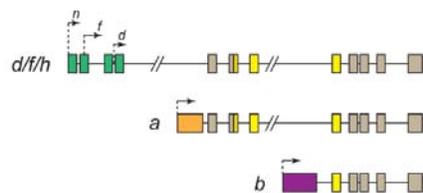


Figura 13. Estructura genómica del locus de DAF-16/FOX, donde sus exones específicos se encuentran en colores verde, anaranjado y morado. Modificado de: C. Murphy et al. (2013) WormBook.

ii. SKN-1/Nrf

Las proteínas Cap'n'collar (Cnc) forman una familia de factores básicos de transcripción de cremallera de leucina conservados en nemátodos, insectos, peces, aves y mamíferos, incluyendo humanos, pero están ausentes en plantas y hongos. Estos factores se definen por la presencia de un dominio conservado Cnc de 43 aminoácidos, situado en el extremo NH₂-terminal del dominio de unión al ADN (Figura 14a). Los factores de transcripción de Cnc comprenden a SKN-1 (miembro de la familia Skinhead 1) en *Caenorhabditis elegans*, Cnc en *Drosophila melanogaster* y los factores Nrf1, Nrf2 y Nrf3 en vertebrados, (35). Aunque SKN-1 ha divergido en relación a cómo se une al ADN, presenta un grado alto de conservación de la funcionalidad con las proteínas Nrf/CNC (Figura 14b), además de que regula muchas de las mismas familias de genes blanco (29).

Se han predicho cuatro principales isoformas codificadas por el gen *skn-1*, de las cuales sólo tres se han observado *in vivo* (*skn-1a-c*); *skn-1a* se encuentran predominantemente en el retículo endoplásmico y la mitocondria, ya que presenta un segmento transmembranal; *skn-1c* se ha mostrado que tiene la mayor expresión en el intestino, mientras que *skn-1b* se expresa únicamente en las neuronas ASI (Figura 14c). Este factor transcripcional inicia el desarrollo de la alimentación y el sistema digestivo durante las primeras etapas embrionarias y más adelante se requieren etapas post-embriónicas para desarrollar un ciclo de vida normal y resistencia al estrés; por otro lado SKN-1b está presente en los núcleos constitutivamente en las neuronas ASI (hipotálamo putativo), donde es necesario para prolongar la longevidad durante restricción calórica (28).

En *C. elegans*, SKN-1 se activa en respuesta a diversas intervenciones (por lo que se ha denominado como el protector maestro contra el estrés), tales como estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico (RE), reducción en la traducción y la actividad del proteosoma, dando lugar a la expresión de genes cuya acción se superpone parcialmente, pero es distinta a la vez (36, 37). Además el factor de transcripción SKN-1 combate contra el estrés oxidante mediante la activación de genes de la fase 2 de desintoxicación como *gst-4*, *gsc-1*, *gst-7*, *ugt-1* en respuesta a estrés oxidante, respuesta que se encuentra conservada en muchos organismos (28, 38). SKN-1 contribuye al aumento de la tolerancia a estrés y longevidad como resultado de la reducción de la vía de señalización de la insulina, ya que la IIS no sólo inhibe a DAF-16 sino que también inhibe directamente a SKN-1 en paralelo, sin embargo SKN-1b mayoritariamente se encuentra activo en el núcleo para regular la esperanza de vida de *C. elegans* independientemente de DAF-16.

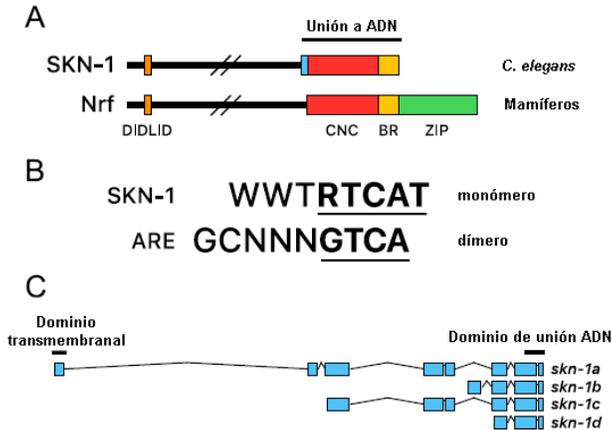


Figura 14. (A) Comparación entre SKN-1 y Nrf, (B) Comparación del sitio de unión al DNA, (C) Isoformas de SKN-1. Modificado de: T. K. Blackwell et al. (2015) *Free Radic Biol. Med.*

iii. RHEB-1/GTPasa

El blanco de la rapamicina (TOR) es una cinasa serina/treonina que se ha conservado en todos los eucariontes, y que regula el crecimiento celular y el metabolismo en respuesta a cambios ambientales, por lo que el papel de RHEB-1 y TOR (codificado por el gen *let-363*) en el aumento de la longevidad, inducido por el ayuno intermitente, se sabe que es debido a que RHEB-1 (activador de TOR), se induce bajo condiciones de bajos nutrientes (39).

El ayuno induce cambios profundos, incluyendo cambios transcripcionales, postranscripcionales y metabólicos; por lo que se ha visto que la respuesta de incremento en la esperanza de vida en ayuno intermitente, se encuentra mediada por la vía de RHEB/TOR, que se requiere para la translocación nuclear de DAF-16/FOXO y para cambios transcripcionales. Dichos hallazgos sugieren la importancia de los cambios en la transcripción que son inducidos por el ayuno, y que culminan en un incremento en la longevidad. No obstante, debido a que DAF-16 es parcialmente responsable por el aumento en la esperanza de vida inducido por AI, es posible que además de éste existan otros factores de transcripción responsables de los cambios transcripcionales inducidos por el ayuno y por lo tanto la longevidad (27, 30).

TOR regula varios procesos que podrían estar implicados en la respuesta de la longevidad a la restricción dietética, por ejemplo estimula la síntesis de proteínas mediante la modulación de componentes clave de la maquinaria de traducción, incluyendo la proteína ribosomal S6 quinasa (S6K) y el factor de iniciación de la traducción de unión a la proteína 4E (4E-BP). Además TOR regula la autofagia, que también se ha visto es inducida bajo condiciones de estrés, incluyendo la limitación de nutrientes, pues la RC estimula la autofagia en roedores y en *C. elegans* que puede entrar en el estado *dauer*, en respuesta a la limitación de alimentos y al hacinamiento, también el proceso de autofagia se ha relacionado con el incremento en la esperanza de vida en los mutantes de la vía de señalización de la insulina/IGF-1 (40).

V. Estrés oxidante

El término estrés oxidante se refiere a una condición en la cual las células están sujetas a niveles excesivos de oxígeno molecular o sus derivados químicos llamados especies reactivas del oxígeno (ROS), en condiciones fisiológicas, el oxígeno molecular sufre una serie de reacciones que conducen a la generación del anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y H_2O . El peroxinitrito ($OONO^-$), el ácido hipocloroso ($HOCl$), el radical hidroxilo (OH), los aldehídos reactivos, los peróxidos lipídicos y los óxidos de nitrógeno se consideran los oxidantes de mayor relevancia (2, 6).

El estrés oxidante es el resultado de las reacciones metabólicas que utilizan oxígeno, y se ha definido como una perturbación en el estado de equilibrio de los sistemas pro-oxidantes/antioxidantes en células, por lo que esta definición implica que las células tienen sistemas pro-oxidantes/antioxidantes que genera y desintoxica continuamente oxidantes durante el metabolismo aeróbico normal; debido a que el oxígeno es el oxidante primario en las reacciones metabólicas para obtener energía a partir de la oxidación de una variedad de moléculas orgánicas (41).

i. Radicales libres

Los radicales libres son compuestos reactivos que se producen naturalmente en el cuerpo humano, y pueden ejercer efectos positivos (sobre el sistema inmune) o efectos negativos (oxidación de lípidos y proteínas o daño al ADN); los radicales libres están normalmente presentes en el cuerpo en concentraciones mínimas, ya que los procesos bioquímicos conducen naturalmente a la formación de éstos bajo condiciones normales (Figura 15). Por otra parte, los radicales libres son moléculas tóxicas que se derivan del oxígeno, por lo que se producen persistentemente, atacan y dañan a las moléculas dentro de las células por lo que, este daño se mide como productos lipídicos peroxidados (lipoperoxidación), proteínas carboniladas y fragmentación del ADN (2, 41).

El proceso de daño de los radicales libres a las moléculas se conoce como estrés oxidante, por lo que para limitar estos efectos nocivos, un organismo requiere de una protección compleja, es decir requiere del sistema antioxidante, el cual consiste en enzimas antioxidantes como catalasa (*ctl*), glutatión peroxidasa (*gpx*), superóxido dismutasa (*sod*), glutatión-S-transfera (*gst*) y antioxidantes no enzimáticos, como la vitamina E (tocoferol), vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), glutatión y ácido úrico (2, 6, 41). Los antioxidantes neutralizan los radicales libres donando uno de sus electrones poniendo así fin a la reacción de ganancia de electrones; por otro lado es importante mencionar que los nutrientes antioxidantes no se convierten en radicales libres por donar un electrón ya que son estables en cualquiera de las dos formas, por lo que actúan ayudando a prevenir el daño celular y tisular que podría conducir a daño celular y la muerte (2, 36, 41).



Figura 15. Esquema del sistema antioxidante/oxidante, donde se observa a la acción y formación de radicales libres en el organismo. Modificado de: Fundación UNAM (2012).

ii. Superóxido dismutasa (SOD)

La producción biológica de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son capaces de provocar daño a moléculas de diferentes clases, incluyendo aminoácidos y ácidos nucleicos (29).

Durante la transferencia de electrones, una pequeña fracción de electrones se desprende y reacciona con el oxígeno molecular (O_2) para formar un anión superóxido (O_2^-) mediante el paso de reducción de un electrón. El anión superóxido es un radical libre extremadamente reactivo, de vida corta e incapaz de cruzar membranas, además es importante mencionar que el anión superóxido no se forma exclusivamente en las mitocondrias sino también como un subproducto de varias reacciones enzimáticas en el citosol y otros organelos (Figura 16).

Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), son enzimas especializadas que capturan el anión superóxido O_2^- y lo reducen a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dichas enzimas tienen un cofactor de iones de metal de transición en su dominio catalítico que reacciona con el anión superóxido reduciéndolo a H_2O_2 . En el nemátodo *C. elegans* se encuentran cinco genes de codificación a SOD, dos se encuentran en el citosol *sod-1* y *sod-5* (Cu/ZnSOD), dos en la mitocondria *sod-2* y *sod-3* (MnSOD) y *sod-4* es extracelular (Cu/ZnSOD) (41).

iii. Catalasa (CAT)

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un agente de señalización REDOX, actúa como un segundo mensajero ya que reacciona con grupos tiol de residuos de cisteína en proteínas implicadas en dicha señalización, alterando así su función primaria; es un agente relativamente estable hasta que reacciona con metales de transición, para formar sustancias altamente reactivas y tóxicas conocidas como radicales hidroxilo (OH), además de que tiene la capacidad de cruzar fácilmente las membranas celulares. En la mayoría de las células, la catalasa (CAT) descompone el H_2O_2 en oxígeno y agua, evitando así la formación de radicales libres (41, 42).

Se ha demostrado que el H_2O_2 endógeno se forma principalmente por la flavoproteína mitocondrial monoamina oxidasa y por la superóxido dismutasa (SOD), quien cataliza la dismutación de los radicales superóxido (O_2^-) generados por la cadena respiratoria mitocondrial y por el transporte de electrones. *Caenorhabditis elegans* posee tres genes que codifican la catalasa, *ctl-1* es una catalasa citosólica mientras que *ctl-2* es peroxisomal y representa el 80% de la actividad total de la catalasa, mientras que la localización celular específica de *ctl-3* no se ha definido hasta la fecha. Además de estos tres genes de catalasa, *C. elegans* expresa ocho proteínas glutatión peroxidasa, quienes utilizan a glutatión como un donante de electrones para reducir el H_2O_2 en H_2O (Figura 16) (42). Finalmente el estrés oxidante causado por los altos niveles de peróxido de hidrógeno es inherente a patologías como el cáncer, la diabetes, cataratas en los ojos, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento y deficiencias nutricionales (6, 42, 43).

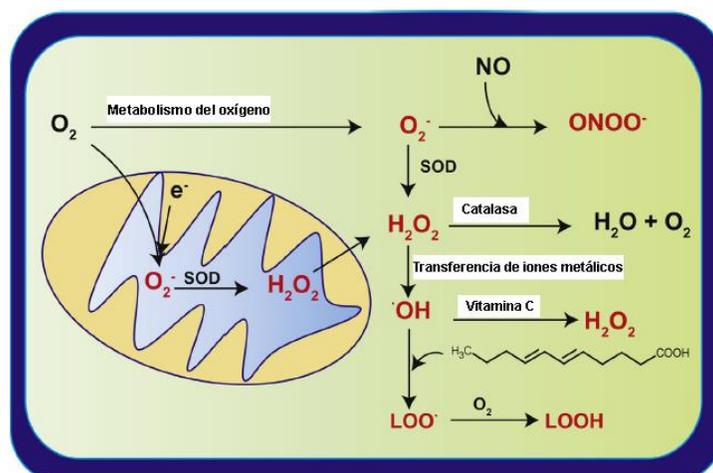


Figura 16. Formación de ROS y actividad enzimática. Modificado de: C.F. Labuschagne, A.B. Brenkman (2013) 918–930

Finalmente, la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) se ha visto que incrementa en la formación de nemátodos *dauer* y disminuye cuando los nemátodos son expuestos a alimento para reestablecer sus niveles normales. Por otra parte, también se ha observado que la actividad de SOD tiende a incrementar en nemátodos que crecen en medios sólidos, ya que la concentración de oxígeno es 30 veces mayor en el aire (14).

VI. Metabolismo de xenobióticos

El metabolismo de xenobióticos se divide en dos fases sucesivas que resultan en la desintoxicación y la eventual excreción de compuestos (fase III) que podrían ser perjudiciales para el organismo. El metabolismo de la fase 1 comprende reacciones que añaden grupos funcionales, a menudo grupos hidroxilo a los compuestos que causan daño, dichos grupos funcionales son normalmente pero no siempre requeridos para el metabolismo de la fase 2, ya que la adición del grupo funcional durante la fase 1 resulta en

la generación de una molécula polar (lo que facilita su excreción) y un sustrato más reactivo para las enzimas de fase 2, que catalizan reacciones de conjugación que aumentan la solubilidad, cabe señalar que en *C. elegans* la respuesta de fase 2 es orquestada principalmente por el factor de transcripción SKN-1 (28).

Cada fase del metabolismo de desintoxicación es catalizada por enzimas específicas, la mayoría de las cuales residen en retículo endoplásmico liso que sirve como un centro de desintoxicación celular. En la fase I, los xenobióticos o endobióticos lipófilos son solubilizados por enzimas como el citocromo P450 (CYP), de las cuales se conocen 86 genes en *C. elegans*, deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDH) de las que se han documentado 63 genes. Los productos reactivos generados por estos u otros procesos son metabolizados por la fase II, donde pasan por enzimas que sintetizan el agente reductor glutatión (GSH), se metabolizan las moléculas reactivas o grupos reactivos conjugados (entre las que se incluyen radicales libres de oxígeno que surgen de la respiración mitocondrial u otras fuentes) por las glutatión-S-transferasas (GST) (48 genes) y UDP-glucuronosil/glucosiltransferasas (UGT) (72 genes); y finalmente en la fase III las toxinas conjugadas son expulsadas de las células por las proteínas transportadoras ABC (casette de unión a ATP) y otros transportadores. Cuando *Caenorhabditis elegans* se expone a un estrés oxidativo agudo, el SKN-1 se acumula en los núcleos intestinales y activa los genes de desintoxicación de fase II que corresponden a los blancos canónicos de Nrf2 (29, 44).

i. Ciclo de Glutatión

El glutatión (GSH) es un tripéptido (L-glutamato, L-cisteína, L-glicina) conocido por participar en muchos aspectos de la actividad celular, incluyendo la síntesis de proteínas y ADN, transporte, detoxificación de xenobióticos y carcinógenos, metabolismo y defensa contra los radicales libres y el estrés oxidante. Se sintetiza en el ciclo γ -glutamil (Figura 17) por la glutatión sintetasa (GS). GSH se encuentra principalmente en su forma reducida y sólo del 1-5% en su forma oxidada glutatión-disulfuro (GSSG), quien es reducida de nuevo a GSH por la enzima glutatión-disulfuro reductasa que requiere de NADPH₂. La pareja GSH/GSSG representa un importante amortiguador celular redox que contribuye significativamente al mantenimiento del medio intracelular reducido y por tanto a la capacidad antioxidante de las células. La homeostasis del GSH intracelular está regulada por una vía de síntesis que consiste en una reacción en dos etapas catalizada por γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS) y GSH sintetasa (GSS) (45).

Se ha descrito que el GSH exógeno representa una fuente importante para mantener los niveles de GSH intracelular, esto después de la descomposición extracelular y la re-síntesis intracelular del tripéptido que se da través del ciclo γ -glutamil, donde la γ -glutamil transferasa (GGT) cataliza y limita el primer paso de dicha síntesis. Debido a que glutatión es una coenzima o un sustrato para diversas enzimas como la glutatión peroxidasa (GPX), glutatión S-transferasa (GST) y glutaredoxina (GLRX), GSH funciona como un actor

iii. glutatión-S-transferasa 4 (GST-4)

La fase 2 del metabolismo de xenobióticos, comprende las reacciones de desintoxicación, empleando las UGTs y GSTs como principales herramientas enzimáticas para estas reacciones(44). Las glutatión S-transferasas (GST) son una clase de enzimas de desintoxicación que catalizan la conjugación de glutatión a electrófilos; en *C. elegans*, la expresión de la GST que codifica el gen *gst-4* es activado por compuestos del ciclo REDOX, electrofilos y metales pesados. Se ha demostrado que *gst-4* es necesario para la resistencia normal a la naptoquinona y la juglona quienes provocan estrés en el nemátodo, por otro lado se ha visto que *gst-4* se induce predominantemente en el intestino (51).

SKN-1 es un factor de transcripción que desempeña múltiples funciones esenciales, por lo que la localización de SKN-1 en el núcleo es un pre-requisito esencial para activar la transcripción de los genes blanco, como *gst-4* y *gcs-1*. Por otra parte, dentro de los genes que son regulados positivamente por SKN-1 bajo condiciones normales, se encuentran genes que están directamente relacionados con procesos de estrés, siendo *gst-4* el que presenta una mayor expresión, ya que parece funcionar no sólo como GST, sino también como una prostaglandina D sintasa dependiente de glutatión (52).

Finalmente es importante señalar que la activación transcripcional de *gst-4* es usualmente atribuida a la actividad de SKN-1, sin embargo la glutatión S-transferasa 4 no se encuentra bajo control exclusivo de SKN-1, ya que *gst-4* puede ser transcripcionalmente activado por EOR-1, factor transcripcional que media los efectos de la vía del factor del crecimiento epidérmico (53).

iv. Peroxidación lipídica

La lipoperoxidación o peroxidación lipídica es considerada como el principal mecanismo relacionado con el daño oxidante en las estructuras celulares y con el proceso de toxicidad que lleva a la muerte celular, dicho proceso es una cadena de reacciones iniciada por la abstracción o adición de un radical de oxígeno, resultando en el daño oxidante a ácidos grasos poliinsaturados(Figura 18) (2, 54). Por otra parte, la peroxidación lipídica es un proceso complejo que ocurre tanto en plantas como en animales e implica tres etapas distintas: iniciación, propagación y terminación, las que involucran la formación y propagación de radicales lipídicos, la obtención de oxígeno, el reordenamiento de las uniones dobles en los lípidos insaturados y la eventual destrucción de las membranas lipídicas, junto con la producción de una gran variedad de productos de descomposición como lo son alcoholes, cetonas, aldehídos y éteres (2).

Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados para determinar el daño oxidativo de los lípidos, el más comúnmente utilizado se basa en la reacción del malondialdehído con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para formar aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-

TBA muy estables y que se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción visible, ya que la determinación de la magnitud de la peroxidación lipídica es muy difícil debido a que los productos de la misma son muy reactivos y de corta vida, por lo cual se determinan los productos de la degradación metabólica de los lipoperóxidos, y el malondialdehído (MDA) es el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación (54).

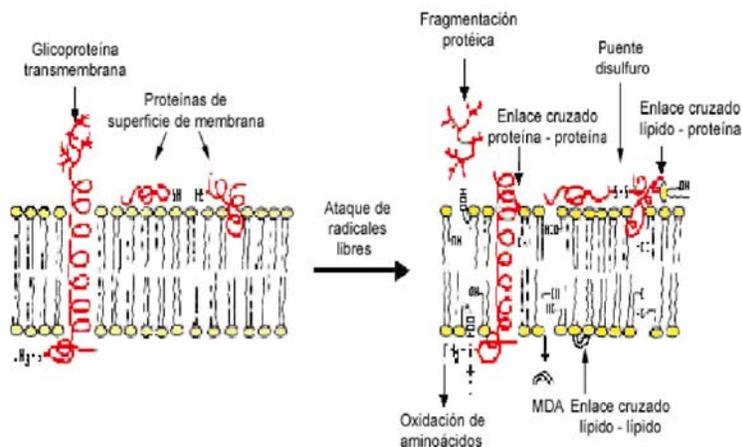


Figura 18. Representación del ataque de los radicales libres a las membranas biológicas. Modificado de: M. Repetto et al. (2012) InTech.

3. Pregunta

¿Los factores transcripcionales DAF-16 y SKN-1 se encuentran regulando la resistencia al estrés nutricional provocado por un ayuno de 12 horas en el estadio L4 del nemátodo *Caenorhabditis elegans*?

4. Objetivo

Determinar la participación de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf2 en la resistencia al estrés nutricional en *Caenorhabditis elegans* durante el estadio larvario L4, cuando es sometido a 12 horas de ayuno.

Objetivos particulares

- 1) Evaluar la esperanza de vida de *C. elegans* en condiciones de ayuno de 12 horas.
- 2) Evaluar la abundancia de los mRNA de los factores transcripcionales *daf-16/FOXO* y *skn-1/Nrf-2* de *C. elegans* en condiciones de ayuno de 12 horas.
- 3) Evaluar la participación de los factores de transcripción *daf-16/FOXO* y *skn-1/Nrf-2* en la regulación de la esperanza de vida en *C. elegans* cuando es sometido a condiciones de ayuno de 12 horas, empleando cepas mutantes y RNAi de éstos genes.
- 4) Determinar si el ayuno de 12 horas en *C. elegans* promueve la generación de especies reactivas de oxígeno que forman parte de las respuestas celulares ante este estrés.

5. Justificación

La privación de alimento, es un evento común al que se enfrentan todos los organismos, a lo largo de su ciclo de vida, no obstante existe muy poco conocimiento sobre las respuestas fisiológicas y moleculares que se generan ante dicho estrés. *Caenorhabditis elegans* es un nematodo de vida libre no parásito, el cual ha sido ampliamente utilizado como modelo para el estudio de los efectos fisiológicos que tienen distintos regímenes alimenticios, particularmente la restricción calórica (23), en la cual se ha observado de forma general que el nemátodo genera resistencia al estrés e incrementa su esperanza de vida. Lo anterior ha sido relacionado con cambios en la expresión de múltiples genes, dentro de los que sobresalen los factores transcripcionales DAF-16/FOXO, SKN-1/NRF-2 y la GTPasa RHEB-1 dependiendo del tipo de restricción alimenticia a la que se somete.

Gran parte de los reportes se han centrado en modelos de restricción calórica, es decir dilución de alimento, mutantes que comen menos y ayuno intermitente (24) no obstante, existen pocos trabajos donde se estudien las respuestas fisiológicas y los mecanismos genéticos que se presentan ante la privación total de alimento *C. elegans*. Por lo cual, hemos implementado un modelo de ayuno en *C. elegans*, en el cual lo hemos privado de alimento por 12 horas en la etapa L4 ya que en reportes previos se ha observado por medio de estudios de transcriptómica que los principales cambios en la expresión de genes ocurre entre las 9-12 horas de ayuno (30).

6. Hipótesis

Los factores transcripcionales DAF-16 y SKN-1 regulan la esperanza de vida y la resistencia al estrés provocado por un ayuno de 12 horas en *Caenorhabditis elegans*.

7. Metodología

I. Cepas y cultivo

En el presente trabajo se utilizaron 4 cepas distintas del nemátodo *Caenorhabditis elegans*: la cepa N2 (silvestre), las cepas mutantes *skn-1 (zu135)* y *daf-16 (mgDf50)*, así como el transgénico *skn-1::GFP (LD1)*. Adicionalmente se generaron líneas de nemátodos con genes silenciados por medio de RNA de interferencia (*daf-16-B8* y *PL4440*). Todas las cepas utilizadas se cultivaron en el Medio de Crecimiento para Nemátodos (NGM), fueron mantenidas a 18°C y alimentadas con *Escherichia coli* OP50 mientras que, para las líneas RNAi se utilizó *Escherichia coli* HT115 (DE3)-K12.

II. Sincronización de cepas

Para la obtención de nemátodos en el mismo estadio, se llevó a cabo la sincronización de nemátodos grávidos (después de su primera puesta de huevecillos), éstos fueron lavados y separados de las larvas L1 por medio de sedimentación en un tubo Falcon de 15 ml con solución amortiguadora M9, una vez separados los nemátodos grávidos se lavaron 2 veces más con la solución amortiguadora M9 para eliminar los residuos de bacteria. Finalmente se retiró el mayor volumen de solución amortiguadora posible; el botón de nemátodos fue transferido a un tubo eppendorf, al cual se le agregó 1 ml de la mezcla NaOH-Cl (2 perlas de NaOH ~200mg, 2 ml cloro de uso comercial, 5 ml dH₂O), se agitó en vortex aproximadamente 40 segundos y después se centrifugó a 4500 rpm/30 seg/temperatura ambiente, se retiró todo el sobrenadante y se repitió este paso. Al final de este paso se obtuvo un botón pequeño de color blanco (huevecillos) que fue lavado 5 veces con solución amortiguadora M9, tras el último lavado se agregó 1 ml de solución amortiguadora M9 en el cual se resuspendieron los huevecillos y fueron transferidos a un tubo Falcon con 9 ml de dicha solución amortiguadora en el que se dejaron en agitación durante 24 horas o hasta que los huevecillos eclosionaran. Una vez eclosionados los huevecillos, los nemátodos se encontraban en estadio L1 y se sembraron en medio NGM con alimento.

III. Ensayos de ayuno

La obtención de muestras de nemátodos en estadio larvario L4 alimentadas así como en ayuno de 12 horas fue una parte primordial de este trabajo, para ello los nemátodos que se obtuvieron de la sincronización fueron crecidos y alimentados en medio NGM o NGM lite (RNAi) desde el estadio L1 hasta el inicio del estadio L4 (aproximadamente entre 48-50 horas después de haber sido sembrados). Una vez que los nemátodos alcanzaban el estadio L4 eran retirados de sus cajas con solución amortiguadora M9 y transferidos a tubos de 15 ml, en donde por medio de sedimentación se obtuvo un botón con todos los nemátodos y se retiró todo el sobrenadante, dicho botón se lavó 3 veces con solución amortiguadora M9 para retirar todos los residuos de bacteria, en el último lavado se retiró toda la solución amortiguadora posible y el botón de nemátodos fue sembrado en dos nuevas cajas de

NGM/NGM lite una con alimento y la otra sin alimento. Una vez que las cajas se encontraban con los nemátodos sembrados se siguieron manteniendo a 18°C y se comenzó con el conteo de 12 horas tanto para la condición de ayuno como para la condición control.

Al finalizar el periodo de 12 horas las cajas con los nemátodos L4 control y ayuno fueron retirados de sus cajas con solución amortiguadora M9 y transferidos a tubos de 15 ml, en donde por medio de sedimentación se obtuvo un botón con todos los nemátodos y se retiró todo el sobrenadante, el botón de los nemátodos control se lavó 3 veces con solución amortiguadora M9 para retirar todos los residuos de bacteria, mientras que el botón de nemátodos puestos en ayuno sólo se dejó sedimentar, finalmente se retiró toda la solución amortiguadora posible, los botones fueron transferidos a tubos eppendorf diferentes previamente rotulados, los cuales fueron congelados con nitrógeno líquido durante 4 minutos y almacenados a -70°C.

IV. Silenciamiento de genes por RNAi

Para llevar a cabo el silenciamiento del gen *daf-16* por medio de RNAi, fue utilizada la bacteria *Escherichia coli* HT115 transformada con el vector vacío L4440 y otras bacterias transformadas con el fragmento del gen *daf-16*, en este último caso se probaron dos cepas distintas para silenciar a *daf-16*.

Se inocularon las cepas de RNAi en medio 2xYT, para ello se agregó 200 µl de bacterias en glicerol por cada 5 ml de medio, una vez que se obtuvo el inóculo este se dejó incubando toda la noche a 37°C en agitación.

Posteriormente se llevó a cabo la inducción de las bacterias, para lo cual en un matraz Erlenmeyer de 100 ml, se agregaron 20 ml de medio 2xYT, 2 ml del inóculo de las cepas RNAi e IPTG [0.4 mM], se agitó levemente y se incubó durante 2 horas a 37°C en agitación para obtener una mayor cantidad de bacterias. Transcurrido este tiempo el medio fue transferido a un tubo Falcon de 50 ml, el cual fue centrifugado a 10000 rpm/10 min/temp. ambiente, una vez centrifugado se obtuvo un botón de bacterias el cuál se conservó, mientras que el sobrenadante fue desechado. Finalmente al botón de bacterias le fue agregado 5 ml de medio 2xYT, se mezcló en vortex y se almacenó a 4°C.

Para la generación de líneas RNAi de nemátodos, se partió de nemátodos silvestres N2, los cuales fueron alimentados desde el estadio larvario L1 con la cepa *Escherichia coli* HT115 *daf-16-B8* y *daf-16-D8* que se obtuvo anteriormente y crecidos en medio sólido NGM lite. Una vez que los nemátodos se encontraban en el estadio adulto se sincronizaron y los nemátodos L1 obtenidos de la sincronización se continuaron alimentando con la cepa transformada. En este caso estos nemátodos (primera generación) ya presentaban el silenciamiento del gen *daf-16* por lo que esta generación es la que se utilizó para la obtención de muestras de nemátodos RNAi.

V. Ensayos de longevidad

Por lo que se refiere a los ensayos de longevidad, los nemátodos que fueron sincronizados y sometidos a tratamiento de ayuno 12 horas en el estadio L4 o bien fueron alimentados todo el tiempo, al llegar al estadio de adulto joven se separaron aproximadamente entre 100-140 nemátodos en cajas pequeñas en donde fueron alimentados todo el tiempo. Cada día aproximadamente a la misma hora se realizó el conteo de nemátodos que permanecían vivos y cuántos habían muerto, tomando en cuenta los siguientes criterios de conteo y censura:

- Se consideraron para el análisis aquellos nemátodos que morían a consecuencia del tratamiento
- Los nemátodos que morían enterrados en el agar y pegados a la caja fueron censurados al momento del análisis
- Censura de nemátodos que morían a causa de “bagging” (embolsado) un efecto que se llega a observar de manera poco frecuente en individuos silvestres pero en individuos mutantes es más frecuente dependiendo del gen mutado (28).
- Censura: con los datos obtenidos de *bagging* se llevó a cabo un análisis de comparaciones múltiples de Tukey.

Una vez terminado el ensayo, los datos obtenidos fueron analizados con el programa OASIS (55) y GraphPad Prism 6.01.

VI. Obtención de muestras de nemátodos L4

Se cultivaron nematodos en las condiciones anteriormente descritas (control y ayuno de 12 horas), terminado el tratamiento, fueron cosechados y limpiados con amortiguador M9 tal y como se describe en el apartado de “sincronización de cepas” y se preservaron a -70°C para su procesamiento posterior.

VII. Extracción de RNA de *C. elegans* con Trizol

La extracción de RNA tanto con el método de Trizol como con el Kit comercial RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen), se realizó tomando las muestras de nemátodos congelados a las cuales se les agregó 500 ul de QIAzol (reactivo de lisis que contiene Isotiocianato de Guanidina y fenol) por cada 100 ul de muestra, a continuación las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y después fueron llevadas a 37°C en termomixer, este paso se repitió 3 veces. Una vez que las muestras se descongelaron, fueron agitadas en vortex 30 segundos y se dejaron reposar otros 30 segundos en frío, este paso se repitió 5 veces, posteriormente se agregaron 100 ul de cloroformo (por cada 500 ul de QIAzol) se agitó a mano 20 seg. y la mezcla se dejó reposar durante 3 min. a temperatura ambiente, pasado este tiempo se centrifugó a 11,400 rpm/15 min/4°C y se obtuvo la formación de tres fases, de las cuales sólo se tomó la fase superior (sin tocar la fase media) y se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, se agregó 1/10 del volumen de la fase, de acetato de sodio 3M pH 4.8 (2.46 g

acetato de sodio, 8 ml H₂O DEPC, ajustar pH con Ác. acético) y 2 volúmenes de isopropanol frío, se almacenó a -70°C durante toda la noche y al día siguiente se descongeló el tubo, se centrifugó a 11,400 rpm/15 min/4°C y se retiró todo el sobrenadante teniendo cuidado de no tomar el botón formado en la parte final del tubo. El botón se lavó con 100 ul de etanol al 70%, se centrifugó a 11,400 rpm/10 min/4°C, este paso se repitió 3 veces y hasta el último lavado se retira el sobrenadante, finalmente el botón es secado a 37°C en termomixer durante 5 minutos y se le agregan 25 ul de H₂O DEPC para resuspender el botón, en este volumen se encuentra el RNA.

El RNA obtenido fue cuantificado en Nanodrop, para determinar la cantidad y pureza, y posteriormente fue analizada su integridad en un gel de agarosa al 1% (0.3 g agarosa, 30 ml solución amortiguadora TAE 1X).

VIII. Retrotranscripción (RT)

Los ensayos de retrotranscripción y PCR punto final fueron realizados con las muestras de RNA correspondientes tanto a ayuno de 12 horas como a controles. Para una reacción de retrotranscripción se utilizó de manera general 3 ul de RNA stock [100 ng/ 10 ul], 1 ul oligo reverse [10 pmol/ul] y un mezcla que consta de los siguientes componentes: 2 ul solución amortiguadora reverse, 1 ul dNTPs [10 mM], 2.5 ul H₂O DEPC y 0.5 ul enzima reverse transcriptasa [200 U/ul] (una unidad de enzima incorpora 1 nmol de dTMP en una fracción de polinucleótidos en 10 min. A 37°C).

IX. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la PCR se tomó todo el producto de la retrotranscripción, es decir los 10 ul de la reacción, a esta se le agregó una mezcla que contenía los siguientes componentes: 2.5 ul solución amortiguadora Taq, 2.5 ul MgCl₂ [25 mM], 0.5 ul dNTPs [10 mM], 8.2 ul H₂O DEPC y 0.5 ul enzima Taq polimerasa [5 U/ul] (una unidad de incorpora 10 nmol de desoxirribonucleótidos en DNA en 30 min a 74°C), además se le agregó 1 ul de cada uno de los oligonucleótidos tanto forward como reverse [10uM]. Obteniendo un volumen final de 16.2 ul de la reacción de PCR utilizó la misma programación para todos los casos y sólo se cambió la temperatura de alineamiento según fuera la T_m de los oligonucleótidos.

X. Electroforesis en geles de poliacrilamida para la visualización de productos de PCR

Una vez terminada la PCR, el producto obtenido fue analizado mediante la electroforesis de un gel de acrilamida al 12% (3.2 ml acrilamida al 30%, 800 ul Solución amortiguadora TBE 10 X, 4 ml dH₂O, 80 ul APS 10%, 10 ul TEMED) durante 3 h/60V/12 mA, ya que los amplicones generados para todos los genes con los que se trabajó se encontraban en un

intervalo de 100-115 pb. Posterior a esto los geles fueron teñidos con bromuro de etidio [5 ul/100ml] y observados en el fotodocumentador, obteniendo imágenes que más adelante fueron analizadas por medio de densitometría con el programa ImageJ.

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'→3') |
|------------------|------------------------------------|
| actina forward | CCG TGA AAA GAT GAC CCA AAT C |
| actina reverse | GGT ACG TCC GGA AGC GTA GA |
| daf-2 forward | TGC AGA CAG AAC GAT GAC GAG AAT G |
| daf-2 reverse | GAG CTT CGG TGG CAG CGG TTG |
| daf-16 forward | AAA GAG CTC GTG GTG GGT TA |
| daf-16 reverse | TTC GAG TTG AGC CTT TGT AGT CG |
| skn-1-a forward | ACG ACG AAG AAG AGA CGA CG |
| skn-1-a reverse | TGT TGG ACG ATG GTG AAC TG |
| skn-1-b forward | TGG ATC AAC ACG GCC ATC ATC |
| skn-1-b reverse | GGC GTA GTT GGA TGT TGG GAA C |
| skn-1-c forward | AAG GGC ACA CGA CAA GTG G |
| skn-1-c reverse | AGC ATT CTC TTC GGC AGT GAG |
| gst-4 forward | CTC TTG CTG AGC CAA TCC GT |
| gst-4 reverse | CTG GCC AAA TGG AGT CGT TG |
| gsc-1 forward | GGA ATG CCT TAC GGA GGT C |
| gsc-1 reverse | CGA TAG ACA TGT TTC ATC CTT C |
| skn-1 forward | GAT TAA GAT CGC GAG AGT TGT TCC AC |
| skn-1 reverse | ACA CTG GAA GCT CGT TGT CAC TGG CG |

XI. Extracción de proteínas totales de *C. elegans*

Se tomaron muestras de nemátodos congeladas a -70°C , una vez que las muestras se descongelaron en hielo, fueron pesadas para agregar solución amortiguadora de lisis dependiendo de su peso (100 ul solución amortiguadora si el peso es <90 mg, 150 ul solución amortiguadora si es peso es >90 mg), después de agregar la solución amortiguadora de lisis las muestras se mezclaron en vortex por 30 segundos, se congelaron en nitrógeno líquido y se descongelaron a 37°C en termomixer, esto se repitió 3 veces para así desgastar la cutícula de los nemátodos, una vez que se descongeló por última vez, las muestras se mantuvieron en hielo y se sonicaron durante 3 ciclos de 15 seg. por 45 seg. de

reposo o 5 ciclos de 15 seg. por 45 seg. de reposo dependiendo del tamaño de la muestra, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm/10 min/4°C y fue transferido el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, ya que en éste se encuentran las proteínas, mientras que el botón fue desechado.

XII. Extracción de proteínas citoplásmicas y nucleares

Se realizó el mismo procedimiento para la extracción de proteínas totales, sin embargo la muestra sonicada en este caso se centrifugó a 1000 g/5 min/4°C, el sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf nuevo y puesto en refrigeración (en este se encontraban las proteínas de citoplasma y mitocondriales), por otra parte el botón formado correspondía a la fracción nuclear cruda la cual fue lavada con 200 ul de solución amortiguadora de extracción y se centrifugó a 1000 g/5 min/4°C, fue descartado el sobrenadante y este paso se repitió, tras descartar el sobrenadante del último lavado se agregaron 200 ul de solución amortiguadora de lisis y se mezclaron los núcleos por medio de pipeteo aproximadamente 10 veces.

XIII. Slot-blot y Western blot

Con respecto a la determinación de la abundancia de proteínas, se llevaron a cabo ensayos de Slot Blot y Western Blot, el primero fue utilizado sólo para la proteína DAF-16. En este caso se montó el equipo de Slot Blot con tres capas de papel filtro y una membrana de nitrocelulosa (previamente humedecidos con TBS 1X), una vez montado todo el equipo se conectó a una bomba de vacío y se comenzó con la técnica. En primer lugar se rehidrató la membrana con 100 ul TBS 1X en cada pozo, después se agregaron las muestras de proteínas (las cuales fueron llevadas a un volumen de 200 ul con TBS 1X [20 ug proteína] y hervidas durante 5 min), una vez que las muestras fueron absorbidas, se lavó con 100 ul de TBS 1X dos veces. Se retiró la membrana del equipo y se bloqueó con TBS-tween 0.1%- leche baja en grasa 5% durante una hora a temperatura ambiente, una vez bloqueada la membrana se lavó dos veces con TBS-tween 0.1% durante 20 segundos y 5 minutos con TBS 1X. Después de los lavados se incubó con el anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology, No. cat. sc-9230, lot. #B2614) (TBS-tween 0.1%-daf-16 [1:1000]- leche 5%) 1 hora a temperatura ambiente, pasado este tiempo se lavó como la primera vez (2x TBS-tween 0.1%- 20 seg, TBS 1X- 5 min) y se incubó con el anticuerpo secundario (TBS-tween 0.1%-anticuerpo [1:1000]- leche 5%) durante 1 hora a temperatura ambiente, después fue lavada la membrana como las veces anteriores y por último se realizaron dos lavados con H₂O destilada.

En el caso de los ensayos de Western Blot, se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida 8 y 10% dependiendo del tamaño de la proteína que se observó, el tiempo de corrida fue de 2:40-3 horas en todos los casos. En este caso la cantidad de proteína también fue de 20 ug, una vez realizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa a 70 V/ 3:15 min/7°C. Después de la transferencia la membrana fue bloqueada toda la noche a 4°C (TBS-tween 20 0.1%-leche 5%), al día siguiente se lavó con PBS 1X dos veces y se incubó con el anticuerpo primario (TBS-tween 0.1%-daf-16, daf-2 (Santa Cruz Biotechnology, No. cat. sc-9232 lot. #F0314)

actina [1:500] (Desarrollado y clonado por el Depto. De Bioquímica, Facultad de Medicina. UNAM) - leche 5%) toda la noche a 7°C, posteriormente la membrana fue lavada con PBS 1X dos veces y se incubó con el anticuerpo secundario (Santa Cruz Biothechnology No. cat. sc-2020, lot. #H2113) (TBS-tween 20 0.1%-daf-16, daf-2 [1:1000] /actina [1:2000]-leche 5%) dos horas a temperatura ambiente. Finalmente se observaron las membranas en el fotodocumentador, se obtuvieron las imágenes y se analizaron por densitometría.

XIV. Actividades enzimáticas

i. Actividad de Catalasa

Por lo que se refiere a la actividad de catalasa se siguió el ensayo Espectrofotométrico de Molibdato para H₂O₂ (Goth, 1991), en donde se utilizaron muestras de proteínas totales en una concentración de [20 ug/20 ul], en una placa de ELISA se colocaron 100 ul de PBS-H₂O₂ (10 ml PBS 0.1 M, 13.6 ul H₂O₂ 12 mM) por cada pozo, después de esto se agregaron los 20 ul de proteína de las muestras y se contaron 30 segundos, después de este tiempo la reacción se detuvo agregando 100 ul de molibdato de amonio 32.4 mM y de inmediato se cuantificó la absorbancia en el lector de placas a 405 nm. Adicionalmente se cuantificaron dos blancos, el primero con 100 ul PBS- H₂O₂ + PBS 1x + 100 ul molibdato de amonio y el segundo con 120 ul PBS 1x + 100 ul molibdato de amonio. Una vez obtenidos los datos de la absorbancia se analizaron mediante la siguiente ecuación para determinar la actividad de Catalasa: $x = (A405 \text{ muestra} - A405 \text{ blanco 2} / A405 \text{ blanco 2} - A405 \text{ blanco 3}) \times 271$.

ii. Actividad de Superóxido dismutasa

En el caso de la actividad de la súperoxido dismutasa (SOD), fue utilizado el kit SOD Assay de Sigma y los ensayos se llevaron a cabo en una placa de ELISA. En cada pozo se colocó 20 ul de la muestra de proteína, 100 ul de solución de trabajo y 20 ul de enzima, una vez agregado todo se incubó la placa a 37°C/20 min, posterior a este tiempo se cuantificó la absorbancia a 450 nm, ya obtenidos los valores fueron analizados con la siguiente ecuación: $\% \text{inhibición} = \{[(\text{blanco1} - \text{blanco3}) - (\text{muestra} - \text{blanco2})] / (\text{blanco1} - \text{blanco3})\} * 100$, para determinar la actividad de SOD.

XV. Determinación de peroxidación lipídica

Finalmente, los ensayos de lipoperoxidación se realizaron siguiendo la reacción de malondialdehído con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para formar aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables. Método colorimétrico de TBARs propuesto por Asakawa, T., Matsushita, S. (1981). Se realizó una curva estándar con concentraciones que abarcaron un rango de 0 a 2000 nM, y en la cual fue utilizado TMP 20 mM como precursor de malondialdehído, y la solución de TBA 0.375%, posterior a esto se llevó a cabo la reacción para todas las muestras, en donde se agregó 100 ul de la muestra de proteína y 400 ul TBA 0.375% en un tubo de ensayo. Una vez que todas las muestras y la curva estaban listas, se hirvieron durante 45 min a baño maría. Transcurrido este tiempo tanto las muestras de la curva como las muestras de trabajo fueron transferidas a un tubo eppendorf nuevo, se centrifugó 5000 rpm/1 min/temp. ambiente y después fueron colocadas en una

placa de ELISA para su lectura a 532 nm, posteriormente se analizaron los datos obtenidos para determinar la cantidad de TBARs (sustancias reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico).

XVI. Ensayos de translocación nuclear de SKN-1B

i. Montaje de laminillas

La microscopía de fluorescencia se llevó a cabo con la cepa *skn-1b::GFP (LD1)* la cual también fue sometida al tratamiento de ayuno y control, una vez que el tiempo de tratamiento transcurrió, los nemátodos fueron lavados y transferidos a un tubo eppendorf el cual se congeló 2 minutos en nitrógeno líquido y después se dejó descongelar a temperatura ambiente; esto para hacer una fijación física de los nemátodos. Posterior a esto se montaron laminillas con 5 ul de nemátodos y 5 ul de medio de montaje (Vectashield). Ya que las laminillas se encontraban montadas se observaron al microscopio de fluorescencia y confocal.

ii. Microscopía de fluorescencia

En cuanto a la microscopía de fluorescencia, ésta se llevó a cabo en el laboratorio de Nanobiología Celular de la Facultad de Ciencias a cargo del Dr. Luis Felipe Jiménez, todas las laminillas fueron observadas en un microscopio NIKON Eclipse E800 (0180838), a 60X con un filtro de 390-480 nm, y una vez obtenidas las imágenes, a la misma laminilla se le agregó una gota de DAPI [100 ug/1 ml], para que penetrara por capilaridad y aproximadamente 30 segundos después se observó la laminilla de nuevo con las mismas condiciones pero ahora con el filtro de doble banda y triple banda para colocalizar la señal de DAPI con la de GFP.

iii. Cuantificación de GFP

Con respecto a la cuantificación de la señal de GFP, ésta se llevó a cabo con las imágenes obtenidas del microscopio de epifluorescencia y las cuales fueron trabajadas en formato 8 bit con el programa ImageJ. Posterior a la determinación de pixeles se realizó el análisis de los datos con la ecuación del Total correcto de células fluorescentes (CTCF) = densidad integrada – (área * promedio de las lecturas de background).

XVII. Análisis estadístico

Para el análisis de todos los datos obtenidos, se realizó de manera general la estadística descriptiva para cada conjunto de datos con el propósito de conocer su distribución. En el caso de las actividades enzimáticas se llevó a cabo la comparación de más de dos grupos, por medio de la prueba (Kruskal-Wallis) ANOVA no paramétrico y las comparaciones múltiples por medio de la prueba Sidak y Tukey, dependiendo el caso. Por otro lado los datos obtenidos en los ensayos de longevidad fueron analizados con la aplicación OASIS utilizando el estimador de Kaplan-Meier y las comparaciones entre los distintos tratamientos se hicieron por medio de la prueba de log-rank (Mantel-Cox

8. Resultados

I. Efecto del ayuno de 12 horas en la esperanza de vida del nemátodo y el papel de DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf en su regulación

En cuanto a los experimentos de longevidad, estos se llevaron a cabo con el objetivo principal de determinar de manera general la participación de los factores de transcripción DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf en la regulación de la esperanza de vida de *C. elegans* cuando éste es sometido a 12 horas de ayuno en el estadio L4, ya que ambos factores se han visto implicados en la respuesta de incremento en la esperanza de vida del nemátodo cuando éste es sometido a diferentes regímenes de restricción calórica (RC) y ayuno intermitente (AI).

Por lo cual los ensayos de longevidad, se llevaron a cabo primero en la cepa silvestre N2 para determinar si se presentaban cambios en la curva de supervivencia cuando los nemátodos eran sometidos a 12 horas de ayuno durante el estadio larvario L4 y posteriormente estos ensayos se realizaron en las cepas RNAi (PL4440, *daf-16-B8* y *daf-16-D8*), en las cepas mutantes *daf-16 (mgDf50)* y *skn-1(zu135)* y finalmente en las cepas mutante- RNAi *skn-1;PL4440* y *skn-1;daf-16-B8*.

Una vez que se llevaron a cabo los ensayos pertenecientes a la cepa N2 se observó que los nemátodos sometidos a 12 horas de ayuno presentan una media de supervivencia mayor (12 días) a la de su respectivo control (11 días) (Tabla 1), sin embargo, esta diferencia no es significativa. Por otro lado se observó que el día final de muerte (100% muertes) se presenta primero en los nemátodos que fueron sometidos a 12 horas de ayuno y 4 días después en los control, es decir al día 24 todos los nemátodos que habían sido sometidos a ayuno habían muerto mientras que los nemátodos control murieron el 28 (Figura 19).

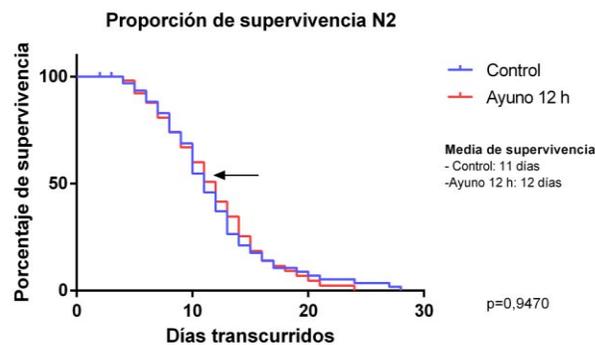


Figura 19. Curvas de supervivencia pertenecientes a la cepa N2 (silvestre) donde se observa tanto la curva control como la curva perteneciente a ayuno de 12 horas en el estadio L4. La flecha indica el punto exacto donde se ubica el 50% de muertes (Vida media) para ambas curvas, dicho esto no se observan diferencias significativas entre ambas curvas.

Tabla 1. Comparación de la vida media y mortalidad de cepas de *C. elegans* cuando son sometidas a 12 horas de ayuno en el estadio L4.

| Cepa | Vida media (días) | 100% muertes (días) |
|--|-------------------|---------------------|
| N2 Control | 11 | 28 |
| N2 Ayuno 12 h | 12 | 24 |
| <i>daf-16 (mgDf50) Control</i> | 8 | 18 |
| <i>daf-16 (mgDf50) Ayuno 12 h</i> | 11 | 15 |
| <i>skn-1 (zu135) Control</i> | 9 | 20 |
| <i>skn-1 (zu135) Ayuno 12 h</i> | 13 | 18 |
| PL4440 Control (Control RNAi) | 14 | 23 |
| PL4440 Ayuno 12 h (Control RNAi) | 12 | 21 |
| <i>daf-16-B8 Control (RNAi)</i> | 10 | 21 |
| <i>daf-16-B8 Ayuno 12 h (RNAi)</i> | 11 | 16 |
| <i>daf-16-D8 Control (RNAi)</i> | 10 | 19 |
| <i>daf-16-D8 Ayuno 12 h (RNAi)</i> | 11 | 16 |
| <i>skn-1 (zu135); PL4440 Control</i> | 16 | 20 |
| <i>skn-1 (zu135); PL4440 Ayuno 12 h</i> | 11 | 18 |
| <i>skn-1 (zu135); daf-16-B8 Control</i> | 9 | 14 |
| <i>skn-1 (zu135); daf-16-B8 Ayuno 12 h</i> | 10 | 14 |

Posteriormente se realizaron los ensayos de longevidad correspondientes a las líneas RNAi, donde se observó que no hay cambios significativos entre la curva control y la curva perteneciente a ayuno de 12 horas en ninguna de las líneas RNAi (PL4440, *daf-16-B8* y *daf-16-D8*), por otra parte las líneas *daf-16-B8* y *daf-16-D8* presentan una media de supervivencia idéntica (Figura 20, Tabla 1) pero no así un comportamiento igual, excepto en el caso de las curvas de ayuno de ambas líneas, donde se observa un empalme de estas (Anexo II).

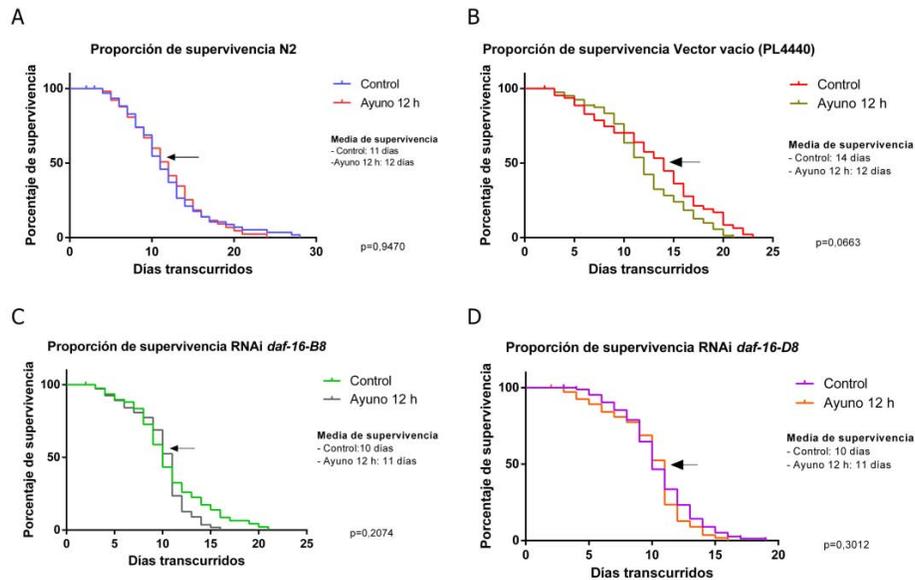


Figura 20. Curvas de supervivencia pertenecientes a las líneas RNAi *daf-16 B*) PL4440, C) *daf-16-B8* y D) *daf-16-D8*

Se analizaron y compararon las curvas de supervivencia de *daf-16-B8* y *daf-16-D8*, para determinar si existían diferencias significativas entre sí y con respecto al vector vacío PL4440. Dichas comparaciones fueron realizadas utilizando la prueba de Log-rank, con la cual se determinó que existen diferencias significativas entre las curvas del vector vacío y las curvas pertenecientes a *daf-16-B8* y *daf-16-D8* ya que en ambas líneas RNAi de *daf-16* se observó una disminución de la esperanza de vida tanto en nemátodos control como en nemátodos que habían sido sometidos a ayuno con respecto al vector vacío; pero no así una diferencia significativa entre la línea *daf-16-B8* y *daf-16-D8* (Figura 21).

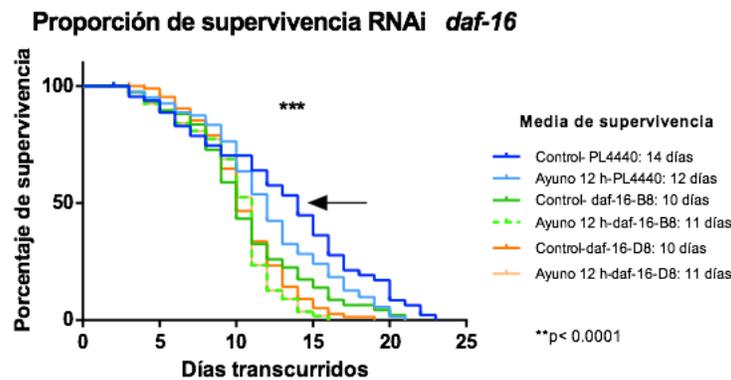


Figura 21. Curvas de supervivencia pertenecientes a las líneas RNAi *daf-16*, donde se observan diferencias significativas entre las líneas *daf-16-B8* y *daf-16-D8* con respecto al vector vacío PL4440. *** $p < 0,0001$.

Por otra parte se llevaron a cabo los ensayos de longevidad correspondientes a las cepas mutantes *daf-16 (mgDf50)* y *skn-1 (zu135)* y se observó de manera general que de igual forma que ocurren en las cepas N2 y RNAi *daf-16-B8* y *daf-16-D8* la media de supervivencia es mayor en los nemátodos que fueron sometidos a ayuno de 12 horas sin embargo el 100% de muertes ocurre primero en estos nemátodos a comparación de su control correspondiente (Tabla 1). En el caso de la mutante *daf-16 (mgDf50)* se presenta una diferencia significativa (** $p < 0.005$) entre la curva control y la curva correspondiente a ayuno de 12 horas ya que el 100% de muertes se presenta 3 días antes en los nemátodos que fueron sometidos a ayuno, mientras que para la mutante *skn-1 (zu135)* no se observaron cambios significativos en cuanto a la esperanza de vida total, sin embargo, cabe destacar que la media de supervivencia de los nemátodos sometidos a ayuno es 4 días mayor a la de los controles (Figura 22).

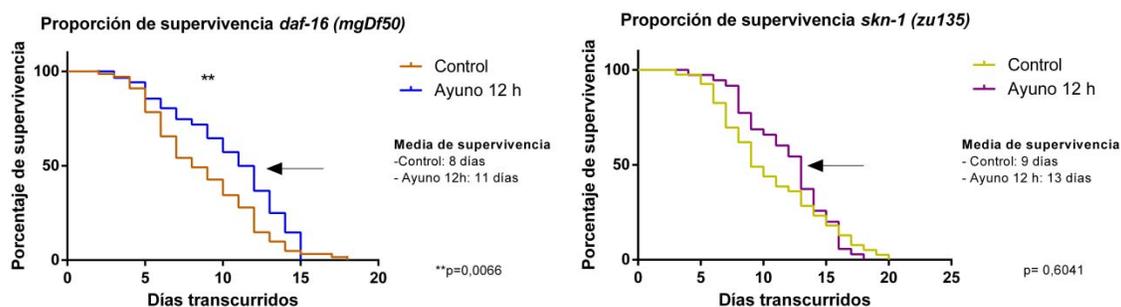


Figura 22. Curvas de supervivencia pertenecientes a las cepas *daf-16 (mgDf50)* y *skn-1 (zu135)* en condiciones control y ayuno de 12 horas en el estadio L4. Izquierda) Curva de la cepa *daf-16 (mgDf50)*, Derecha) Curva de la cepa *skn-1 (zu135)*.

Así mismo, se compararon las curvas de supervivencia de dichas cepas para determinar cuál mutación afectaba más la esperanza de vida de los nemátodos y para determinar cómo influye el ayuno 12 horas en cada una de estas cepas. Lo cual demostró que existen diferencias significativas entre estas dos cepas, siendo *daf-16 (mgDf50)* la que presenta una esperanza de vida menor que *skn-1 (zu135)* tanto en condiciones control como en ayuno de 12 horas (Figura 23), pero en ambas se observa que el 100% de muerte ocurre primero en los nemátodos sometidos a ayuno de 12 horas (Anexo II).

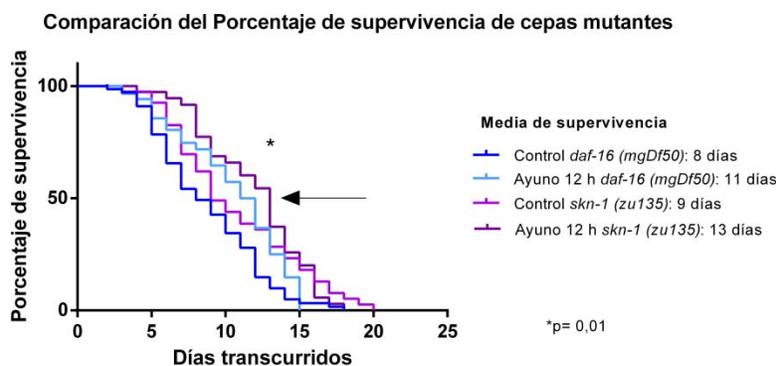


Figura 23. Comparación de las curvas de supervivencia pertenecientes a las cepas *daf-16 (mgDf50)* y *skn-1 (zu135)* en condiciones control y ayuno de 12 horas en el estadio L4. * $p < 0,05$.

Finalmente se llevaron a cabo los ensayos de longevidad en las cepas mutante-RNAi *skn-1 (zu135);PL4440* y *skn-1 (zu135);daf-16-B8*, donde se observó que la esperanza de vida de *skn-1 (zu135);PL4440* presenta diferencias significativas ($***p < 0,0005$) entre la curva control y la curva perteneciente a ayuno de 12 horas (Figura 24-G). Por otro lado en las curvas de supervivencia de *skn-1 (zu135);daf-16-B8* no se observan diferencias entre ellas, sin embargo es notable la disminución de la esperanza de vida de esta cepa (Figura 24-H), principalmente en el 100% de muertes ya que tanto el control como el ayuno de 12 horas viven sólo 14 días (Tabla 1), mientras que en las demás cepas el 100% de muertes se presenta por lo menos al día 15.

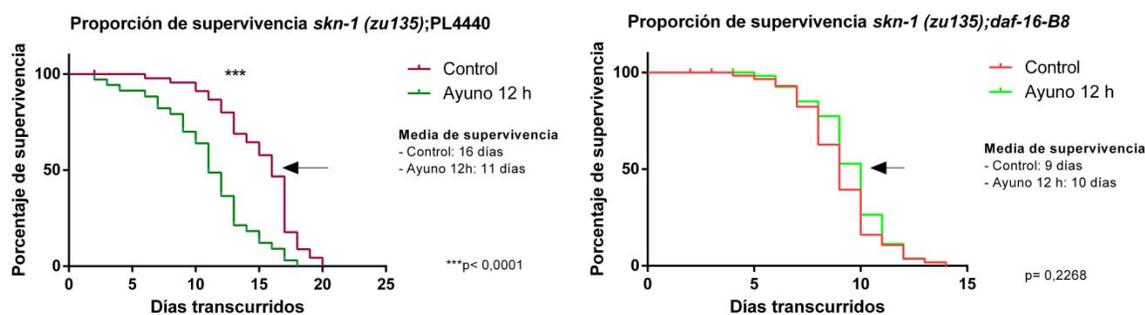


Figura 24. Curvas de supervivencia pertenecientes a las mutantes- RNAi *skn-1 (zu135); PL4440* y *skn-1 (zu135); daf-16-B8*. Izquierda) Curva de supervivencia de *skn-1 (zu135); PL4440* donde se observa una diferencia significativa entre la curva control y la curva perteneciente a ayuno de 12 horas. $***p < 0,0001$ Derecha) Curva de supervivencia de *skn-1 (zu135); daf-16-B8*.

Posteriormente se realizó la comparación de las curvas de supervivencia de *skn-1 (zu135); daf-16-B8* y *skn-1 (zu135); PL4440*, para determinar si existe un efecto aditivo entre la mutación del gen *skn-1* y el silenciamiento del gen *daf-16*, utilizando la prueba de Long-rank. Dicha prueba demostró que existen diferencias significativas en la esperanza de vida de *skn-1 (zu135); PL4440* y *skn-1 (zu135); daf-16-B8* tanto con condiciones control como en ayuno de 12 horas (Anexo II), ya que tanto la vida media como el 100% de muertes de *skn-1 (zu135); daf-16-B8* es menor en ambas condiciones con respecto a *skn-1 (zu135); PL4440* (Tabla 1, Figura 25).

En este punto es importante mencionar que al comparar la curva de supervivencia de *skn-1 (zu135); daf-16-B8* con la curva del RNAi *daf-16-B8* y con la de la mutante *skn-1 (zu135)*, se observa una disminución tanto en la vida media como en el 100% de muertes de la mutante-RNAi *skn-1 (zu135); daf-16-B8* (Tabla 1), lo que confirma que existe un efecto aditivo al silenciar el gen *daf-16* en la mutante *skn-1 (zu135)* ya que la esperanza de vida de *skn-1 (zu135); daf-16-B8* se reduce hasta en un 30% con respecto a *skn-1 (zu135); PL4440* (Figura 25) y a *skn-1 (zu135)*.

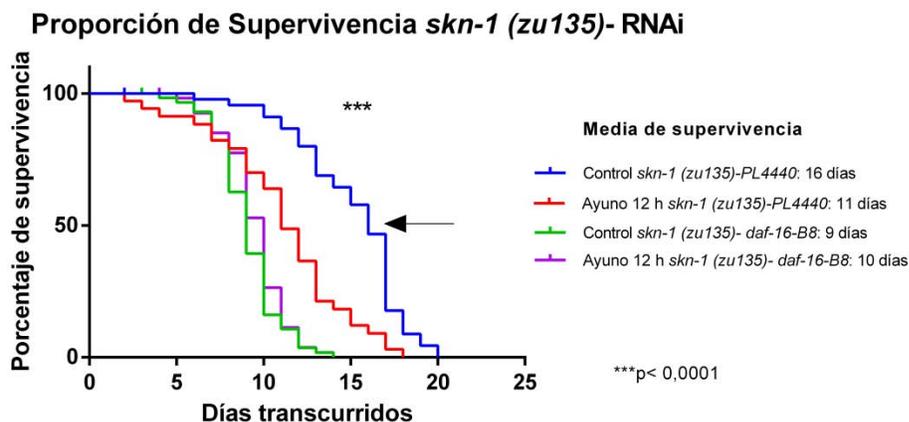


Figura 25. Comparación de las curvas de supervivencia de las mutantes- RNAi *skn-1 (zu135)*; PL4440 y *skn-1 (zu135)*; *daf-16-B8*, donde se observa una diferencia significativa entre dichas curvas (**p < 0,0001).

Los resultados obtenidos de estos ensayos muestran de manera general que para las cepas N2, *daf-16 (mgDf50)*, *skn-1(zu135)*, las líneas RNAi *daf-16-B8* y *daf-16-D8* y la mutante-RNAi *skn-1 (zu135)*; *daf-16-B8* la media de supervivencia de los nemátodos control es menor que la de los nemátodos que fueron sometidos a 12 horas de ayuno; con una diferencia de entre 1 a 4 días. Sin embargo, el 100% de los individuos que fueron sometidos a ayuno mueren antes que sus respectivos controles (Tabla 1), revirtiéndose el efecto de resistencia al estrés que se observa en un principio, cabe mencionar que para el caso de *skn-1 (zu135)*; *daf-16-B8* los nemátodos pertenecientes tanto a control como a ayuno de 12 horas mueren el mismo día.

II. Estrés y daño oxidante provocado por el ayuno de 12 horas en *C. elegans*

El mecanismo por el cual la RC incrementa la esperanza de vida continúa poco claro, pero una hipótesis ampliamente aceptada es que la RC atenúa el daño oxidante, ya que la restricción de nutrientes reduce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) sin embargo, la electroquímica sugiere lo contrario, es decir, es más probable que debido a la RC se incremente la producción de ROS, ya que al incrementar el potencial de membrana, más electrones tienden a filtrarse a medida que la velocidad de reducción de oxígeno por el complejo IV disminuye. Debido a ello, y a que existe sólo un trabajo donde se comprueba lo anterior, se llevaron a cabo ensayos que permitieran probar si bajo el régimen de 12 horas de ayuno existe estrés y daño oxidante en el nemátodo, por lo cual se llevaron a cabo ensayos de la actividad enzimática de catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) así como también ensayos de lipoperoxidación, ya que se ha visto es el principal mecanismo molecular relacionado con el daño oxidante.

Por lo que se refiere a las actividades enzimáticas, se llevaron a cabo ensayos de la actividad de catalasa y la actividad de superóxido dismutasa para determinar si existen cambios cuando los nemátodos son sometidos a 12 horas de ayuno. Para ello en ambos ensayos fueron utilizadas muestras de proteína total, de manera que los resultados observados se atribuyen a la actividad de las tres catalasas (*ctl-1*, *ctl-2*, *ctl-3*) presentes en *C. elegans* y a las 5 isoenzimas de superóxido dismutasa (*sod-1*, *sod-2*, *sod-3*, *sod-4* y *sod-5*).

a. Actividad de Catalasa

Los ensayos de la actividad de catalasa, se realizaron siguiendo el protocolo espectrofotométrico de molibdato de amonio para peróxido de hidrógeno (Goth, 1991), ya que la enzima catalasa actúa de manera muy rápida y no es posible verificar el complejo enzima-sustrato.

Una vez mencionado esto, se observó que la actividad de catalasa aumenta de manera significativa en un 121% ($*p < 0.05$) bajo condiciones de ayuno de 12 horas en nemátodos pertenecientes a la cepa silvestre N2 (Figura 26); en tanto que las cepas *daf-16 (mgDf50)*, *skn-1 (zu135)* y *skn-1; daf-16-B8*, de manera general muestran un aumento de la actividad de catalasa con respecto a la cepa N2, lo cual sugiere que hay una alteración en la actividad de esta enzima debido a la falta de los genes *skn-1* y *daf-16*. Sin embargo, también observó que en dichas cepas la actividad de catalasa de nemátodos sometidos a ayuno es menor que la de su respectivo control, siendo significativa ésta disminución en las cepas *skn-1 (zu135)* y *skn-1; daf-16-B8* ($*p < 0.05$) (Figura 26- B).

De manera particular en *daf-16 (mgDf50)* la actividad de catalasa tiene el mayor aumento (Anexo III-ii), tanto en condiciones normales como en condiciones de ayuno con un incremento del 385% ($***p < 0.0005$) y 91% ($**p < 0.005$) con respecto a la cepa N2 (Figura 26-B), lo cual sugiere que la enzima catalasa es regulada por otros genes de forma independiente del factor transcripcional *daf-16/FOXO* y por otro lado indica que la actividad de esta enzima no se ve limitada por la falta de dicho factor transcripcional, sin embargo si altera la actividad de la enzima. Por otro lado en la cepa *skn-1 (zu135)* se observó un aumento del 163% ($**p < 0.005$) en la actividad de catalasa específica (U/ug proteína), en muestras control con respecto a la cepa N2 (Figura 26-B), mientras que al comparar la actividad de catalasa en muestras correspondientes a ayuno no se detectaron cambios significativos (Anexo III-i).

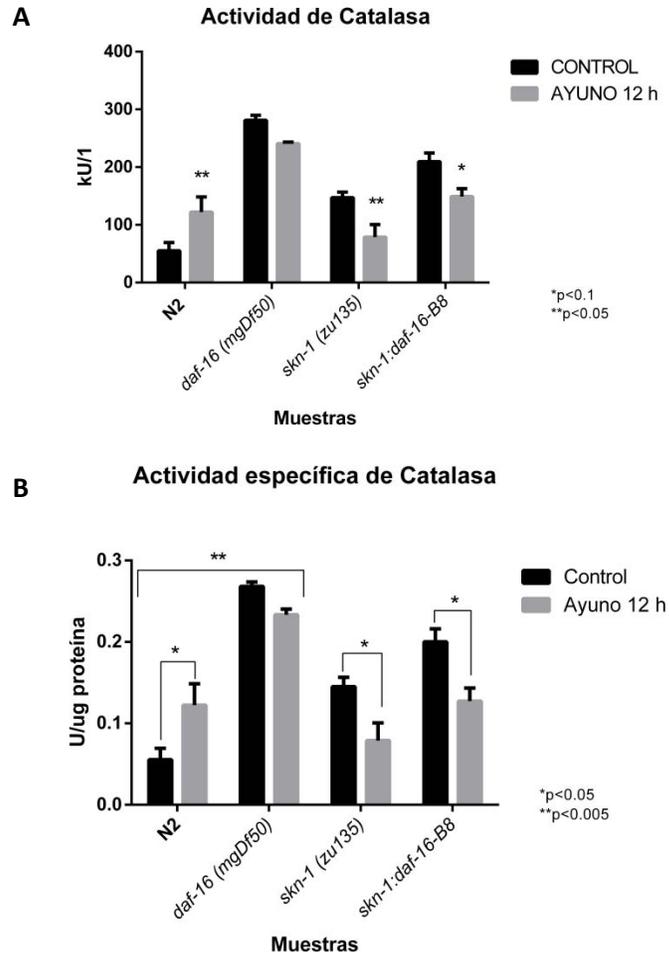


Figura 26. Gráficos de la actividad de catalasa en nemátodos N2, *daf-16 (mgDf50)*, *skn-1 (zu135)* y *skn-1;daf-16-B8*, cuando son sometidos a 12 horas de ayuno en el estadio L4, donde se comparan los resultados de ayuno vs control para cada cepa. (A) Actividad de catalasa en kU/L. (B) Actividad de catalasa específica en U/ug de proteína. En ambas gráficas se observa un aumento significativo en la actividad de catalasa en la cepa N2 ($p < 0.05$) cuando hay 12 horas de ayuno, por otro lado hay una disminución en la actividad de catalasa en las cepas *daf-16 (mgDf50)*, *skn-1 (zu135)* y *skn-1;daf-16-B8*, siendo significativa la disminución en éstas últimas dos cepas.

Finalmente, en cuanto a la mutante-RNAi *skn-1;daf-16-B8* se observó un aumento del 262% ($***p < 0.0005$) de la actividad de catalasa específica en muestras control con respecto a la cepa N2, y con respecto a *skn-1 (zu135)* hay un aumento del 89% ($*p < 0.05$) de la actividad de catalasa en las muestras de ayuno, por el contrario con respecto a la cepa *daf-16 (mgDf50)* hay una disminución de la actividad en un 25.4% y en 37% ($*p < 0.05$) en condiciones control y en ayuno de 12 horas respectivamente (Figura 26).

b. Actividad de Superóxido dismutasa (SOD)

Por lo que se refiere a los ensayos de la actividad de la superóxido dismutasa, estos se llevaron a cabo utilizando el Kit de ensayos para SOD-WST de Sigma Aldrich, el cual utiliza un método indirecto para determinar la actividad de SOD.

Una vez obtenidos los porcentajes de la actividad de SOD de las muestras control y ayuno 12 horas pertenecientes a cada cepa (N2, *daf-16 (mgDf50)*, *skn-1 (zu135)* y *skn-1;daf-16-B8*), estos fueron analizados estadísticamente con una prueba de ANOVA de dos vías no paramétrica y con la Prueba de comparaciones múltiples de Sidak para determinar cambios significativos entre cepas y cambios dentro de cada grupo (cepa) asociados al ayuno (*control vs ayuno*) (Anexo II).

Se observó un aumento del 30% en la actividad enzimática de la superóxido dismutasa correspondiente a la cepa N2 cuando los nemátodos son sometidos a 12 horas de ayuno con respecto a la actividad de los controles (Anexo III-iii). Así mismo se observó que la actividad de SOD aumenta de manera general en las cepas *skn-1 (zu135)* y *skn-1;daf-16-B8* con respecto de la cepa N2, sin embargo para el caso de *daf-16 (mgDf50)* solo bajo condiciones de ayuno de 12 horas se observó dicho aumento, ya que bajo condiciones control la actividad disminuye (Anexo III-iii). En este caso el aumento de la actividad de SOD en la cepa *daf-16 (mgDf50)* cuando los nemátodos son sometidos a 12 horas de ayuno es significativo con respecto a su control (** $p < 0.005$), siendo ésta la única cepa en la que se observó un cambio de este tipo (Figura 27).

Por lo que se refiere a las cepas *skn-1 (zu135)* y *skn-1;daf-16-B8* en estas se observó el mayor incremento de la actividad de SOD tanto en condiciones control como en condiciones de ayuno con respecto a la cepa N2; ya que *skn-1 (zu135)* control aumenta un 298% y bajo condiciones de ayuno un 225% (Anexo III-iii), lo cual representa un aumento significativo de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa cuando no se encuentra presente el gen *skn-1* (en ninguna de sus isoformas descritas). Mientras que para la cepa mutante-RNAi *skn-1;daf-16-B8* el incremento que se observó fue ligeramente menor al observado en *skn-1 (zu135)*, ya que en condiciones control se observó un aumento del 265% y para ayuno de 12 horas un 179% respecto de la cepa N2 (Figura 27).

Actividad de la Superóxido dismutasa

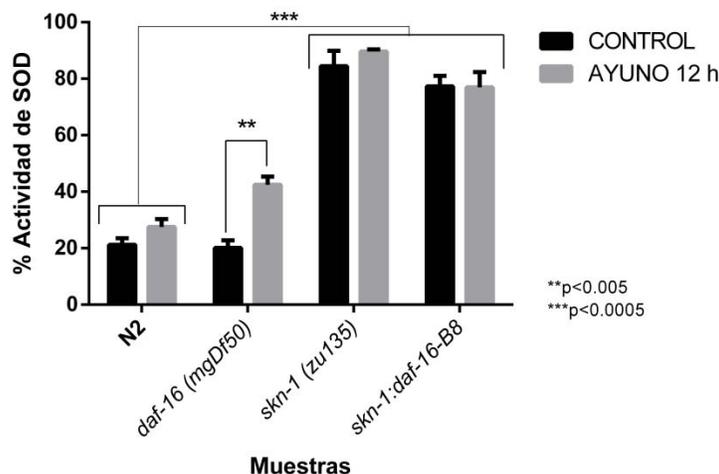


Figura 27. Gráfico del porcentaje de la actividad de superóxido dismutasa en nemátodos N2, *daf-16 (mgDf50)*, *skn-1 (zu135)* y *skn-1;daf-16-B8*, cuando son sometidos a 12 horas de ayuno en el estadio L4, donde se observa un aumento significativo*** $p < 0.005$ en la actividad de SOD de la cepa *daf-16 (mgDf50)* cuando es sometida a un ayuno de 12 horas con respecto a su control, mientras que en las demás cepas no se observa un cambio significativo con respecto a sus controles.

c. Peroxidación lipídica (Lipoperoxidación)

En cuanto a la determinación de los niveles de peroxidación lipídica, estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo el método colorimétrico de TBARs propuesto por ASAKAWA y MATSUSHITA (1981), en el cuál se determinan los productos de la degradación metabólica de los lipoperóxidos, que son fundamentalmente aldehídos reactivos formados por la descomposición de estos lipoperóxidos.

Se llevó a cabo la reacción tanto en muestras control como en muestras de ayuno de 12 horas en las cepas N2, *daf-16 (mgDf50)*, *skn-1 (zu135)* y *skn-1;daf-16-B8*. Una vez obtenidos los datos de la absorbancia a 532 nm, estos fueron analizados tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1.9}$) utilizado para calcular la cantidad de MDA, y la concentración fue expresada en *nmoles/mg de proteína*.

Una vez realizadas las pruebas estadísticas se observó que no hay cambios significativos en la concentración de MDA en la cepa N2, a pesar de que se observa un aumento del 55.6% en la concentración de MDA en muestras de nemátodos sometidos a ayuno de 12 horas (Figura 28).

Por otra parte, en los ensayos de lipoperoxidación se observa un incremento en la concentración de MDA en la cepa *skn-1 (zu135)* y la mutante- RNAi *skn-1(zu135);daf-16-*

B8 tanto en condiciones control como en ayuno de 12 horas con respecto de la cepa N2, siendo significativo este incremento en el control de *skn-1(zu135);daf-16-B8* con un aumento del 2917% en la concentración de MDA ($***p<0,0005$) y en las muestras de ayuno de la mutante *skn-1 (zu135)* con un incremento de 1211% ($**p<0,005$) (Figura 21). En contraste, en la cepa mutante-RNAi *skn-1 (zu135);daf-16-B8* se observó una disminución significativa en la concentración de MDA en muestras pertenecientes a ayuno de 12 horas (Figura 28), dicha disminución es del 84.4% con respecto al control.

Finalmente, al comparar las cepas mutantes y la mutante-RNAi, respecto de la cepa silvestre se observa que las cepas *skn-1 (zu135)* y *skn-1(zu135);daf-16-B8* presentan un mayor incremento de la concentración de MDA a comparación de *daf-16 (mgDf50)* (Figura 28), lo cual sugiere que hay un posible efecto aditivo debido al knockout y knock-down de *skn-1* y *daf-16* respectivamente.

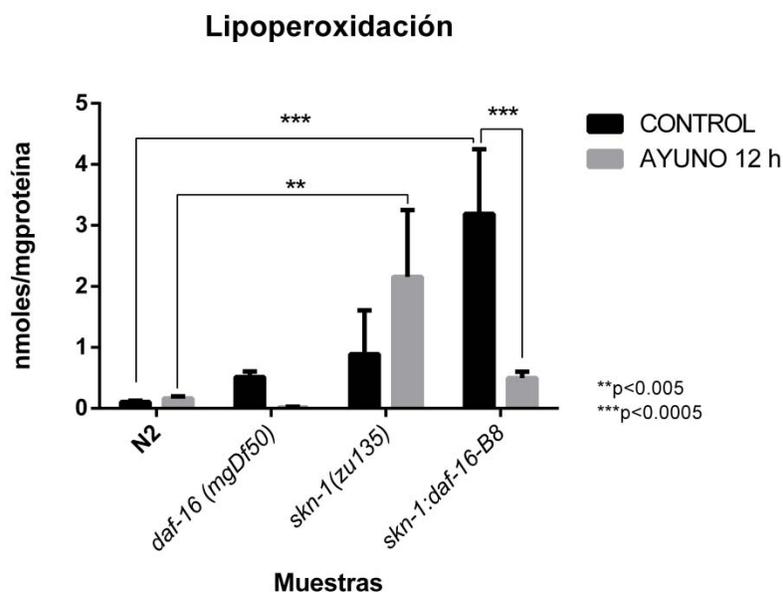


Figura 28. Concentración de malondialdehído (MDA) en nemátodos N2, *daf-16 (mgDf50)*, *skn-1 (zu135)* y *skn-1;daf-16-B8*, cuando son sometidos a 12 horas de ayuno en el estadio L4, donde se observa disminución significativa ($***p<0,0005$) en la concentración de MDA de la cepa mutante-RNAi *skn-1;daf-16-B8* cuando es sometida a un ayuno de 12 horas con respecto a su control, mientras que en las demás cepas no se observa un cambio significativo con respecto a sus controles. Sin embargo, de manera general hay un incremento de la cantidad de MDA en las cepas mutantes.

III. Cambios en la expresión de componentes de la vía de señalización de la insulina (IIS) y la vía p38 MAPK provocados por el ayuno

El análisis de la abundancia de mRNA correspondiente a componentes de la vía de señalización de la insulina (IIS) y de la vía p38 MAPK se llevó a cabo con el objetivo de determinar si el ayuno de 12 horas en el nemátodo *C. elegans* provoca cambios en dichas vías, ya que algunos de sus componentes se ha visto que cambian su expresión cuando son sometidos a diferentes regímenes de restricción calórica. Por lo cual se llevó a cabo el análisis de la expresión de los genes *daf-2* y *daf-16* debido a que *daf-2* (receptor de insulina) y *daf-16* (factor transcripcional) componentes de la vía de señalización de la insulina, así como el factor transcripcional *skn-1* (*a*, *b*, *c*), quien se conoce como el regulador principal de los genes de desintoxicación, entre los cuales se encuentran las enzimas γ -glutamylcisteína-sintasa 1 (*gcs-1*) y la enzima glutatión-S-transferasa 4 (*gst-4*), este último también se ha descrito como blanco de *daf-16*, por lo que para ambos genes fue realizado el análisis de abundancia mediante PCR cualitativa.

Con respecto al análisis de la abundancia de mensajeros, se analizaron los genes *daf-2*, *daf-16*, *gcs-1* y *gst-4* en muestras de nemátodos que fueron sometidos a condiciones de ayuno de 12 horas en el estadio L4., se han visto implicados en la respuesta de incremento en la esperanza de vida del nemátodo cuando éste es sometido a restricción calórica.,

En este caso primero se realizaron los análisis en la cepa N2, para determinar si bajo condiciones de ayuno de 12 horas había un cambio en la expresión de dichos genes y se observó que la expresión del gen *daf-16* y *daf-2* no presentan cambios significativos en su expresión relativa cuando el nemátodo es sometido a 12 horas de ayuno (Figura 29). En el caso del gen *skn-1* donde se analizó la expresión sus tres isoformas (*a*, *b*, *c*), se observó que únicamente hay un aumento significativo en la expresión relativa del mensajero de *skn-1a* con un aumento del 17% con respecto al control, mientras que en el caso de *skn-1b* y *skn-1c* no se observó algún cambio significativo, sin embargo, se observa un ligero aumento en su expresión (Figura 29B).

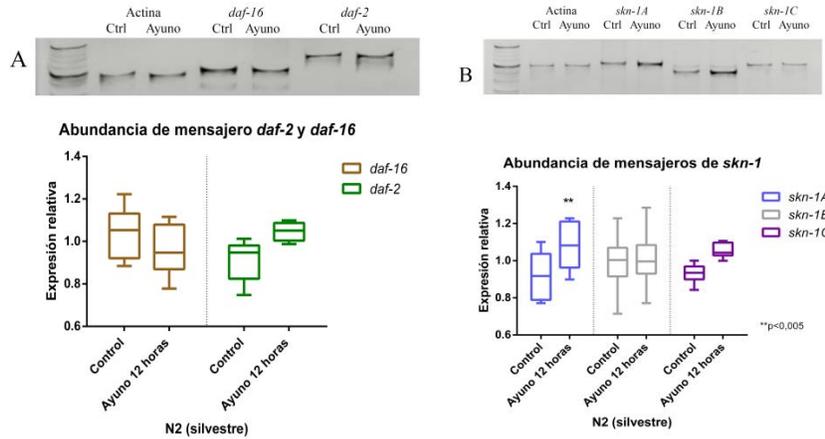


Figura 29. A) En la parte superior imagen de un gel de acrilamida donde se observan las bandas correspondientes a los mensajeros de *daf-16* y *daf-2*, en la parte inferior se muestra el gráfico de expresión relativa de dichos genes, donde la expresión de ninguno de los dos genes cambia de manera significativa en condiciones de ayuno. B) En la parte superior se observan las bandas correspondientes a las tres isoformas de *skn-1* y en la parte inferior el gráfico de expresión relativa. ** $p < 0,005$.

Por los resultados obtenidos en el análisis de mRNA, posteriormente se llevó a cabo el análisis de la abundancia de la proteína DAF-2, este se llevó a cabo únicamente en la cepa silvestre N2, donde no se observaron cambios significativos en la expresión de la proteína cuando los nemátodos habían sido sometidos a 12 horas de ayuno (Figura 30), a pesar de que la abundancia del mensajero de *daf-2* tiende a incrementar en estas condiciones (Figura 29-A).

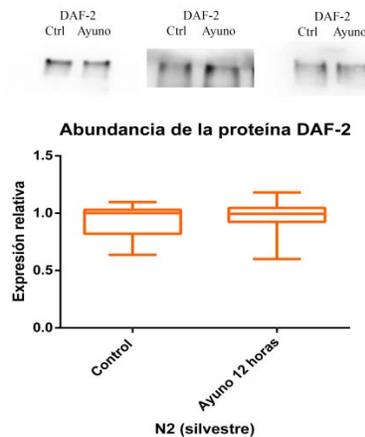


Figura 30. Expresión relativa de las proteínas DAF-2 y DAF-16 en la cepa N2 (silvestre) cuando los nemátodos fueron sometidos a 12 horas de ayuno en el estadio L4. Análisis de la abundancia de la proteína DAF-2, en la parte superior imágenes de las tres replicas biológicas

Posteriormente se analizó la expresión de los genes *gsc-1* y *gst-4*, donde no se observaron cambios significativos en la expresión de *gsc-1*; por el contrario *gst-4* presenta un aumento significativo en su expresión correspondiente a las muestras de ayuno de 12

horas, en este caso dicho aumento fue del 90% con respecto al control, es decir presenta un aumento de casi dos veces (Figura 31).

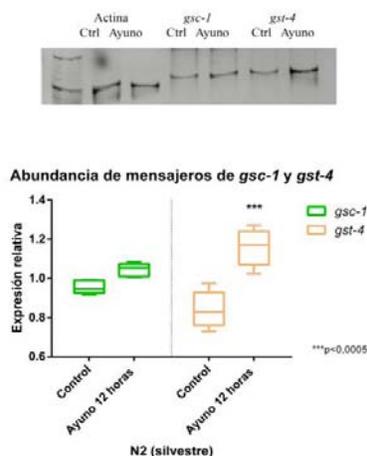


Figura 31. En la parte superior se observan las bandas correspondientes a los mensajeros de *gsc-1* y *gst-4*, y en la parte inferior se muestra el gráfico de expresión relativa de dichos genes, donde la expresión de *gst-4* aumenta en condiciones de ayuno de 12 horas. *** $p < 0,0005$.

En segundo lugar se llevó a cabo el análisis de la expresión de los genes *skn-1* (*a*, *b*, *c*) y *gst-4* en las líneas RNAi *daf-16* cuando son sometidas a 12 horas de ayuno en el estadio L4. Para empezar, en el vector vacío PL4440 se observó una disminución del 36 % en la expresión de *skn-1a* bajo condiciones de ayuno de 12 horas con respecto al control (Figura 32-A), mientras que en las isoformas *b* y *c* no se detectó ningún cambio significativo en la expresión del mensajero. Así mismo, se analizó la expresión de los mensajeros de *skn-1* en el RNAi *daf-16-B8* y *daf-16-D8*; en ambos casos no se observó ningún cambio significativo en la expresión de los mensajeros de *skn-1* a comparación de su respectivo control (Figura 32-B-C).

Finalmente, el análisis de la expresión de *gst-4* sólo se llevó a cabo en el RNAi *daf-16-B8* y se comparó con el análisis que se llevó a cabo en la cepa mutante *daf-16 (mgDf50)*, de modo que los resultados se muestran en una misma gráfica, en la cual no se observan cambios significativos en la expresión de *gst-4* bajo condiciones de ayuno, tanto en el RNAi como en la mutante (Figura 33).

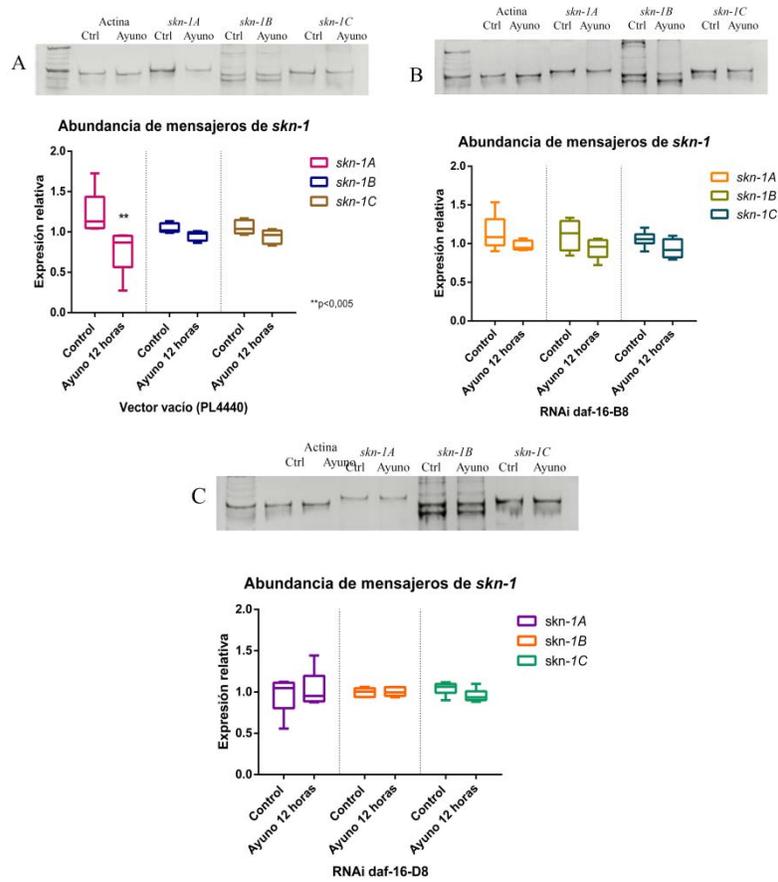


Figura 32. En la parte superior se observan las bandas correspondientes a los mensajeros de *skn-1* y en la parte inferior se muestra el gráfico de expresión relativa de los mensajeros. A) Expresión relativa de *skn-1* en la cepa PL4440, donde se observa la disminución de *skn-1a*. B) Expresión relativa en la cepa RNAi *daf-16-B8*. C) Expresión relativa de *skn-1* en la cepa *daf-16-D8* $**p < 0,005$.

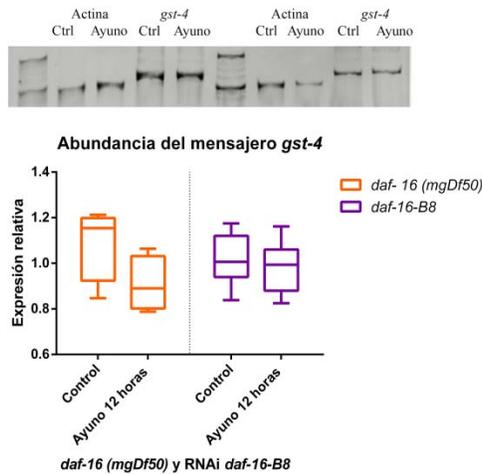


Figura 33. Expresión relativa del mensajero de *gst-4* en la cepa mutante *daf-16 (mgDf50)* (izquierda) y en la línea RNAi *daf-16-B8* (derecha), cuando son sometidos a 12 horas de ayuno en L4.

Como tercer punto se llevaron a cabo los análisis de la expresión del mRNA de los genes *gsc-1* y *gst-4* en la cepa *skn-1 (zu135)* para lo cual se determinó que estadísticamente no se presentan cambios ni diferencias significativas en la expresión de dichos genes cuando los nemátodos son sometidos a 12 horas de ayuno (Figura 34), sin embargo, es posible observar una tendencia de disminución en la expresión de ambos genes en condiciones de ayuno.

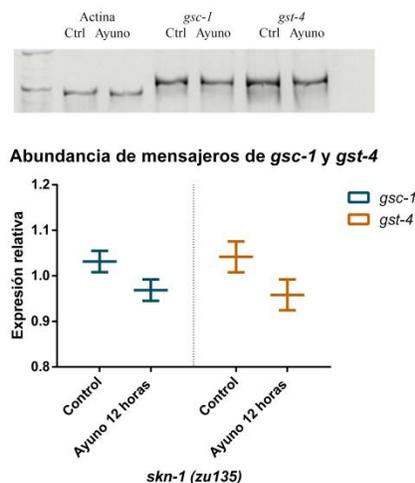


Figura 34. Expresión relativa del mensajero de *gsc-1* y *gst-4* en la cepa mutante *skn-1 (zu135)* cuando es sometida a 12 horas de ayuno en el estadio L4. N=3 réplicas biológicas.

Por último, se analizó la expresión de mRNA de los genes *gsc-1* y *gst-4* en las cepas mutante-RNAi *skn-1 (zu135);PL4440* y *skn-1 (zu135);daf-16-B8*, en la primera cepa se observaron cambios significativos en la expresión de ambos genes cuando los nemátodos son sometidos a 12 horas de ayuno; dichos cambios para ambos genes muestran una disminución de la expresión, ya que para *gsc-1* se presenta una disminución del 32.5% con respecto al control mientras que para *gst-4* hay una disminución de la expresión en un 21% en condiciones de ayuno (Figura 35-A).

Finalmente, se analizó la expresión de los genes *gsc-1* y *gst-4* en la cepa *skn-1 (zu135);daf-16-B8*, donde no se observaron cambios significativos en la expresión de *gsc-1* bajo condiciones de ayuno de 12 horas, a diferencia de *gst-4* donde se observó un aumento significativo de su expresión en condiciones de 12 horas de ayuno en el estadio L4, dicho aumento es del 27.6% con respecto al control (Figura 35-B). Al comparar los resultados obtenidos en ambas cepas mutante-RNAi se observa que en *skn-1 (zu135);PL4440* hay una disminución en la expresión de ambos genes bajo condiciones de ayuno de 12 horas y por el otro lado en la cepa *skn-1 (zu135);daf-16-B8* hay un aumento de la expresión de *gst-4* mientras que la expresión de *gsc-1* permanece sin cambios significativos.

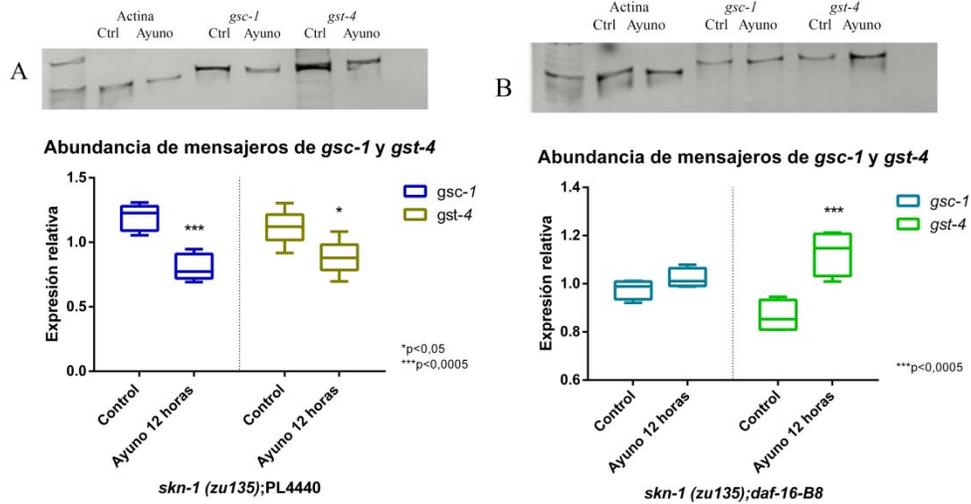


Figura 35. Expresión relativa del mensajero de *gsc-1* y *gst-4* en las cepas mutante-RNAi, A) *skn-1 (zu135);PL4440* y B) *skn-1 (zu135);daf-16-B8* cuando son sometidas a 12 horas de ayuno en el estadio L4. En ambas cepas se observan cambios en la expresión de *gst-4* y únicamente se observan cambios en *gsc-1* en la cepa *skn-1 (zu135);PL4440*. * $p < 0,05$ *** $p < 0,0005$.

IV. Actividad de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf bajo condiciones de 12 horas de ayuno

La actividad de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf se ha visto relacionada con la regulación de la esperanza de vida y la resistencia al estrés del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, por lo que se ha descrito que bajo diferentes regímenes de restricción calórica crónica, tanto DAF-16/FOXO como SKN-1/Nrf están activos en el núcleo, donde se encuentran regulando la longevidad del nemátodo; ya que al permitirse la translocación de estos factores hacia el núcleo se desencadena la activación de sus genes blanco, los cuales en su mayoría son de regulación de la esperanza de vida, resistencia al estrés, regulación del metabolismo y sistema inmune, por lo cual resulta importante estudiar si bajo condiciones de 12 horas de ayuno, dichos factores se encuentran activos en el núcleo promoviendo una resistencia ante el estrés provocado por el ayuno.

a. Localización nuclear de DAF-16/FOXO

En este punto cabe mencionar que en cuanto al análisis de la abundancia de la proteína DAF-16/FOXO esta se llevó a cabo en la fracción citoplásmica, fracción nuclear y de manera total, para determinar si se encuentra activo dicho factor transcripcional, es decir si se encuentra en el núcleo, además de determinar si existen cambios en la abundancia de la proteína DAF-16 bajo condiciones de 12 horas de ayuno.

Finalmente, en la abundancia de la proteína DAF-16/FOXO no se observaron cambios significativos tanto en la fracción de citoplasma ni en la proteína total, sin embargo, en la fracción nuclear se observa un aumento significativo del 83% en la abundancia de DAF-16 (Anexo V-ii), de igual forma se observó dicho aumento de la abundancia de DAF-16 en el núcleo en los experimentos de SLOT BLOT (Figura 36), lo cual indica que el ayuno de 12 horas en *C. elegans* promueve la translocación de DAF-16 hacia el núcleo celular.

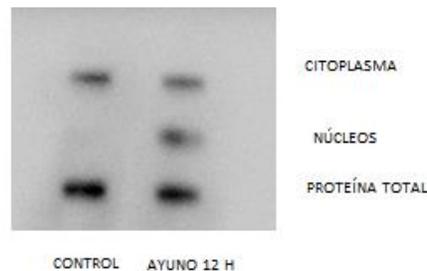


Figura 36. *SLOT BLOT* perteneciente a la proteína DAF-16 en la cepa N2 (silvestre) cuando los nemátodos fueron sometidos a 12 horas de ayuno en el estadio L4. Abundancia de DAF-16 en las fracciones celulares de núcleo, citoplasma y total.

b. Cuantificación de fluorescencia en nemátodos *skn-1::GFP (LD1)* por y translocación de SKN-1b al núcleo

Por lo que se refiere al análisis de la actividad del factor transcripcional SKN-1/Nrf en este caso se llevó a cabo utilizando el transgénico *skn-1b/c::GFP (LD1)*, por lo que se llevó a cabo el análisis de translocación de SKN-1b al núcleo y la cuantificación de fluorescencia de SKN-1b en las neuronas ASI de los nemátodos transgénicos, siendo así que esta última fue analizada con la ecuación del *Total correcto de células fluorescentes (CTCF)*.

Los resultados obtenidos fueron graficados en un diagrama de caja-bigotes (Box-plot) y en un diagrama de dispersión (Figura 37-A), además de ser analizados mediante la prueba de Mann-Whitney para determinar si existe una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia de las neuronas ASI de nemátodos sometidos a 12 h de ayuno con respecto al control, sin embargo, no se observó ningún cambio significativo en la fluorescencia (Figura 37), a pesar de que se puede apreciar una leve disminución en la fluorescencia de los nemátodos que fueron sometidos a 12 horas de ayuno (Figura 37-B), lo cual indica que el ayuno de 12 horas no provoca un cambio significativo en la expresión de la proteína SKN-1 isoforma b.

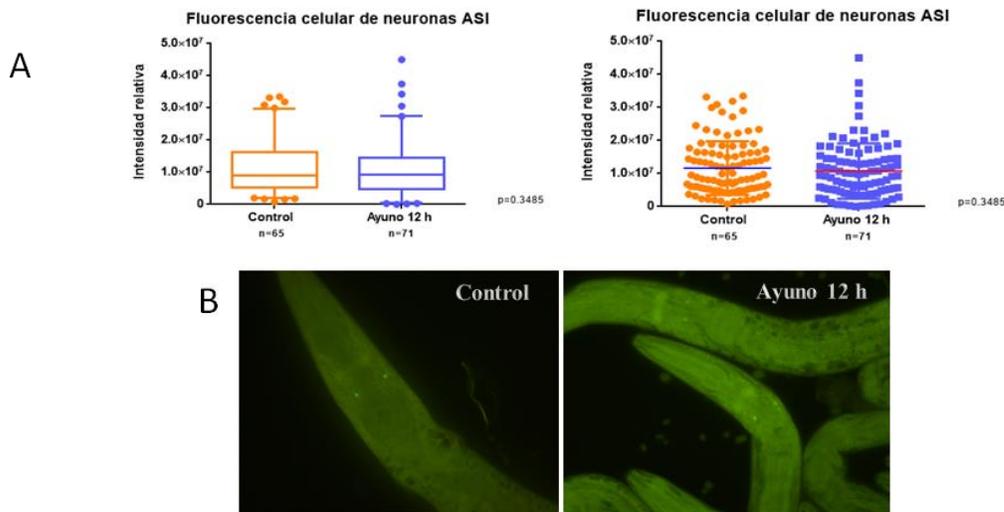


Figura 37. Cuantificación de fluorescencia en neuronas ASI de nemátodos de la cepa *SKN-1::GFP (LD1)* cuando son sometidos a 12 horas de ayuno. (A) A la izquierda diagrama de caja-bigotes con intervalo de confianza 5-95%, a la derecha diagrama de dispersión donde se señala la media en colores azul y rojo con su desviación estándar, además se observa que no existe una diferencia significativa. (B) Imágenes representativas de la cepa *SKN-1::GFP (LD1)* en condiciones control (izquierda) y ayuno de 12 horas (derecha) obtenidas por medio de microscopía de fluorescencia, donde se observa la fluorescencia de las neuronas ASI.

Posteriormente las mismas muestras de nemátodos utilizadas para la cuantificación de GFP, fueron utilizadas para determinar si la proteína SKN-1b (que se expresa específicamente en las dos neuronas ASI) se encontraba dentro del núcleo, para lo cual se llevó a cabo la tinción de laminillas con DAPI [100 ug/1 ml], y debido a que la señal de DAPI es más intensa que la de GFP, la observación de laminillas se llevó a cabo de 30-40 segundos después de haberlas teñido; finalmente se observó que la proteína SKN-1b colocaliza con la tinción de DAPI lo cual hace suponer que se encuentra en el núcleo (Figura 38) en condiciones de ayuno.

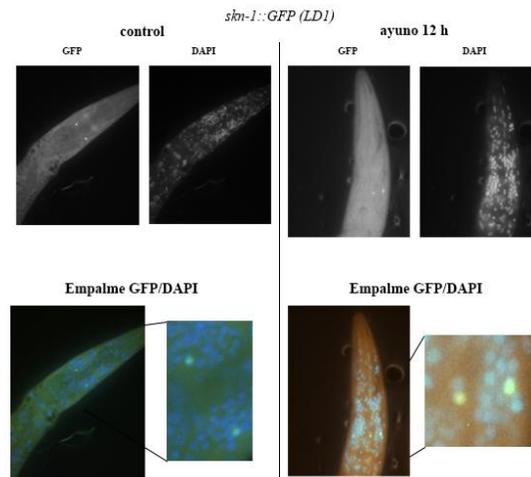


Figura 38. Izquierda: localización de la proteína SKN-1b bajo condiciones control. Derecha: Colocalización de la proteína SKN-1b en los núcleos de las neuronas ASI cuando *Caenorhabditis elegans* es sometido a 12 horas de ayuno en el estadio L4. (A) Imagen obtenida con el filtro FITC, donde se observa la fluorescencia de SKN-1b dentro de las neuronas ASI. (B) Imagen obtenida con el filtro de triple banda en donde se observa la tinción con DAPI de los núcleos y la expresión de SKN-1b::GFP.

9. Discusión

i. **Efecto del ayuno de 12 horas en la esperanza de vida del nemátodos y el papel de DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf en su regulación**

Hace poco más de 83 años, se descubrió que la reducción de la ingesta dietética sin llegar a la inanición incrementa sustancialmente la esperanza de vida en una amplia gama de especies, entre las que se encuentra el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, a dicho régimen o tratamiento se le denomina restricción dietética (RD) o restricción calórica (RC). Desde entonces se ha estudiado de manera exhaustiva, teniendo como principal objetivo investigar el mecanismo por el cual la RC incrementa la esperanza de vida y qué vías metabólicas se encuentran involucradas, por dicha razón se ha documentado que los factores de transcripción DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf median este efecto bajo diferentes regímenes de RC y RHEB-1 bajo condiciones de ayuno intermitente (AI).

En este estudio se estableció un régimen de ayuno en el cual los nemátodos fueron sometidos a 12 horas de ayuno en el estadio L4, se mantuvieron a 18°C y fueron alimentados con bacterias vivas; lo cual hace por sí mismo a este régimen muy diferente a la restricción calórica que comúnmente se lleva a cabo en *C. elegans*, puesto que este régimen representa un estrés agudo y no uno crónico como lo es la dilución del alimento a lo largo de todo el ciclo de vida.

En cuanto a los ensayos de longevidad, de manera general hay un incremento en la vida media de nemátodos pertenecientes a las cepas N2, RNAi *daf-16-B8*, *daf-16-D8*, *daf-16(mgDf50)*, *skn-1(zu135)* y *skn-1(zu135);daf-16-B8* cuando son sometidos a 12 horas de ayuno (control: 8-11 días, ayuno 12 h: 10-13 días), excepto en las cepas que fueron alimentadas con el vector vacío (PL4440), es decir en las líneas PL4440 y *skn-1(zu135);PL4440* hay una disminución de la vida media en condiciones de ayuno de 12 horas (PL4440- C: 14 días, A: 12 días, *skn-1(zu135);PL4440*- C: 16 días, A: 11 días). Cabe señalar que los resultados anteriores no se esperaban para los RNAi, las mutantes y la mutante-RNAi, ya que al no encontrarse o encontrarse silenciados los genes *daf-16* y/o *skn-1* se esperaba que la vida media de dichos nemátodos fuera menor en condiciones de ayuno, lo cual sugeriría que dichos genes participan en la regulación de la esperanza de vida de *C. elegans* bajo condiciones de 12 horas de ayuno.

En principio este aumento en la esperanza de vida es consistente con lo reportado en estudios de restricción calórica (RC) y reducción en el consumo de alimento, que han demostrado un incremento en la esperanza de vida de vertebrados y muchas especies de invertebrados como *C. elegans* (22), sin embargo el mecanismo por el cual la RC aumenta la esperanza de vida continúa desconocido, debido a esto se han planteado múltiples hipótesis, de las cuales dos han sido ampliamente aceptadas en *C. elegans*.

La primera menciona que el efecto de la RC en la esperanza de vida puede deberse a una reducción en la tasa metabólica y/o a una reducción en la vía de señalización de la insulina (1), mientras que en la segunda se ha planteado que la RC atenúa el daño oxidante infligido por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son los primeros indicios de un proceso de envejecimiento y por lo tanto esto puede derivar en una tasa metabólica baja; dicha propuesta se encuentra basada en la combinación de la Teoría de radicales libres de Harman (23) y las observaciones de que la tasa metabólica es inversamente proporcional a la longevidad en muchas especies (22). Sin embargo, los resultados obtenidos en los ensayos de longevidad de nemátodos sometidos a 12 horas de ayuno no parecen acoplarse a ninguna de estas dos hipótesis, ya que los nemátodos de ayuno mueren antes que su respectivo control, por lo cual sugiere la existencia de una nueva hipótesis.

Por otra parte, la disminución en la vida media de los nemátodos sometidos a 12 horas de ayuno pertenecientes a las líneas alimentadas con el vector vacío PL4440, puede deberse a que diferentes cepas de bacterias modulan de manera distinta las respuestas fisiológicas de *C. elegans*, como por ejemplo el desarrollo, la reproducción, el metabolismo de ácidos grasos y la esperanza de vida (56), sin embargo los nemátodos presentan una esperanza de vida similar cuando se alimentan con la cepa OP50 (*E. coli* B) o HT115 (*E. coli* K-12) (57).

Mientras tanto el 100% de muertes de todas las cepas se presentó primero en los nemátodos que habían sido ayunados por 12 horas (control: 18-28 días, ayuno 12h: 15-24 días), excepto en la mutante- RNAi *skn-1 (zu135);daf-16-B8* ya que en este caso los nemátodos control y los pertenecientes a ayuno mueren el mismo día (control: 14 días, ayuno12h: 14 días). Lo anterior puede ser explicado por el tipo de estrés provocado, puesto que al realizar ayuno de 12 horas en el estadio L4, se provocó un estrés agudo y no crónico como comúnmente se ha llevado a cabo con la RC y el AI (21, 26); es importante señalar que no se ha reportado ningún régimen de ayuno como el que se realizó en este estudio, por lo que las respuestas en esperanza de vida y resistencia al estrés pueden diferir de lo que hasta ahora se ha reportado. Ya que se ha observado que el ayuno intermitente y la restricción calórica a pesar de que provocan efectos que se superponen, las moléculas de señalización que median estas respuestas en la RC y el AI son diferentes (26), por lo que podríamos suponer que bajo nuestras condiciones de estudio (régimen de 12 horas de ayuno) entran en acción respuestas celulares diferentes.

Así mismo mediante un análisis de Ontología génica (OG) en *C. elegans* se demostró que genes relacionados con envejecimiento y respuesta a estrés, aumentan su expresión en muestras de nemátodos ayunados entre 9-12 horas, además sugieren que los cambios cruciales en la expresión de genes que están relacionados con la esperanza de vida deben ocurrir dentro de 9-12 horas de ayuno, de manera que lo observado en la vida media y el 100% de muertes puede ser atribuido en gran parte a estos cambios en la expresión de genes relacionados con la regulación de la longevidad, ya que se encuentran involucrados genes relacionados con la determinación de la esperanza de vida, envejecimiento, respuesta

del retículo endoplásmico, respuesta a proteínas desplegadas, entre algunos otros como *sod-3*, *ctl*, *mtl-1*, *dod-6*, *hsp-12.6* (29).

Otros factores que intervienen en la esperanza de vida del nemátodo, son la temperatura y la toxicidad que *E. coli* produce a *C. elegans* (19), por lo que en este estudio la alimentación de los nemátodos tiene un papel importante, ya que se llevó a cabo con bacterias vivas para simular un ambiente silvestre, lo que representa un factor que interviene en la longevidad del nemátodo cuando es sometido a 12 horas de ayuno. Dado que se ha demostrado que existe proliferación de bacterias en el tracto gastrointestinal que promueve el empaquetamiento de bacterias en la faringe, además de que al proliferar las bacterias producen una toxina que puede provocar la muerte de *C. elegans* (58), por ello la mayoría de los trabajos de longevidad se han llevado a cabo con bacterias muertas, principalmente por radiación UV, ya que se ha reportado que de esta forma también incrementan la media de supervivencia de los nemátodos en un 16-36% (6, 56, 58). Por otro lado, el uso de FUdR (5-fluoro-2'-deoxiuridina) compuesto que usualmente es utilizado para esterilizar a los nemátodos que son utilizados en experimentos de longevidad, inhibe la síntesis de ARN y ADN resultando en la muerte de las células mitóticas, sin embargo se ha observado que FUdR a una concentración mayor a 50 μM altera la esperanza de vida del nemátodo e induciendo resistencia a diferentes tipos de estrés, lo cual culmina en un incremento en el tiempo de vida de *C. elegans* (59, 60). Dado que se ha demostrado que el uso de FUdR altera la interpretación de los resultados en un experimento (61), y debido a que en todos los reportes hasta ahora evaluados sobre RC y AI se ha utilizado FUdR a concentraciones entre 100 μM - 200 μM , es probable que el incremento en la esperanza de vida de los nemátodos sometidos a estos regímenes se deba en parte a este compuesto.

En cuanto a la mutante-RNAi *skn-1 (zu135);daf-16-B8* no se observó diferencia en el día final de muerte entre el control y el ayuno de 12 horas, no obstante en cuanto a la vida media se observó que esta es mayor en nemátodos sometidos a ayuno, como también se observa en las mutantes *daf-16 (mgDf50)*, *skn-1 (zu135)* y el RNAi *daf-16-B8*, sin embargo el 100% de muertes en dichas líneas ocurre primero en nemátodos sometidos a 12 horas de ayuno, lo que sugiere que *daf-16* y *skn-1* se encuentran implicados en la regulación de la longevidad y resistencia a estrés cuando el nemátodo es sometido a ayuno, ya que a comparación del N2 (silvestre) todas las líneas anteriormente mencionadas viven menos tiempo, pues presentan una reducción entre el 20-38% en su esperanza de vida, lo que indica que estos genes son requeridos para una esperanza de vida normal (50, 62, 63); así mismo es importante mencionar que en el caso particular de *skn-1 (zu135);daf-16-B8* se observa un efecto aditivo entre los efectos de la mutante y el RNAi, de manera que es la línea que menos tiempo vive. Por consiguiente, lo anterior sugiere que DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf2 no son los únicos factores de transcripción que regulan la esperanza de vida y la resistencia a estrés cuando *C. elegans* es sometido a 12 horas de ayuno en el estadio L4, sin embargo juegan un papel importante en la longevidad del nemátodo bajo estas

condiciones, por lo que no queda descartada la posibilidad de que la GTPasa RHEB-1 pueda encontrarse involucrada en esta regulación como ha sido reportado en ayuno intermitente, así como el factor como PHA-4/FOXO quien bajo diferentes regímenes de restricción calórica también se ha visto regula la esperanza de vida (26).

ii. Estrés y daño oxidante provocado por el ayuno de 12 horas en *C. elegans*

En *C. elegans* tanto la esperanza de vida como la resistencia a estrés pueden incrementar por la alteración de varios procesos, incluyendo la vía de señalización de la insulina (IIS), la ingesta calórica, respiración mitocondrial y la función de la línea germinal (27). En la privación de nutrientes, las células experimentan un reajuste metabólico donde las células incrementan su actividad mitocondrial, la cual es asociada con el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), sin embargo esto no se ha comprobado en los regímenes de RC y AI, excepto en la dilución de alimento, donde se ha observado una tendencia a incrementar la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, lo cual sugiere un incremento en la cantidad de ROS y posiblemente la presencia de daño oxidante en los nemátodos sometidos a este régimen (24).

Por lo que se refiere a las actividades enzimáticas de catalasa y superóxido dismutasa (SOD), en la cepa silvestre (N2) se observa un incremento del 121% en la actividad de catalasa de los nemátodos que son sometidos a 12 horas de ayuno, ya que se ha descrito que la privación de nutrientes promueve en las células un reajuste metabólico que en consecuencia promueve un incremento en la actividad mitocondrial, la cual se encuentra asociada al incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) (43), mientras que en las mutantes *daf-16 (mgDf50)*, *skn-1 (zu135)* y la mutante-RNAi *skn-1 (zu135);daf-16-B8* de manera general se observa una disminución de la actividad de catalasa bajo condiciones de ayuno respecto de su control correspondiente; en cambio al comparar la actividad de catalasa de la cepa mutante *daf-16 (mgDf50)* vs N2, se observa un incremento de la actividad de esta enzima en ausencia del factor transcripcional DAF-16/FOXO, tanto en condiciones control como en ayuno de 12 horas en 385 y 91% respectivamente, lo que sugiere que en la mutante *daf-16 (mgDf50)* las enzimas catalasa se encuentran afectadas, y que la ausencia de DAF-16 resulta detrimental para los nemátodos.

Lo anterior se explica debido a que DAF-16 se ha identificado como uno de los principales genes que promueven un incremento en la expresión de genes como superóxido dismutasa (*sod-3*), catalasa (*ctl-1* y *2*), metalotioneína (*mtl-1*) y proteínas pequeñas de choque térmico (*hsp-16*, *hsp-16.2*), que combaten diferentes tipos de estrés (13), sin embargo los resultados indican que *daf-16* no es el único gen que se encuentra regulando la actividad de catalasa, lo que coincide con lo descrito en los últimos años, donde se ha observado que el sistema que contiene contra las ROS y el estrés oxidante es complejo, involucrando múltiples vías de señalización y moléculas que promueven la activación del sistema de protección (41, 43), lo que hace que la activación de genes como *ctl* o *sod* no

sólo dependen de su activación vía DAF-16/FOXO, pues se ha visto que pueden ser activados por otras vías como AMPK (64). Por otra parte SKN-1 bajo condiciones normales no se ha visto involucrado en la regulación de *sod* ni de *ctl* (52), sin embargo los resultados de este estudio sugieren que bajo nuestras condiciones de trabajo, la actividad de catalasa si se ve afectada por el factor transcripcional SKN-1.

En contraste en la actividad de SOD no se observan cambios significativos cuando los nemátodos son sometidos a 12 horas de ayuno en la cepa N2, sin embargo hay una tendencia al incremento de la actividad de la enzima bajo estas condiciones; por otro lado en la mutante *daf-16 (mgDf50)* hay un incremento de la actividad de la superóxido dismutasa en un 110% bajo condiciones de ayuno con respecto al control, lo cual puede ser atribuido a que al reprimir o inhibir tanto a DAF-16 y/o SKN-1, se incrementa la cantidad de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidante, por lo cual la activación de las isoformas de *sod* puede estar regulada por otros genes como lo es *aak-2* quien se ha descrito como regulador de *sod-3* (31, 41).

Finalmente al comparar la actividad de SOD de la mutante *skn-1 (zu135)* y la mutante-RNAi *skn-1 (zu135);daf-16-B8* respecto de la cepa silvestre, ambas mutantes presentan un incremento significativo en la actividad de dicha enzima tanto en condiciones control como en ayuno de 12 horas, lo cual sugiere de manera indirecta que la falta de los genes *daf-16* y/o *skn-1* provoca cambios en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante, además de que se promueve la generación e incremento de las especies reactivas de oxígeno y por consecuente el incremento de estrés oxidante, como se mencionó anteriormente, provocando daño al DNA e inestabilidad genómica, además de inducir el envejecimiento (43). No obstante es importante señalar que se han presentado nuevas evidencias que apoyan un nuevo papel para las especies reactivas de oxígeno como moléculas de señalización que ayudan a las funciones fisiológicas normales, además de su papel como agentes de daño que promueven el estrés oxidante, ya que se ha demostrado que el estrés oxidante en ratones previene aspectos del desarrollo de cáncer, es decir limita la progresión de tumores así como la metástasis (43), por otro lado en *C. elegans* estudios recientes sugieren que ligeros incrementos en los niveles de ROS pueden tener efectos beneficiosos sobre la esperanza de vida del nemátodo al activar la expresión de las vías de protección celular, como la vía del factor inducido por hipoxia (HIF-1), quien se ha demostrado tiene un papel importante en la regulación de la longevidad del nemátodo (65, 66).

La lipoperoxidación o peroxidación lipídica es considerada como el principal mecanismo relacionado con el daño oxidante en las estructuras celulares y con el proceso de toxicidad. Ahora bien, en cuanto a los ensayos de lipoperoxidación pertenecientes a la cepa N2, no se observan cambios significativos en la cantidad de peroxidación lipídica de nemátodos sometidos a 12 horas de ayuno con respecto al control, a pesar de que se presenta un aumento del 56% en la concentración de MDA, lo cual indica que las especies reactivas de oxígeno que se producen bajo condiciones de ayuno de 12 horas son

combatidas por la acción de las enzimas pertenecientes al sistema antioxidante, ya que como se vio en las actividades enzimáticas de catalasa y SOD, su actividad tiene a incrementar bajo condiciones de ayuno, por lo cual no se presentan daños significativos en los lípidos que conforman las membranas. Sin embargo, estas membranas y organelos se encuentran constantemente sujetos a diferentes tipos de daños (40, 67). En cambio al comparar la mutante- RNAi *skn-1 (zu135);daf-16-B8* vs N2, se observa una tendencia a aumentar la cantidad de peroxidación de lípidos tanto en condiciones control como en ayuno, siendo el control el que presenta un aumento de 2917%, es decir más de 30 veces el valor de lo observado en la cepa silvestre, lo cual sugiere que debido a la falta de estos dos factores transcripcionales (DAF-16 y SKN-1), el daño oxidante a la célula incrementa, por lo que es posible que se genere daño celular, debido al desbalance entre oxidantes y antioxidantes, producto del aumento de las ROS. En contraste cuando los nemátodos pertenecientes a esta línea son sometidos a ayuno, se observa una disminución en la peroxidación de lípidos en un 84% con respecto a su control, lo que apoya lo observado en restricción calórica (RC), donde se desencadena un programa de defensa activa para reducir el estrés oxidante (40, 43, 67, 68).

iii. Cambios en la expresión de componentes de la vía de señalización de la insulina, la vía p38 MAPK y la actividad de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf bajo condiciones de 12 horas de ayuno en el estadio L4

Poco se sabe acerca de los mecanismos que producen el incremento en la esperanza de vida de los nemátodos cuando éstos son sometidos a regímenes de RC, sin embargo dicha respuesta se ha relacionado con la actividad de factores transcripcionales como DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf, los cuales se han descrito como reguladores de la esperanza de vida del nemátodo, debido a que regulan genes que se encuentran relacionados con la longevidad, respuesta ante estrés y sistema inmune, entre otros. Sin embargo la participación de dichos factores transcripcionales no se encuentra de manera general en todos los tipos de restricción calórica y de ayuno intermitente hasta ahora implementados.

Por lo que se refiere a la expresión de mRNA en nemátodos sometidos a 12 horas de ayuno, en la cepa silvestre N2, se observó un incremento en la expresión de la isoforma A de *skn-1* (17%) y la glutatión-S-transferasa 4 (90%), mientras que en *daf-2*, *daf-16*, *skn-1B*, *skn-1C* y *gcs-1* no se observaron cambios significativos en su expresión relativa.

En el caso de *skn-1A* el aumento en su expresión bajo condiciones de ayuno se atribuye a que *skn-1* es activado en respuesta a diversos estímulos, como lo son el estrés oxidante, estrés en el retículo endoplásmico, reducción en la traducción y reducción en la actividad del proteosoma (36, 50, 52, 69, 70), además se ha observado que la expresión de esta isoforma se encuentra principalmente enriquecida en la fracción mitocondrial y del retículo

endoplásmico (RE), por lo que se sugiere que *skn-1A* puede responder directamente al estado de estos organelos, sin embargo su función aún queda poco clara (37, 70).

En cuanto al aumento en la expresión de *gst-4*, se ha observado que los genes que se encuentran involucrados en la regulación del estrés, normalmente tienden a expresarse a niveles más altos a comparación de los demás genes, por lo cual la expresión de *gst-4* bajo condiciones normales tiende a ser alta, además parece ser que *gst-4* no sólo tiene función como GST, sino que también tiene función como glutatión dependiente de prostaglandina-D sintasa, por lo que se encuentra involucrado de manera normal en la ciclación oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados(52). Sin embargo, debido a que el aumento de la expresión bajo condiciones de ayuno es de casi el doble, esto sugiere que puede haber un aumento de compuestos del ciclo REDOX y/o electrófilos (O₂⁻, OH, H₂O₂) ya que son los principales activadores de los genes de la Fase II de desintoxicación. Es importante señalar que la activación transcripcional de *gst-4* es atribuida principalmente a la actividad de SKN-1 que se ha referido como el regulador maestro de los genes de desintoxicación, no obstante recientemente se ha reportado que *gst-4* puede ser activado por EOR-1 factor transcripcional de la vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (51, 53), por lo cual *gst-4* no se encuentra bajo control exclusivo de SKN-1 como se conocía.

En contraste, a pesar de que no se observaron cambios significativos en la expresión de mRNA correspondiente a los genes *daf-2*, *daf-16*, *skn-1b*, *skn-1c* y *gcs-1*, todos tienden a aumentar sus niveles de expresión bajo condiciones de ayuno de 12 horas, lo cual coincide con reportes donde se observa que *skn-1B*, que se encuentra en las neuronas ASI regula e induce un incremento en la longevidad bajo condiciones de restricción calórica y por otro lado *skn-1C* media la respuesta a estrés dentro del intestino (30, 36, 69, 70), lo anterior también explica el aumento que se observa en *gcs-1*, ya que su expresión es inducida por SKN-1 en presencia de estrés, pero en ausencia de este, *gcs-1* es expresado a niveles muy bajos (27, 50).

Por otra parte se observó que *daf-2* aumenta su expresión en un 15% bajo condiciones de ayuno, mientras que *daf-16* disminuye su expresión de forma no significativa en un 7% respecto al control, no obstante debido a que es la primera vez que se observa esto bajo ayuno de 12 horas en el estadio L4 del nemátodo, sería importante corroborar estos datos con técnicas más precisas como RT-qPCR. Por su parte en RC se ha visto que hay una reducción en la vía de señalización de la insulina (IIS), específicamente en el receptor de insulina DAF-2, ya que la abundancia de la proteína correlaciona positivamente con la expresión del gen, lo cual incrementa la esperanza de vida de los nemátodos (14). Por lo anterior este comportamiento en la abundancia de mensajeros se encuentra directamente relacionado con lo observado anteriormente en los ensayos de longevidad de los nemátodos sometidos a 12 horas de ayuno, ya que muestran en un principio resistencia al estrés provocado por el ayuno sin embargo mueren primero que los nemátodos control.

Ahora bien por lo que se refiere a la abundancia de las proteínas DAF-16 y DAF-2, en el caso de DAF-16/FOXO hay un incremento significativo de su abundancia dentro del núcleo en un 83%, asimismo la abundancia de la proteína total (dentro de toda la célula) también presenta un aumento del 20%, mientras que en el receptor de insulina DAF-2 no se observaron cambios significativos en la abundancia. Lo anterior puede ser explicado porque se ha demostrado que los niveles de proteína de DAF-2 son regulados por distintos factores ambientales, siendo uno de ellos la alimentación, es decir que el receptor de insulina es regulado por las condiciones ambientales, además se ha determinado que la inanición altera la abundancia de DAF-2 y su capacidad de señalización en la IIS (14), sin embargo esto sólo se ha visto en regímenes de RC y/o AI crónico, es decir a lo largo de todo el ciclo de vida del nemátodo (26, 27), por lo que es posible que bajo nuestras condiciones de estudio este efecto no se vea como se ha reportado en otro regímenes debido a que el ayuno de 12 horas provoca un tipo de estrés diferente (agudo). Por otra parte la reducción en la vía de señalización de la insulina permite la acumulación de DAF-16 en el núcleo, lo que desencadena la activación de los genes blanco de este factor, provocando un incremento en la longevidad y resistencia a estrés, no obstante DAF-16 es necesario pero no suficiente para conferir este incremento, por lo cual se ve involucrado SKN-1 (27, 71, 72).

Con respecto a las líneas RNAi de *daf-16*, la abundancia de mRNA de las tres isoformas de *skn-1* bajo condiciones de 12 horas de ayuno no mostraron cambios significativos en su expresión relativa en *daf-16-B8* y *daf-16-D8*, lo cual sugiere que no hay una relación directa entre ambos factores transcripcionales, es decir *skn-1* no está sujeto a regulación transcripcional por parte de *daf-16*. Se ha reportado que DAF-16 y SKN-1 a pesar de que presentan funciones que convergen, estos dos factores transcripcionales cooperan o actúan de manera independiente bajo condiciones normales, de estrés y/o de reducción en la vía de señalización de IIS, ya que aunque SKN-1 también es inhibido por esta vía su regulación es independiente de la actividad de DAF-16 (27, 69). Cabe señalar que en los nemátodos alimentados con el vector vacío PL4440 se observó una disminución significativa del 36% en la expresión de mRNA de *skn-1A*, lo cual puede atribuirse a los efectos que la cepa HT115 causa en el nemátodo y al ayuno de 12 horas en sí mismo, ya que se ha demostrado que los nemátodos que son alimentados con la cepa HT115 atraviesan por periodos de restricción calórica debido a que pasan menos tiempo en la capa de bacterias alimentándose, por lo cual presentan cambios en la expresión de los genes *skn-1* y *gst-4* a comparación de los nematodos que son alimentados con la cepa OP450 (37, 56, 57).

Asimismo en la línea *daf-16-B8*, la mutante *daf-16 (mgDf50)* y *skn-1 (zu135)* se observó que la expresión del mRNA de *gst-4* no se ve afectada por el ayuno de 12 horas en el knock-down o knock-out de estos genes, lo cual apoya los recientes estudios donde se ha observado que *gst-4* es regulado y activado transcripcionalmente por el factor transcripcional EOR-1 bajo distintas condiciones de estrés (53). Adicionalmente en la cepa *skn-1 (zu135)* se observó que la expresión de la γ - glutamilcisteína- sintasa 1 (*gcs-1*) blanco

directo de SKN-1, no presenta cambios significativos en su expresión cuando los nemátodos son sometidos a 12 horas de ayuno en ausencia del gen *skn-1*; lo anterior se puede explicar ya que la presencia de SKN-1 en el núcleo permite que *gcs-1* sea expresado constitutivamente en las neuronas ASI, sin embargo la expresión de *gcs-1* en la faringe es independiente de SKN-1 (50).

Por su parte en las línea mutante-RNAi *skn-1 (zu135);PL4440*, se observó que la expresión de mRNA de *gcs-1* y *gst-4* disminuye de manera significativa en un 33 y 21% respectivamente bajo condiciones de ayuno, lo cual puede ser explicado debido a que se ha demostrado que SKN-1 es esencial para inducir la expresión de estos genes en diferentes tejidos en respuesta a condiciones de estrés (27, 50). Por otra parte en *skn-1 (zu135);daf-16-B8* para *gcs-1* no se observó ningún cambio significativo en su expresión, por el contrario *gst-4* incrementa su expresión en un 28% bajo condiciones de ayuno de 12 horas comparado con su respectivo control, lo cual sugiere que para la activación de *gst-4* bajo condiciones de 12 horas de ayuno no es esencial la activación de este gen vía DAF-16, y que pueden estar involucrados otros genes (53). Sin embargo al comparar la expresión de *gst-4* en la cepa N2 vs *skn-1 (zu135);daf-16-B8* bajo condiciones de ayuno, se observa una disminución del 63% en la expresión de *gst-4* en la mutante-RNAi, por lo que estos resultados sugieren que la falta de DAF-16 y SKN-1 altera y desregula la expresión de *gst-4* en condiciones de ayuno, asimismo este comportamiento coincide con estudios recientes donde se observó que *gst-4* se puede ver regulado por otros factores bajo diferentes tipos de estrés (53), sin embargo la translocación de SKN-1 al núcleo es un pre-requisito para activar la transcripción de genes como *gcs-1* y *gst-4* en condiciones de estrés oxidante y como parte de la respuesta inmune de *C. elegans* (50, 73).

En cuanto a la expresión y translocación nuclear del transgénico *SKN-1B/C::GFP*, no se observaron cambios significativos en la expresión de GFP ni en la translocación de la proteína SKN-1 al núcleo cuando los nemátodos son sometidos a 12 horas de ayuno, a pesar de que se observa una tendencia a incrementar la expresión de SKN-1::GFP, esto se observó principalmente en la isoforma SKN-1B que se localiza en el núcleo de las neuronas ASI constitutivamente, y que induce la expresión de genes de la fase II de desintoxicación, en contraste en el intestino la expresión de SKN-1C fue generalmente indetectable, lo cual puede explicarse debido a que la presencia de estrés es necesaria para la acumulación de SKN-1C en los núcleos intestinales o bien si es inhibido GSK-3, quien previene la acumulación de SKN-1 en los núcleos del intestino (27, 50, 63). Estos resultados coinciden con lo observado en la abundancia de mRNA correspondiente a *skn-1B* y *skn-1C* donde no se observaron cambios en su expresión a pesar de que tienden a aumentar, no obstante es importante resaltar que el incremento de la abundancia de SKN-1 no necesariamente correlaciona con un incremento en su actividad, sin embargo bajo condiciones de estrés como lo es la limitación de alimento, la activación de SKN-1 puede tener un papel de protección para que el nemátodo pueda enfrentarse a periodos de falta de alimento (37).

10. Conclusiones

Por los resultados obtenidos en este estudio, es posible concluir que los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf se encuentran involucrados en la regulación de la esperanza de vida y la resistencia a estrés cuando el nemátodo *Caenorhabditis elegans* es sometido a 12 horas de ayuno en el estadio L4, sin embargo también es posible que otros factores y vías de señalización se encuentren involucrados, debido a que como se ha visto los mecanismos de respuesta ante diversos tipos de estrés, del nemátodo son complejos e involucran múltiples vías de señalización que le permiten contender contra ellos.

Por otro lado también se concluye que bajo este régimen de ayuno implementado en el laboratorio es posible encontrar la presencia de estrés oxidante, el cual en este caso puede ser el factor determinante de la actividad de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf, puesto que ambos se han visto relacionados tanto en la regulación de la respuesta antioxidante como en la restricción calórica, y sin embargo hasta ahora no se ha evaluado la presencia de estrés oxidante en la restricción calórica y mucho menos en condiciones de ayuno. Por lo cual, las aportaciones de este trabajo resultan novedosas e integrativas, ya que por muchos años se ha creído que el incremento en la esperanza de vida del nemátodo cuando es sometido a RC y/o AI se deben a que al disminuir el consumo de nutrientes se atenúa el daño oxidante y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), resultando así en una baja tasa metabólica. Sin embargo en este estudio fue posible demostrar que las actividades enzimáticas tanto de catalasa como de SOD tienden a incrementar bajo condiciones de ayuno de 12 horas, lo cual evidencia que no hay una disminución en el daño oxidante y posiblemente tampoco en la tasa de ROS, a pesar de que éstas últimas no pueden ser medidas directamente debido a que son moléculas altamente reactivas y de vida corta.

De ahí que, es posible que el incremento en la esperanza de vida que se ha observado en regímenes de RC y AI se encuentre influenciado por otros factores como lo es el tipo de régimen de restricción (crónico), el uso de compuestos químicos como FudR (para esterilizar a los nemátodos) que se ha visto produce un efecto pro-longevidad y la forma en que se alimenta a los nemátodos, ya que en todos los reportes hasta ahora conocidos se les alimenta con bacterias muertas, lo que se ha visto promueve un aumento en la esperanza de vida de *C. elegans*.

Razón por la cual, proponemos que el estrés oxidante generado por el ayuno de 12 horas en el nemátodo, desencadena la activación de factores transcripcionales como DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf, ya que ambos se encuentran íntimamente relacionados en la regulación de la esperanza de vida y la respuesta ante diversos tipos de estrés (siendo uno de ellos el estrés oxidante).

11. Perspectivas

Sin embargo es necesario reconocer que se requiere complementar los hallazgos de éste trabajo con estudios que permitan entender de forma clara y específica los mecanismos y procesos que se encuentran involucrados en el ayuno de 12 horas y el estrés oxidante que este puede ocasionar, además de implementar técnicas más precisas que permitan determinar cómo se encuentran interviniendo las especies reactivas de oxígeno en este régimen y cómo es la interacción de estas con los factores transcripcionales SKN-1 y DAF-16, ya que ambos factores transcripcionales se han visto involucrados en el proceso de envejecimiento y con ello el desarrollo de múltiples enfermedades (37).

En cuanto al mecanismo que regula la esperanza de vida del nemátodo cuando es sometido a ayuno de 12 horas y debido a que se observó que los factores transcripcionales DAF-16 y SKN-1 se ven influenciados por la presencia de estrés oxidante, resulta importante analizar la actividad de otros genes que se encuentran involucrados en la respuesta antioxidante y que son blanco directo de dichos factores (*sod, ctl, gpx, ugt, cyp*, entre otros) para determinar si estos inducen su expresión bajo condiciones de ayuno, además resulta importante investigar si existe algún otro factor que se encuentre regulando la resistencia a estrés bajo este régimen.

Finalmente es importante realizar otro tipo de microscopía que permita de manera más exacta mostrar la colocalización de la proteína SKN-1 en el núcleo, ya sea por microscopía confocal o bien microscopía FRET quien se ha definido como la técnica para definir interacciones moleculares.

12. Referencias

1. Walker G, Houthoofd K, Vanfleteren JR, & Gems D (2005) Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mechanisms of ageing and development* 126(9):929-937.
2. Kaletsky R & Murphy CT (2010) The role of insulin/IGF-like signaling in *C. elegans* longevity and aging. *Disease models & mechanisms* 3(7-8):415-419.
3. Markaki M & Tavernarakis N (2010) Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnology journal* 5(12):1261-1276.
4. Rodriguez M, Snoek LB, De Bono M, & Kammenga JE (2013) Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. *Trends in genetics : TIG* 29(6):367-374.
5. Kenyon C (2010) A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1204:156-162.
6. Gems D & Riddle DL (2000) Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 154(4):1597-1610.
7. Byerly L, Cassada RC, & Russell RL (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental biology* 51(1):23-33.
8. Cassada RC & Russell RL (1975) The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 46(2):326-342.
9. Braeckman BP, Houthoofd K, & Vanfleteren JR (2009) Intermediary metabolism. *WormBook : the online review of C. elegans biology*:1-24.
10. Blaxter M (1998) *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science* 282(5396):2041-2046.
11. Braeckman BP, Houthoofd K, & Vanfleteren JR (2002) Assessing metabolic activity in aging *Caenorhabditis elegans*: concepts and controversies. *Aging cell* 1(2):82-88; discussion 102-103.
12. Houthoofd K, *et al.* (2002) Ageing is reversed, and metabolism is reset to young levels in recovering dauer larvae of *C. elegans*. *Experimental gerontology* 37(8-9):1015-1021.
13. Murphy CT & Hu PJ (2013) Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology*:1-43.
14. Kimura KD, Riddle DL, & Ruvkun G (2011) The *C. elegans* DAF-2 insulin-like receptor is abundantly expressed in the nervous system and regulated by nutritional status. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 76:113-120.
15. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, & Ruvkun G (1997) *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277(5328):942-946.
16. Lau HE & Chalasani SH (2014) Divergent and convergent roles for insulin-like peptides in the worm, fly and mammalian nervous systems. *Invertebrate neuroscience : IN* 14(2):71-78.

17. Ritter AD, *et al.* (2013) Complex expression dynamics and robustness in *C. elegans* insulin networks. *Genome research* 23(6):954-965.
18. Braeckman BP, *et al.* (2002) No reduction of energy metabolism in *Clk* mutants. *Mechanisms of ageing and development* 123(11):1447-1456.
19. Szewczyk NJ, *et al.* (2006) Delayed development and lifespan extension as features of metabolic lifestyle alteration in *C. elegans* under dietary restriction. *The Journal of experimental biology* 209(Pt 20):4129-4139.
20. Lamitina ST, Morrison R, Moeckel GW, & Strange K (2004) Adaptation of the nematode *Caenorhabditis elegans* to extreme osmotic stress. *American journal of physiology. Cell physiology* 286(4):C785-791.
21. Taormina G & Mirisola MG (2014) Calorie restriction in mammals and simple model organisms. *BioMed research international* 2014:308690.
22. Houthoofd K & Vanfleteren JR (2006) The longevity effect of dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental gerontology* 41(10):1026-1031.
23. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11(3):298-300.
24. Houthoofd K, *et al.* (2002) No reduction of metabolic rate in food restricted *Caenorhabditis elegans*. *Experimental gerontology* 37(12):1359-1369.
25. Houthoofd K, *et al.* (2002) Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental gerontology* 37(12):1371-1378.
26. Honjoh S, Yamamoto T, Uno M, & Nishida E (2009) Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 457(7230):726-730.
27. Tullet JM, *et al.* (2008) Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 132(6):1025-1038.
28. Blackwell TK, Steinbaugh MJ, Hourihan JM, Ewald CY, & Isik M (2015) SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free radical biology & medicine* 88(Pt B):290-301.
29. Uno M, *et al.* (2013) A fasting-responsive signaling pathway that extends life span in *C. elegans*. *Cell reports* 3(1):79-91.
30. Bishop NA & Guarente L (2007) Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 447(7144):545-549.
31. Murphy CT (2006) The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Experimental gerontology* 41(10):910-921.
32. Houthoofd K, Braeckman BP, Johnson TE, & Vanfleteren JR (2003) Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental gerontology* 38(9):947-954.
33. Oh SW, *et al.* (2006) Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nature genetics* 38(2):251-257.
34. Sykiotis GP & Bohmann D (2010) Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Science signaling* 3(112):re3.
35. Ogawa T, Kodera Y, Hirata D, Blackwell TK, & Mizunuma M (2016) Natural thioallyl compounds increase oxidative stress resistance and lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating SKN-1/Nrf. *Scientific reports* 6:21611.

36. Staab TA, *et al.* (2013) The conserved SKN-1/Nrf2 stress response pathway regulates synaptic function in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics* 9(3):e1003354.
37. Paek J, *et al.* (2012) Mitochondrial SKN-1/Nrf mediates a conserved starvation response. *Cell metabolism* 16(4):526-537.
38. Wullschleger S, Loewith R, & Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3):471-484.
39. Hansen M, *et al.* (2008) A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS genetics* 4(2):e24.
40. Repetto M, Jimena Semprine., Alberto Boveris (2012) Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination, Lipid Peroxidation. *InTech*.
41. Labuschagne CF, *et al.* (2013) Quantification of in vivo oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* during aging by endogenous F3-isoprostane measurement. *Aging cell* 12(2):214-223.
42. Shangari N & O'Brien PJ (2006) Catalase activity assays. *Current protocols in toxicology* Chapter 7:Unit 7 7 1-15.
43. Luo H, Chiang HH, Louw M, Susanto A, & Chen D (2017) Nutrient Sensing and the Oxidative Stress Response. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*.
44. Lindblom TH & Dodd AK (2006) Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology* 305(9):720-730.
45. Atwal PS, Medina CR, Burrage LC, & Sutton VR (2016) Nineteen-year follow-up of a patient with severe glutathione synthetase deficiency. *Journal of human genetics* 61(7):669-672.
46. Luersen K, *et al.* (2013) The glutathione reductase GSR-1 determines stress tolerance and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PloS one* 8(4):e60731.
47. Townsend DM, Tew KD, & Tapiero H (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 57(3-4):145-155.
48. Liao VH & Yu CW (2005) *Caenorhabditis elegans* gcs-1 confers resistance to arsenic-induced oxidative stress. *Biomaterials : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 18(5):519-528.
49. Inoue H, *et al.* (2005) The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes & development* 19(19):2278-2283.
50. An JH & Blackwell TK (2003) SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes & development* 17(15):1882-1893.
51. Leung CK, Empinado H, & Choe KP (2012) Depletion of a nucleolar protein activates xenobiotic detoxification genes in *Caenorhabditis elegans* via Nrf /SKN-1 and p53/CEP-1. *Free radical biology & medicine* 52(5):937-950.
52. Oliveira RP, *et al.* (2009) Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging cell* 8(5):524-541.
53. Detienne G, Van de Walle P, De Haes W, Schoofs L, & Temmerman L (2016) SKN-1-independent transcriptional activation of glutathione S-transferase 4 (GST-4) by EGF signaling. *Worm* 5(4):e1230585.

54. Estepa VRSMC (2001) Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real Acad. Farm.* 67 (3).
55. Yang JS, *et al.* (2011) OASIS: online application for the survival analysis of lifespan assays performed in aging research. *PLoS one* 6(8):e23525.
56. Pang S & Curran SP (2014) Adaptive capacity to bacterial diet modulates aging in *C. elegans*. *Cell metabolism* 19(2):221-231.
57. Brooks KK, Liang B, & Watts JL (2009) The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*. *PLoS one* 4(10):e7545.
58. Garigan D, *et al.* (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161(3):1101-1112.
59. Anderson EN, *et al.* (2016) *C. elegans* lifespan extension by osmotic stress requires FUDR, base excision repair, FOXO, and sirtuins. *Mechanisms of ageing and development* 154:30-42.
60. Davies SK, Leroi AM, & Bundy JG (2012) Fluorodeoxyuridine affects the identification of metabolic responses to daf-2 status in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of ageing and development* 133(1):46-49.
61. Van Raamsdonk JM & Hekimi S (2011) FUDR causes a twofold increase in the lifespan of the mitochondrial mutant gas-1. *Mechanisms of ageing and development* 132(10):519-521.
62. Lee SJ, Murphy CT, & Kenyon C (2009) Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell metabolism* 10(5):379-391.
63. An JH, *et al.* (2005) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(45):16275-16280.
64. Xie M & Roy R (2012) Increased levels of hydrogen peroxide induce a HIF-1-dependent modification of lipid metabolism in AMPK compromised *C. elegans* dauer larvae. *Cell metabolism* 16(3):322-335.
65. Lee SJ, Hwang AB, & Kenyon C (2010) Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Current biology : CB* 20(23):2131-2136.
66. Leiser SF, Begun A, & Kaeberlein M (2011) HIF-1 modulates longevity and healthspan in a temperature-dependent manner. *Aging cell* 10(2):318-326.
67. Wang Q, *et al.* (2016) Bioactive Peptides from *Angelica sinensis* Protein Hydrolyzate Delay Senescence in *Caenorhabditis elegans* through Antioxidant Activities. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016:8956981.
68. Catala A (2012) Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the "Fluid Mosaic Model" to the "Lipid Whisker Model". *Biochimie* 94(1):101-109.
69. Wang J, *et al.* (2010) RNAi screening implicates a SKN-1-dependent transcriptional response in stress resistance and longevity deriving from translation inhibition. *PLoS genetics* 6(8).
70. Glover-Cutter KM, Lin S, & Blackwell TK (2013) Integration of the unfolded protein and oxidative stress responses through SKN-1/Nrf. *PLoS genetics* 9(9):e1003701.
71. Kenyon C (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120(4):449-460.
72. Larsen PL (2001) Asking the age-old questions. *Nature genetics* 28(2):102-104.

73. Li WH, Chang CH, Huang CW, Wei CC, & Liao VH (2014) Selenite enhances immune response against *Pseudomonas aeruginosa* PA14 via SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS one* 9(8):e105810.

ANEXOS

Anexo I

Métodos

Medio de Crecimiento para Nemátodos (NGM)

3 g NaCl, 20 g Bacto Agar, 2.5 g Bacto Peptona, 0.005 g de Colesterol disuelto en alcohol etílico absoluto, 975 ml dH₂O, 1 ml de CaCl 1M, 20 ml de buffer fosfatos pH 6.0, 1 ml de MgSO₄ 1M.

Medio de Crecimiento para Nemátodos RNAi (NGM-lite)

6 g NaCl, 30 g Bacto Agar, 2.5 g Bacto Peptona, 0.005 g de Colesterol disuelto en alcohol etílico absoluto, 975 ml dH₂O, 1 ml de CaCl 1M, 20 ml de buffer fosfatos pH 6.0, 1 ml de MgSO₄ 1M.

Antibióticos: Ampicilina [100 ug/ml], tetraciclina [12.5 ug/ml]

Buffer M9

6 gr Na₂HPO₄, 3 gr KH₂PO, 5 gr NaCl, 0.105gr MgSO₄, 1 L dH₂O.

Medio 2xYT para inoculación e inducción de cepas RNAi

16 g triptona, 10 g extracto de levadura, 5 g NaCl, cbp 1 L dH₂O.

Antibióticos: para 30 ml de medio 2xYT, 80.65 ul Ampicilina [100 ug/ml], 28.85 ul tetraciclina [12.5 ug/ml], 120 ul IPTG [0.4 mM].

Buffer de lisis

Hepes-KOH 50 Mm pH 7.6, EDTA 1 Mm, KCl 140 Mm, NP-40 0.5%, Glicerol 10%, DTT 5Mm, Inhibidor de proteasas 1Mm.

Buffer de extracción

10Mm HEPES, pH 7.1, 5Mm MgCl₂, 2Mm Dithiothreitol (DTT), 10% glicerol, 1X Inhibidor de proteasas Complete Roche.

Programación utilizada para la retrotranscripción

| Número de ciclos | Retrotranscripción |
|-------------------------|---|
| 1 | 70 °C- 5 min (sólo RNA + oligo reverso) |
| 1 | 37°C-5 min (agregar la mezcla) |
| 1 | 42°C- 1 hora |
| 1 | 70°C- 10 min |
| 1 | 4°C- 3 min |

Programación utilizada para PCR

| Número de ciclos | PCR |
|------------------|------------------------|
| 1 | 95 °C- 2 min |
| 30 | 95°C- 15 seg |
| | 60,62,63,65 °C- 10 min |
| | 72°C- 1 min |
| 1 | 72°C- 5 min |
| | 4°C- 3 min |

TBA 0.375%

3.75 mg TBA, 830 ul dH₂O, 150 ul TCA, 20 ul HCl concentrado, cantidades para una reacción.

Curva estándar

| | Blanco | 50 nM | 100nM | 200 nM | 500 nM | 1000 nM | 2000 nM |
|-----------------------|--------|-----------|----------|--------|----------|---------|---------|
| TMPO 20uM | --- | 1.25 ul | 2.5 ul | 5 ul | 12.5 ul | 25 ul | 50 ul |
| TBA 0.375% | 500 ul | 498.75 ul | 497.5 ul | 495 ul | 487.5 ul | 475 ul | 450 ul |
| Vol.final | 500 ul | 500 ul | 500 ul | 500 ul | 500 ul | 500 ul | 500 ul |

Anexo II

Ensayos de longevidad

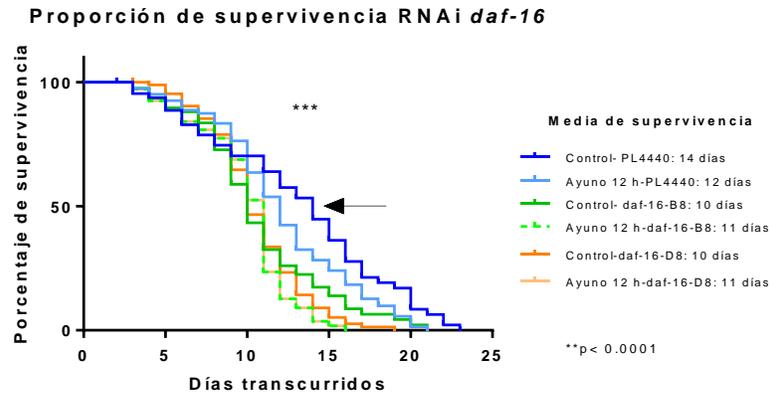
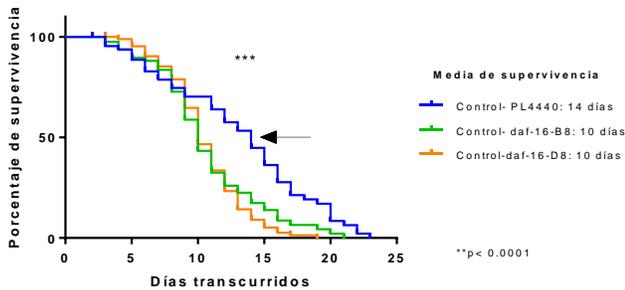


Figura 1. Curvas de supervivencia pertenecientes a las líneas RNAi *daf-16*, donde se observan diferencias significativas entre las cepas *daf-16-B8* y *daf-16-D8* con respecto al vector vacío PL4440, dichas comparaciones fueron realizadas utilizando la prueba de log-rank.

Proporción de Supervivencia: Comparación CONTROL-RNAi



Proporción de Supervivencia: Comparación AYUNO RNAi

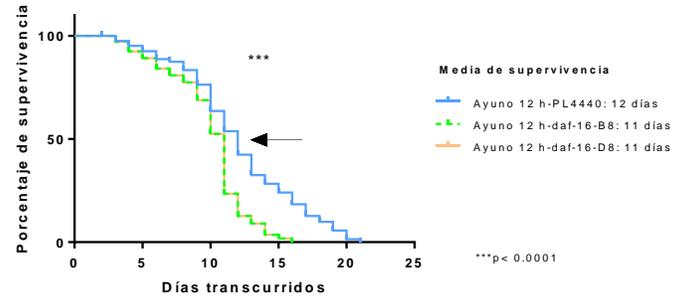
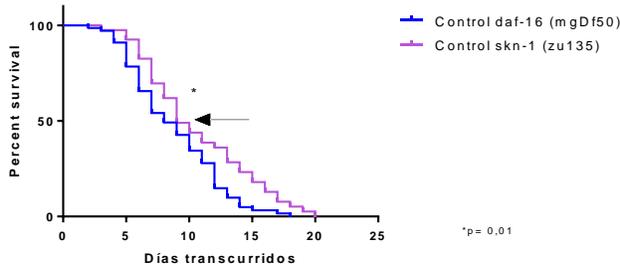


Figura 2. Comparación de las curvas de supervivencia pertenecientes a muestras controles (izquierda) y ayuno 12 horas (derecha) de nemátodos RNAi; en cada gráfico se compararon las curvas control de PL4440, *daf-16-B8* y *daf-16-D8*, en ambos casos se observó que hay diferencias significativas entre curvas $***p < 0.0001$.

Proporción de Supervivencia: Comparación CONTROL daf-16/skn-1



Proporción de Supervivencia: Comparación AYUNO-DAF-16/SKN

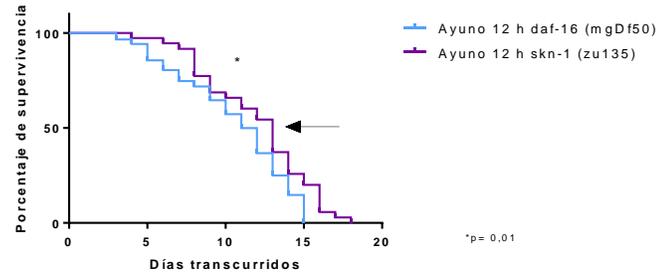
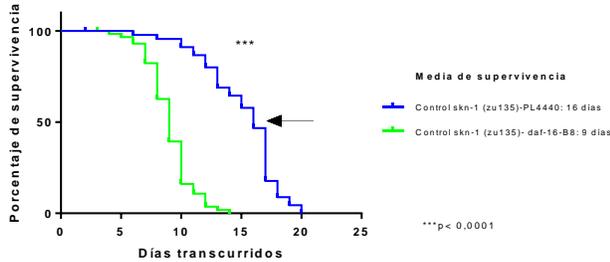


Figura 3. Comparación de las curvas de supervivencia pertenecientes a muestras controles (izquierda) y ayuno 12 horas (derecha) de las cepas *daf-16 (mgDf50)* y *skn-1 (zu135)*. En cada gráfico se realizó la comparación de las curvas pertenecientes a cada cepa y se observó un diferencia significativa entre ambas cepas tanto en condiciones control como en condiciones de ayuno $*p < 0.01$.

Proporción de Supervivencia: Comparación Control skn-1 (zu135)-RNAi



Proporción de Supervivencia: Comparación AYUNO skn (zu135)- RNAi

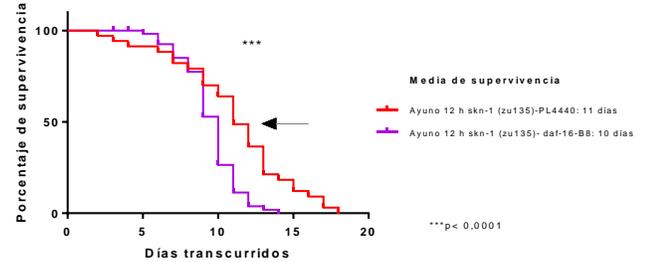


Figura 4. Comparación de las curvas de supervivencia pertenecientes a muestras controles (izquierda) y ayuno 12 horas (derecha) de las cepas mutantes-RNAi *skn-1(zu135);PL4440* y *skn-1 (zu135);daf-16-B8*, donde se observa cambios significativos entre grupos tanto en condiciones control como en condiciones de ayuno $***p < 0.0001$.

Tabla 1. Comparación de las proporciones de supervivencia (en percentiles) de la cepa N2 (silvestre), *daf-16* (mgDf50), *skn-1*(zu135), líneas RNAi PL4440, *daf-16-B8*, *daf-16-D8* y la mutante -RNAi *skn-1*; PL4440 y *skn-1*; *daf-16-B8* de *C. elegans* cuando es sometido a 12 horas de ayuno en el estadio L4.

| Nombre | No. de sujetos | Media restringida | | | Edad en días por porcentaje de mortalidad | | | | | |
|---------------------------|----------------|-------------------|------------|---------------|---|-----|-----|-----|------|----------------|
| | | Días | Std. error | 95% C.I. | 25% | 50% | 75% | 90% | 100% | 95% Media C.I. |
| N2 CONTROL | 69 | 11.87 | 0.67 | 10.55 ~ 13.19 | 8 | 11 | 14 | 19 | 28 | 10 ~ 11 |
| N2 AYUNO | 59 | 11.84 | 0.68 | 10.51 ~ 13.16 | 8 | 12 | 15 | 18 | 24 | 10 ~ 12 |
| PL4440-CONTROL | 73 | 13.12 | 0.76 | 11.63 ~ 14.61 | 8 | 14 | 17 | 20 | 23 | 12 ~ 14 |
| PL4440-AYUNO | 82 | 12.14 | 0.50 | 11.16 ~ 13.11 | 10 | 12 | 15 | 18 | 21 | 11 ~ 12 |
| <i>daf-16-B8</i> -CONTROL | 81 | 10.67 | 0.49 | 9.71 ~ 11.64 | 8 | 10 | 13 | 16 | 21 | 9 ~ 10 |
| <i>daf-16-B8</i> -AYUNO | 77 | 9.93 | 0.37 | 9.21 ~ 10.65 | 9 | 11 | 12 | 13 | 16 | 10 ~ 10 |
| <i>daf-16-D8</i> -CONTROL | 89 | 10.51 | 0.33 | 9.87 ~ 11.15 | 9 | 10 | 12 | 14 | 19 | 10 ~ 10 |
| <i>daf-16-D8</i> -AYUNO | 77 | 9.93 | 0.37 | 9.21 ~ 10.65 | 9 | 11 | 12 | 13 | 16 | 10 ~ 10 |
| DAF-16 (mgDf50)-CONTROL | 69 | 8.77 | 0.45 | 7.88 ~ 9.65 | 6 | 8 | 12 | 13 | 18 | 7 ~ 9 |
| DAF-16 (mgDf50)-AYUNO | 87 | 10.51 | 0.41 | 9.71 ~ 11.32 | 7 | 11 | 13 | 15 | - | 10 ~ 11 |
| SKN-1 (zu135)-CONTROL | 40 | 10.67 | 0.69 | 9.31 ~ 12.03 | 7 | 9 | 14 | 17 | 20 | 8 ~ 12 |
| SKN-1 (zu135)-AYUNO | 37 | 11.99 | 0.58 | 10.85 ~ 13.13 | 9 | 13 | 15 | 16 | 18 | 11 ~ 13 |
| SKN:PL4440-CONTROL | 47 | 15.13 | 0.46 | 14.22 ~ 16.04 | 13 | 16 | 17 | 18 | 20 | 15 ~ 16 |
| SKN:PL4440-AYUNO | 35 | 11.07 | 0.66 | 9.78 ~ 12.35 | 9 | 11 | 13 | 16 | 18 | 10 ~ 12 |
| SKN;B8-CONTROL | 60 | 9.04 | 0.25 | 8.56 ~ 9.53 | 8 | 9 | 10 | 12 | 14 | 8 ~ 9 |
| SKN;B8-AYUNO | 59 | 9.50 | 0.25 | 9.01 ~ 9.98 | 9 | 10 | 11 | 12 | 14 | 9 ~ 9 |

Anexo III

Actividades enzimáticas

i. Actividad de Catalasa

Tabla 2 . Actividad de catalasa en kU/L, se muestran los valores de las medias de cada cepa tanto en condiciones control como en condiciones de ayuno de 12 horas.

| Cepa | Media Control (kU/L) | Media Ayuno 12 horas (kU/L) |
|-----------------|----------------------|-----------------------------|
| N2 | 55,27 | 122,3 |
| daf-16 (mgDf50) | 281,1 | 240,8 |
| skn-1 (zu135) | 147,2 | 78,96 |
| SKN-1:B8 | 209,6 | 149,3 |

Tabla 3. Análisis estadístico de ANOVA- dos vías no paramétrico, para analizar los datos de la actividad de catalasa en kU/L.y determinar si hay cambios significativos.

| ANOVA de dos vías | Ordinario | | | | |
|----------------------------|----------------------|----------|---------------------|-------------------|------------|
| Alfa | 0,05 | | | | |
| Fuente de variación | % de variación total | Valor P | Resumen del valor P | ¿Significativo? | |
| Interacción | 12,63 | 0,0017 | ** | Si | |
| Factor fila | 76,29 | < 0,0001 | **** | Si | |
| Factor columna | 2,773 | 0,0345 | * | Si | |
| ANOVA | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor P |
| Interacción | 17724 | 3 | 5908 | F (3, 16) = 8,106 | P = 0,0017 |
| Factor fila | 107041 | 3 | 35680 | F (3, 16) = 48,95 | P < 0,0001 |
| Factor columna | 3891 | 1 | 3891 | F (1, 16) = 5,338 | P = 0,0345 |
| Residual | 11662 | 16 | 728,8 | | |
| Numero de valores perdidos | 0 | | | | |

Tabla 4. Prueba de comparaciones múltiples de Sidak, donde se comparan los resultados de ayuno con su respectivo control para cada cepa, para determinar cambios dentro de cada grupo debido al ayuno de 12 horas al cual fueron sometidos los nemátodos.

| | | | | | | | | |
|---|-------------------------|----------------------|-------------------------|---------------|---------------------|----|-------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Numero de comparaciones por familia | 4 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| CONTROL - AYUNO 12 h | | | | | | | | |
| N2 | -67,00 | -128,8 to -5,192 | Sí | * | 0,0309 | | | |
| daf-16 (mgDf50) | 40,25 | -21,55 to 102,1 | No | ns | 0,3038 | | | |
| skn-1 (zu135) | 68,27 | 6,463 to 130,1 | Si | * | 0,0274 | | | |
| SKN-1:B8 | 60,34 | -1,467 to 122,1 | No | ns | 0,0572 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia entre medias | Diferencia SE | N1 | N2 | t | DF |
| CONTROL - AYUNO 12 h | | | | | | | | |
| N2 | 55,27 | 122,3 | -67,00 | 22,04 | 3 | 3 | 3,039 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) | 281,1 | 240,8 | 40,25 | 22,04 | 3 | 3 | 1,826 | 16 |
| skn-1 (zu135) | 147,2 | 78,96 | 68,27 | 22,04 | 3 | 3 | 3,097 | 16 |
| SKN-1:B8 | 209,6 | 149,3 | 60,34 | 22,04 | 3 | 3 | 2,737 | 16 |

Tabla 5. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey, donde se comparan los resultados de ayuno y los resultados de los controles de cada cepa, para determinar cambios entre grupos.

| | | | | | | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|-------|----|
| Número de familias | 2 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 6 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Tukey | Diferencia de medias | Diferencia de CI 95% | ¿Significante? | Resumen | Valor ajustado de P | | | |
| CONTROL | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | -225,8 | -288,9 to -162,7 | Si | **** | < 0,0001 | | | |
| N2 vs. skn-1 (zu135) | -91,95 | -155,0 to -28,89 | Si | ** | 0,0036 | | | |
| N2 vs. SKN-1:B8 | -154,4 | -217,4 to -91,29 | Si | **** | < 0,0001 | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1 (zu135) | 133,8 | 70,77 to 196,9 | Si | **** | < 0,0001 | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | 71,43 | 8,369 to 134,5 | Si | * | 0,0238 | | | |
| skn-1 (zu135) vs. SKN-1:B8 | -62,41 | -125,5 to 0,6598 | No | ns | 0,0529 | | | |
| AYUNO 12 h | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | -118,5 | -181,6 to -55,48 | Si | *** | 0,0003 | | | |
| N2 vs. skn-1 (zu135) | 43,31 | -19,75 to 106,4 | No | ns | 0,2417 | | | |
| N2 vs. SKN-1:B8 | -27,02 | -90,09 to 36,04 | No | ns | 0,6201 | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1 (zu135) | 161,9 | 98,79 to 224,9 | Si | **** | < 0,0001 | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | 91,52 | 28,45 to 154,6 | Si | ** | 0,0038 | | | |
| skn-1 (zu135) vs. SKN-1:B8 | -70,34 | -133,4 to -7,270 | Si | * | 0,0263 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | q | DF |
| CONTROL | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | 55,27 | 281,1 | -225,8 | 22,04 | 3 | 3 | 14,49 | |
| N2 vs. skn-1 (zu135) | 55,27 | 147,2 | -91,95 | 22,04 | 3 | 3 | 5,899 | 16 |
| N2 vs. SKN-1:B8 | 55,27 | 209,6 | -154,4 | 22,04 | 3 | 3 | 9,903 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1 (zu135) | 281,1 | 147,2 | 133,8 | 22,04 | 3 | 3 | 8,587 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | 281,1 | 209,6 | 71,43 | 22,04 | 3 | 3 | 4,583 | 16 |
| skn-1 (zu135) vs. SKN-1:B8 | 147,2 | 209,6 | -62,41 | 22,04 | 3 | 3 | 4,004 | 16 |
| AYUNO 12 h | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | 122,3 | 240,8 | -118,5 | 22,04 | 3 | 3 | 7,605 | |
| N2 vs. skn-1 (zu135) | 122,3 | 78,96 | 43,31 | 22,04 | 3 | 3 | 2,779 | 16 |
| N2 vs. SKN-1:B8 | 122,3 | 149,3 | -27,02 | 22,04 | 3 | 3 | 1,734 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1 (zu135) | 240,8 | 78,96 | 161,9 | 22,04 | 3 | 3 | 10,38 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | 240,8 | 149,3 | 91,52 | 22,04 | 3 | 3 | 5,872 | 16 |
| skn-1 (zu135) vs. SKN-1:B8 | 78,96 | 149,3 | -70,34 | 22,04 | 3 | 3 | 4,513 | 16 |

ii. Actividad de catalasa específica

Tabla 6. Actividad de catalasa específica (U/ug de proteína), se muestran los valores de las medias de la actividad específica de cada cepa tanto en condiciones control como en condiciones de ayuno de 12 horas.

| Cepa | Media Control (kU/L) | Media Ayuno 12 horas (kU/L) |
|-----------------|----------------------|-----------------------------|
| N2 | 0,05527 | 0,1223 |
| daf-16 (mgDf50) | 0,2681 | 0,2335 |
| skn-1 (zu135) | 0,1452 | 0,07896 |
| SKN-1:B8 | 0,2002 | 0,1273 |

Tabla 7. Análisis estadístico de ANOVA- dos vías no paramétrico, para analizar los datos de la actividad de catalasa específica (U7ug proteína) y determinar cambios significativos.

| ANOVA de dos vías | Ordinaria | | | | |
|----------------------------|----------------------|----------|---------------------|-------------------|------------|
| Alfa | 0,05 | | | | |
| Fuente de Variación | % total de variación | Valor P | Resumen del valor P | ¿Significativo? | |
| Interacción | 14,64 | 0,0017 | ** | Si | |
| Factor fila | 72,27 | < 0,0001 | **** | Si | |
| Factor columna | 3,331 | 0,0327 | * | Si | |
| Tabla de ANOVA | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor P |
| Interacción | 0,01881 | 3 | 0,006272 | F (3, 16) = 8,008 | P = 0,0017 |
| Factor fila | 0,09286 | 3 | 0,03095 | F (3, 16) = 39,52 | P < 0,0001 |
| Factor columna | 0,004280 | 1 | 0,004280 | F (1, 16) = 5,465 | P = 0,0327 |
| Residual | 0,01253 | 16 | 0,0007832 | | |
| Número de valores perdidos | 0 | | | | |

Tabla 8. Prueba de comparaciones múltiples de Sidak de la actividad específica de catalasa, donde se comparan los resultados de ayuno con su respectivo control para cada cepa, para determinar cambios dentro de cada grupo debido al ayuno de 12 horas al cual fueron sometidos los nemátodos.

| | | | | | | | | |
|---|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|-------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 4 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 h N2 | -0,06700 | -0,1311 to -0,002931 | Yes | * | 0,0385 | | | |
| daf-16 (mgDf50) | 0,03466 | -0,02941 to 0,09872 | No | ns | 0,4751 | | | |
| skn-1 (zu135) | 0,06623 | 0,002166 to 0,1303 | Yes | * | 0,0412 | | | |
| SKN-1:B8 | 0,07294 | 0,008876 to 0,1370 | Yes | * | 0,0225 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 h N2 | 0,05527 | 0,1223 | -0,06700 | 0,02285 | 3 | 3 | 2,932 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) | 0,2681 | 0,2335 | 0,03466 | 0,02285 | 3 | 3 | 1,517 | 16 |
| skn-1 (zu135) | 0,1452 | 0,07896 | 0,06623 | 0,02285 | 3 | 3 | 2,899 | 16 |
| SKN-1:B8 | 0,2002 | 0,1273 | 0,07294 | 0,02285 | 3 | 3 | 3,192 | 16 |

Tabla 9. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la actividad específica de catalasa donde se comparan los resultados de ayuno y los resultados de los controles de cada cepa, para determinar cambios entre grupos

2

| Número de familias | | | | | | | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|----|----|--------|----|--|
| Número de comparaciones por familia | 6 | | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Tukey | Diferencia de medias | Diferencia de CI 95% | ¿Significante? | Resumen | | | | | |
| Control | | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | -0,2128 | -0,2782 to -0,1475 | Si | **** | | | | | |
| N2 vs. skn-1 (zu135) | -0,08991 | -0,1553 to -0,02454 | Si | ** | | | | | |
| N2 vs. SKN-1:B8 | -0,1450 | -0,2103 to -0,07958 | Si | **** | | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1 (zu135) | 0,1229 | 0,05756 to 0,1883 | Si | *** | | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | 0,06789 | 0,002516 to 0,1333 | Si | * | | | | | |
| skn-1 (zu135) vs. SKN-1:B8 | -0,05504 | -0,1204 to 0,01033 | No | ns | | | | | |
| Ayuno 12 h | | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | -0,1112 | -0,1766 to -0,04582 | Si | *** | | | | | |
| N2 vs. skn-1 (zu135) | 0,04331 | -0,02206 to 0,1087 | No | ns | | | | | |
| N2 vs. SKN-1:B8 | -0,005020 | -0,07039 to 0,06035 | No | ns | | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1 (zu135) | 0,1545 | 0,08913 to 0,2199 | Si | **** | | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | 0,1062 | 0,04080 to 0,1715 | Si | ** | | | | | |
| skn-1 (zu135) vs. SKN-1:B8 | -0,04833 | -0,1137 to 0,01704 | No | ns | | | | | |
| Detalles de la prueba | | | | | | | | | |
| | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | q | DF | |
| Control | | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | 0,05527 | 0,2681 | -0,2128 | 0,02285 | 3 | 3 | 13,17 | 16 | |
| N2 vs. skn-1 (zu135) | 0,05527 | 0,1452 | -0,08991 | 0,02285 | 3 | 3 | 5,565 | 16 | |
| N2 vs. SKN-1:B8 | 0,05527 | 0,2002 | -0,1450 | 0,02285 | 3 | 3 | 8,972 | 16 | |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1 (zu135) | 0,2681 | 0,1452 | 0,1229 | 0,02285 | 3 | 3 | 7,609 | 16 | |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | 0,2681 | 0,2002 | 0,06789 | 0,02285 | 3 | 3 | 4,202 | 16 | |
| skn-1 (zu135) vs. SKN-1:B8 | 0,1452 | 0,2002 | -0,05504 | 0,02285 | 3 | 3 | 3,407 | 16 | |
| Ayuno 12 h | | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | 0,1223 | 0,2335 | -0,1112 | 0,02285 | 3 | 3 | 6,882 | 16 | |
| N2 vs. skn-1 (zu135) | 0,1223 | 0,07896 | 0,04331 | 0,02285 | 3 | 3 | 2,681 | 16 | |
| N2 vs. SKN-1:B8 | 0,1223 | 0,1273 | -0,005020 | 0,02285 | 3 | 3 | 0,3107 | 16 | |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1 (zu135) | 0,2335 | 0,07896 | 0,1545 | 0,02285 | 3 | 3 | 9,563 | 16 | |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | 0,2335 | 0,1273 | 0,1062 | 0,02285 | 3 | 3 | 6,571 | 16 | |
| skn-1 (zu135) vs. SKN-1:B8 | 0,07896 | 0,1273 | -0,04833 | 0,02285 | 3 | 3 | 2,991 | 16 | |

iii. Actividad de la Superóxido dismutasa (SOD)

Tabla 10. Actividad de SOD, se muestran los valores de las medias de la actividad enzimática de cada cepa tanto en condiciones control como en condiciones de ayuno de 12 horas.

| Cepa | Media Control | Media Ayuno |
|-----------------|---------------|-------------|
| N2 | 21,18 | 27,57 |
| daf-16 (mgDf50) | 20,12 | 42,48 |
| SKN-1(zu135) | 84,44 | 89,66 |
| SKN-1:B8 | 77,32 | 76,98 |

Tabla 11. Análisis estadístico de ANOVA- dos vías no paramétrico, para analizar los datos de la actividad de SOD y determinar cambios significativos.

| ANOVA de dos vías | Ordinario | | | | |
|----------------------------|----------------------|----------|---------------------|-------------------|------------|
| Alfa | 0,05 | | | | |
| Fuente de Variación | % total de variación | Valor P | Resumen del valor P | ¿Significativo? | |
| Interacción | 2,190 | 0,0318 | * | Si | |
| Factor fila | 92,55 | < 0,0001 | **** | Si | |
| Factor columna | 2,169 | 0,0041 | ** | Si | |
| Tabla de ANOVA | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor P |
| Interacción | 428,3 | 3 | 142,8 | F (3, 16) = 3,777 | P = 0,0318 |
| Factor fila | 18105 | 3 | 6035 | F (3, 16) = 159,6 | P < 0,0001 |
| Factor columna | 424,3 | 1 | 424,3 | F (1, 16) = 11,22 | P = 0,0041 |
| Residual | 604,8 | 16 | 37,80 | | |
| Número de valores perdidos | 0 | | | | |

Tabla 12. Prueba de comparaciones múltiples de Sidak de la actividad de SOD, donde se comparan los resultados de ayuno con su respectivo control por cada cepa, para determinar cambios dentro de cada grupo.

| | | | | | | | | |
|---|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|---------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 4 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| CONTROL - AYUNO 12 h | | | | | | | | |
| N2 | -6,396 | -20,47 to 7,680 | No | ns | 0,6315 | | | |
| daf-16 (mgDf50) | -22,37 | -36,44 to -8,290 | Si | ** | 0,0016 | | | |
| SKN-1(zu135) | -5,214 | -19,29 to 8,861 | No | ns | 0,7791 | | | |
| SKN-1:B8 | 0,3391 | -13,74 to 14,41 | No | ns | > 0,9999 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| CONTROL - AYUNO 12 h | | | | | | | | |
| N2 | 21,18 | 27,57 | -6,396 | 5,020 | 3 | 3 | 1,274 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) | 20,12 | 42,48 | -22,37 | 5,020 | 3 | 3 | 4,455 | 16 |
| SKN-1(zu135) | 84,44 | 89,66 | -5,214 | 5,020 | 3 | 3 | 1,039 | 16 |
| SKN-1:B8 | 77,32 | 76,98 | 0,3391 | 5,020 | 3 | 3 | 0,06755 | 16 |

Tabla 13. Prueba de comparaciones múltiples de Sidak, de la actividad enzimática de SOD, donde se comparan los resultados de ayuno 12 h y los resultados de los controles de cada cepa, para determinar cambios entre grupos.

| | | | | | | | | |
|---|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|----|----|--------|----|
| Número de familias | 2 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 6 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | | | | |
| CONTROL | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | 1,062 | -13,99 to 16,11 | No | ns | | | | |
| N2 vs. SKN-1(zu135) | -63,27 | -78,32 to -48,21 | Si | **** | | | | |
| N2 vs. SKN-1:B8 | -56,14 | -71,19 to -41,09 | Si | **** | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1(zu135) | -64,33 | -79,38 to -49,28 | Si | **** | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | -57,21 | -72,26 to -42,15 | Si | **** | | | | |
| SKN-1(zu135) vs. SKN-1:B8 | 7,122 | -7,929 to 22,17 | No | ns | | | | |
| AYUNO 12 h | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | -14,91 | -29,96 to 0,1433 | No | ns | | | | |
| N2 vs. SKN-1(zu135) | -62,08 | -77,13 to -47,03 | Si | **** | | | | |
| N2 vs. SKN-1:B8 | -49,41 | -64,46 to -34,36 | Si | **** | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1(zu135) | -47,18 | -62,23 to -32,12 | Si | **** | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | -34,50 | -49,55 to -19,45 | Si | **** | | | | |
| SKN-1(zu135) vs. SKN-1:B8 | 12,67 | -2,376 to 27,73 | No | ns | | | | |
| Detalles de la prueba | | | | | | | | |
| | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| CONTROL | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | 21,18 | 20,12 | 1,062 | 5,020 | 3 | 3 | 0,2115 | 16 |
| N2 vs. SKN-1(zu135) | 21,18 | 84,44 | -63,27 | 5,020 | 3 | 3 | 12,60 | 16 |
| N2 vs. SKN-1:B8 | 21,18 | 77,32 | -56,14 | 5,020 | 3 | 3 | 11,18 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1(zu135) | 20,12 | 84,44 | -64,33 | 5,020 | 3 | 3 | 12,81 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | 20,12 | 77,32 | -57,21 | 5,020 | 3 | 3 | 11,40 | 16 |
| SKN-1(zu135) vs. SKN-1:B8 | 84,44 | 77,32 | 7,122 | 5,020 | 3 | 3 | 1,419 | 16 |
| AYUNO 12 h | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | 27,57 | 42,48 | -14,91 | 5,020 | 3 | 3 | 2,970 | 16 |
| N2 vs. SKN-1(zu135) | 27,57 | 89,66 | -62,08 | 5,020 | 3 | 3 | 12,37 | 16 |
| N2 vs. SKN-1:B8 | 27,57 | 76,98 | -49,41 | 5,020 | 3 | 3 | 9,842 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1(zu135) | 42,48 | 89,66 | -47,18 | 5,020 | 3 | 3 | 9,397 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. SKN-1:B8 | 42,48 | 76,98 | -34,50 | 5,020 | 3 | 3 | 6,873 | 16 |
| SKN-1(zu135) vs. SKN-1:B8 | 89,66 | 76,98 | 12,67 | 5,020 | 3 | 3 | 2,525 | 16 |

Anexo IV

i. Lipoperoxidación

Tabla 14. Peroxidación lipídica, se muestran los valores de las medias de cada cepa tanto en condiciones control como en condiciones de ayuno de 12 horas.

| Cepa | Media Control | Media Ayuno |
|-----------------|---------------|-------------|
| N2 | 0,1057 | 0,1645 |
| daf-16 (mgDf50) | 0,5155 | 0,01506 |
| SKN-1(zu135) | 0,8910 | 2,156 |
| SKN-1:B8 | 3,189 | 0,4962 |

Tabla 15. Análisis estadístico de ANOVA- dos vías no paramétrico, para analizar los datos obtenidos de los ensayos de lipoperoxidación y determinar cambios significativos.

| ANOVA de dos vías | Ordinario | | | | |
|----------------------------|----------------------|---------|---------------------|-------------------|------------|
| Alfa | 0,05 | | | | |
| Fuente de Variación | % total de variación | Valor P | Resumen del valor P | ¿Significativo? | |
| Interacción | 37,51 | 0,0003 | *** | Yes | |
| Factor fila | 41,17 | 0,0002 | *** | Yes | |
| Factor columna | 3,983 | 0,0732 | ns | No | |
| Tabla de ANOVA | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor P |
| Interacción | 12,34 | 3 | 4,115 | F (3, 16) = 11,54 | P = 0,0003 |
| Factor fila | 13,55 | 3 | 4,516 | F (3, 16) = 12,66 | P = 0,0002 |
| Factor columna | 1,311 | 1 | 1,311 | F (1, 16) = 3,676 | P = 0,0732 |
| Residual | 5,706 | 16 | 0,3566 | | |
| Número de valores perdidos | 0 | | | | |

Tabla 16. Prueba de comparaciones múltiples de Sidak de los resultados obtenidos en lipoperoxidación, donde se comparan los resultados de ayuno con su respectivo control por cada cepa, para determinar cambios dentro de cada grupo.

| Número de comparaciones por familia | | 4 | | | | | | | |
|---|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|--------|----|--|
| Alfa | 0,05 | | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | | |
| CONTROL - AYUNO 12 h N2 | -0,05877 | -1,426 to 1,308 | No | ns | > 0,9999 | | | | |
| daf-16 (mgDf50) | 0,5004 | -0,8667 to 1,868 | No | ns | 0,7862 | | | | |
| skn-1(zu135) | -1,265 | -2,632 to 0,1025 | No | ns | 0,0761 | | | | |
| skn-1:B8 | 2,693 | 1,326 to 4,060 | Yes | *** | 0,0002 | | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF | |
| CONTROL - AYUNO 12 h N2 | 0,1057 | 0,1645 | -0,05877 | 0,4876 | 3 | 3 | 0,1205 | 16 | |
| daf-16 (mgDf50) | 0,5155 | 0,01506 | 0,5004 | 0,4876 | 3 | 3 | 1,026 | 16 | |
| skn-1(zu135) | 0,8910 | 2,156 | -1,265 | 0,4876 | 3 | 3 | 2,594 | 16 | |
| skn-1:B8 | 3,189 | 0,4962 | 2,693 | 0,4876 | 3 | 3 | 5,522 | 16 | |

Tabla 17. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los resultados de lipoperoxidación, donde se comparan los resultados de ayuno y los resultados de los controles de cada cepa, para determinar cambios entre grupos.

| | | | | | | | | |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|-----|-----|-------|----|
| Número de familias | 2 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 6 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Tukey | Diferencia de medias | Diferencia de CI 95% | ¿Significativo? | Resumen | | | | |
| CONTROL | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | -0,4098 | -1,805 to 0,9852 | No | ns | | | | |
| N2 vs. skn-1(zu135) | -0,7853 | -2,180 to 0,6097 | No | ns | | | | |
| N2 vs. skn-1:B8 | -3,083 | -4,478 to -1,688 | Si | **** | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1(zu135) | -0,3755 | -1,771 to 1,019 | No | ns | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1:B8 | -2,673 | -4,068 to -1,278 | Si | *** | | | | |
| skn-1(zu135) vs. skn-1:B8 | -2,298 | -3,693 to -0,9027 | Si | ** | | | | |
| AYUNO 12 h | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | 0,1494 | -1,246 to 1,544 | No | ns | | | | |
| N2 vs. skn-1(zu135) | -1,991 | -3,386 to -0,5962 | Si | ** | | | | |
| N2 vs. skn-1:B8 | -0,3317 | -1,727 to 1,063 | No | ns | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1(zu135) | -2,141 | -3,536 to -0,7456 | Si | ** | | | | |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1:B8 | -0,4811 | -1,876 to 0,9139 | No | ns | | | | |
| skn-1(zu135) vs. skn-1:B8 | 1,660 | 0,2645 to 3,055 | Si | * | | | | |
| Detalles de la prueba | | | | | | | | |
| | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N 1 | N 2 | q | DF |
| CONTROL | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | 0,1057 | 0,5155 | -0,4098 | 0,4876 | 3 | 3 | 1,189 | 16 |
| N2 vs. skn-1(zu135) | 0,1057 | 0,8910 | -0,7853 | 0,4876 | 3 | 3 | 2,278 | 16 |
| N2 vs. skn-1:B8 | 0,1057 | 3,189 | -3,083 | 0,4876 | 3 | 3 | 8,942 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1(zu135) | 0,5155 | 0,8910 | -0,3755 | 0,4876 | 3 | 3 | 1,089 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1:B8 | 0,5155 | 3,189 | -2,673 | 0,4876 | 3 | 3 | 7,754 | 16 |
| skn-1(zu135) vs. skn-1:B8 | 0,8910 | 3,189 | -2,298 | 0,4876 | 3 | 3 | 6,664 | 16 |
| AYUNO 12 h | | | | | | | | |
| N2 vs. daf-16 (mgDf50) | 0,1645 | 0,01506 | 0,1494 | 0,4876 | 3 | 3 | 0,433 | 16 |
| N2 vs. skn-1(zu135) | 0,1645 | 2,156 | -1,991 | 0,4876 | 3 | 3 | 5,775 | 16 |
| N2 vs. skn-1:B8 | 0,1645 | 0,4962 | -0,3317 | 0,4876 | 3 | 3 | 0,962 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1(zu135) | 0,01506 | 2,156 | -2,141 | 0,4876 | 3 | 3 | 6,209 | 16 |
| daf-16 (mgDf50) vs. skn-1:B8 | 0,01506 | 0,4962 | -0,4811 | 0,4876 | 3 | 3 | 1,395 | 16 |
| skn-1(zu135) vs. skn-1:B8 | 2,156 | 0,4962 | 1,660 | 0,4876 | 3 | 3 | 4,813 | 16 |

Anexo V

i. Análisis de la abundancia de mensajeros

Tabla 18. Análisis de la abundancia de mensajeros de *daf-2*, *daf-16* en nemátodos N2 cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|-------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 2 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas | | | | | | | | |
| <i>daf-16</i> | 0,07152 | -0,07071 to 0,2138 | No | ns | 0,4256 | | | |
| <i>daf-2</i> | -0,2528 | -0,3950 to -0,1106 | Sí | *** | 0,0006 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 horas | | | | | | | | |
| <i>daf-16</i> | 1,036 | 0,9642 | 0,07152 | 0,05963 | 7 | 7 | 1,199 | 24 |
| <i>daf-2</i> | 0,8736 | 1,126 | -0,2528 | 0,05963 | 7 | 7 | 4,239 | 24 |

Tabla 19. Análisis de la abundancia de mensajeros de *skn-1* (a, b, c) en nemátodos N2 cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|--------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 3 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas | | | | | | | | |
| <i>skn-1A</i> | -0,1557 | -0,2781 to -0,03343 | Sí | ** | 0,0082 | | | |
| <i>skn-1B</i> | -0,01017 | -0,1273 to 0,1069 | No | ns | 0,9952 | | | |
| <i>skn-1C</i> | -0,1273 | -0,2591 to 0,004528 | No | ns | 0,0615 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 horas | | | | | | | | |
| <i>skn-1A</i> | 0,9221 | 1,078 | -0,1557 | 0,04977 | 11 | 11 | 3,129 | 59 |
| <i>skn-1B</i> | 0,9949 | 1,005 | -0,01017 | 0,04766 | 12 | 12 | 0,2133 | 59 |
| <i>skn-1C</i> | 0,9315 | 1,059 | -0,1273 | 0,05363 | 10 | 9 | 2,373 | 59 |

Tabla 20. Análisis de la abundancia de mensajeros de *gsc-1* y *gst-4* en nemátodos N2 cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|-------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 2 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas <i>gsc-1</i> | -0,09388 | -0,1890 to 0,001229 | No | ns | 0,0534 | | | |
| <i>gst-4</i> | -0,3176 | -0,4127 to -0,2224 | Sí | **** | < 0,0001 | | | |
| Test details | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 horas <i>gsc-1</i> | 0,9531 | 1,047 | -0,09388 | 0,03935 | 6 | 6 | 2,386 | 20 |
| <i>gst-4</i> | 0,8412 | 1,159 | -0,3176 | 0,03935 | 6 | 6 | 8,070 | 20 |

Tabla 21. Análisis de la abundancia de mensajeros de *skn-1* (a, b, c) en nemátodos RNAi PL4440 cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|--------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 3 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas <i>skn-1A</i> | 0,4391 | 0,1534 to 0,7248 | Yes | ** | 0,0018 | | | |
| <i>skn-1B</i> | 0,09565 | -0,1901 to 0,3813 | No | ns | 0,7827 | | | |
| <i>skn-1C</i> | 0,1191 | -0,1666 to 0,4048 | No | ns | 0,6501 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 horas <i>skn-1A</i> | 1,220 | 0,7805 | 0,4391 | 0,1113 | 5 | 5 | 3,944 | 24 |
| <i>skn-1B</i> | 1,048 | 0,9522 | 0,09565 | 0,1113 | 5 | 5 | 0,8591 | 24 |
| <i>skn-1C</i> | 1,060 | 0,9404 | 0,1191 | 0,1113 | 5 | 5 | 1,070 | 24 |

Tabla 22. Análisis de la abundancia de mensajeros de *skn-1* (a, b, c) en nemátodos RNAi *daf-16-B8* cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|---------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 3 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas <i>skn-1A</i> | -0,07628 | -0,2757 to 0,1231 | No | ns | 0,7141 | | | |
| <i>skn-1B</i> | -0,001939 | -0,2014 to 0,1975 | No | ns | > 0,9999 | | | |
| <i>skn-1C</i> | 0,08611 | -0,1133 to 0,2855 | No | ns | 0,6323 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 horas <i>skn-1A</i> | 0,9619 | 1,038 | -0,07628 | 0,07887 | 6 | 6 | 0,9671 | 30 |
| <i>skn-1B</i> | 0,9990 | 1,001 | -0,001939 | 0,07887 | 6 | 6 | 0,02459 | 30 |
| <i>skn-1C</i> | 1,043 | 0,9569 | 0,08611 | 0,07887 | 6 | 6 | 1,092 | 30 |

Tabla 23. Análisis de la abundancia de mensajeros de *skn-1* (a, b, c) en nemátodos RNAi *daf-16-D8* cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|-------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 3 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas <i>skn-1A</i> | 0,1597 | -0,08470 to 0,4041 | No | ns | 0,2890 | | | |
| <i>skn-1B</i> | 0,1758 | -0,04727 to 0,3990 | No | ns | 0,1556 | | | |
| <i>skn-1C</i> | 0,1260 | -0,1235 to 0,3754 | No | ns | 0,5051 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 horas <i>skn-1A</i> | 1,134 | 0,9747 | 0,1597 | 0,09579 | 5 | 5 | 1,667 | 26 |
| <i>skn-1B</i> | 1,110 | 0,9346 | 0,1758 | 0,08744 | 6 | 6 | 2,011 | 26 |
| <i>skn-1C</i> | 1,059 | 0,9326 | 0,1260 | 0,09777 | 6 | 4 | 1,288 | 26 |

Tabla 24. Análisis de la abundancia de mensajeros de *gst-4* en nemátodos RNAi *daf-16-B8* y la mutante *daf-16* (*mgDf50*) cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|--------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 2 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas <i>daf-16</i> (<i>mgDf50</i>) | 0,1840 | -0,02935 to 0,3974 | No | ns | 0,0971 | | | |
| <i>daf-16-B8</i> | 0,02553 | -0,1358 to 0,1868 | No | ns | 0,9124 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 horas <i>daf-16</i> (<i>mgDf50</i>) | 1,092 | 0,9080 | 0,1840 | 0,08749 | 4 | 4 | 2,103 | 18 |
| <i>daf-16-B8</i> | 1,013 | 0,9872 | 0,02553 | 0,06614 | 7 | 7 | 0,3860 | 18 |

Tabla 25. Análisis de la abundancia de mensajeros de *gsc-1* y *gst-4* en nemátodos *skn-1* (*zu135*) cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|-------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 2 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas <i>gsc-1</i> | 0,06273 | -0,08017 to 0,2056 | No | ns | 0,3619 | | | |
| <i>gst-4</i> | 0,08336 | -0,05954 to 0,2263 | No | ns | 0,2116 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 horas <i>gsc-1</i> | 1,031 | 0,9686 | 0,06273 | 0,04105 | 2 | 2 | 1,528 | 4 |
| <i>gst-4</i> | 1,042 | 0,9583 | 0,08336 | 0,04105 | 2 | 2 | 2,031 | 4 |

Tabla 26. Análisis de la abundancia de mensajeros de *gsc-1* y *gst-4* en nemátodos *skn-1* (*zu135*); *PL4440* cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|-------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 2 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas <i>gsc-1</i> | 0,3871 | 0,1990 to 0,5752 | Sí | *** | 0,0002 | | | |
| <i>gst-4</i> | 0,2335 | 0,04537 to 0,4216 | Sí | * | 0,0149 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 horas <i>gsc-1</i> | 1,194 | 0,8065 | 0,3871 | 0,07627 | 5 | 5 | 5,075 | 16 |
| <i>gst-4</i> | 1,117 | 0,8833 | 0,2335 | 0,07627 | 5 | 5 | 3,061 | 16 |

Tabla 27. Análisis de la abundancia de mensajeros de *gsc-1* y *gst-4* en nemátodos *skn-1* (*zu135*); *daf-16-B8* cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|--------|----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 2 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas <i>gsc-1</i> | -0,04426 | -0,1598 to 0,07126 | No | ns | 0,5739 | | | |
| <i>gst-4</i> | -0,2638 | -0,3793 to -0,1483 | Sí | *** | 0,0002 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | DF |
| Control - Ayuno 12 horas <i>gsc-1</i> | 0,9779 | 1,022 | -0,04426 | 0,04525 | 4 | 4 | 0,9783 | 12 |
| <i>gst-4</i> | 0,8652 | 1,129 | -0,2638 | 0,04525 | 4 | 4 | 5,831 | 12 |

ii. Análisis de la abundancia de proteínas

Tabla 28. Análisis de la abundancia de la proteína DAF-16 en nemátodos N2 cuando son sometidos a ayuno de 12 horas.

| | | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|----|-----|-----|
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 3 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Sidak | Diferencia entre medias | 95% CI de diferencia | ¿Significativo? | Resumen | Valor de P ajustado | | | |
| Control - Ayuno 12 horas DAF-16 (Total) | -0,1828 | -0,7196 to 0,3540 | No | ns | 0,6679 | | | |
| DAF-16 (Núcleo) | -0,5857 | -1,122 to -0,04884 | Sí | * | 0,0349 | | | |
| DAF-16 (Citoplasma) | 0,0 | -0,5368 to 0,5368 | No | ns | > 0,9999 | | | |
| Detalles de la prueba | Media 1 | Media 2 | Diferencia de medias | Diferencia de SE | N1 | N2 | t | D F |
| Control - Ayuno 12 horas DAF-16 (Total) | 0,9086 | 1,091 | -0,1828 | 0,1640 | 2 | 2 | 1,1 | 6 |
| DAF-16 (Núcleo) | 0,7072 | 1,293 | -0,5857 | 0,1640 | 2 | 2 | 3,5 | 6 |
| DAF-16 (Citoplasma) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1640 | 2 | 2 | 0,0 | 6 |

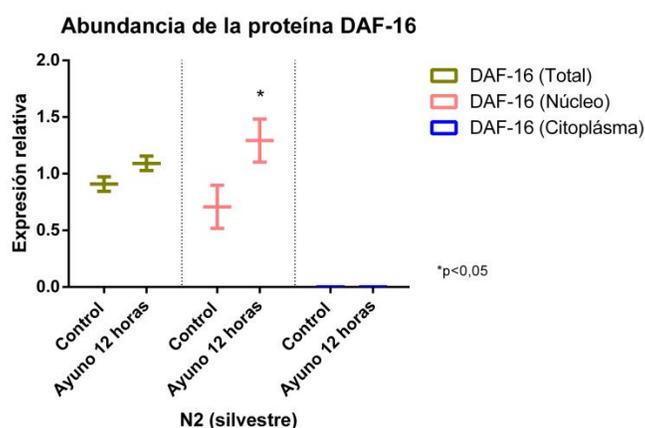
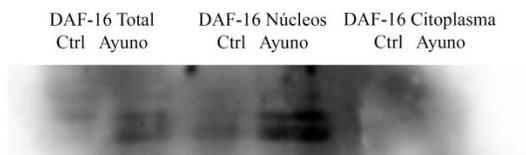


Figura 5. Western Blot, análisis de la abundancia de la proteína DAF-16/FOXO bajo condiciones de 12 horas de ayuno en las diferentes fracciones celulares.