



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA AUSENCIA DE LA CATALASA EN EL METABOLISMO, EL
ENVEJECIMIENTO Y EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES METABÓLICAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

JOSÉ RAÚL PÉREZ ESTRADA

DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES
[INSTITUTO DE BIOTENOLOGÍA](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Patricia Joseph Bravo – [Instituto de Biotecnología](#)
Dra. Mauricio Díaz Muñoz – [Instituto de Neurobiología](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con los proyectos IN209813 y IN213416 y con la beca de doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) número 229346/210525 (CVU/Becario).

Un agradecimiento especial al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para congresos.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Dr. Luis Covarrubias por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por proporcionarme todos los recursos académicos, financieros y de infraestructura. Por apoyarme y motivarme en la realización de este proyecto. Por darme libertad y confianza al realizar el proyecto, tomando siempre en cuenta mis opiniones y posturas, enriqueciéndolas con críticas constructivas.

A la Dra. Patricia Joseph y al Dr. Mauricio Díaz por el apoyo y las críticas positivas hechas al trabajo, por su paciencia, dedicación y compromiso en la revisión de los avances, pues sin ellos no hubiera sido posible lograr el resultado obtenido.

A la Dra. Rosa María Uribe por el apoyo y la motivación, siempre desinteresado, para la realización del proyecto y en lo personal.

A la Dra. Irma Aguiar y el Dr. Francisco Kuri Breña por el apoyo, la confianza y darme la oportunidad de explorar nuevos campos y proyectos.

A la Dra. Susana Castro por el apoyo, sus consideraciones y críticas.

A Francisco Leyva y a la Dra. Celina García por el invaluable apoyo en la realización de experimentos.

Al laboratorio de la Dra. Patricia Joseph, por su apoyo en la determinación de niveles de insulina. En especial a la Dra. Rosa María Uribe y la Dra. Lorraine Jaimes.

Al laboratorio del Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por su apoyo en la determinación de lipoperoxidación en el hígado. En especial a la Dra. Olivia Vázquez-Martínez.

A todos los compañeros pasados y presentes del laboratorio, y a los de otros laboratorios que de alguna manera ayudaron a realizar de este trabajo.

A las unidades del Bioterio, Síntesis de DNA y Docencia, por el apoyo.

Al jurado de doctorado: Dra. Selva Lucía Rivas, Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes, Dra. Clarita Olvera, Dr. Wilhelm Hansberg y al Dr. Gustavo Pedraza, por su revisión y todo el apoyo para finalizar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mi mamá, quien siempre ha estado conmigo, por su confianza, motivación y el apoyo al caminar con las pesadas cargas de la vida, por su amor y cariño.

A mi papá por el apoyo, cariño, sus enseñanzas y consejos para tratar de ser siempre una mejor persona.

A mis hermanos Isabel, Victor y Raquel, por su cariño y apoyo incondicional, sin ellos este viaje no hubiera sido posible.

A mis sobrinos Jimena, Valentina, Sofía, Jania, Joseline y José Román, por su energía, cariño y alegría.

A mi familia en general, pero en especial a Paty, Eduardo, Diana, Reyna y Eric, por su apoyo y alegría.

A Ricardo por su apoyo, cariño y paciencia. A mis amigas Gaby, Gilda, Tania, Jazmín y Emma; a mis amigos Ramón, Carlos, Néstor, Cano, Abraham, Josué, Óscar y Everardo, a todos ellos por su amistad que ha demostrado ser resistente al paso de los años y a los cambios de la vida; por sus consejos y apoyo.

A todos aquellos que han hecho de este viaje algo más placentero.

Este trabajo está dedicado a todos los que tuvieron la oportunidad y la tomaron...

A los que la tuvieron, pero se las arrebataron...

A los que tendrán que luchar para tener una oportunidad y lo lograrán...

A los que tendrán que luchar y no lo lograrán, pero que lo intentaron...

A los que luchan contra todos los pronósticos sin importar el dolor y sufrimiento...

A los que disfrutan el viaje y no el objetivo...

RESUMEN

El envejecimiento es un proceso biológico de deterioro progresivo y acumulativo que experimentan todos los organismos. Entender cuáles son los mecanismos celulares y moleculares que lo causan es de gran interés, ya que es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, la obesidad y la diabetes tipo II. Por su parte la longevidad se ha relacionado directamente con el envejecimiento, no obstante, depende además de otros factores tanto intrínsecos (p. ej. carga genética) como ambientales (p. ej. tipo de alimentación). Los factores que afectan al envejecimiento y la longevidad no se conocen completamente, aunque los efectos benéficos de la restricción calórica, la dieta cetogénica y el ayuno intermitente en el envejecimiento y la longevidad, sugieren que el metabolismo es un componente central y determinante de ambos procesos. Otro factor, como el daño oxidante inducido por las especies reactivas del oxígeno (ROS), también se ha propuesto que contribuye al proceso de envejecimiento. Debido a que las ROS son subproductos naturales de la actividad metabólica, en este trabajo se propone que existe una relación directa entre las ROS y la regulación del metabolismo, que es determinante en el envejecimiento y la longevidad. Para probar esta hipótesis, se caracterizó una línea de ratones que carecen de la catalasa ($Cat^{-/-}$), una enzima antioxidante. Para ello los ratones $Cat^{-/-}$ se caracterizaron durante el envejecimiento natural y al ser sometidos a condiciones metabólicas adversas, como el ayuno y la alimentación con una dieta alta en grasa (HFD). Los resultados obtenidos muestran que la longevidad de los ratones $Cat^{-/-}$ alimentados *ad libitum* con una dieta estándar es menor con respecto a los ratones silvestre ($Cat^{+/+}$). Dicho hallazgo correlaciona con una disminución del peso corporal y una menor acumulación de las grasas en el hígado, lo cual no correlaciona con el incremento en el daño oxidante o el envejecimiento prematuro. Por otro lado, se encontró que el ayuno causa un incremento en el daño oxidante en el hígado de los ratones $Cat^{+/+}$, pero no en los ratones $Cat^{-/-}$. La acumulación de grasas por efecto del ayuno disminuyó en los ratones $Cat^{-/-}$. Dicha acumulación se relaciona con un mayor riesgo de muerte por falta de alimento y con bajos niveles de los cuerpos cetónicos. Un fenómeno similar se observó en los ratones neonatos, en los que la ausencia de la catalasa disminuyó la supervivencia por la falta de alimento. La disminución de la acumulación de grasas en el hígado de los ratones $Cat^{-/-}$ correlacionó

con una disminución de los niveles de expresión de los genes de la lipogénesis, tanto en el ayuno como en la alimentación con la HFD. El menor nivel de expresión de los genes de la lipogénesis está de acuerdo con el incremento en la actividad de la AMPK que se observó en el hígado de los ratones *Cat*^{-/-}, por lo que se sugiere que la AMPK es el regulador del efecto de la ausencia de la catalasa. Con base en los resultados obtenidos se propone que, mediante la regulación de los niveles de H₂O₂, la catalasa participa en el control de la actividad metabólica, afectando el proceso de envejecimiento y la longevidad, pero sin afectar el daño oxidante en general del organismo. Debido a las similitudes encontradas en otros organismos se propone que este que se trata de un mecanismo conservado evolutivamente.

ABSTRACT

The aging is a biological and progressive process of cumulative damage experienced by all organisms. Understand which are the cellular and molecular mechanisms that underlie the aging is of great interest, especially because is a risky factor for developing a chronic-degenerative diseases such as cancer, obesity and type II diabetes. The longevity has been directly related to aging; however, it also depends on intrinsic factors (e.g. genetic factors) and environmental factors (e.g. diet type). The factors that affect the aging and longevity are not completely known, but the benefits on aging and the longevity extension caused several metabolic conditions such as caloric restriction, ketogenic diet and intermittent fasting, suggest that the metabolism is an important and determining factor for aging and longevity. The accumulated damage caused by reactive oxygen species (ROS) have also been proposed as a determinant in aging, however, due that the ROS are natural products of metabolic activity, we propose that there is a relationship between ROS and metabolism that is determined for longevity and aging. To test this hypothesis, we have used mice lacking the antioxidant catalase enzyme (*Cat*^{-/-}). The *Cat*^{-/-} mice were characterized during natural aging and under stressed metabolic conditions, including fasting and feeding with a high-fat diet (HFD). We have found that the longevity of *Cat*^{-/-} mice fed *ad libitum* with a standard diet is shorter than the wild type mice (*Cat*^{+/+}). The phenom correlated with decreased in body weight, blood glucose and fat accumulation in the liver, but not with increase in oxidative damage or premature aging. On the other hand, fasting increased the oxidative damage in the liver in *Cat*^{+/+} mice but, it was not the case for *Cat*^{-/-} mice. Interestingly, the liver fat accumulation due to fasting was diminished in *Cat*^{-/-} mice, which correlated with increased risk of death and low ketone body blood levels. The expression of lipogenic genes were down-regulated in liver of catalase deficient mice in response to an HFD and upon fasting. The lower expression of lipogenic genes correlated with increased activity of AMPK in *Cat*^{-/-} mice, suggesting that AMPK could work as a master metabolic regulator for catalase absence phenotype. Based on our results, we propose that the catalase controlle the H₂O₂ levels, affecting aging and longevity but without effect in oxidative damage.

Contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	13
1.1	El envejecimiento y la longevidad.....	13
1.2	Las especies reactivas del oxígeno y su relación con el metabolismo, el envejecimiento y la longevidad.....	18
1.2.1	La producción de las ROS en la mitocondria y su importancia en el envejecimiento y la longevidad.....	20
1.2.2	Los peroxisomas y su relación con el metabolismo y el envejecimiento.....	23
1.3	Importancia del metabolismo en el envejecimiento y la longevidad.....	26
1.4	Regulación del metabolismo.....	28
1.4.1	Regulación del metabolismo por AMPK.....	30
1.4.2	Regulación del metabolismo por la mTOR.....	33
1.4.3	Regulación del metabolismo por los PPAR.....	37
1.4.4	La autofagia y su importancia en el metabolismo y el envejecimiento.....	41
1.5	Efecto de la ausencia de la catalasa en la alimentación con una dieta alta en grasas.....	46
2	HIPÓTESIS.....	49
3	OBJETIVO GENERAL.....	49
4	OBJETIVOS PARTICULARES.....	49
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
5.1	Línea de ratones mutantes en catalasa (<i>Cat</i> ^{-/-}).....	50
5.2	Mantenimiento de los ratones y diseños experimentales.....	50
5.2.1	Supervivencia de los ratones adultos.....	50
5.2.2	Determinación de la actividad motora en ratones viejos.....	51
5.2.3	Alimentación con la dieta alta en grasa y ayuno.....	51
5.2.4	Supervivencia y ayuno de ratones neonatos.....	52
5.2.5	Determinación de la activación de la AKT <i>in vivo</i>	52
5.3	Rayos X de ratones.....	53
5.4	Análisis de química sanguínea.....	53
5.5	Determinación del contenido de los dienos conjugados, el colesterol total y los triacilglicéridos del hígado.....	54

5.6	Determinación de contenido de glucógeno del hígado	54
5.7	Determinación de la actividad de la catalasa	54
5.8	Histología del hígado	55
5.9	Detección de las proteínas específicas por inmunodetección	56
5.10	Análisis de la expresión por RT-qPCR.....	56
5.11	Análisis estadísticos.....	57
6	RESULTADOS	58
6.1	La ausencia de la catalasa disminuye la supervivencia sin promover envejecimiento prematuro.....	58
6.2	La ausencia de la catalasa no incrementa el daño oxidante en el hígado, pero afecta la actividad de la β -galactosidasa y la acumulación de las grasas.....	62
6.3	En el ayuno la acumulación de las grasas en el hígado se afecta por la falta de la catalasa.....	67
6.4	Los niveles de expresión de los genes del metabolismo se afectan por la ausencia de la catalasa.....	70
6.5	La actividad de la AMPK se encuentra incrementada en los ratones <i>Cat^{+/-}</i>	77
6.6	La señalización de la insulina no se afecta por la falta de la catalasa.....	80
6.7	La autofagia y la actividad lisosomal parecen estar afectadas por la ausencia de la catalasa.....	82
6.8	La ausencia de la catalasa afecta a la viabilidad de los ratones neonatos en condiciones de ayuno.....	90
6.9	En los ratones viejos también se altera la expresión de los genes del metabolismo, la actividad de la AMPK y la actividad lisosomal.....	95
6.10	Klotho: un candidato causante del fenotipo de los ratones por la ausencia de la catalasa.....	101
7	DISCUSIÓN.....	104
7.1	Teoría del envejecimiento debida a las especies reactivas del oxígeno: ¿Vigente?...	104
7.2	Alteración del metabolismo por la ausencia de la catalasa	106
7.3	Los peroxisomas y el metabolismo de las grasas en ausencia de la catalasa	109
7.4	La autofagia en ausencia de la catalasa.....	110
7.5	Las grasas: lo bueno, lo malo; su papel en la enfermedad, la supervivencia, la longevidad y el envejecimiento	112
7.6	Diferencias entre ratones mutantes de la catalasa: La importancia del fondo genético	117
7.7	La importancia de la catalasa en la fisiología general del ratón	120

8	CONCLUSIONES.....	124
9	PERSPECTIVAS.....	125
10	ANEXOS.....	126
Anexo I	Determinación del genotipo de los ratones mutantes de la catalasa.....	126
Anexo II	Composición de las dietas utilizadas.....	127
Anexo III	Determinación de los triacilglicéridos y del colesterol en el suero.....	129
Anexo IV	Determinación del colesterol, los triglicéridos y los dienos conjugados en el hígado 130	
Anexo V	Determinación del glucógeno.....	131
Anexo VI	Determinación de la actividad de la catalasa.....	132
Anexo VII	Tinción de rojo oleoso.....	137
Anexo VIII	Tinción de β -galactosidasa.....	138
Anexo IX	Detección de proteínas por medio de inmunodetección.....	138
Anexo X	Anticuerpos utilizados para inmunoblot.....	145
Anexo XI	Extracción de RNA total para RT-qPCR.....	146
Anexo XII	Síntesis de cDNA utilizando HyperScrip, GeneAll.....	147
Anexo XIII	Reacción de qPCR.....	148
Anexo XIV	Oligonucleótidos para RT-qPCR.....	149
	BIBLIOGRAFÍA.....	151

1 INTRODUCCIÓN

Entender la biología del envejecimiento ha sido uno de los principales intereses de muchos investigadores, no solo porque se asocia a la esperanza de vida, sino también porque durante el envejecimiento la prevalencia de enfermedades degenerativas como el Alzheimer o la diabetes se incrementa significativamente, trayendo consigo problemas sociales y económicos, tanto en lo individual, como para la sociedad. Este trabajo de tesis buscó contribuir al entendimiento de la biología del envejecimiento, estudiando ratones que carecen de la enzima antioxidante catalasa. Los datos obtenidos permiten proponer una relación directa entre el metabolismo y las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como un nuevo paradigma para entender el envejecimiento y la longevidad, y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas.

1.1 El envejecimiento y la longevidad

El envejecimiento y la longevidad son términos que muchas veces se utilizan como sinónimos pero se tratan de dos procesos distintos, que si bien están relacionados, hay factores que perturban a uno sin afectar al otro (Gladyshev, 2012). Mientras el envejecimiento se refiere a un proceso intrínseco de deterioro acumulativo que experimentan los seres vivos a lo largo de su vida (López-Otín *et al.*, 2013; Partridge and Gems, 2002), la longevidad se refiere al tiempo que logra vivir el organismo (McDonald y Ruhe, 2011). A la fecha, los mecanismos que determinan el envejecimiento o la longevidad no se entienden completamente, sin embargo, la diferencia de la longevidad entre especies (Figura 1) ha permitido sugerir que ambos procesos están genéticamente determinados (Partridge y Gems, 2002). El envejecimiento en las especies del reino animal puede ser muy diferente y no correlaciona con la longevidad (Jones *et al.*, 2014), lo que se puede deber, en parte, a la complejidad de los procesos involucrados, pero sobre todo a la importante influencia de los factores ambientales.

Para entender y estudiar el envejecimiento, en el 2013 López-Otín *et al.*, propusieron que existen nueve características distintivas del envejecimiento presentes en la mayoría de los organismos; estas características son: la inestabilidad genómica, el acortamiento de telómeros, la pérdida de la proteostasis, las alteraciones epigenéticas, la desregulación de

la homeostasis de los nutrientes, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de las células troncales y la alteración en la comunicación intercelular (Figura 2A). Los autores proponen que estas características deben cumplir con al menos tres criterios: 1) Se deben manifestar durante el envejecimiento natural, 2) Agravar alguna característica experimentalmente debiera incrementar el envejecimiento y, 3) Evitar el desarrollo de alguna de las características debiera disminuir el envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2013).

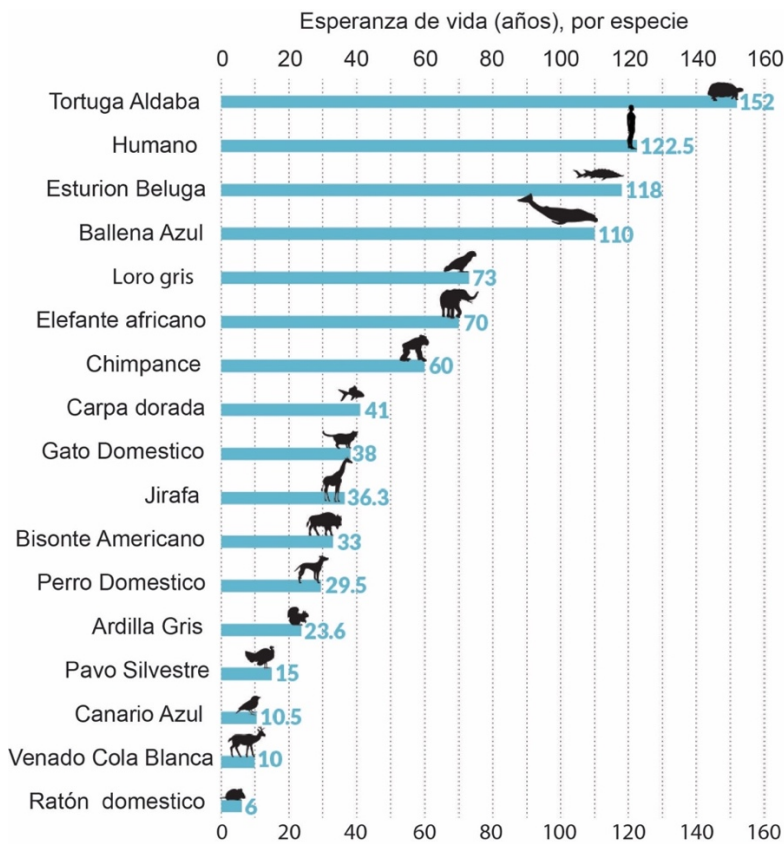


Figura 1. Esperanza de vida de distintas especies. Modificado de:

de:

<https://www.sciencenews.org/article/what-animals'-life-spans-can-tell-us-about-how-people-age>

Las características del envejecimiento propuestas por López-Otín *et al.*, podrían indicar que prácticamente cualquier cosa que altere la actividad celular a sus diferentes niveles causa envejecimiento, sin embargo, los autores sugieren que estas características se pueden clasificar en tres categorías: las características primarias, las características antagónicas y las características integrativas (Figura 2B). Las primeras son, como su denominación lo indica, las primeras en aparecer como parte del proceso de envejecimiento; un ejemplo de estas son las mutaciones en el DNA o las aneuploidías que

provocan enfermedades como el cáncer y el envejecimiento. Por su parte, sobre las características antagónicas sugieren que son una respuesta compensatoria a las características primarias, que, dependiendo de la intensidad, podría tener beneficios o ser perjudiciales; por ejemplo, la senescencia celular que como respuesta inicial podría evitar el desarrollo del cáncer, pero si se mantiene entonces podría promoverlo y a su vez causar envejecimiento. Si el daño se vuelve crónico entonces las características primeras y las segundas provocan que aparezcan las terceras, que sería el daño final asociado al deterioro del organismo por el envejecimiento. Esta clasificación podría ayudar a entender una gran cantidad de datos y teorías del envejecimiento como, por ejemplo, la teoría del envejecimiento mediada por las ROS.

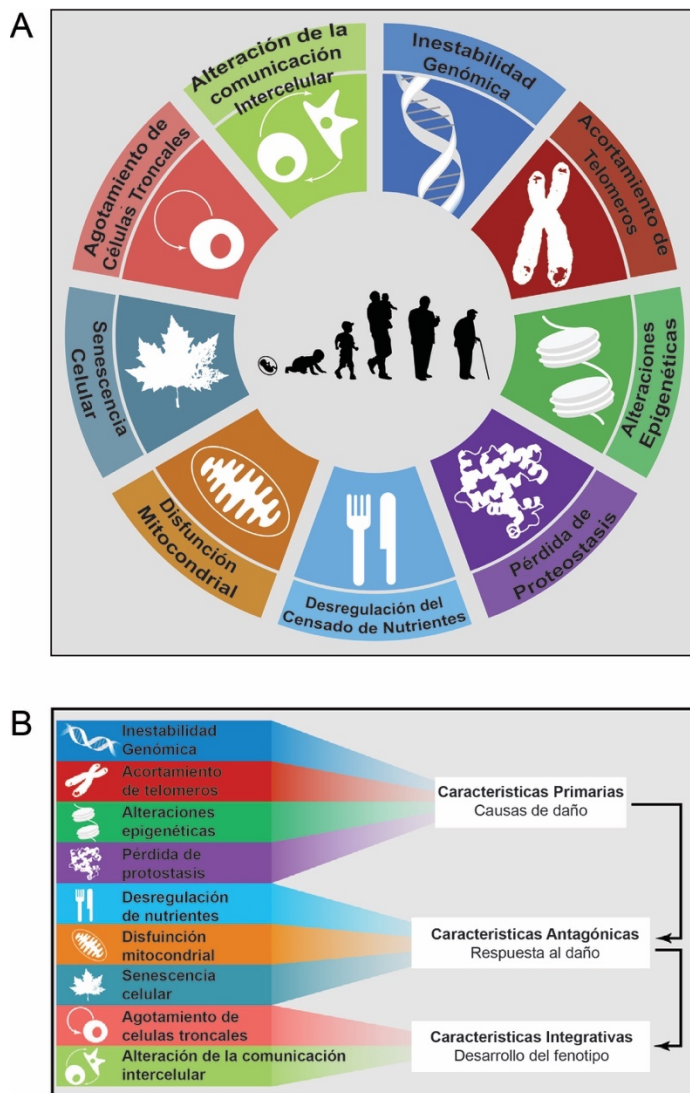


Figura 2. Características del envejecimiento. (A) El esquema muestra las 9 características del envejecimiento propuestos por López-Otín, *et al.* en 2013. (B) Clasificación de las características del envejecimiento Modificado de: (López-Otín *et al.*, 2013).

La teoría del envejecimiento mediada por las ROS propuesta por Harman en 1956 (Harman, 1956) es una de las más conocidas, pero también controvertida, para explicar este proceso. Esta teoría propone que el daño oxidante provocado por compuestos parcialmente reducidos del oxígeno, conocidos como ROS, causan envejecimiento al provocar daño en macromoléculas como los lípidos, las proteínas y el DNA. Sin embargo, manipulaciones genéticas en el ratón han dado resultados que no predice la teoría. Por ejemplo, la disminución de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa 4 (GPX4) incrementa su sensibilidad al daño oxidante y también retarda los efectos del envejecimiento e incrementa la longevidad (Ran *et al.*, 2007). En los ratones con mutación heterocigota de la superóxido dismutasa 2 (*Sod2^{+/-}*), a pesar de presentar incremento en el daño oxidante e incidencia de cáncer, no se acelera el envejecimiento (Van Remmen *et al.*, 2004). En sentido opuesto, los ratones carentes de la enzima antioxidante superóxido dismutasa 1 (*Sod1^{-/-}*), tienen características de envejecimiento en el músculo incrementadas y disminución de su esperanza de vida (Muller *et al.*, 2006). De manera relevante para el presente estudio, la sobre-expresión de las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2 y la catalasa (CAT) tanto individuales como en alguna combinación no incrementa la longevidad de los ratones (Pérez *et al.*, 2009).

Similar a lo observado en los ratones modificados genéticamente en las enzimas antioxidantes, la comparación entre el ratón (*mus musculus*) y el topo desnudo o ratopín (*Heterocephalus glaber*), ha mostrado resultados opuestos a la predicción de la teoría del envejecimiento debida a las ROS. El ratón y el ratopín son especies con un peso y tamaño similar pero con una longevidad significativamente distinta, pues mientras los primeros tienen una esperanza de vida de entre 3 y 4 años, el ratopín vive hasta 32 años y además no presenta características típicas de envejecimiento (Edrey *et al.*, 2011). A pesar de su longevidad y resistencia al envejecimiento, el ratopín presenta altos niveles de daño oxidante, tanto en los lípidos (lipoperoxidación), las proteínas (carbonilación) como en el DNA (8-oxo-2-hidroxi-guanosina), en comparación con el ratón (Andziak and Buffenstein, 2006; Andziak *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2009). Contrario a la expectativa, el mayor daño oxidante presente en el ratopín, no se ve reflejado en una respuesta antioxidante, pues la actividad de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) en este roedor es solo 1.35 veces mayor en comparación con el ratón. De manera sorprendente la actividad de la glutatión

peroxidasa (GPX) en el ratopín es de hasta 70 veces menor que la que se observa en el ratón (Andziak *et al.*, 2005).

Lo que sucede en el ratopín indica que no hay correlación entre la teoría del envejecimiento debida a las ROS, lo que está de acuerdo con manipulaciones genéticas que alteran los niveles de ROS en el ratón (revisadas en Pérez *et al.* 2010), que muestran que de 18 de ellas sólo 1 correlaciona con lo predicho por la teoría (Pérez *et al.*, 2010). Los datos antagónicos encontrados a la fecha al tratar de demostrar la teoría del envejecimiento debida a la función oxidante y las observaciones entre especies como el ratón y ratopín, parecen indicar que las ROS y el daño oxidante tienen un fin benéfico, y que en ciertas condiciones ayuda al organismo a contender con el envejecimiento y, en consecuencia, incrementa la longevidad. Entonces, de acuerdo con los nueve marcadores del envejecimiento propuestos por López-Otín *et al.*, 2013, el estrés oxidante se puede clasificar como una característica antagónica del envejecimiento.

Para entender cómo un estímulo de daño, como el causado por las ROS, puede estimular un proceso benéfico bajo condiciones específicas, se ha planteado el fenómeno de **hormesis** (Figura 3). Se propone que la hormesis es una respuesta ante un daño moderado pero persistente, que permite preparar y hacer más resistente al individuo ante un eventual daño mayor, dándole una ventaja adaptativa. Pero si el daño se incrementa por encima del umbral que puede tolerar el sistema, entonces provoca los efectos negativos esperados, que puede ser una enfermedad o incluso la muerte (Mattson, 2008). La hormesis, por lo tanto, podría explicar, en parte, las características que se observan tanto en el ratopín como en las diferentes líneas de ratones que carecen o sobre-expresan los genes que codifican para enzimas antioxidantes y que se contraponen con la expectativa de acuerdo con la teoría del envejecimiento del estrés oxidante.

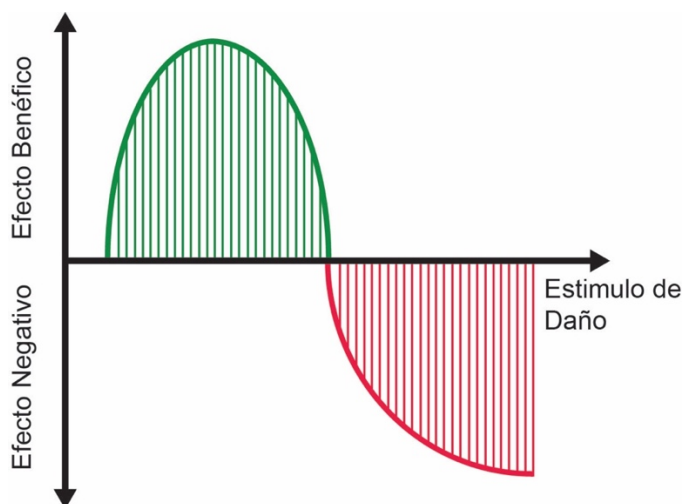


Figura 3. Gráfica de hormesis. Un estímulo de daño conforme incrementa crea una zona de respuesta benéfica (zona verde) que prepara y adapta al organismo, sin embargo, un estímulo por encima de la zona benéfica provoca los efectos negativos asociados al estímulo del que se trate (zona roja)

1.2 Las especies reactivas del oxígeno y su relación con el metabolismo, el envejecimiento y la longevidad

Si bien la teoría del envejecimiento debido a las ROS no predice completamente la participación de las ROS en el envejecimiento y la longevidad, no quiere decir que estos compuestos no juegan un papel importante en estos procesos, pues podrían regular la hormesis, aunque el mecanismo preciso por el cual pueden actuar aún no se entiende completamente. Se conoce que las ROS actúan como segundos mensajeros, participando en procesos celulares importantes como la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular (Covarrubias *et al.*, 2008). Lo anterior indica que el papel de las ROS en el envejecimiento y la longevidad puede ser interviniendo como señales moleculares que alteran el proceso de envejecimiento y la longevidad.

Existe una relación directa entre el metabolismo y la producción de las ROS. A nivel molecular la mayoría de las reacciones del metabolismo involucran la transferencia de electrones de un compuesto reducido a uno oxidado. El principal aceptor final de electrones en los organismos aeróbicos es el oxígeno, sin embargo, en ciertas condiciones algunos de estos electrones son transferidos directamente al oxígeno molecular, causando la formación de las ROS (Figura 4). Las ROS al ser compuestos parcialmente oxidados son más reactivos que el O_2 , característica que las hace capaces de dañar a la célula al oxidar macromoléculas como los lípidos, las proteínas y el DNA. Para evitar este daño, la célula ha desarrollado sistemas antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos que

le permiten eliminarlas (Droge, 2002; Franco *et al.*, 2008) por lo que se vuelven necesarias para mantener el balance de las ROS evitando su acumulación.

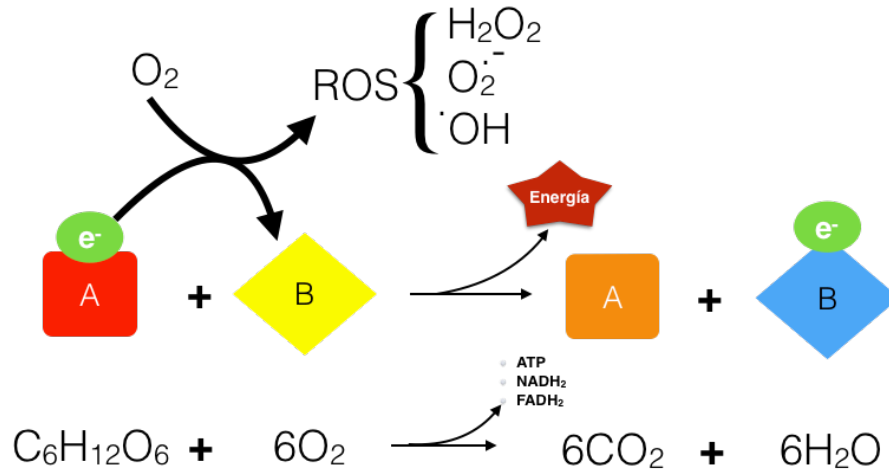


Figura 4. Reacción general para la producción de energía y de ROS. Los electrones de un compuesto reducido (Compuesto A) son transferidos a un compuesto oxidado (Compuesto B) permitiendo la obtención de energía. Como resultado el compuesto A se oxida y el compuesto B se reduce. Durante la transferencia de electrones entre el compuesto A y B pueden pasar directamente al oxígeno formando compuestos parcialmente reducidos del oxígeno conocidas como las ROS. Si bien el oxígeno es el principal aceptor de electrones en los organismos aeróbicos, la transferencia de estos electrones sucede a lo largo de una serie de reacciones bioquímicas controladas.

A pesar de la producción de las ROS, el metabolismo es central e indispensable para todos los seres vivos, debido a que para realizar todas sus funciones biológicas requieren de energía y sintetizar sus propias macromoléculas, proceso que implica realizar una serie de reacciones bioquímicas que les permiten degradar, de los alimentos, compuestos como los carbohidratos, los ácidos grasos y las proteínas, obteniendo así energía en forma de ATP, NADH₂, FADH₂, que utilizan para la síntesis de macromoléculas como el DNA, las proteínas, los ácidos grasos y los carbohidratos. El metabolismo se puede dividir en dos grandes grupos de reacciones: el **catabolismo** y el **anabolismo**, el primero es el conjunto de reacciones encaminadas a la producción de energía mientras el segundo tiene la función opuesta, es decir, el uso de la energía obtenida para la síntesis de macromoléculas (Voet *et al.*, 2006); las reacciones del catabolismo son las principales implicadas en la formación de las ROS. Dentro de las células, las ROS son producidas principalmente durante la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la mitocondria y durante la β -oxidación

de los ácidos grasos que sucede en los peroxisomas (Bonekamp *et al.*, 2009; Droge, 2002; Ivashchenko *et al.*, 2011). Otras reacciones como las llevadas a cabo por el citocromo p450, o las NADPH oxidasas también generan ROS, por lo que no toda la producción de las ROS está necesariamente asociada al catabolismo (Droge, 2002).

1.2.1 La producción de las ROS en la mitocondria y su importancia en el envejecimiento y la longevidad

La mitocondria es el principal orgánulo encargado en la producción de energía pudiendo generar hasta el 95% del ATP de una célula (Tzamelis, 2012). Dado que la fuente principal de producción de ATP es la cadena respiratoria (también conocida como cadena transportadora de electrones), la mitocondria llega a consumir hasta el 85% del total del oxígeno utilizado por las células (Judge *et al.*, 2007). Se estima que del total oxígeno consumido por la mitocondria entre un 1-2% es convertido en ROS (Boveris and Chance, 1973). Para la producción del ATP, la cadena transportadora de electrones, conformada por cuatro complejos proteicos (Complejo I, II, III y IV), utiliza los electrones de los cofactores NADPH_2 y FADH_2 , ambos principalmente sintetizados en el ciclo de Krebs. El NADH_2 reduce el complejo I y éste a su vez transfiere sus electrones a la ubiquinona (Q), que al reducirse se transforma en ubiquinol (QH_2), un compuesto liposoluble que se mueve libremente por la membrana interna de la mitocondria para transportar los electrones al complejo III. Por su parte el FADH_2 reduce al complejo II y éste a la ubiquinona que a su vez transfiere los electrones al complejo III. Posteriormente, del complejo III los electrones son transferidos al complejo IV por medio del citocromo-c. Finalmente, el complejo IV cede sus electrones al oxígeno de manera controlada formándose agua. El paso de los electrones por los complejos I, III y IV permite el bombeo de protones desde el lumen de la mitocondria al espacio intermembranal, dando lugar a un gradiente de protones entre el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Este gradiente es, al final, energía potencial que es aprovechada por la ATP sintetasa para producir el ATP (Figura 5). Durante el paso de electrones entre los complejos de la cadena respiratoria, pueden pasar directamente al oxígeno molecular de forma no controlada, produciendo de esta forma el anión súper óxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) que es transformado en H_2O_2 por la acción de la superóxido dismutasa presente. Es relevante notar que, mientras el complejo I y II solo forman a las

ROS en la matriz mitocondrial, el complejo III las producen de ambos lados de la membrana interna (Murphy, 2009; Turrens, 2003) (Figura 5).

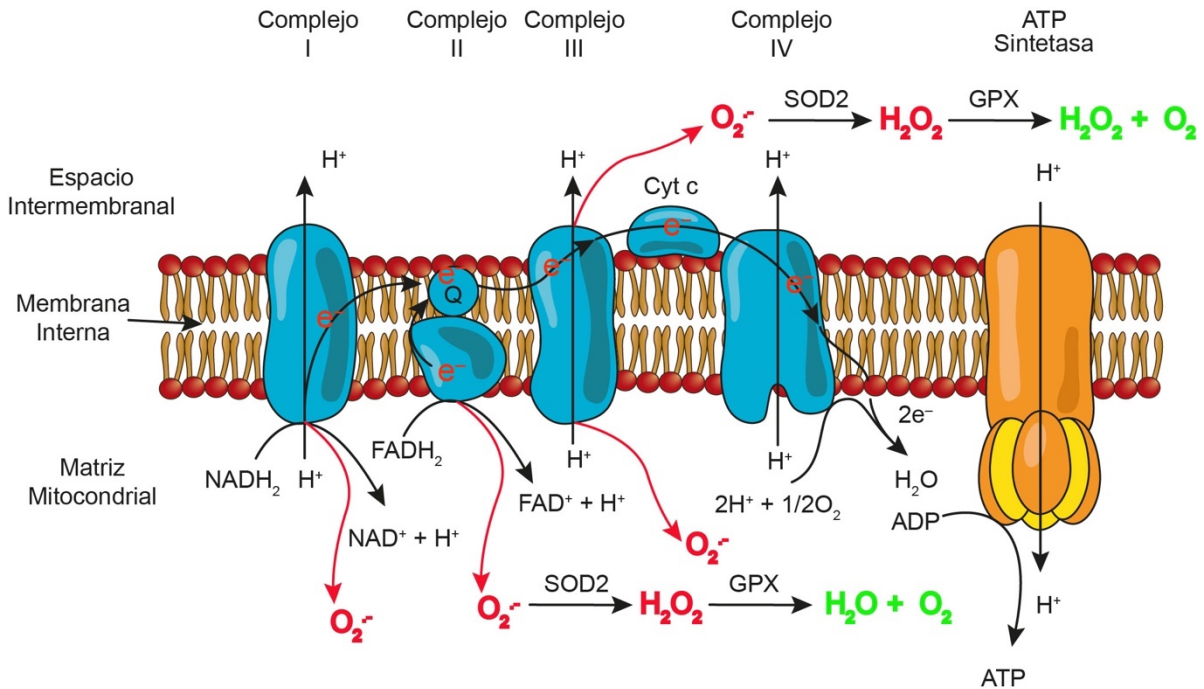


Figura 5. Cadena transportadora de electrones y producción de las ROS. Los electrones de NADH₂ son transferidos al complejo I y posteriormente transferidos al complejo III y IV. El FADH₂ transfiere sus electrones al complejo II y de ahí son transferidos al complejo III y IV. La transferencia de electrones entre el complejo I y II hacia el complejo III requiere de la ubiquinona como acarreador, mientras que el citocromo-c acarrea los electrones del complejo III al IV. El paso de electrones entre los complejos I, III y IV permite transportar protones hacia el espacio intermembranal generando un gradiente que es aprovechado por la ATP sintetasa para la síntesis del ATP. Las ROS son producidas en el complejo I, II y III, sin embargo, el complejo III tiene capacidad de hacerlo de ambos lados de la membrana interna mitocondrial mientras el complejo I y II solo en la matriz mitocondria. El complejo IV es el que finalmente transfiere, de forma controlada, los electrones al oxígeno formando agua.

La producción de las ROS en la mitocondria está controlada por los sistemas antioxidantes que se encuentran presentes, en especial la superóxido dismutasa 2 (SOD2) y la glutatión peroxidasa 1 y 4 (GPX1 y GPX4), ambas especialmente localizadas en este orgánulo (Esworthy *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1995). Además de las enzimas antioxidantes, las proteínas desacopladoras (UCP) en la membrana mitocondrial pueden evitar la formación de las

ROS. Las UCP actúan disipando el gradiente de protones, permitiendo el transporte de los protones hacia la matriz mitocondrial, produciendo calor en lugar de ATP, evitando así la acumulación de electrones a lo largo de la cadena respiratoria y, por tanto, la formación de las ROS (Bouillaud, 2009).

Por la gran cantidad de ROS producidos en la mitocondria, se propuso, en línea con la teoría de las ROS causante del envejecimiento, la teoría mitocondrial del envejecimiento (Harman, 1972). Esta teoría predice que a mayor actividad mitocondrial mayor producción de ROS y envejecimiento. En la mosca *Drosophila melanogaster* (*Drosophila*) con la edad se incrementa la producción de las ROS, fenómeno que correlaciona con disminución de la función mitocondrial. A pesar de este fenómeno, la producción de ROS vía el complejo I por la sobre-reducción de la ubiquinona incrementa la longevidad de la mosca (Scialò *et al.*, 2016). Al respecto, mayor longevidad en *Ceanorhabditis elegans* (*C. elegans*) ocurre con la eliminación de los complejos de la cadena respiratoria de electrones mediante el uso de RNA de interferencia (RNAi), y también con la inhibición farmacológica del complejo III de la cadena respiratoria con actimicina (Dillin *et al.*, 2002). No obstante, el incremento de la longevidad inducida con la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria en *C. elegans* requiere de la formación de ROS (Schmeisser *et al.*, 2013). Por lo tanto, estas evidencias indican que las ROS se producen de manera natural con el envejecimiento, pero además pueden ser la señal que le permite al organismo responder ante un posible daño causando un aumento de la longevidad.

En el ratón la mutación de la DNA polimerasa de la mitocondria causa disfunción mitocondrial y envejecimiento prematuro, pero no incremento en el daño oxidante o la producción de las ROS (Kujoth *et al.*, 2005; Trifunovic *et al.*, 2004). En enfermedades neurodegenerativas asociadas con el envejecimiento, como el Parkinson, el Alzheimer y el Huntington, se caracterizan por una susceptibilidad en la función mitocondrial y un incremento en el estrés oxidante en las neuronas involucradas en el padecimiento (Kujoth *et al.*, 2005). Por lo tanto, si bien la actividad mitocondrial podría disminuir en el envejecimiento, el efecto de las ROS podría ser dual, es decir, son necesarias para inducir señales de respuesta, posiblemente para su eliminación, pero su producción exacerbada puede ser negativa para la salud del organismo.

1.2.2 Los peroxisomas y su relación con el metabolismo y el envejecimiento

Después de la mitocondria, los peroxisomas son los orgánulos que más ROS y energía producen. Inicialmente se propuso que los peroxisomas tenían la función de sólo producir y eliminar el H_2O_2 (Schrader and Fahimi, 2006), además de contar con enzimas que les permite transferir electrones de ciertos metabolitos al O_2 y así formar H_2O_2 . De hecho su nombre es debido a la gran cantidad de H_2O_2 que se detectó en ellos (De Duve and Baudhuin, 1966). En la actualidad se conoce con mayor detalle sus funciones y se sabe que son organulos metabólicos que llevan a cabo reacciones bioquímicas específicas, tanto catabólicas como anabólicas.

Se estima que en los peroxisomas se produce hasta el 35% del total de H_2O_2 formado en la célula (Boveris *et al.*, 1972) y que utiliza hasta el 20% del oxígeno total consumido por la célula (Reddy and Mannaerts, 1994). Para contender con las ROS producidas, los peroxisomas cuentan con una gran variedad de enzimas antioxidantes, que incluyen las glutatión peroxidasas, las peroxiredoxinas y las superóxido dismutasas, pero la enzima antioxidante más abundante es la catalasa (Lodhi and Semenkovich, 2014; Schrader and Fahimi, 2006). Sin embargo, existe una amplia variedad de oxidasas presentes en este orgánulo, que son las responsables de la formación de las ROS, como la acil-CoA oxidasa, la xantina oxidasa y la D-aminoácido oxidasa, por mencionar sólo algunas (Schrader y Fahimi, 2006). Los peroxisomas no solo son orgánulos catabólicos, pues también tienen la función de sintetizar metabolitos como la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). El DHAP es un precursor para la síntesis de ésteres de fosfolípidos, comúnmente conocidos como plasmalógenos, moléculas que se sintetizan en el peroxisoma y, que si bien no se conoce con claridad su función, es posible que, junto con el colesterol y los esfínlolípidos, formen las balsas lipídicas, pues representan entre el 15%-20% del total de los fosfolípidos de las membranas celulares (Braverman and Moser, 2012; Lodhi and Semenkovich, 2014).

La β -oxidación de los ácidos grasos es una de las funciones más importantes que realiza este orgánulo, pues le permite a la célula degradar ácidos grasos de cadena larga, muy complejos y poliinsaturados, función que solo en algunos casos la mitocondria también puede realizar, aunque no con la misma eficiencia (Hryb and Hogg, 1979; Nguyen *et al.*,

2008; Osumi and Hashimoto, 1978). A diferencia de la β -oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria, en donde el FAD^+ es el aceptor de los electrones del primer paso de oxidación del acil-CoA (Figura 6A), en el peroxisoma la oxidación de la acil-CoA a trans-2-enoil-CoA lo realiza la acil-CoA oxidasa (ACOX) que transfiere los electrones directamente al oxígeno para producir H_2O_2 ; el H_2O_2 es posteriormente metabolizado a oxígeno y agua por la acción de la catalasa (Figura 6B).

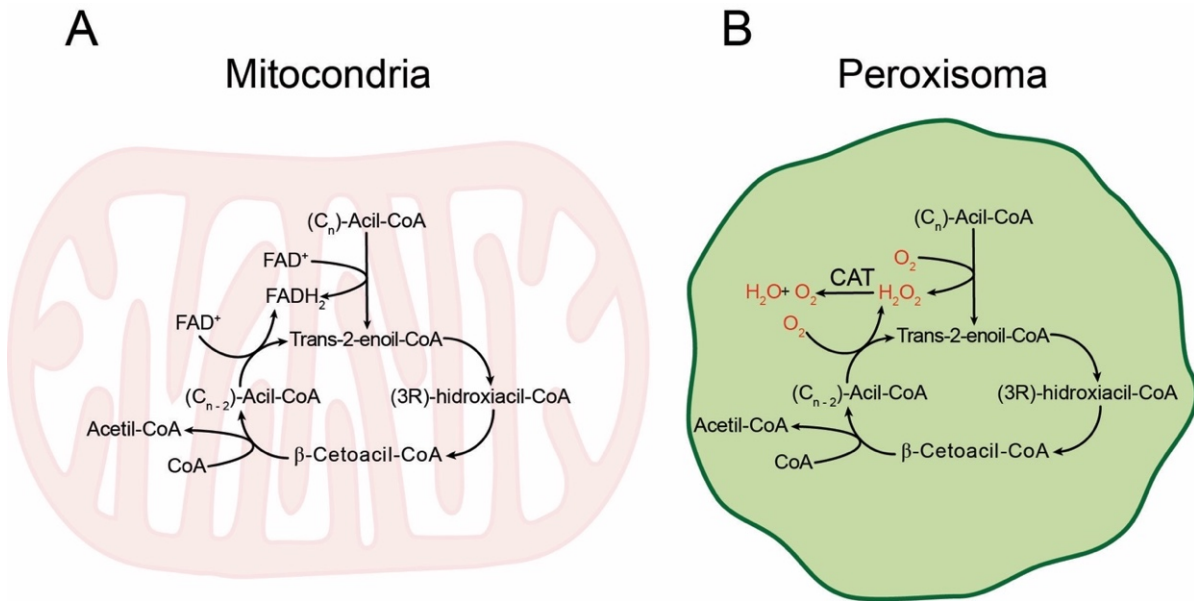


Figura 6. La β -oxidación de los ácidos grasos del peroxisoma produce H_2O_2 . (A) La β -oxidación de los ácidos grasos de la mitocondria. El acil-CoA al oxidarse transfiere los electrones al FAD^+ para formar $FADH_2$. (B) La β -oxidación de ácidos grasos del peroxisoma. La ACOX al oxidar el acil-CoA transfiere los electrones al O_2 produciendo H_2O_2 .

En las plantas el único lugar en donde se pueden degradar los ácidos grasos es en los peroxisomas (Del Río and López-Huertas, 2016), mientras que en los mamíferos esta reacción se realiza tanto en las mitocondrias como en los peroxisomas. El metabolismo algunos ácidos grasos sólo se lleva a cabo en los peroxisomas. Los pacientes con el síndrome de Zellweger, que tienen defectos en la biogénesis de los peroxisomas, acumulan ácidos grasos de cadena larga, en especial el ácido lignocérico (Singh *et al.*, 1984) y otros ácidos grasos como los ramificados también se han visto acumulados en pacientes con desórdenes en los peroxisomas (Wanders *et al.*, 2001). En el ratón la ausencia de la ACOX provoca la proliferación de los peroxisomas y esteatosis hepática

(Fan *et al.*, 1998), indicando la importancia de este orgánulo en el metabolismo de los ácidos grasos que no pueden ser metabolizados en ningún otro lugar de la célula.

Los peroxisomas, además, pueden ser reguladores generales del metabolismo, pues se han identificado metabolitos producidos en el peroxisoma que son ligandos de los factores transcripcionales conocidos como receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR, por sus siglas en inglés). En especial, PPAR γ , implicado en la lipogénesis y la diferenciación de los adipocitos (Walczak and Tontonoz, 2002), es un factor de transcripción que podría ser activado por algún metabolito producido en los peroxisomas (Lodhi and Semenkovich, 2014). Por lo tanto, es posible que otros PPAR como el α y δ también puedan ser activados por metabolitos producidos en los peroxisomas.

Se ha propuesto que los peroxisomas, por la gran cantidad de ROS que producen y por sus funciones en la homeostasis del metabolismo, pueden tener un papel determinante en la biología del envejecimiento (Périchon *et al.*, 1998; Sandalio *et al.*, 2013; Titorenko and Terlecky, 2011). Al respecto, algunos experimentos *in vitro* muestran que los defectos en el transporte de la catalasa al peroxisoma induce senescencia celular (Legakis *et al.*, 2002). Además, durante el envejecimiento de *C. elegans* disminuye la abundancia de proteínas del peroxisoma, incluida la PEX5, cuya función es el transporte de las proteínas hacia el peroxisoma (Narayan *et al.*, 2016). Así entonces, los mecanismos de participación del peroxisoma en el envejecimiento pueden no estar restringidos a la producción de las ROS, sino también a otras actividades que lleva a cabo este orgánulo y que se ven afectadas por la deficiencia en la importación de las enzimas requeridas (Terlecky *et al.*, 2006).

En el ratón, el envejecimiento causa incremento de la proteína de la membrana del peroxisoma PMP70 en el hipocampo, fenómeno que coincide con una disminución de la ACOX y la tiolasa (THL), enzimas que son necesarias para la β -oxidación de los ácidos grasos del peroxisoma, sin embargo, que se ve afectada la capacidad antioxidante de los peroxisomas (Cipolla and Lodhi, 2017). No obstante, la síntesis de plasmalógenos en el cerebro incrementa con la edad, aunque también su degradación (André *et al.*, 2006) sugiriendo mayor actividad peroxisomal. Al respecto, en el hígado la abundancia de

enzimas de la β -oxidación de los ácidos grasos como la THL y la hidrolasa, incrementan con la edad (Amelina *et al.*, 2011), sin embargo, en el hígado la actividad de la β -oxidación de los ácidos grasos del peroxisoma podrían disminuir con la edad (Périchon y Bourre, 1995; Yang *et al.*, 2014). Por lo tanto, durante el envejecimiento es posible que disminuya la capacidad de la β -oxidación de los ácidos grasos peroxisomal, fenómeno que la célula podría tratar de compensar incrementando la abundancia de las enzimas involucradas en esta vía.

Si bien la actividad peroxisomal puede participar directamente en el proceso de envejecimiento, otra posibilidad es que lo haga a través de la mitocondria, pues el incremento en el H_2O_2 de los peroxisomas tiene repercusiones en el balance de las ROS de la mitocondria sin repercusiones directas en el estado redox externo a los peroxisomas. Estos orgánulos regulan fuertemente el estado redox de la célula aunque individualmente son resistentes a las ROS que se producen fuera de ellos (Ivashchenko *et al.*, 2011).

1.3 Importancia del metabolismo en el envejecimiento y la longevidad

De acuerdo con las características del envejecimiento, la señal de la prevalencia o ausencia de nutrientes puede estar afectada directamente por las alteraciones en el metabolismo. Al respecto, en *C. elegans* la mutación hipomórfica en *daf-2*, un gen que codifica para un homólogo del receptor a la insulina y de los factores de crecimiento tipo insulina (Insulina/IGF-I), incrementa la esperanza de vida de este organismo (Lin *et al.*, 2013). En *Drosophila* la mutación de *chico*, un gen que codifica para el sustrato del receptor a la insulina 1 en este organismo, y que participa en la vía de señalización Insulina/IGF, incrementa la esperanza da vida de la mosca (Clancy *et al.*, 2001). En *Saccharomyces cerevisiae* la mutación de *SCH9*, homólogo de AKT, también aumenta la esperanza de vida de la levadura (Fabrizio *et al.*, 2001). En ratones, si bien las mutaciones en la vía Insulina/IGF-1 no ha mostrado resultados contundentes en el incremento de la esperanza de vida, sí se ha observado que la restricción calórica, al igual que en otras especies como *C. elegans* y *Drosophila*, incrementa la longevidad (Cavallini *et al.*, 2008; Spindler, 2001). Se propone que el mecanismo mediante el cual sucede este fenómeno es por un aumento en la sensibilidad a la insulina (Bonkowski *et al.*, 2006). Algunas observaciones recientes

mostran que en el ratón los niveles de la insulina se incrementan con la edad, causando resistencia a la insulina, sin embargo, al disminuir la insulina se incrementa la sensibilidad, y al mismo tiempo mejora la homeostasis de la glucosa y aumenta la longevidad (Martin *et al.*, 2007). Por lo tanto, un factor determinante para la longevidad es la señalización de la insulina, ya que su desregulación, como lo es la resistencia a la insulina, tiene efectos negativos en la longevidad y en el envejecimiento, probablemente al afectar la homeostasis de los nutrientes y el metabolismo.

Similar a la restricción calórica, el ayuno intermitente incrementa la longevidad en ratones y en organismos invertebrados, incluidos la mosca y el ratón (Anson *et al.*, 2003; Catterson *et al.*, 2018; Mitchell *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2017). De manera interesante el efecto benéfico del ayuno intermitente en la longevidad parece no depender de la composición calórica de la dieta (Mitchell *et al.*, 2019). Aunado a la restricción calórica y a el ayuno intermitente, en condiciones *ad libitum*, el contenido de macronutrientes podría ser determinante para la longevidad. En particular, cuando las proteínas representan una baja proporción del contenido calórico de la dieta, la longevidad se incrementa. Este fenómeno se asocia con una menor cantidad de aminoácidos ramificados y menores niveles de la insulina, resultando en menor actividad de la cinasa mTOR, una cinasa que entre otras funciones regula el metabolismo (ver más adelante), pues ambas condiciones son activadoras de esta cinasa (Chotechuang *et al.*, 2009; Solon-Biet *et al.*, 2014). Otra condición de alimentación que tiene efectos en la longevidad y el envejecimiento en el ratón es la dieta cetogénica, que se observó que evita el envejecimiento mejorando así la vida saludable, efecto que podría estar determinado por menor actividad de la mTOR y de la señalización de la insulina (Meidenbauer *et al.*, 2014). Uno de los mecanismos por el cual la dieta cetogénica inhibe la actividad de la mTOR es por acetilación, fenómeno que sucede en el hígado de ratones alimentados con esta dieta (Roberts *et al.*, 2017). Estas observaciones en conjunto indican la importancia y el papel determinante que puede tener el régimen de alimentación, los metabolitos y la composición de la dieta en el envejecimiento y la longevidad. Para entender cómo el metabolismo puede influir en el envejecimiento y la longevidad primero hay que entender cómo éste se regula.

1.4 Regulación del metabolismo

Por su papel esencial en la vida de las células y de los organismos, el metabolismo se consideró por muchos años como un proceso constitutivo con limitadas variaciones. Sin embargo, algunas evidencias recientes demuestran que el metabolismo es un proceso muy dinámico y regulado en todos los organismos, que además tiene la capacidad de controlar e influenciar activamente en los procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Agathocleous and Harris, 2013; Green *et al.*, 2014). En los mamíferos, la actividad metabólica depende del tipo de tejido y del órgano, así como de la comunicación entre ellos. En especial los órganos como el cerebro, el páncreas, el hígado, y los tejidos como el adiposo y el muscular se les consideran los más importantes en la regulación y mantenimiento de la homeostasis del metabolismo a nivel sistémico (Figura 7).

Para el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo, el cerebro interpreta señales que llegan de otros órganos. Por ejemplo, la leptina, que es producida y secretada por el tejido adiposo, controla la ingesta de alimento y el gasto energético al inhibir la producción del péptido AgRP y el neuropéptido Y (NPY) en las neuronas POMC/CART del núcleo arcuato del hipotálamo, además de la hormona melanina-concentrina (MCH) y la orexinas en el área hipotalámica lateral (Park and Ahima, 2014). Por su parte el hígado es el mayor órgano metabólico, pues en él tienen lugar la mayoría de las vías metabólicas conocidas, incluyendo: la glucólisis, la gluconeogénesis, la lipólisis, la lipogénesis, así como el catabolismo y anabolismo de las proteínas. En el hígado se mantiene la segunda reserva más grandes de glucógeno en el organismo después del músculo, que funciona como fuente de monómeros de glucosa de una respuesta rápida para mantener la glucemia normal en condiciones de falta de alimento como lo es el ayuno o en alto gasto energético como el ejercicio extenuante (Hornbrook and Lyon, 1970). El hígado también es el encargado de oxidar los lípidos provenientes del tejido adiposo para producir los cuerpos cetónicos que utiliza el cerebro cuando la glucosa escasea, por ejemplo, en el ayuno. En sentido opuesto, cuando los nutrientes son abundantes, el hígado sintetiza lípidos que envía al tejido adiposo para su almacenamiento. El tejido adiposo, por su parte, es el encargado de mantener las reservas de energía en forma de lípidos, que cuando son

necesarios, los metaboliza para enviar los productos al hígado y producir cuerpos cetónicos, y al músculo para ser oxidados y obtener energía. El músculo es uno de los tejidos que más energía consumen después del cerebro y el corazón. En este tejido se mantienen las mayores reservas de glucógeno del organismo (Hornbrook and Lyon, 1970). Sin embargo, a pesar de su alto consumo de energía, en general el ATP que utiliza lo obtiene de la glucólisis, pues en las personas sedentarias las fibras musculares prevalentes son las del tipo II que prácticamente sólo realizan glucólisis, pero, en personas que realizan actividad física, se desarrollan fibras musculares tipo I que son capaces de hacer glucólisis y ciclo de Krebs permitiéndoles oxidar la glucosa completamente hasta el CO₂ y agua (Figura 7).

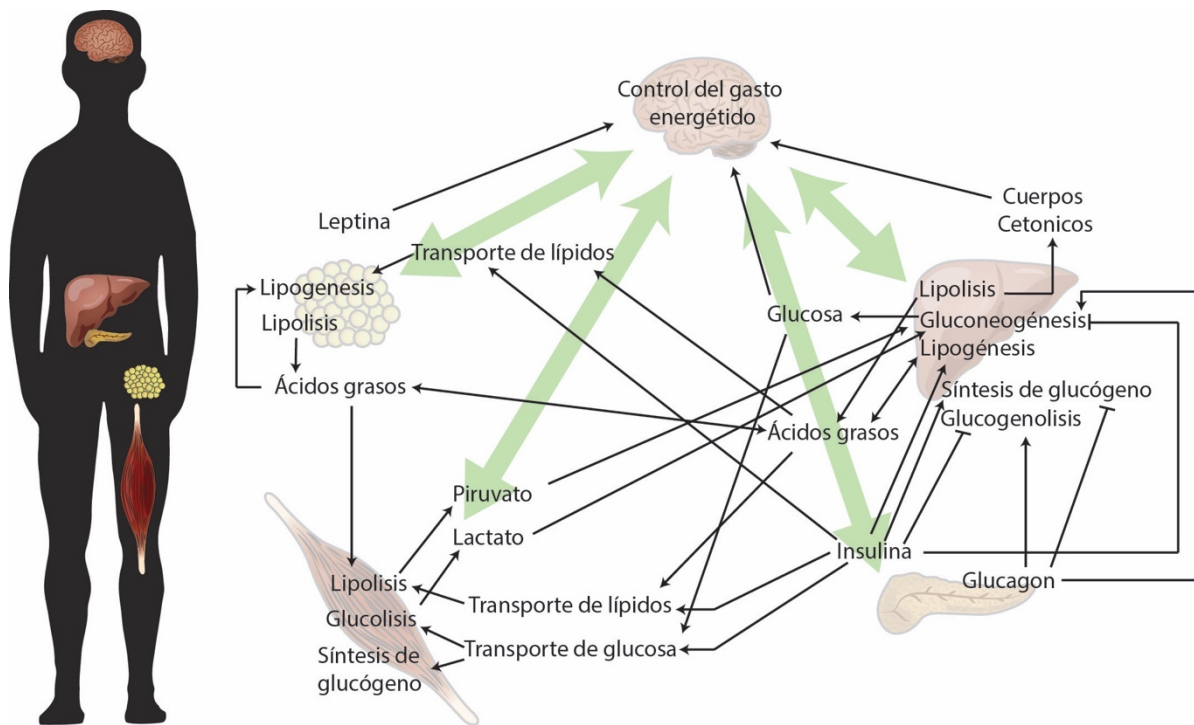


Figura 7. La homeostasis del metabolismo depende de la comunicación entre distintos órganos y tejidos. El cerebro es el órgano que controla, mediante señales nerviosas, el metabolismo. A su vez interpreta las señales que otros órganos y tejidos le envían por medio de hormonas, como la leptina que se secreta del tejido adiposo, la insulina del páncreas y los metabolitos como la glucosa y los ácidos grasos que produce el hígado.

El mantenimiento de la homeostasis metabólica entre los diferentes órganos y tejidos es necesario para el funcionamiento óptimo del organismo, la desregulación podría ser causa del desarrollo de enfermedades. Por ejemplo, en la obesidad, la acumulación exacerbada

de tejido adiposo puede generar resistencia a la insulina, provocando que el hígado produzca glucosa de manera descontrolada mediante la gluconeogénesis y, al mismo tiempo, evitando que sea transportada hacia el músculo o el mismo tejido adiposo. Además, la resistencia a la insulina es un factor de riesgo para el desarrollo posterior de la diabetes tipo II. Contrario a la obesidad, en condiciones de falta de alimento, las reservas de energía del hígado y del músculo en forma de glucógeno son necesarias para producir la glucosa que el organismo requiere para alimentar al resto de los tejidos. En especial aquellos tejidos que prácticamente sólo dependen de ella, como el cerebro. Si el ayuno se extiende por largo tiempo, las reservas de lípidos del tejido adiposo juegan un papel determinante para obtener energía mediante la oxidación de los ácidos grasos y la producción de los cuerpos cetónicos (Figura 7).

A nivel celular la actividad metabólica se regula a todos los niveles, desde el transcripcional, el traduccional, el pos-traduccional así como por la regulación alostérica en muchas enzimas que directamente llevan a cabo las reacciones bioquímicas dentro de las vías metabólicas. En el control global, existen reguladores metabólicos “maestros”, que detectan el estado metabólico de la célula para inducir o reprimir las vías metabólicas específicas. Dentro de estos reguladores metabólicos se encuentran la cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) y la cinasa denominada ‘el blanco de rapamicina’ (mTOR). También factores de transcripción como los PPARs, entre otros, regulan globalmente las vías metabólicas, tal que la respuesta sea coordinada. Todos estos reguladores del metabolismo responden al estado metabólico y provocan cambios de expresión en los genes que codifican para varias de las enzimas que catalizan reacciones críticas del metabolismo. A continuación, se describe cómo estos reguladores metabólicos actúan.

1.4.1 Regulación del metabolismo por AMPK

AMPK es una cinasa presente en todas las células eucariotas y uno de los principales reguladores del metabolismo (Hardie *et al.*, 2012). Para regular el metabolismo, la AMPK detecta los niveles de AMP/ATP en la célula. La AMPK se compone de una subunidad catalítica α y las subunidades reguladoras β y γ (Hardie *et al.*, 2012). La AMPK se activa

por dos mecanismos conocidos, por la vía canónica al incrementar la concentración del AMP. A pesar de que ADP también puede unirse a la AMPK, sólo el AMP es capaz de inducir su activación por medio de provocar cambios conformacionales que le permiten ser fosforilada por la cinasa LKB (Gowans *et al.*, 2013; Shaw *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2003). La otra vía de activación de la AMPK es la no canónica que involucra su fosforilación inducida por la cinasa calmodulina dependiente de calcio 2 (CAMKK2) que responde al incremento en la concentración de calcio (García y Shaw, 2017; Hawley *et al.*, 2005; Woods *et al.*, 2005). La vía no canónica parece activarse especialmente en respuesta a las hormonas (García y Shaw, 2017).

Una vez activada, la AMPK promueve el catabolismo e inhibe el anabolismo (Figura 8). En la regulación del catabolismo, AMPK promueve la degradación de lípidos y carbohidratos al inducir la actividad de la desacetilasa SIRT1 por medio del incremento de la relación $NAD^+/NADH_2$. Al activarse, SIRT1 desacetila específicamente PCG1-a y FOXO1a, promoviendo que se vayan al núcleo y, consecuentemente, se incremente la expresión de los genes de la oxidación de los carbohidratos y los lípidos, incluidos el citocromo-c (*cyt-c*) y la canitina parmitoiltransferasa alfa (*Cpt1a*) (Cantó *et al.*, 2009, 2010). En sentido contrario, el anabolismo de los carbohidratos, específicamente la gluconeogénesis, está regulado negativamente por la AMPK mediante CREB, un factor de transcripción que regula la transcripción de genes de la gluconeogénesis (Herzig *et al.*, 2002). La AMPK impide el transporte al núcleo de TORC2, un coactivador de CREB, mediante su fosforilación, evitando así la transcripción de los genes de la gluconeogénesis incluidos, *Pck1* y *G6pc* (Koo *et al.*, 2005). Además, el receptor nuclear huérfano SHP también está involucrado en la regulación negativa de la gluconeogénesis por la AMPK, sin embargo, el mecanismo a detalle no se conoce (Kim *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

En el caso del anabolismo de los lípidos, la AMPK regula negativamente la lipogénesis por múltiples vías. Una de ellas es por medio de la SIRT1, que inhibe por desacetilación a PPAR γ , un regulador positivo de la lipogénesis (Jiang *et al.*, 2012). También lo hace regulando a SREBP, de la cual existen varias isoformas, pero la SREBP-1c y la SREBP-2c son particularmente reguladores de la lipogénesis. Mientras que SREBP-1c promueve la síntesis de los ácidos grasos y los triacilglicéridos, SREBP-2c lo hace con la síntesis del

colesterol; ambas isoformas provienen del mismo precursor (Eberlé *et al.*, 2004). SREBP se produce como un precursor y requiere de cortes proteolíticos para que se active y se pueda transportar al núcleo. De manera interesante, la AMPK inhibe directamente a SREBP al fosforilar su precursor, evitando su maduración y transporte al núcleo (Li *et al.*, 2011). Además de este mecanismo, la AMPK puede inhibir la actividad de SREBP a través de SIRT1, que provoca su desacetilación, disminuyendo su actividad (Ponugoti *et al.*, 2010). El resultado de la inhibición de la SREBP es la disminución de la lipogénesis debido a una menor expresión de sus genes blanco, que incluyen a los lipogénicos *Fas*, *Acc*, *Scd-1*, entre otros (Ikeda *et al.*, 2002). A otro nivel de regulación, la AMPK también inhibe la actividad de la ACC y de la FAS por fosforilación directa (An *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2015), lo que incrementa el grado de regulación de esta cinasa sobre la lipogénesis.

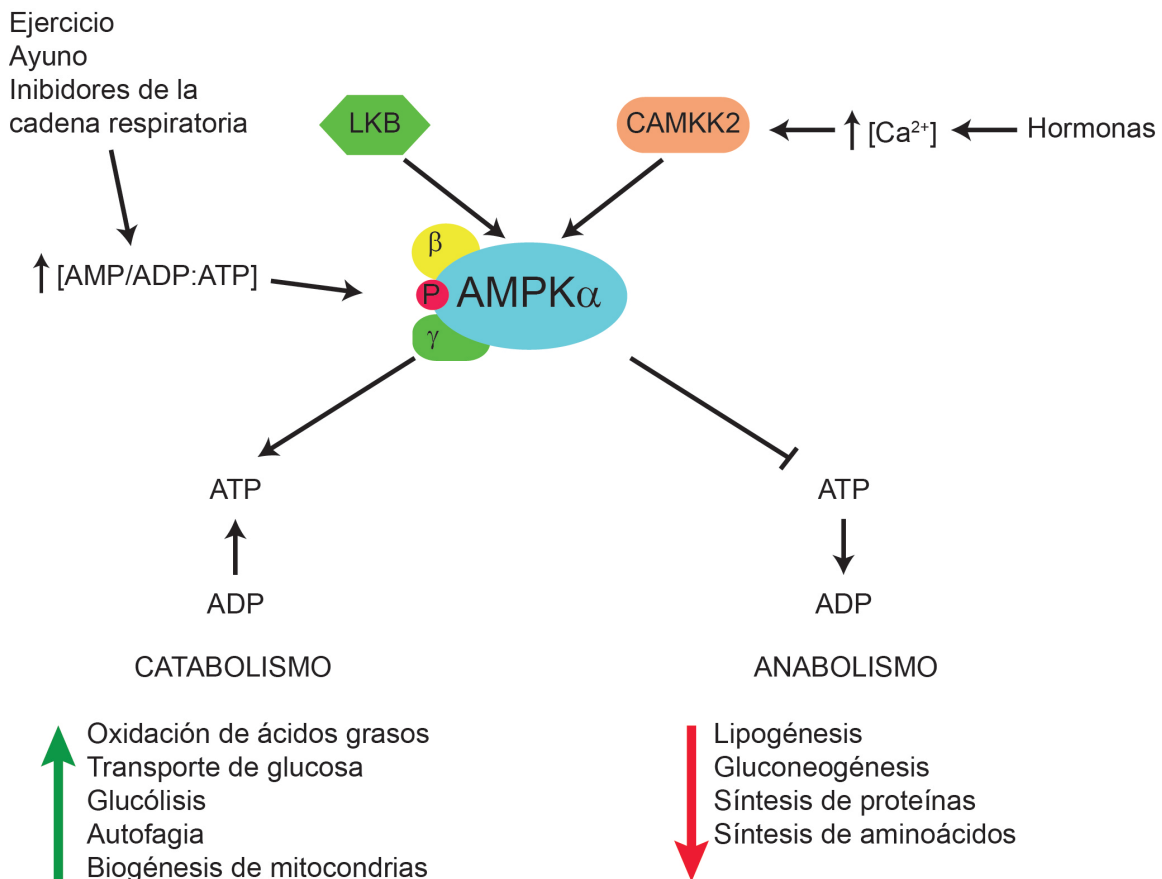


Figura 8. Regulación del metabolismo por la AMPK. La AMPK activa promueve el catabolismo e inhibe el anabolismo. Condiciones como el ejercicio o el ayuno que afectan la relación AMP/ADP:ATP promueven la activación de AMPK por LKB, mientras las hormonas lo hacen a través de CAMKK2. Modificado de: Garcia and Shaw, 2017.

El anabolismo también es regulado negativamente por la AMPK a través de la mTOR, pues inhibe específicamente el complejo mTORC1 por dos vías principales. La primera es mediante la activación del supresor de tumores TSC2 (Inoki *et al.*, 2003), un inhibidor de mTORC1, y la segunda es por la inhibición de su subunidad reguladora Raptor (Gwinn *et al.*, 2008). Este último mecanismo se ha observado sucede *in vivo* en el hígado en el ratón (Howell *et al.*, 2017). Mediante la inhibición de mTOR, AMPK regula negativamente el anabolismo en general, lo que incluye la síntesis de los aminoácidos y la de las proteínas.

A nivel fisiológico la actividad de la AMPK tiene muchas implicaciones. Desde el punto de vista médico, activadores de esta cinasa, como la metformina, se utilizan para el control de la glucemia en pacientes con diabetes tipo II (Zhang *et al.*, 2009a). Además, su actividad es indispensable durante el ayuno y el ejercicio (Bujak *et al.*, 2015; Cantó *et al.*, 2010), condiciones en las que permite mantener la glucemia. En la obesidad, la activación de la AMPK puede ayudar a tratar el hígado graso al inhibir la lipogénesis (Li *et al.*, 2011). AMPK también parece estar implicado en la regulación del ciclo circadiano, que al desestabilizar e inhibir al criptocromo CRY1, actúa como un regulador negativo de las proteínas del ciclo circadiano CLOCK y BMAL (Lamia *et al.*, 2009). Además, la AMPK participa en la regulación de la ingesta, pues en el núcleo arcuato del hipotálamo se inhibe por la leptina para controlar la ingesta del alimento (Stark *et al.*, 2013). En conjunto estas evidencias muestran la importancia y el nivel de control que tiene la AMPK sobre el metabolismo general del organismo.

1.4.2 Regulación del metabolismo por la mTOR

mTOR o la proteína blanco de la rapamicina es, como la AMPK, uno de los reguladores maestros del metabolismo. La actividad de la mTOR es contraria a la de la AMPK, pues regula positivamente el anabolismo. mTOR es una cinasa de serina/treonina que puede formar dos complejos proteicos: mTORC1 y mTORC2, ambos complejos comparten la subunidad catalítica mTOR, y las subunidades Deptor, mLST8, Tti1 y Tel2. Específicamente el complejo mTORC1 cuenta con la subunidad reguladora Raptor y la subunidad inhibitoria Pras40, mientras que el complejo mTORC2 contiene la subunidad reguladora Ricor, y las subunidades mSin1 y Protor1/2. Ambos complejos regulan el metabolismo, pero mTORC1 puede responder a estímulos diversos como concentración

de los aminoácidos, la glucosa y el oxígeno, por mencionar algunos. Por su parte mTORC2 responde a estímulos más limitados, sobre todo asociados a factores de crecimiento, lo que le permite, además de participar en la regulación del metabolismo, regular la organización del citoesqueleto y la supervivencia celular. Otra diferencia entre mTORC1 y mTORC2, es que la segunda es menos sensible a la acción inhibitoria de la rapamicina (Laplante and Sabatini, 2012) (Figura 9).

La regulación de mTORC1 es muy compleja. Río arriba de la vía mTORC1, Rheb, el activador de mTORC1 que requiere GTP para su actividad, esta inhibido por el heterodímero TSC1/2, con actividad de GTPasa. Una vez que TSC1/2 se inactiva, Rheb cambia su unión de GDP a GTP, lo que le permite activar a mTORC1 (Laplante and Sabatini, 2012). mTORC1 también está regulado negativamente de manera directa por la AMPK al fosforilar la subunidad reguladora Raptor y mantener activo a TSC2 también mediante su fosforilación (Gwinn *et al.*, 2008; Inoki *et al.*, 2003). Los factores de crecimiento y la insulina promueven la actividad de mTORC1 al inducir la inhibición de TSC1/2, mientras los primeros lo hacen a través de la vía de las MAPK cinasas, la insulina actúa por la vía PI3K/AKT (Figura 9). Por su parte, las proteínas involucradas en la inhibición y la activación de mTORC2 no se conocen con claridad a la fecha, sólo se ha descrito que en las células del glioblastoma multiforme la fosfatasa PTEN la puede regular negativamente (Bhattacharya *et al.*, 2016).

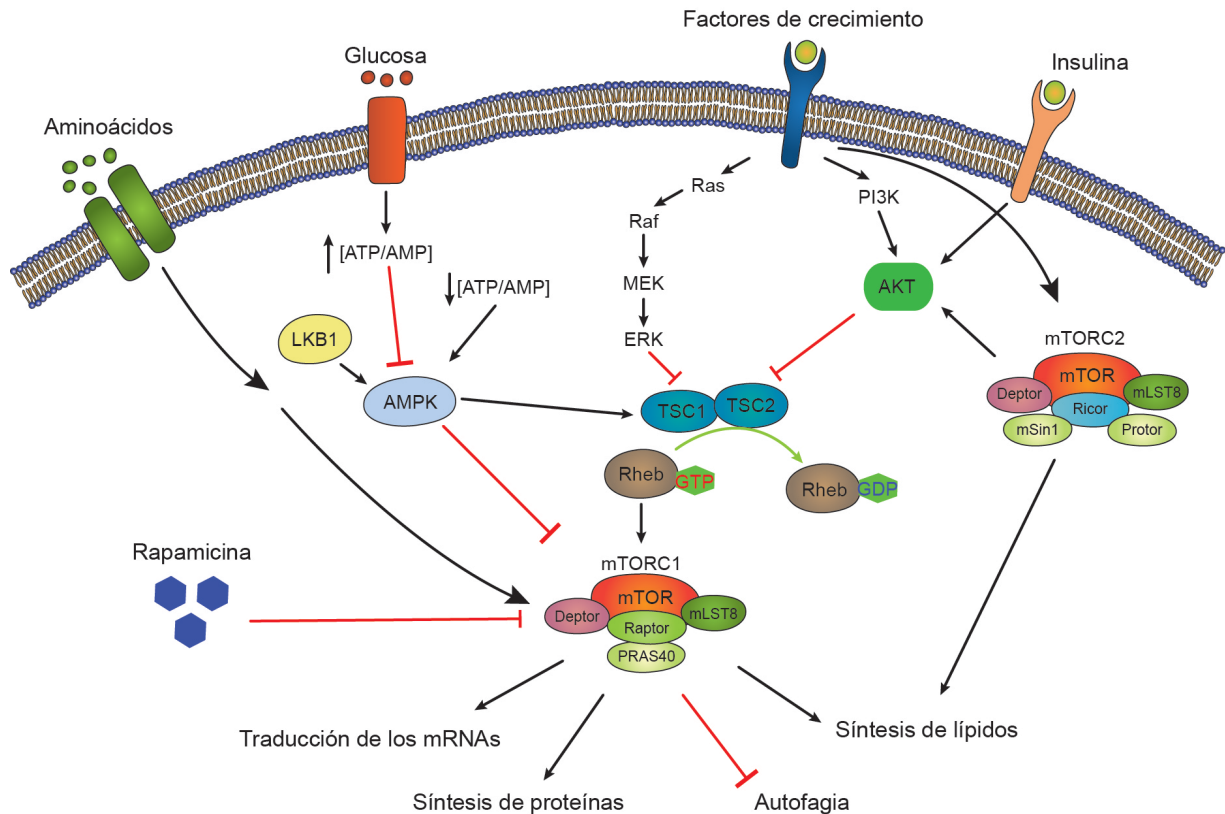


Figura 9. Regulación del metabolismo por la mTOR. La cinasa mTOR forma los complejos funcionales: mTORC1 y mTORC2. Mediante estos complejos participa en la regula positiva del anabolismo. Rio arriba, mTORC1 es regulado negativamente por la AMPK y positivamente por la AKT. Por su parte mTORC2 responde positivamente a la acción de factores de crecimiento y regula positivamente a la AKT, promoviendo la lipogénesis. mTORC1 es sensible a la inhibición por rapamicina mientras que la mTORC2 es poco sensible.

Una de las vías metabólicas que regula la mTOR es la lipogénesis. El mecanismo involucra a la Lipina-1, una fosfatasa de ácido fosfatídico, que al ser fosforilada por el complejo mTORC1 se mantiene en el citoplasma, sin embargo, la inhibición de mTORC1 causa la desfosforilación de la lipina-1 y posterior transporte al núcleo. Una vez en el núcleo, la Lipina-1 evita la expresión de genes de la lipogénesis al inhibir la actividad transcripcional de SREBP-c (Peterson *et al.*, 2011). Además, en el hígado NOTCH estabiliza a mTORC1 promoviendo la lipogénesis vía SREBP-1c (Pajvani *et al.*, 2013). Sorprendentemente, la mutación de TCS2 en ratones evita el desarrollo de laesteatosis hepática de los animales (Yecies *et al.*, 2011). Este fenotipo parece que se debe a que mTORC1 es necesario para la señalización de la insulina por la vía la AKT. La insulina por medio de la AKT e independiente de la mTORC1, inhibe a INSIG2a, un inhibidor de la SREBP-1c, promoviendo la lipogénesis. Por lo tanto, al parecer existe un circuito de auto regulación

de la lipogénesis inducida por mTORC1 en el control de la lipogénesis y que requiere de la AKT (Engelking *et al.*, 2004; Yecies *et al.*, 2011). A pesar de ello, mTORC1 no se requiere para la inhibición de la gluconeogénesis vía la AKT, indicando que sólo en la lipogénesis mTORC1 y AKT actúan simultáneamente (Li *et al.*, 2010). Contrario a lo que sucede con mTORC1, la mutación en *Ricor*, que afecta la formación del complejo mTORC2, causa disminución en la expresión de los genes lipogénicos regulados por SREBP-1c, pero también provoca menor actividad de la AKT dando como resultado gluconeogénesis exacerbada en el hígado (Hagiwara *et al.*, 2012). Estos datos indican que tanto mTORC1 como mTORC2 podrían regular la lipogénesis utilizando a la AKT como intermediario, pero sólo mTORC2 puede regular la gluconeogénesis al estar río arriba de la AKT.

La regulación de la mTOR sobre el metabolismo no se limita a la lipogénesis. También la síntesis de proteínas es regulada positivamente por mTORC1. En condiciones basales el factor de iniciación de la traducción 4E (eIF4E) se encuentra unido a 4E-BP1 evitando su actividad. Una vez que 4E-BP1 es fosforilado por mTORC1 deja de interactuar con eIF4E, permitiendo que este último promueva la traducción de los mRNA que tienen Cap. Por su parte la regulación positiva de S6K1 por mTORC1 promueve la biogénesis de los mRNA y la traducción dependiente de Cap (Laplante and Sabatini, 2009). La síntesis de proteínas inducida por la mTOR podría estar regulada por la disponibilidad de aminoácidos, pues estos promueven la actividad de la mTOR (Laplante y Sabatini, 2009). Recientemente se encontró que la leucina regula positivamente a la mTORC1 mediante su conversión a acetil-CoA, permitiendo que la célula use a este aminoácido como un sensor de los niveles de los aminoácidos. El acetil-CoA producto de la degradación de la leucina sirve como sustrato para que la acetilasa EP300 acetile a Raptor, teniendo como consecuencia la activación de mTORC1 (Son *et al.*, 2019). A otro nivel, mTORC1 también puede regular positivamente el uso de los aminoácidos para producir energía por vías anapleróticas, pues promueve la degradación de la glutamina para obtener energía, y así se mantiene, por ejemplo, el crecimiento de células cancerosas. El mecanismo por el cual mTORC1 promueve la oxidación de glutamina es induciendo la actividad de la glutamato deshidrogenasa (GHD) (Csibi *et al.*, 2013), al regular negativamente la transcripción de la SIRT4, que a su vez regula negativamente a la GHD por ADP-riboadenilación (Haigis *et*

al., 2006). Este mecanismo permite a las células cancerosas crecer, al usar a la glutamina como fuente de carbono y de energía (Csibi *et al.*, 2013).

A nivel fisiológico la actividad de la mTOR tiene consecuencias importantes en los mamíferos. Se encontrado desregulada en múltiples tipos de cáncer promoviendo el metabolismo que permite a estas células sobrevivir y crecer (Pópulo *et al.*, 2012). En otros padecimientos, como la obesidad y la diabetes tipo II, la actividad de mTORC1 se encuentra incrementada (Catania *et al.*, 2011). En ratones el tratamiento con rapamicina incrementa la esperanza de vida, indicando que la mTOR tiene un rol determinante en la longevidad (Yajima *et al.*, 2016). En la extensión de la vida por medio de la restricción calórica también podría ser, en parte, consecuencia de la inhibición de la actividad de la mTOR. Igualmente la extensión de la esperanza de vida ocasionada por el α -cetoglutarato en el nematodo *C. elegans* se puede deber a la inhibición de la actividad de la mTOR (Chin *et al.*, 2014). Estas observaciones están de acuerdo al efecto positivo que tienen la dieta con bajo contenido de proteínas y la cetogénica en la longevidad que, en parte, se debe a menor actividad de la mTOR (Meidenbauer *et al.*, 2014; Solon-Biet *et al.*, 2014).

1.4.3 Regulación del metabolismo por los PPAR

El metabolismo, como se ha descrito, está regulado en múltiples niveles por la AMPK y la mTOR, sin embargo, existen otros reguladores importantes como son los receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR, por sus siglas en inglés). Los PPAR son una subfamilia de receptores nucleares. Se han descrito tres: PPAR α , PPAR δ (también conocido como PPAR β) y el PPAR γ . Los PPAR se componen de un dominio de unión a DNA y uno de regulación transcripcional en su extremo N-terminal, además cuentan con dominio de unión a ligando en el C-terminal. Para promover la expresión de genes, los PPARs requieren formar heterodímeros con el receptor X de retinoides (RXR, por sus siglas in inglés), complejo que se une a sus secuencias de DNA blanco. El PPAR α principalmente se expresa en el hígado y en el músculo y, en condiciones específicas, en el riñón y el tejido adiposo café, este último involucrado en la termogénesis en los mamíferos (Fedorenko *et al.*, 2012). Por su parte, el PPAR δ se expresa en el riñón, el

hígado y en el músculo, mientras que el PPAR γ se expresa abundantemente en el tejido adiposo, y en menores niveles en el hígado, el riñón y el hueso (Figura 10).

En el ratón la actividad del PPAR α es indispensable para inducir la oxidación de los lípidos durante el ayuno, pues los ratones *Ppar α ^{-/-}* ayunados muestran hipoglucemia, bajos niveles de cuerpos cetónicos y altos niveles de ácidos grasos libres en sangre (Kersten *et al.*, 1999; Leone *et al.*, 1999). PPAR α regula la oxidación de los ácidos grasos en el hígado y el corazón al promover la expresión de genes involucrados en la degradación de los ácidos grasos en la mitocondria, entre los que se encuentran la acil-CoA deshidrogenasa de la vía de la β -oxidación de ácidos los grasos y la carnitina palmitoiltransferasa I, esta última necesaria para el transporte de los ácidos grasos a la mitocondria (Leone *et al.*, 1999). La actividad del PPAR α no sólo se requiere para contender con la falta de nutrientes en el ayuno, también en una condición de exceso, como es la dieta alta en grasa, la ausencia de PPAR α causa acumulación masiva de grasa en los ratones. Además, la falta de PPAR α puede provocar obesidad, aunque hay datos contradictorios al respecto (Akiyama *et al.*, 2001; Costet *et al.*, 1998). De manera interesante la actividad del PPAR α en el hígado tiene efectos sistémicos sobre la inducción de la oxidación de los ácidos grasos a través del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21, por sus siglas en inglés). La síntesis de FGF21 es inducida por PPAR α en el hígado y secretado al torrente sanguíneo para que, a través de su receptor, estimule la lipólisis en el tejido adiposo y la síntesis de cuerpos cetónicos en el mismo hígado. Además, la función del PPAR α puede no solo estar limitada a la oxidación de los lípidos, sino también al mantenimiento general de la homeostasis de las grasas, ya que en ratones carentes de la FAS específicamente en el hígado desarrollan esteatosis hepática, hipoglucemia y tienen menores niveles de colesterol en la sangre, además menor expresión de los genes blanco del PPAR α . Los efectos de la ausencia de la FAS son revertidos por agonistas de PPAR α (Chakravarthy *et al.*, 2005), lo que indica la necesidad de la lipogénesis para la activación del PPAR α . Al respecto se determinó que la lipogénesis dependiente de FAS permite la síntesis de 1-palmitoil-2oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina (16:0/181-GPC), identificado como un ligando natural de PPAR α que induce su actividad (Chakravarthy *et al.*, 2009).

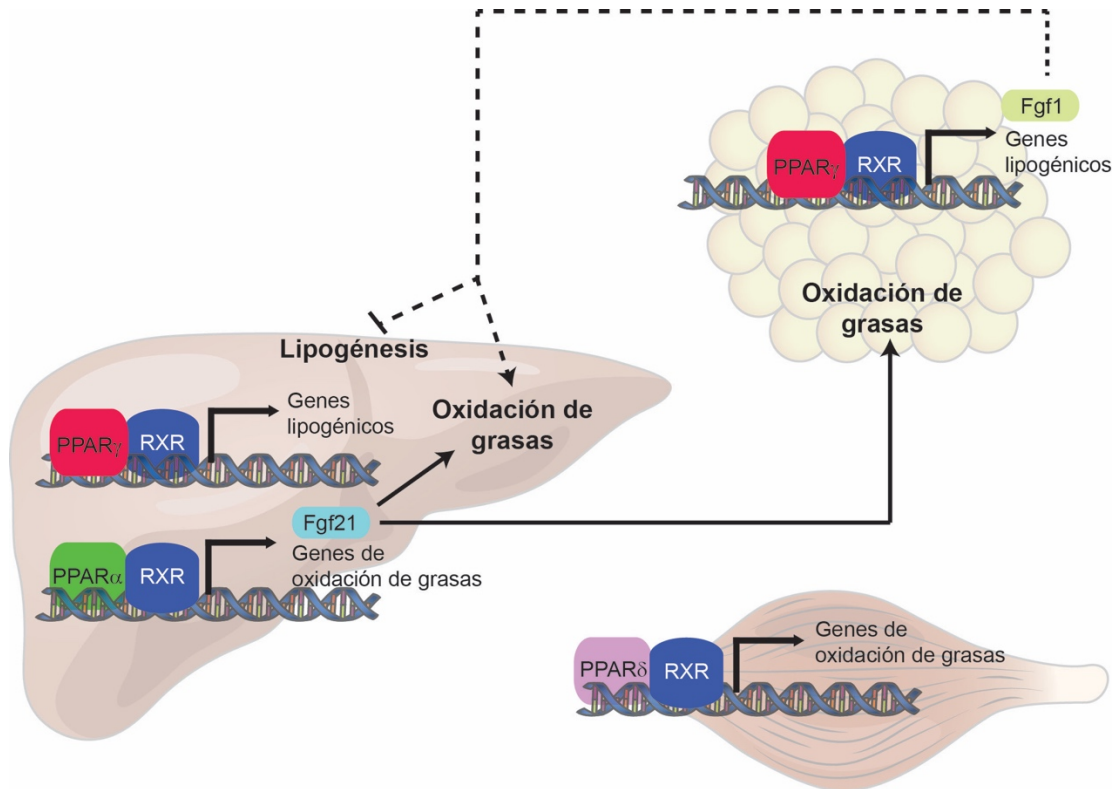


Figura 10. Regulación del metabolismo por los PPAR. Los PPAR regulan principalmente el metabolismo de los ácidos grasos en especial en el hígado, el tejido adiposo y el músculo, ayudando a mantener la homeostasis energética. En el hígado PPAR α promueve la oxidación de las grasas y PPAR γ su síntesis. En el tejido adiposo PPAR γ induce la lipogénesis y el mantenimiento y la diferenciación de los adipocitos. En el músculo la actividad transcripcional de PPAR δ induce la degradación de las grasas. FGF1 podría ser uno de los responsables de los efectos sistémicos de la actividad de PPAR γ en el tejido adiposo, similar a como lo hace PPAR α con FGF21 en el hígado.

El PPAR δ es el menos estudiado, pero no por tener menor importancia. En el ratón la inactivación del gen disminuye la actividad metabólica de los animales, determinado como respiración total, además de hacerlos intolerantes a la glucosa (Lee *et al.*, 2006). En sentido opuesto, su activación farmacológica en ratones *db/db*, roedores que por una mutación nula en el gen que codifica para el receptor de la leptina son obesos y resistentes a la insulina, mejora la sensibilidad a la insulina al promover la oxidación de los ácidos grasos y la glucólisis, en especial en el hígado (Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003). En ratones silvestres la activación de PPAR δ incrementa la formación de fibras tipo I del músculo, causando que los animales sean resistentes a la actividad física sin haber tenido un entrenamiento previo (Wang *et al.*, 2004). Este último fenómeno también sucede cuando se administran activadores de la AMPK, específicamente el AICAR, sugiriendo que

la AMPK está río arriba del PPAR δ (Narkar *et al.*, 2008). No obstante, algunos datos recientes indican que la acción de PPAR δ para incrementar la resistencia al ejercicio en ratones sedentarios es un resultado de la oxidación de las grasas y una disminución en el catabolismo de la glucosa, pues durante el ejercicio la activación de PPAR δ incrementa el tiempo en el que disminuye la glucemia por el ejercicio, además en ratones exhaustos por el ejercicio, en los que no se activa PPAR δ , la simple inyección de glucosa incrementa la resistencia al ejercicio, indicando que la formación de fibras musculares tipo I en la resistencia al ejercicio no es el único fenómeno relevante, y que también es el mantenimiento de los niveles de la glucosa (Fan *et al.*, 2017).

A diferencia de PPAR α y PPAR δ que promueven el catabolismo de las grasas, PPAR γ hace lo contrario, pues se encarga de inducir la lipogénesis y además es determinante para la formación, diferenciación y mantenimiento del tejido adiposo (Imai *et al.*, 2004; Sharma and Staels, 2007). La mutación nula de *Ppar γ* en el ratón es letal aproximadamente al día 10 del desarrollo embrionario (Barak *et al.*, 1999), demostrando su importancia en la fisiología del organismo. Se han descrito dos isoformas de PPAR γ : PPAR1 γ y PPAR2 γ , las cuales se originan del mismo gene y, aunque ambos se expresan en los mismos tejidos, *Ppar2 γ* se expresa principalmente en el tejido adiposo. Lo que podría explicar por qué la carencia de PPAR γ 2 no es letal para el ratón, pero su fenotipo es de menos acumulación de tejido adiposo blanco, pero sí desarrollan resistencia a la insulina (Zhang *et al.*, 2004). La mutación completa de *Ppar γ* en el tejido adiposo ha mostrado fenotipos diferentes. En un caso los ratones se protegen de la obesidad inducida por la dieta alta en grasa y de la hiperglucemia e intolerancia a la glucosa (Jones *et al.*, 2005). En el otro, si bien muestran lipodistrofia, desarrollan resistencia a la insulina y diabetes tipo II, además de esteatosis hepática y anomalías en los huesos (Wang *et al.*, 2013a). Los autores del segundo estudio asociaron la diferencia a la metodología utilizada para mutar *Ppar γ* exclusivamente en los adipocitos, que en el segundo caso parece ser más eficiente.

Aunque *Ppar γ* se expresa principalmente en el tejido adiposo bajo condiciones normales de alimentación, en el hígado también se expresa de manera importante en condiciones

en las que induce esteatosis hepática, por ejemplo, cuando los animales se alimentan con una dieta alta en grasa (Inoue *et al.*, 2005). De acuerdo con lo anterior, la ausencia de PPAR γ en el hígado evita la esteatosis hepática (Matsusue *et al.*, 2003), indicando que PPAR γ es necesario en el desarrollo de esta patología. Por otro lado, debido a que la ausencia de PPAR γ en el tejido adiposo puede causar esteatosis hepática (Wang *et al.*, 2013a) es posible que este factor transcripcional cause efectos sistémicos. Al respecto, uno de los efectores sistémicos de la actividad de PPAR γ en el tejido adiposo podría ser FGF1, que es inducido por PPAR γ . Los ratones con alelos nulos de *Fgf1* desarrollan esteatosis hepática, intolerancia a la glucosa y diabetes (Jonker *et al.*, 2012), indicando que la actividad de PPAR γ en el tejido adiposo afecta a todo el organismo, probablemente a través de FGF1.

A otro nivel, a pesar de que PPAR γ incrementa la lipogénesis, su actividad también es necesaria para regular la sensibilidad a la insulina, pues las tiazolidinedionas, agonistas de PPAR γ , que se utilizan en el tratamiento de la diabetes tipo II, mejoran la sensibilidad a la insulina, posiblemente al promover el transporte y almacenamiento de los lípidos en el tejido adiposo. Aunque no está claro, se propone que la sensibilidad a la insulina que inducen las tiazolidinedionas en otros órganos y tejidos como el hígado y el músculo, es por efectos endocrinos del tejido adiposo (Hauner, 2002). Los ratones que carecen de *Ppar γ* en el hígado pero que tienen tejido adiposo desarrollan resistencia a la insulina, lo que indica que PPAR γ del hígado es necesario para regular la sensibilidad de la insulina en otros tejidos (Gavrilova *et al.*, 2003). Igual a como sucede con PPAR α , los ligandos de PPAR γ parece que se producen *in vivo* por un mecanismo dependiente de la lipogénesis, pues la ausencia de la FAS provoca menor actividad de PPAR γ en células (Lodhi *et al.*, 2012).

1.4.4 La autofagia y su importancia en el metabolismo y el envejecimiento

Además de los reguladores del metabolismo mencionados, otros procesos más complejos a nivel celular podrían ejercer una regulación determinante. La autofagia, en particular, es un proceso catabólico conservado en las células eucariontas. Inicialmente fue descubierto en la levadura, en donde es indispensable para la supervivencia en circunstancias de falta

de nutrientes. La autofagia se caracteriza por tener la capacidad de degradar componentes completos del citoplasma como complejos celulares, los peroxisomas, las mitocondrias, bacterias, entre otros. A diferencia de la actividad del proteosoma, la autofagia permite obtener energía y nutrientes a partir de la propia célula, que además permite regular la abundancia de orgánulos y complejos proteicos (Figura 11). Se han descrito tres tipos de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia a través de chaperonas. En general cuando se habla de autofagia se refiere a la macroautofagia, que es la más común. La autofagia se caracteriza por formar vesículas de doble membrana conocidas como autofagosomas. Durante la formación de los autofagosomas engullen los componentes celulares que se degradarán por esta vía. Una vez que forman los autofagosomas estos se fusionan con los lisosomas, degradando así los componentes que lleva dentro.

Para que la autofagia se lleve a cabo requiere de la actividad de una gran cantidad de complejos proteicos. En general, la autofagia inicia cuando, por falta de nutrientes, la mTOR se inhibe por acción de la AMPK (Figura 12). Mientras la mTOR se encuentra activa, mantiene la inhibición de las proteínas ATG13L y UKL1/2a mediante fosforilación. Una vez que la mTOR se inhibe se activan la ATG13L y la UKL1/2a permitiendo la formación del complejo ULK1/2-Atg13-FIP200, lo que inicia la formación del fagóforo. El fagóforo es un complejo de proteínas y membranas lipídicas que da origen al autofagosoma. Entre las proteínas que lo componen se encuentran la proteína transmembranal VMP1, la ATG9 y la proteína TP53INP2. Una vez formado el fagóforo, inicia el proceso de elongación del autofagosoma para lo cual se reclutan una serie de proteínas que incluyen, entre las más importantes, el LC3. Para que LC3 forme parte de los autofagosomas requiere de modificaciones postraduccionales catalizadas por la familia de proteínas ATGs. En primera instancia el precursor de LC3 es activado por un corte proteolítico catalizado por la ATG4, dando origen a LC3-I. LC3-I es posteriormente lipidado por un sistema tipo ubiquitina. El mecanismo de lipidación de LC3-I inicia cuando LC3-I se activa con ATG7 (similar a una E1 ligasa), formándose el complejo LC3-I-ATG7 unidos por un enlace tiol-éster. Posteriormente, mediante la actividad de ATG3 (similar a una E-2 ligasa), se forma el intermediario LC3-I-ATG3. Finalmente del complejo LC3-I/ATG3 se reemplaza ATG3 por una fosfatidiletalona (PE), reacción que es catalizada por el complejo ATG12-ATG5-ATG16 (similar a una E-3 ligasa), dando como resultado a el LC3-I lipidado al que se le

denominada LC3-II, que entonces ya puede formar parte de los autofagosomas (Tanida *et al.*, 2004).

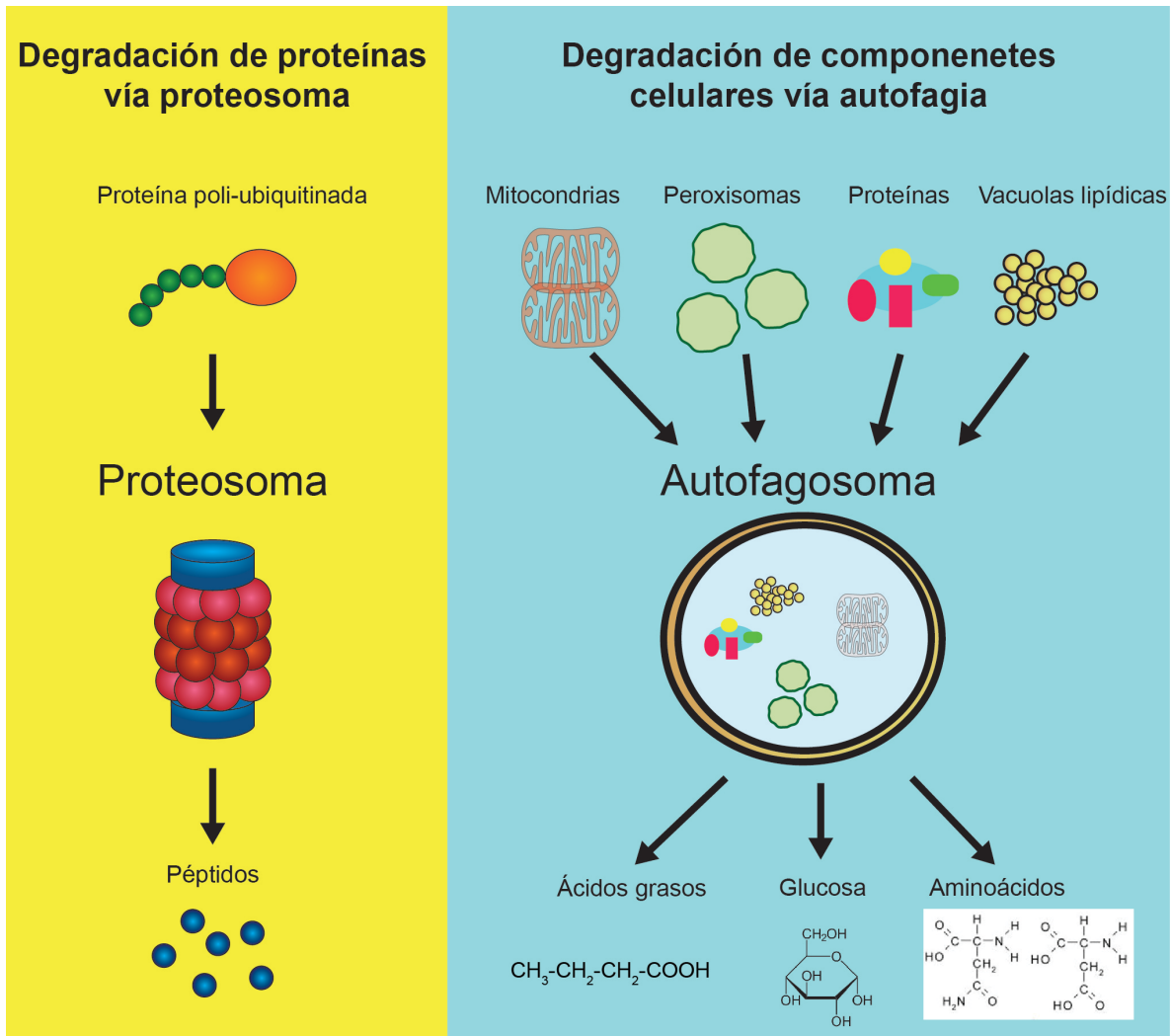


Figura 11. Mecanismos de degradación de las proteínas y los componentes celulares vía el proteosoma y la autofagia. El proteosoma permite a la célula degradar proteínas poli-ubiquitinadas con lo que se obtienen péptidos que después la célula degrada a aminoácidos. Por su parte la autofagia tiene la función de degradar una amplia variedad de componentes celulares, desde complejos protéicos, hasta los orgánulos como las mitocondrias o los peroxisomas, incluidas las vacuolas lipídicas (lipid droplets, en inglés), permitiéndole a la célula para obtener energía, aminoácidos, glucosa y ácidos grasos.

LC3-II, además de ser necesario para la formación y elongación del autofagosoma, también funciona como una proteína adaptadora para reclutar los componentes celulares que se degradan por la autofagia. Para ello se une a proteínas como p62 (también conocida como SQSTM1), la cual a su vez interacciona no covalentemente con proteínas

poli-ubiquitinadas y otros componentes para su degradación. La interacción LC3-II-p62 permite reclutar, durante la formación del autofagosoma, los componentes específicos que se degradan por la autofagia. Una vez formado el autofagosoma y con los componentes que se degradarán dentro de él, éste se fusiona con los lisosomas para degradar los componentes que lleva dentro. LC3-II se puede reciclar para participar en la formación de más autofagosomas, mientras que p62 se degrada junto con los componentes que acarrea. Las isoformas y distribución de LC3 y la cantidad de p62 son usados como marcadores de la autofagia, ya que mientras LC3-II se suele acumular durante la autofagia, p62 disminuye (Figura 12).

Por sus características, la autofagia tiene un papel esencial para los organismos, sobre todo en situaciones de falta de alimento. Por ejemplo, en levaduras con mutaciones en los genes que codifican para los componentes requeridos para la autofagia mueren en condiciones de ausencia de alimento (Tsukada y Ohsumi, 1993). En ratones el ayuno induce autofagia en la mayoría de los tejidos (Noboru Mizushima *et al.*, 2003) al igual que el tratamiento con rapamicina (Takeuchi *et al.*, 2005; Tanemura *et al.*, 2012) indicando la importancia de este proceso para el organismo en general. Lo anterior coincide con el hecho de que en ratones neonatos deficientes de ATG5 y ATG7, ambas proteínas necesarias para la formación de los autofagosomas, son susceptibles a morir por inanición (Kuma *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2009b).

Durante el ayuno la síntesis de los cuerpos cetónicos es necesaria para proveer de energía a otros órganos como el cerebro. La ausencia específica de la autofagia en el hígado y en el riñón causa una disminución de los niveles de cuerpos cetónicos en la sangre, demostrando que este proceso es necesario para la producción de estos metabolitos (Takagi *et al.*, 2016a). En el ayuno, al parecer, la autofagia es necesaria para formación y acumulación de vacuolas lipídicas (lipid dropets en inglés) en el hígado (Li *et al.*, 2018), aunque algunos datos previamente muestran que las vacuolas lipídicas se acumulan al inhibirse la autofagia (Singh *et al.*, 2009). En relación con lo anterior, en ratones la falta de ATG7 en el tejido adiposo causa aumento en la oxidación de las grasas y por ello su disminución. Este fenómeno vuelve a los animales resistentes al desarrollo de la resistencia a la insulina y obesidad por la alimentación con una dieta alta en grasa (Zhang

et al., 2009b). Sin embargo, la falta de ATG7 en el hígado causa resistencia a la insulina (Yang *et al.*, 2010) y, en sentido opuesto, el incremento de la autofagia en un modelo de acumulación de grasa promueve la fosforilación oxidativa y la degradación de las grasas, disminuyendo su acumulación y mejorando la salud del animal (Farah *et al.*, 2016). Por lo tanto, al parecer la autofagia tiene un papel dual en el metabolismo y en la homeostasis de los lípidos, pudiendo ser benéfico o perjudicial dependiente de la condición y del tejido del que se trate.

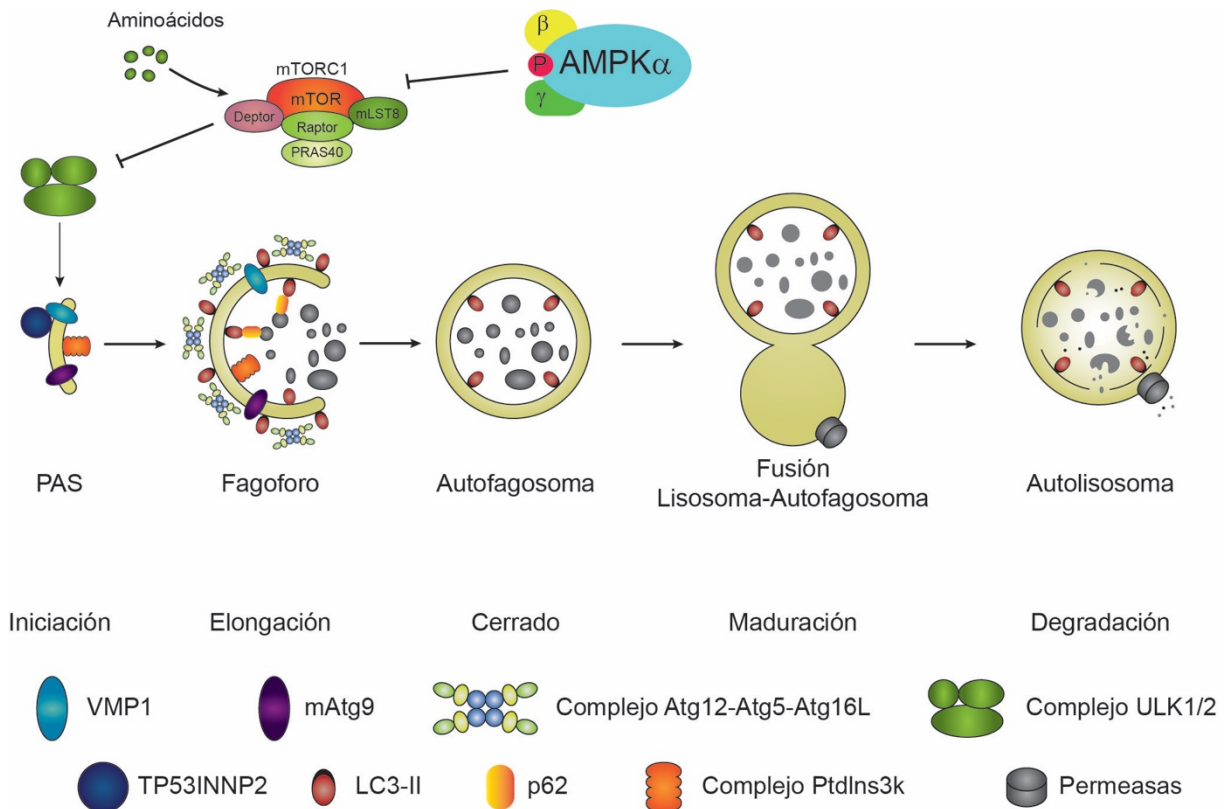


Figura 12. Mecanismo de formación del autofagosoma. Una vez que el complejo ULK1/2 deja de ser reprimido por la mTOR, se induce la formación del fagóforo y posteriormente, mediante el reclutamiento de proteínas ancladas o en complejo con otras, se inicia la elongación del autofagosoma a partir del fagóforo, engullendo al mismo tiempo los componentes celulares que se degradarán. Una vez formado el autofagosoma se fusiona a los lisosomas para finalmente degradar los componentes que lleva dentro. Modificado de: (Zhifen Yang and Lifecript, 2010)

Por la importancia en la regulación del metabolismo, la autofagia puede ser un proceso importante durante el envejecimiento. Al respecto en *C. elegans* el incremento de la longevidad inducida por la restricción calórica o por la inhibición de la mTOR se cancela con la inhibición de la autofagia (Hansen *et al.*, 2008). En el ratón la sobre-expresión de

Atg5 extiende la longevidad de los animales, además de retrasar las características típicas del envejecimiento (Pyo *et al.*, 2013). En sentido contrario, la falta de la AMPK en el músculo causa una disminución de la autofagia reduciendo la capacidad funcional de este tejido, lo que correlaciona con daño en las mitocondrias y una acumulación de proteínas que normalmente se degradan por la autofagia, exacerbando los defectos típicos del envejecimiento en este tejido (Bujak *et al.*, 2015). Lo anterior coincide con el hecho de que los efectos benéficos del ayuno intermitente en el envejecimiento se ven contrarrestados por la ausencia de la autofagia (Martinez-Lopez *et al.*, 2017).

A pesar de las evidencias sobre el efecto positivo de la autofagia en el retraso del envejecimiento, los ratones con alelos nulos de *Zmpste24*, un modelo de envejecimiento acelerado, hay un incremento de la autofagia que, además, se asocia con un incremento en la actividad de la mTOR (Mariño *et al.*, 2008). Al respecto, en un estudio reciente se encontró que en *C. elegans* el incremento de la autofagia en los gusanos nulos para *sgk1* disminuye la esperanza de vida. *sgk1* es un regulador metabólico río debajo de la mTORC2. Los nematodos con *sgk1* no funcional tienen incrementada la permeabilidad mitocondrial, causando la autofagia, que al inhibirla reestablece la esperanza de vida normal de estos organismos (Zhou *et al.*, 2019). Por lo tanto, similar a lo que sucede con la regulación del metabolismo de los lípidos, en el envejecimiento y la longevidad, la autofagia puede tener un efecto diferente dependiendo de las circunstancias.

1.5 Efecto de la ausencia de la catalasa en la alimentación con una dieta alta en grasas

Las evidencias de la participación del metabolismo y las ROS en el proceso de envejecimiento y la longevidad, así como las observaciones experimentales en las que se ha estudiado la pérdida o ganancia de función de diferentes enzimas antioxidantes en una amplia variedad de modelos *in vivo*, incluido el ratón, permite proponer que existe una relación directa entre el metabolismo y las ROS. Esta relación puede ser determinante en el envejecimiento y la longevidad (Figura 13). Por lo tanto, estudiar condiciones en las que ambos estén presentes podría ayudar al conocimiento y al entendimiento de la biología del envejecimiento y la longevidad. Para lograr este propósito, el presente proyecto hizo

uso de un modelo de ratón que carece de la enzima antioxidante catalasa ($Cat^{-/-}$) y que se sometió a distintas condiciones que afectan el metabolismo.

El fenotipo de los ratones $Cat^{-/-}$ resulta interesante, pues los roedores son viables y no presentan un fenotipo aparente. Además, contrario a lo esperado, no se encontró incremento en el daño oxidante a los lípidos y a las proteínas en los distintos órganos y tejidos probados (Cuevas-Benítez, 2007). Sin embargo, en condiciones de alimentación con una dieta alta en grasa (HFD, por sus siglas en inglés), que induce obesidad, los ratones $Cat^{-/-}$ ganan peso en la misma magnitud que los ratones silvestres, pero no desarrollan hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, ni acumulan grasas o daño oxidante en el hígado en el mismo grado que los ratones silvestres (Pérez-Estrada, 2010). Estos datos indican que es posible que la ausencia de la catalasa cause alteraciones metabólicas que sólo se pueden evidenciar en condiciones metabólicas adversas, situaciones que pueden estar presentes y ser determinantes en el envejecimiento y la longevidad. En el presente proyecto se buscó caracterizar e identificar las alteraciones metabólicas que acompañan al envejecimiento en ausencia de la catalasa, así como en condiciones metabólicas adversas como el ayuno y la alimentación con una HFD. Esto con el fin de identificar los mecanismos moleculares que expliquen el fenotipo observado y así aportar un mayor conocimiento para el entendimiento del envejecimiento y su relación con el metabolismo y las ROS (Figura 13). Los datos que se obtengan también podrían ayudar a entender el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes tipo II.

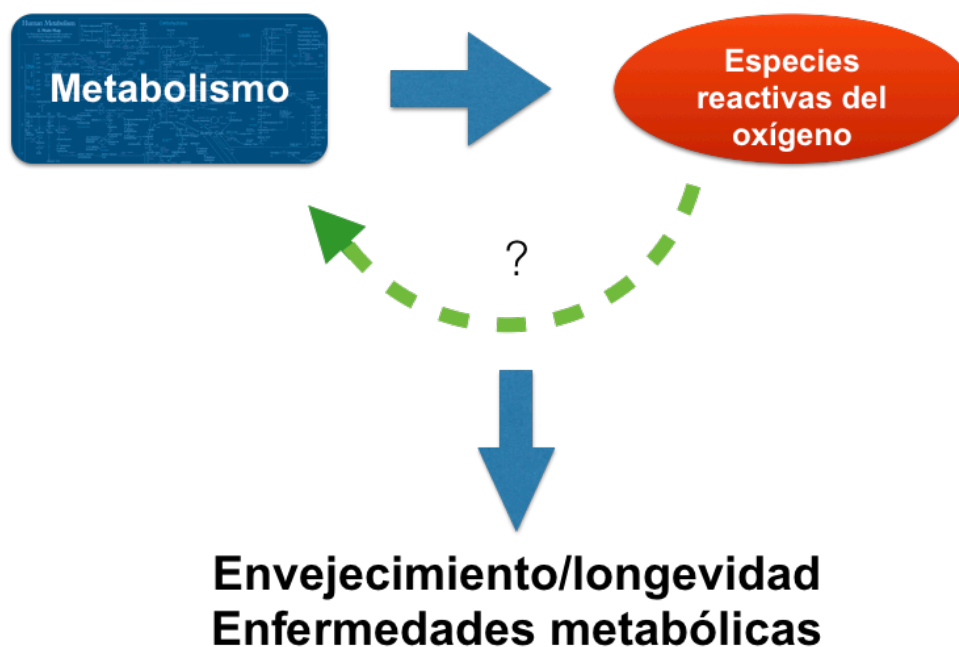


Figura 13. La relación metabolismo/ROSson es determinante para el envejecimiento y la longevidad. La actividad metabólica produce ROS, moléculas que a su vez regulan al metabolismo. Esta relación es determinante en el proceso de envejecimiento y la longevidad, así como el desarrollo de enfermedades metabólicas.

2 HIPÓTESIS

La ausencia de la catalasa causa cambios en la concentración del peróxido de hidrógeno en las células alterando el proceso del envejecimiento, la longevidad y la actividad metabólica del hígado.

3 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el mecanismo por el cual la ausencia de la catalasa altera el metabolismo del hígado y afecta los procesos de envejecimiento y/o longevidad en ratones.

4 OBJETIVOS PARTICULARES

- A. Determinar los efectos de la ausencia de la catalasa en el envejecimiento y la longevidad.
- B. Determinar los cambios metabólicos causados por la ausencia de la catalasa en el hígado en el envejecimiento, el ayuno y la alimentación con una dieta alta en grasa.
- C. Explorar los posibles mecanismos por los cuales la ausencia de la catalasa repercute en alteraciones metabólicas y en los procesos de envejecimiento y/o longevidad.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Línea de ratones mutantes en catalasa ($Cat^{-/-}$)

La línea de los ratones mutantes en la catalasa ($Cat^{-/-}$) se generó previamente en el laboratorio (Hernández-García, 2009) en células ESC derivadas de la cepa 129/Sv. La mutación se transfirió al fondo genético de la cepa C57BL/6JN (Pérez-Estrada, 2010) mediante cruces sucesivas por al menos 10 generaciones con ratones silvestres de la cepa C57BL/6JN obtenidos de los Jackson Laboratories para los posteriores estudios fenotípicos. El genotipo de los animales se determinó por dos métodos: 1) la descomposición del peróxido de H_2O_2 y 2) por la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Ambos métodos se describen en detalle en el Anexo I.

5.2 Mantenimiento de los ratones y diseños experimentales.

Los ratones se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Biotecnología/UNAM, libres de patógenos y en condiciones estándares de temperatura (entre 20 – 25 °C) y humedad (humedad relativa del 40 – 70%) con ciclo luz/obscuridad de 12 horas. Para todos los experimentos solo se utilizaron ratones macho de la edad especificada en cada caso. El sacrificio de los animales se realizó mediante dislocación cervical. Todos los procedimientos *in vivo* se aprobaron por el comité de bioética institucional (Proyecto 260, “Ratones transgénicos modelo de enfermedades prevalentes en México”).

5.2.1 Supervivencia de los ratones adultos

Para la determinación de la supervivencia de los ratones, se hicieron grupos de 28, 30 y 31 individuos de los genotipos $Cat^{+/+}$, $Cat^{+/-}$ y $Cat^{-/-}$, respectivamente. Los animales se mantuvieron en cajas de plástico en grupos de entre 2 y 3 individuos. Los ratones se alimentaron *ad libitum* con una dieta estándar (2018SX, Envigo, Indianapolis, IN, USA) y libre acceso al agua. Para mayor detalle de la composición de las dietas ver el Anexo II. De todos los animales se documentó la fecha de nacimiento y la fecha de muerte. Algunos de los animales desarrollaron dermatitis, úlceras en la piel que son comunes en los ratones de la cepa C57BL/6JN (Hampton *et al.*, 2012), por lo que estos animales se sacrificaron, evitando así sufrimiento innecesario.

5.2.2 Determinación de la actividad motora en ratones viejos

La actividad motora de los animales se determinó en individuos de 12 y 24 meses de edad utilizando el equipo Photobeam Activity System (San Diego Instruments Inc., San Diego, CA, USA). Para realizar la determinación, los ratones se alojaron en cajas de plástico de 11.75" (A) x 18.75" (L) de manera individual durante 24 horas. Esta maniobra les permitió adaptarse al nuevo ambiente. Posterior al tiempo de adaptación se inició el registro de la actividad durante 24 horas. El equipo cuenta con una serie de rayos láser localizados en el eje X y Y de la caja, y en lado opuesto un sensor de luz. Este arreglo permite que se forme una cuadrícula de rayos de luz en el área de la jaula. Con el paso del animal se interrumpen los haces de luz que son registrados por el sensor, logrando así conocer la trayectoria que sigue el animal. Si el animal interrumpió consecutivamente rayos de luz adyacentes se definió como **actividad ambulatoria**, mientras que si interrumpió el mismo haz de luz consecutivamente se definió como **actividad fina**. Los registros de la actividad se realizaron con software PAS Home Cage software (San Diego Instruments Inc, San Diego, CA, USA) cada 5 minutos durante 24 horas y la actividad total fue la suma de la actividad ambulatoria y la fina.

5.2.3 Alimentación con la dieta alta en grasa y ayuno.

De cruces entre ratones $Cat^{+/-}$ y $Cat^{+/-}$ se seleccionaron los ratones machos con el genotipo $Cat^{+/+}$ y $Cat^{+/-}$. Posterior al destete los ratones se albergaron en jaulas en grupos de entre tres y dos individuos. Los roedores se alimentaron *ad libitum* con la dieta estándar (1218SX, Envigo, Indianapolis, IN, USA) hasta la edad de 3 meses. Las ratonas hembra se utilizaron para mantener la colonia.

A los 3 meses de edad, los ratones seleccionados para los grupos experimentales se albergaron en jaulas individuales y se alimentaron con una dieta control (10% de calorías provenientes de la grasa; D1245B, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) o con una dieta alta en grasa (HFD; 60% de calorías provenientes de la grasa; D12492, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA). Los tiempos de alimentación fueron de 15 días o tres meses según el grupo experimental. Para mayor detalle de la composición de las dietas ver el Anexo II.

Para el ayuno se utilizaron ratones de tres meses edad que durante toda su vida se alimentaron con la dieta estándar. Previo al ayuno, los ratones se albergaron en jaulas individuales durante 24 horas para su adaptación. Para iniciar el ayuno primero los animales se transfirieron a jaulas limpias, con su respectivo bebedero de agua. Esta maniobra evitó que por la falta del alimento los animales se vieran obligados a consumir posibles restos de alimento o incluso sus heces. El ayuno inició a las 7:00 horas y a las 24 horas o 48 horas posteriores los ratones se sacrificaron. De los animales se disecaron los órganos de interés y se almacenaron en un ultra-congelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la condición realimentada los ratones se alimentaron por 12 horas después de las 24 horas de ayuno y se sacrificaron. Para mayor detalle de la composición de las dietas ver el Anexo II.

5.2.4 Supervivencia y ayuno de ratones neonatos

Para asegurar obtener los ratones neonatos con el genotipo deseado se hicieron cruces entre los ratones silvestres o los ratones *Cat^{-/-}*. A los 19 días post coito las ratonas preñadas se sacrificaron por dislocación cervical. Los neonatos se obtuvieron por cesárea; sólo los ratones neonatos que lograron respirar se consideraron para los experimentos. Para facilitar la respiración se hicieron masajes muy suaves en la panza de los animales, hasta lograr ver que el ratón respirara. Los neonatos se mantuvieron en una cámara humidificada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la supervivencia se monitoreó constantemente. Se consideró que un ratón ya estaba muerto cuando su tono de piel cambio de un rosa intenso a un rosa pálido. En ese momento el ratón se sacrificó por decapitación y se disecaron los órganos de interés. Otro grupo de ratonas preñadas se dejó que tuvieran sus crías de manera natural y que las alimentaran durante 12 horas; posterior a este tiempo las crías se transfirieron a una cámara humidificada y se monitoreo su supervivencia. Los ratones neonatos destinados para experimentos de distintos tiempos de ayuno se obtuvieron por cesárea y se sacrificaron a los tiempos indicados (0, 2, 4, 6 y 12 horas de ayuno).

5.2.5 Determinación de la activación de la AKT *in vivo*

Ratones de 2 meses de edad alimentados con la dieta estándar durante toda su vida, se ayunaron durante 12 horas, iniciando el ayuno a partir de las 19:00 horas. A la mañana siguiente los ratones se inyectaron con insulina a una dosis de 3 U/kg o sólo con solución

salina fisiológica. 30 minutos posteriores a la inyección los ratones se sacrificaron y se disecó el hígado, el cual se congeló para su posterior análisis por inmunodetección.

5.3 Rayos X de ratones

Los ratones se anestesiaron utilizando 1% de isoflurano intranasal (Sofloran Vet, PiSA Agropecuaria, Guadalajara, JAL, México). Las radiografías de rayos X se obtuvieron en un campo de 15 cm² y una apertura f/stop de 2.8 y un tiempo de adquisición de 5 segundos utilizando un filtro de 0.4 mm y el sistema Multimodal Animal Rotation System (MARS) en el equipo In-vivo Xtreme instrument (Bruker, Germany).

5.4 Análisis de química sanguínea

Los niveles de la glucosa y los cuerpos cetónicos se midieron directamente en la sangre obtenida por un pequeño corte de la punta de la cola de los ratones adultos. Para los ratones neonatos la muestra se obtuvo de una punción cardiaca que hizo inmediatamente después del sacrificio. Para la glucosa se utilizó el glucómetro Ascencia Countour (Bayer, Japan) y para los cuerpos cetónicos el medidor de glucosa/cetonas FreeStyle (Abbot, Maidenhead, UK). El resto de las determinaciones se midieron en el suero. Para obtener el suero, inmediatamente después del sacrificio se recolectó la mayor cantidad de sangre posible mediante punción cardiaca. La muestra de la sangre se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la muestra se centrifugó a 2,000 g por 10 minutos y el sobrenadante (suero) se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -30 °C hasta su uso. El suero se utilizó en la determinación de la insulina, de los triacilglicéridos y del colesterol. Para la determinación de la insulina se utilizó el kit Ultra-Sensitive Mouse Insulin ELISA kit siguiendo las indicaciones del fabricante (Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA) con el apoyo del laboratorio de la Dra. Patricia Joseph (IBT/UNAM). Para la determinación de los triacilglicéridos y el colesterol se utilizaron los reactivos de Biosystem (Costa Brava, Barcelona, España) siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo III.

5.5 Determinación del contenido de los dienos conjugados, el colesterol total y los triacilglicéridos del hígado.

Primero se homogeizaron 50 mg de tejido en 1 ml de PBS utilizando un homogeneizador con pistilo. Al homogeneizado se le agregaron 4 ml del reactivo de Folch y se mezcló perfectamente utilizando un Vortex. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3,000 g por 10 minutos. La fase orgánica (fase inferior) se transfirió a un tubo de cristal y se evaporó a 37 °C por toda la noche en una campana de extracción. El precipitado se re-suspendió en 500 µl de 1% de desoxicolato de sodio para posteriormente determinar la cantidad de colesterol y de triacilgliceridos utilizando los reactivos de BioSystem (Costa Brava, Barcelona, España). El mismo procedimiento se siguió para los dienos conjugados con la diferencia de que el precipitado se re-suspendió en ciclohexano y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 240 nm utilizando como blanco ciclohexano. Para mayor detalle de ambas técnicas consultar el Anexo IV.

5.6 Determinación de contenido de glucógeno del hígado

Entre 40 y 100 mg de hígado se colocaron en un tubo con 100 µl de 30% KOH y se incubaron a 100 °C durante 30 min. El homogeneizado obtenido se enfrió a temperatura ambiente, se le agregaron 100 µl de una solución de Na₂SO₄ al 20% para neutralizar la mezcla y se mezcló por inversión. Posteriormente se agregó 1 ml de etanol 96° a la mezcla. La mezcla se incubó por 6 horas a -20 °C y se centrifugó por 10 minutos a 3,000 g. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado (glucógeno) se re-suspendió en 500 µl de acetato de sodio 0.2 M pH 4.8 y se le agregaron 5 unidades de amiloglucosidasa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). La solución se incubó durante 8 horas a 55 °C. Finalmente, la cantidad de glucosa se midió utilizando el reactivo para la determinación de la glucosa de BioSystem (Costa Brava, Barcelona, España). Para mayor detalle de la técnica consultar el anexo V.

5.7 Determinación de la actividad de la catalasa

La actividad de la catalasa se determinó por dos métodos: gel de actividad de la catalasa y determinación por método espectrofotométrico. Para ambos casos se utilizó un extracto de proteínas del hígado el cual se preparó utilizando un homogeneizador con pistilo en

una solución de lisis para actividad de catalasa; el contenido total de proteína se determinó utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). En el gel, la actividad de la catalasa se detectó por la ausencia del precipitado de azul de prusiana, que se forma por la reacción de oxidación del ferrocianuro de potasio y el cloruro férrico en presencia de H_2O_2 , mientras en el método espectrofotométrico se determina la cinética de degradación del H_2O_2 por la catalasa presente en la muestra. Ambos métodos se realizaron de acuerdo a protocolos previamente publicados y con algunos cambios (Weydert and Cullen, 2009). Para mayor detalle ver Anexo VI.

5.8 Histología del hígado

El hígado se cortó en pequeños cubos de aproximadamente 3 mm de cada lado. El tejido se fijó durante toda la noche en una solución de paraformaldehído al 4% preparada en PBS. Una vez fijados, los fragmentos de tejido se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% por 12 horas. Posteriormente los tejidos se embebieron en Tissue-Tek (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) y se congelaron en hielo seco y se montaron para cortes en criostato (CM1850, Leica, Nussloch, Germany). Los cortes histológicos se realizaron de un espesor de 10 μm y se montaron en portaobjetos pre-tratados con gelatina. Para determinación de la acumulación de las grasas neutras, los cortes se tiñeron con rojo oleoso y se contra tiñeron con hematoxilina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (Anexo VII). Para determinar la actividad de la β -galactosidasa los cortes se tiñeron utilizando el reactivo Beta-Galactosidase Tissue Stain Base Solution (Merk-Millipore, Darmstadt, Germany) y contra tiñeron con eosina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (Anexo VIII). Las imágenes de los cortes teñidos se obtuvieron en campo claro con el microscopio Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) y la cámara C-5050 (Olympus, Tokyo, Japan). Las imágenes de la β -galactosidasa-eosina se cuantificaron utilizando el software ImageJ utilizando la convolución que corresponde a “hematoxilina” lo que permitió obtener imágenes correspondientes a cada capa. La imagen que correspondió a la capa de la “hematoxilina” se convirtió en un formato de 8 bits para realizar un análisis de partículas, obteniendo así la cuenta de puntos azules, tamaño medio de cada punto y total de área azul. El resultado por individuo correspondió al promedio obtenido del análisis de tres imágenes representativas.

5.9 Detección de las proteínas específicas por inmunodetección

Las soluciones y el procedimiento detallado se realizaron de acuerdo con el Anexo IX. Los extractos de proteínas de hígado se obtuvieron en una solución de lisis RIPA. Las proteínas del extracto se separaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10% para posteriormente ser transferidas a una membrana de PVDF Immobilon-FL (Merk-Millipore, Darmstadt, Germany). Las membranas se bloquearon con la solución de bloqueo Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario que reconoce la proteína de interés a detectar (Ver anexo X). Después de la incubación con el anticuerpo primario se hicieron 3 lavados de TBST a la membrana para posteriormente incubarse por 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos fluorescentes anti-ratón o anti-conejo (emisión a 689 o 778 nm; LI-COR Biosciences, Lincor, NE, USA). Subsiguientemente las membranas se lavaron y se visualizaron las bandas de la proteína de interés con el escáner Odyssey Classic Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Solo en el caso de la detección de LC3 se utilizó SDS-PAGE del 20% y el lisado de las proteínas se realizó en solución de lisis RIPA con 1% de SDS. La determinación de las proteínas carboniladas se realizó mediante un procedimiento similar al anterior, solo que las proteínas del lisado previo a la separación en SDS-PAGE se derivaron en 2,4-dinitrofenirhidrazona (DNP-hidrazona) y el anticuerpo primario que se utilizó fue el anti-DNP (Merk-Millipore, Darmstadt, Germany). La cuantificación de las bandas se realizó por densitometría utilizando el software ImageJ (versión 2.0.0). Para mayor detalle de los anticuerpos utilizados ver el Anexo X.

5.10 Análisis de la expresión por RT-qPCR

El RNA total se extrajo del hígado utilizando el reactivo RiboEx (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea) de acuerdo con el Anexo XI. El RNA obtenido se utilizó como templado para la síntesis de cDNA utilizando la enzima AML reverso transcriptasa HyperScrip (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea) y oligonucleótidos aleatorios (Invitrogen, US) (Ver anexo XII). Para la reacción de PCR cuantitativa se utilizó el reactivo SYBR Green mix (KAPA Biosystems, Cape Town, South África) y el equipo Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagene, Germantown, MD, USA) utilizando como control interno la expresión del gene *Rplp0* (Ver

anexo XII). Finalmente, los datos se analizaron por el método del $\Delta\Delta\text{CT}$. Para mayor detalle de los oligonucleótidos utilizados revisar el Anexo XIV.

5.11 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se hicieron utilizando el software Prism versión 5.0b (La Jolla, CA, US). Para el análisis de supervivencia se utilizó la prueba estadística Long-Rank. Para el resto de los análisis se utilizó el análisis de varianza de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni con un valor mínimo de significancia $p < 0.05$ (*0.05, **0.01, ***0.001); el tamaño de la muestra se indica en cada gráfica. Todas las gráficas muestran el promedio \pm desviación estándar.

6 RESULTADOS

6.1 La ausencia de la catalasa disminuye la supervivencia sin promover envejecimiento prematuro.

De acuerdo en la teoría del envejecimiento debida al estrés oxidante, la ausencia de la catalasa podría disminuir la longevidad y causar envejecimiento prematuro de los ratones $Cat^{-/-}$, por lo que se determinó su supervivencia en condiciones normales de alimentación *ad libitum* con una dieta estándar (ver Anexo II). Se encontró que los ratones $Cat^{-/-}$ tuvieron una vida media de supervivencia de 15 meses, dato menor a lo que se observó en los ratones silvestres con el mismo fondo genético, que fue de 24.3 meses (i.e., de la cepa C57BL/6JN; Figura 14A). Si bien la vida media de supervivencia de los ratones $Cat^{+/-}$ también fue menor que en los silvestres (22.3 meses), el resultado no fue estadísticamente significativo. A pesar de la disminución de la vida media de supervivencia de los ratones $Cat^{-/-}$, no se observaron cambios en el estado de salud o comportamiento que permitiera predecir la muerte del animal. Algunos de los ratones independientemente del genotipo, desarrollaron úlceras en la piel que comúnmente progresaron hasta volverse muy graves (50% de ratones $Cat^{+/+}$, 36% de ratones $Cat^{+/-}$ y 45% de ratones $Cat^{-/-}$), por lo que éstos se sacrificaron para evitar sufrimiento innecesario. A pesar de lo anterior, se mantuvo la observación de que la ausencia de la catalasa provocó un acortamiento de la vida media de los animales (Figura 14B). Se ha descrito que el padecimiento de la piel es común en los ratones de la cepa C57BL/6JN (Hampton *et al.*, 2012).

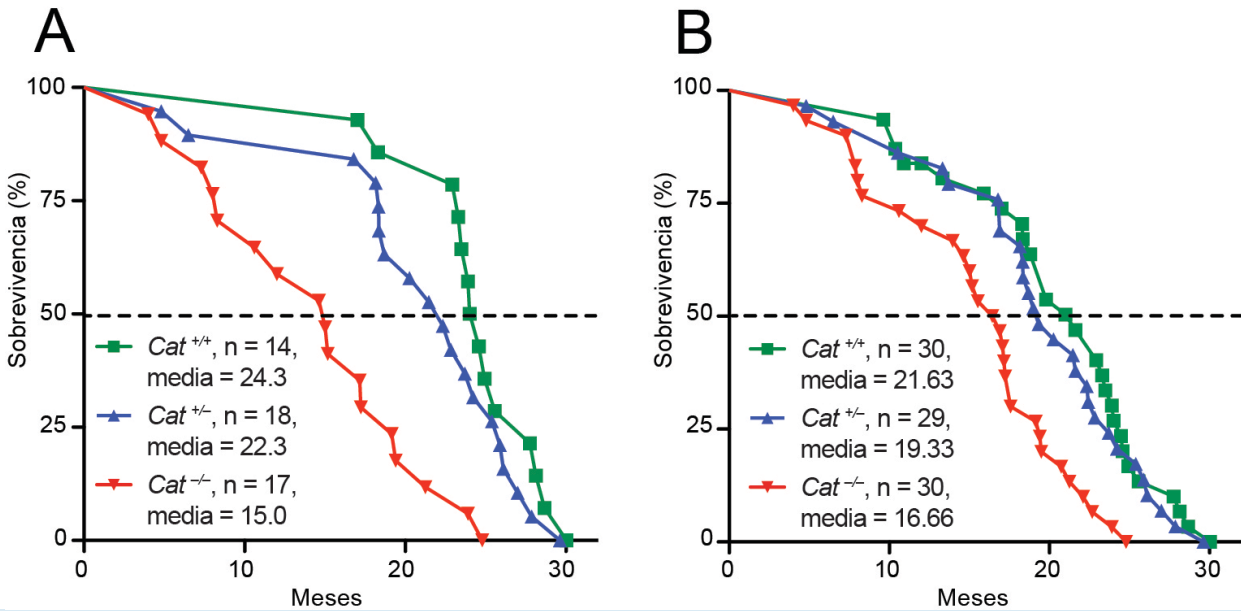


Figura 14. La ausencia de la catalasa provoca una disminución de la supervivencia en los ratones $Cat^{-/-}$ sin un aparente envejecimiento prematuro. (A) Curva de la supervivencia de todos los animales que murieron de causas naturales, la supervivencia entre los ratones $Cat^{-/-}$ y $Cat^{+/+}$ es estadísticamente significativa $p < 0.001$. (B) Curva de la supervivencia considerando los ratones sacrificados por úlceras en la piel, la fecha de muerte se consideró como la de sacrificio, la supervivencia entre los ratones $Cat^{-/-}$ y $Cat^{+/+}$ es estadísticamente significativa $p < 0.001$. Prueba estadística Long-Rank.

A pesar de la disminución de la supervivencia, no se observaron cambios en la apariencia de los ratones $Cat^{-/-}$ como incremento en pelo canoso o alopecia que indicara envejecimiento prematuro (Figura 15A). A edades jóvenes y adultas no se encontraron cambios en el peso corporal, sin embargo, al comparar ratones de edades de 12 y 24 meses los ratones $Cat^{-/-}$ viejos de 24 meses de edad, éstos tuvieron un peso corporal significativamente menor al de los ratones silvestres (Figura 15B). Para determinar si la diferencia del peso podría estar asociada a cambios en la composición corporal del animal (p. ej. masa grasa), se determinó la masa grasa y la masa libre de grasa mediante impedancia. Los resultados obtenidos no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre los ratones $Cat^{+/+}$ y $Cat^{-/-}$, aunque se observó una ligera tendencia de menor masa grasa en los ratones $Cat^{-/-}$ y, en consecuencia, mayor masa libre de grasa (Figura 15C, D), coincidiendo con el índice de masa corporal (BMI) (Figura 15E).

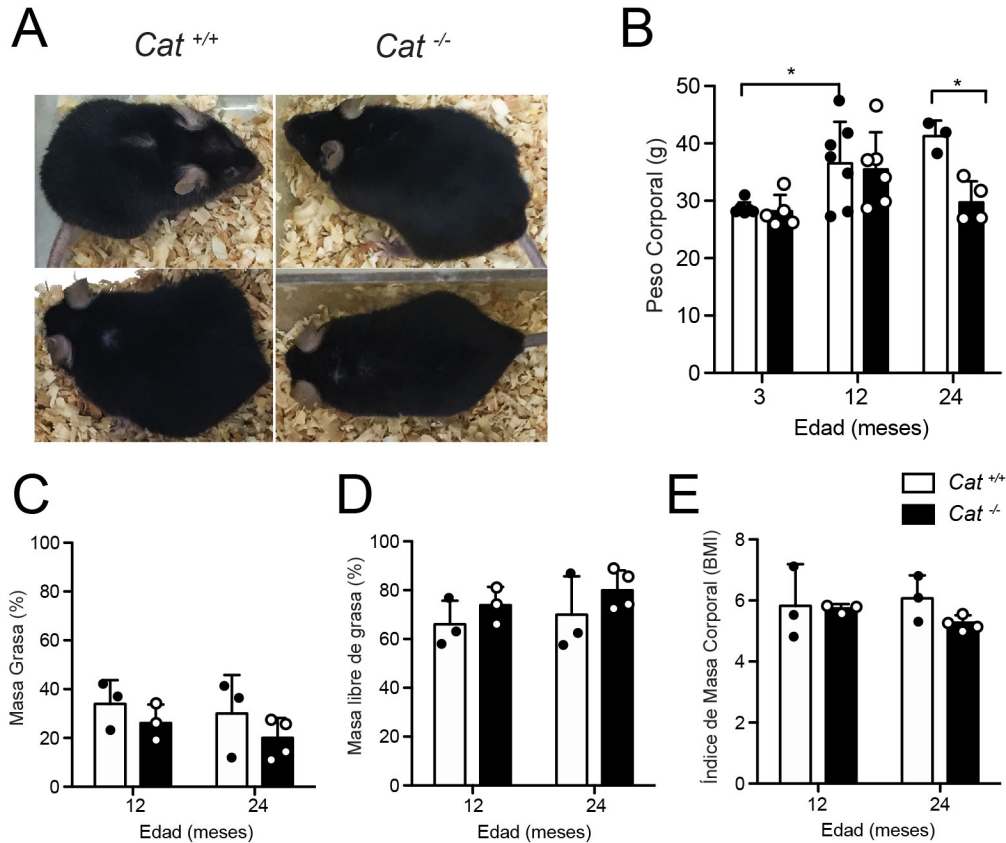


Figura 15. Los ratones *Cat*^{-/-} no mostraron aspecto que indicara envejecimiento prematuro, pero presentaron menor peso corporal. (A) Fotografías representativas de los ratones *Cat*^{-/-} y *Cat*^{+/+} a la edad de 18 meses. (B) Peso corporal de los ratones. Determinaciones de la composición corporal utilizando impedancia: Masa grasa (C), Masa libre de grasa (D) e Índice de Masa Corporal (E). Promedio ± SD, n= 3-7.

Al obtener imágenes del esqueleto de los animales utilizando rayos X, se observó menor talla en los ratones *Cat*^{-/-}, lo cual correlacionó con su peso corporal (Figura 15B y 16A) y, además, mostraron una curvatura exacerbada de la columna vertebral, fenómeno conocido como cifosis (Figura 16A). La cifosis es una característica típica del envejecimiento causada principalmente por la osteoporosis o atrofia muscular (Brennan *et al.*, 2014; Burkin *et al.*, 2001; Dabovic *et al.*, 2002; Nicolaije *et al.*, 2012). El envejecimiento también se asocia a una disminución en la actividad motora (De Waard *et al.*, 2010), por lo que se analizó este parámetro durante 24 horas utilizando el equipo Photobeam Activity System (ver materiales y métodos). Si bien en los ratones de ambos genotipos la actividad descende a medida que avanzó la edad, la comparación entre animales de 24 meses de edad mostró que la actividad total fue mayor en los ratones *Cat*^{-/-} que en los ratones *Cat*^{+/+}

(Figura 16B). Si bien las diferencias en el peso corporal y la cifosis sugieren que los ratones carentes de la catalasa presentan envejecimiento prematuro, la actividad motora que se observó no es coincidente con esta conclusión.

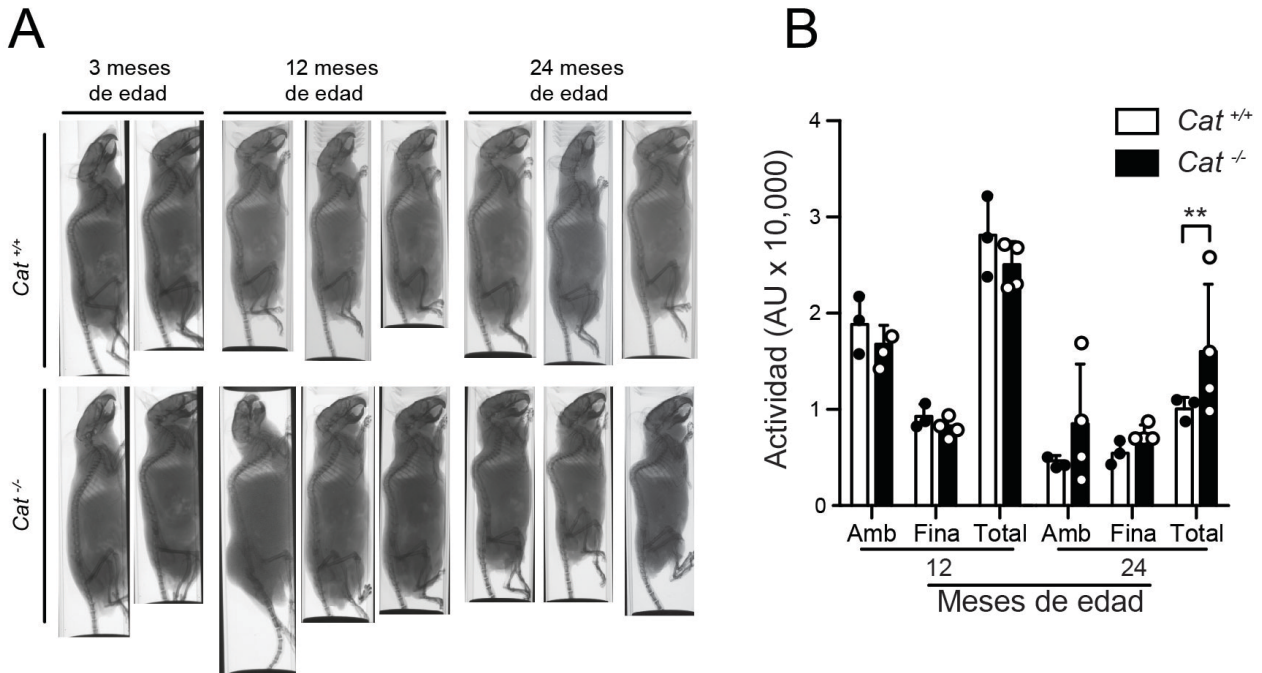


Figura 16. Los ratones *Cat*^{-/-} desarrollan cifosis exacerbada por efecto de la edad, pero no se asocia a alteración en su actividad motora. (A) Imágenes de rayos X de los ratones viejos. Las imágenes se obtuvieron en un campo de 15 cm², una apertura f/stop de 2.8 y un tiempo de adquisición de 5 segundos utilizando un filtro de 0.4 mm y el sistema Multimodal Animal Rotation System (MARS) en el equipo In-vivo Xtreme instrument (Bruker, Germany). (B) Actividad motora. La actividad ambulatoria (Amb), la fina y la total se determinó durante 24 horas en los ratones viejos utilizando el equipo *Photobeam Activity System*. Promedio ± SD, n= 3-4.

Al medir diferentes parámetros en la sangre que indicaran posibles alteraciones metabólicas resultado de la ausencia de la catalasa, se encontró que la edad causó hiperglucemia e hiper-insulinemia típica de animales viejos en ratones *Cat*^{+/+}, pero en los ratones *Cat*^{-/-} sólo se observó hiper-insulemia (Figura 17A, B). Por otra parte, independientemente del genotipo, los niveles séricos de los triacilglicéridos disminuyeron a medida que avanzó la edad (Figura 17C). Por su parte el colesterol total se incrementó en los ratones de 12 meses y descendieron a los 24 meses de edad a niveles similares al de los ratones jóvenes (Figura 17D). Los niveles de los cuerpos cetónicos no se alteraron ya sea en asociación a la edad o por la ausencia de la catalasa (Figura 17E). Al determinar

los niveles de la urea en la sangre se observó que, sin importar el genotipo, la cantidad de urea incrementó por el efecto de la edad (Figura 17F). Los datos indicaron que la falta de la catalasa tiene efectos en la longevidad y en la glucemia, pero otros parámetros metabólicos como los niveles de los triacilglicéridos, el colesterol y la urea en la sangre, que no cambiaron.

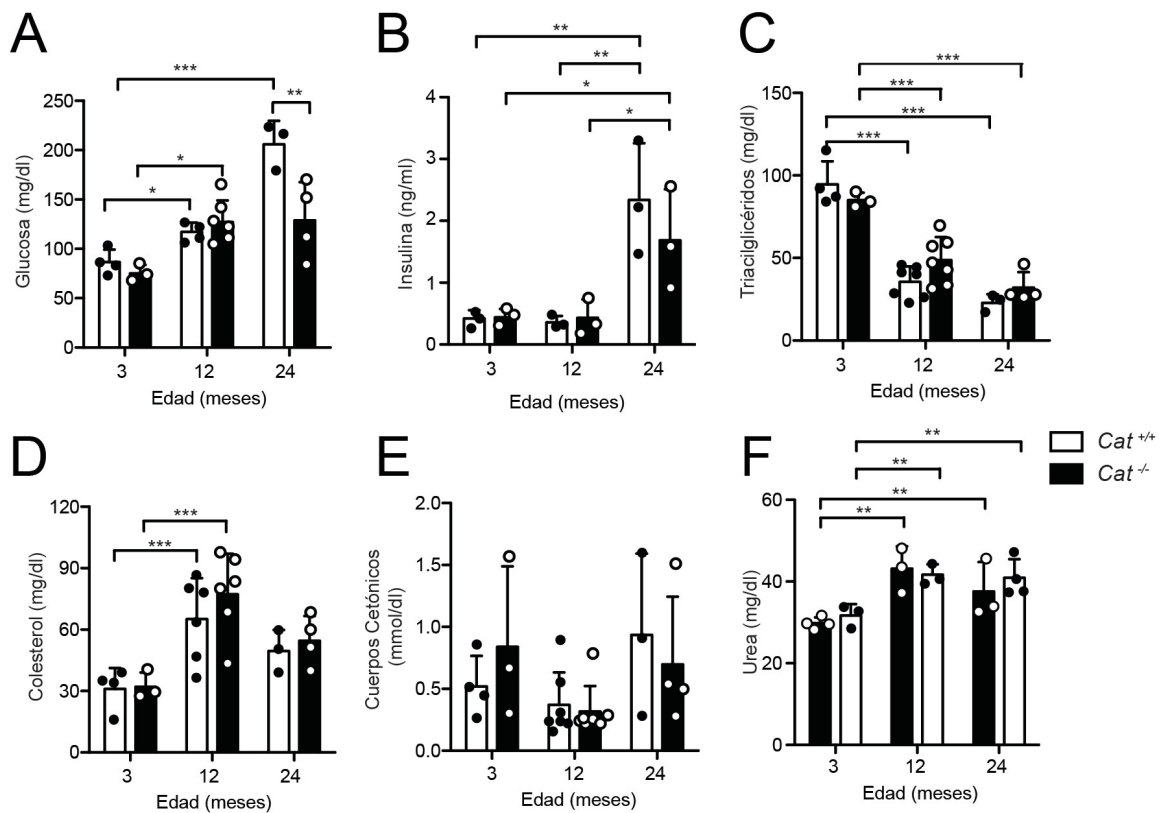


Figura 17. Parámetros fisiológicos de los ratones viejos *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-}. (A) Glucemia. (B) Insulina. (C) Triacilglicéridos. (D) Colesterol total. (E) Cuerpos cetónicos. (F) Urea. Los niveles de la glucosa y los cuerpos cetónicos se midieron directamente en la sangre utilizando un glucómetro, mientras el resto de las determinaciones se midieron en el suero. Promedio ± SD, n= 3-7.

6.2 La ausencia de la catalasa no incrementa el daño oxidante en el hígado, pero afecta la actividad de la β-galactosidasa y la acumulación de las grasas.

La catalasa se encuentra mayoritariamente en el hígado, lo que hace a este órgano el candidato que podría ser el más afectado por su ausencia. Previamente se había observado que el daño oxidante en el hígado desde los 2 y hasta los 10 meses de edad no era más elevado en los ratones *Cat*^{-/-} que en los ratones silvestres (Osiris Cuervas 2007), ni en la condición

de alimentación con la HFD (Pérez-Estrada, 2010), no obstante, aún podría ser posible que este comportamiento no se mantuviera en edades mayores, por lo que se analizó la lipoperoxidación en el hígado de los ratones de 3, 12 y 24 meses de edad. Se encontró que los dienos conjugados, una medida de la lipoperoxidación, se incrementaron a los 24 meses de edad en los ratones *Cat^{+/+}* en comparación con los de 3 meses de edad, fenómeno que no se observó en los ratones *Cat^{-/-}* e, incluso, fueron significativamente menores en comparación con los ratones silvestres a los 24 meses de edad (Figura 18A). Al detectar la oxidación de las proteínas del hígado, similar a lo ocurrido con los dienos conjugados, no se observó un incremento de la oxidación de las proteínas en los ratones *Cat^{-/-}* (Figura 18B). Por lo tanto, la ausencia de la catalasa no causa un incremento en el daño oxidante en el hígado asociado a la edad y en todo caso lo previene.

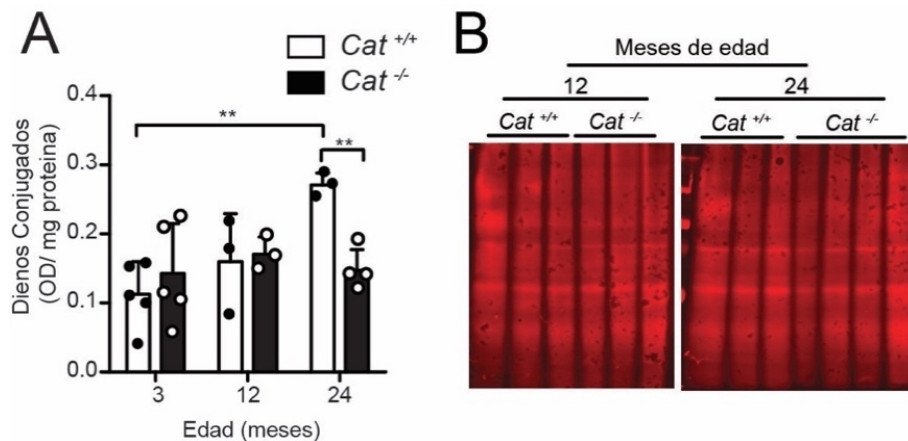


Figura 18. La lipoperoxidación en el hígado no se incrementa por la ausencia de la catalasa. (A) Lipoperoxidación en el hígado determinada como dienos conjugados. (B) Inmunodetección de proteínas oxidadas en el hígado. El extracto total de las proteínas obtenido del hígado se derivó en DNP-hidrazona (DNP) y se detectaron utilizando un anticuerpo específico. Promedio \pm SD, n= 3-4.

El menor daño oxidante en los ratones *Cat^{-/-}* podría explicarse por un aumento en la capacidad antioxidante. Para probar esta hipótesis, en el hígado de ratones de 3 meses de edad se determinaron los niveles de expresión de los genes asociados con la respuesta antioxidante: *Hif1 α* , *Hif2 α* , *Nrf1*, *Nrf2*, *Sod2*, *Ho1* y *Nqo1* (Haddad *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2009; Raghunath *et al.*, 2018). Contrario con la expectativa, no se hallaron cambios en los niveles de la expresión de los genes de la respuesta antioxidante entre los ratones silvestres y los mutantes (Figura 19), resultados que fueron acorde con los datos

publicados por otros grupos (Heit *et al.*, 2017; Ho *et al.*, 2004; Piao *et al.*, 2017) y a las observaciones previas del laboratorio (Hernández-García, 2009). Los resultados indican que a pesar de la falta de la catalasa no hay compensación de otros sistemas antioxidantes, y que el menor daño oxidante en estos roedores podría deberse más una alteración en los mecanismos de la producción de las ROS que en los de la eliminación.

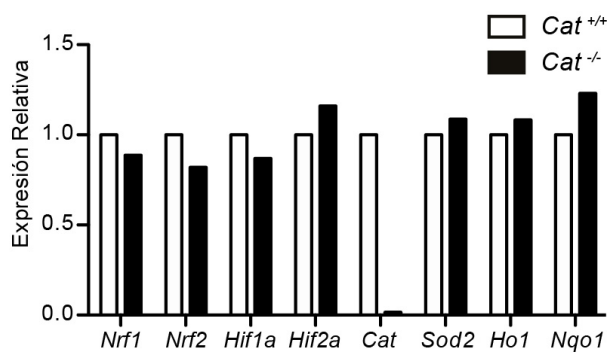


Figura 19. El nivel de expresión de los genes que codifican para las proteínas antioxidantes no se incrementó por la falta de la catalasa.

El nivel de expresión se determinó por medio de qRT-PCR de una mezcla de cDNA de tres ratones de 3 meses de edad. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*.

Uno de los procesos celulares que se ha encontrado que acompañan al envejecimiento es la senescencia celular, fenómeno que además puede ser inducido por el estrés oxidante (Chen and Ames, 1994; Collado *et al.*, 2007). Para determinar si la ausencia de la catalasa pudo alterar este proceso, se realizó una tinción que detecta los altos niveles de actividad de la β -galactosidasa, una característica de la senescencia celular, en cortes histológicos de hígado de los ratones de 3, 12 y 24 meses de edad. La actividad de la β -galactosidasa se encontró incrementada en el hígado de los ratones de 12 y 24 meses de edad, pues la tinción fue más intensa (mayor número de puntos azules y área total teñida), aunque la diferencia solo fue estadísticamente significativa para las comparaciones de las muestras de los ratones *Cat*^{-/-} y no hubo diferencias significativas entre los ratones silvestres de las distintas edades (Figura 20). Si bien las diferencias entre los ratones silvestres y los *Cat*^{-/-} tampoco fueron estadísticamente significativas entre animales de la misma edad, se observó una tendencia de una mayor actividad de la β -galactosidasa en los hígados de los ratones *Cat*^{-/-}, lo que sugiere mayor número de células senescentes en estos animales (Figura 20).

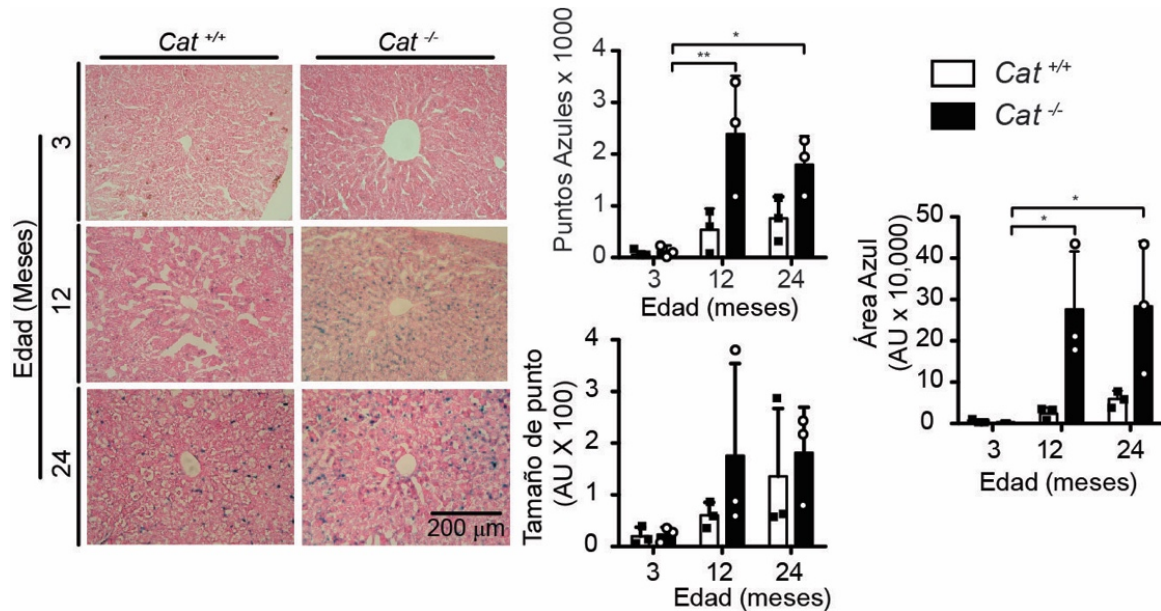


Figura 20. La actividad de la β -galactosidasa se incrementa por la edad. La tinción de la β -galactosidasa se realizó en cortes de 10 μ m de hígado de los ratones *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-} a pH 6. Los cortes se contra tiñeron con eosina. Mediante un análisis de imágenes con el software ImajeJ, se cuantificó la tinción contando los puntos azules, el tamaño promedio de los puntos y el área azul total. Cada dato es el promedio de tres imágenes representativas de un ratón. Promedio \pm SD, n= 3-4.

Para tener mayor evidencia sobre un posible incremento en la senescencia celular en los hígados de ratones *Cat*^{-/-}, se midió el nivel de expresión de *p16*, *p21* y *p53*, genes que codifican para las proteínas reguladoras del ciclo celular cuyo incremento se asocia a la senescencia celular (Krishnamurthy *et al.*, 2004). El nivel de la expresión de estos genes se incrementó considerablemente en los ratones de ambos genotipos desde los 12 meses de edad, sin embargo, este fenómeno no se exacerbó a los 24 meses de edad y además no hubo diferencias entre los ratones silvestres y mutantes (Figura 21), indicando que la senescencia celular en el hígado alcanza su máximo a los 12 meses de edad y sucede en el mismo grado en los ratones silvestres y los mutantes.

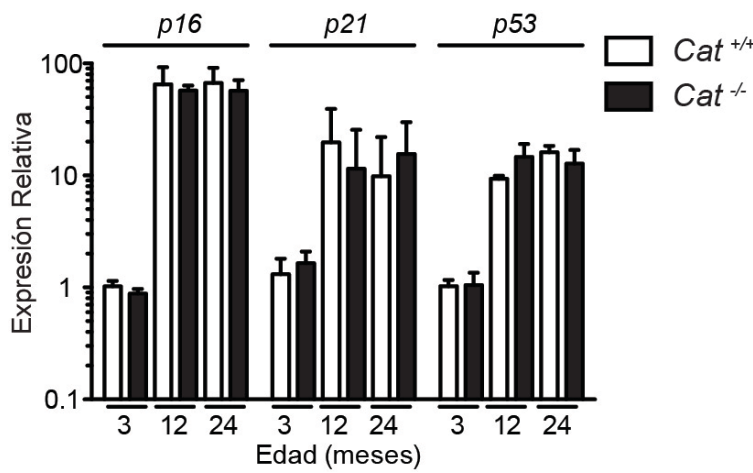


Figura 21. El nivel de expresión de los genes marcadores de la senescencia incrementa por la edad. El nivel de expresión de *p16*, *p21* y *p53* se determinó a partir de RNA total de hígado por medio de qRT-PCR utilizando como gen de referencia el *Rplp0*. Promedio ± SD, n= 3-4.

Debido a que en los ratones *Cat*^{-/-} alimentados con la HFD mostraron una reducción en el nivel de esteatosis hepática en comparación con los ratones silvestres (Pérez-Estrada, 2010), la acumulación de las grasas en el hígado a causa del envejecimiento también podría verse afectada por la falta de la catalasa. La determinación de las grasas neutras por tinción con rojo oleoso mostró una menor acumulación de las grasas en el hígado de los ratones *Cat*^{-/-} que en el de los ratones silvestres (Figura 22A). Este dato que coincidió con el contenido de los triacilglicéridos y el colesterol, particularmente en el hígado de los ratones de 24 meses de edad (Figura 22B, C). El fenómeno parece ser exclusivo de las grasas, pues el contenido del glucógeno no se alteró ni por la edad ni por la ausencia de la catalasa (Figura 22D). Estos datos sugieren que la falta de la catalasa causa alteraciones en los mecanismos que regulan la acumulación de las grasas en el hígado.

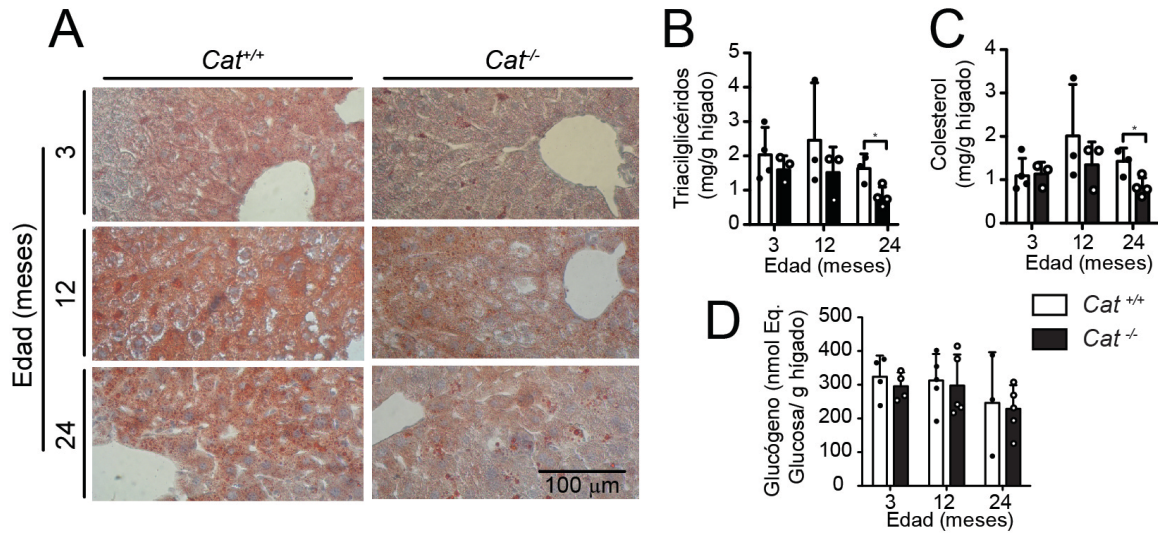


Figura 22. La acumulación de los lípidos en el hígado se afecta por la ausencia de la catalasa en los ratones viejos. (A) Tinción de rojo oleoso en los cortes de hígado de los ratones *Cat*. Contenido de los triacilglicéridos (B) y el colesterol (C) en el hígado de los ratones *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-}. (D) Contenido del glucógeno en el hígado de los ratones *Cat*. Promedios ± SD, n= 3-5.

6.3 En el ayuno la acumulación de las grasas en el hígado se afecta por la falta de la catalasa

Puesto que los datos previos indicaron que la acumulación de las grasas en el hígado podría ser una de las principales afectaciones por la falta de la catalasa, los ratones carentes de la catalasa se sometieron al ayuno. Es ampliamente conocido que el ayuno provoca cambios significativos en el metabolismo general de los organismos en un corto tiempo (Longo and Mattson, 2014; Maughan *et al.*, 2010; Samuel and Shulman, 2012). En las primeras horas induce la degradación de las reservas del glucógeno del hígado y del músculo (Yahagi *et al.*, 2013). Conforme el tiempo avanza se induce la movilización de las grasas hacia los tejidos y los órganos periféricos (Maughan *et al.*, 2010; Samuel and Shulman, 2012). En el hígado las grasas se acumulan en vacuolas lipídicas en tiempos relativamente cortos posterior al ayuno (Lee *et al.*, 2016), con el fin de ser oxidadas y así producir cuerpos cetónicos, la mayor fuente de energía una vez que la glucosa se ha agotado (Fukao *et al.*, 2004). Estas características convierten al ayuno en una condición que podría evidenciar las alteraciones en los mecanismos que regulan la acumulación y la utilización de las grasas que resultan de la ausencia de la catalasa.

De manera inesperada, se encontró que en los ratones silvestres la actividad de la catalasa del hígado, así como la expresión de su gen, disminuyeron durante el ayuno, mientras que la realimentación por 12 horas permitió la recuperación parcial de la actividad (Figura 23A, B). La reducción de la actividad de la catalasa coincidió con el incremento en la lipoperoxidación (Figura 23C), y aunque en los ratones *Cat*^{-/-} también hubo aumento en la lipoperoxidación, en los ratones silvestres fue mayor, sobre todo a las 48 horas de ayuno (Figura 23C). Estas observaciones indicaron que la catalasa podría tener un papel importante durante el ayuno.

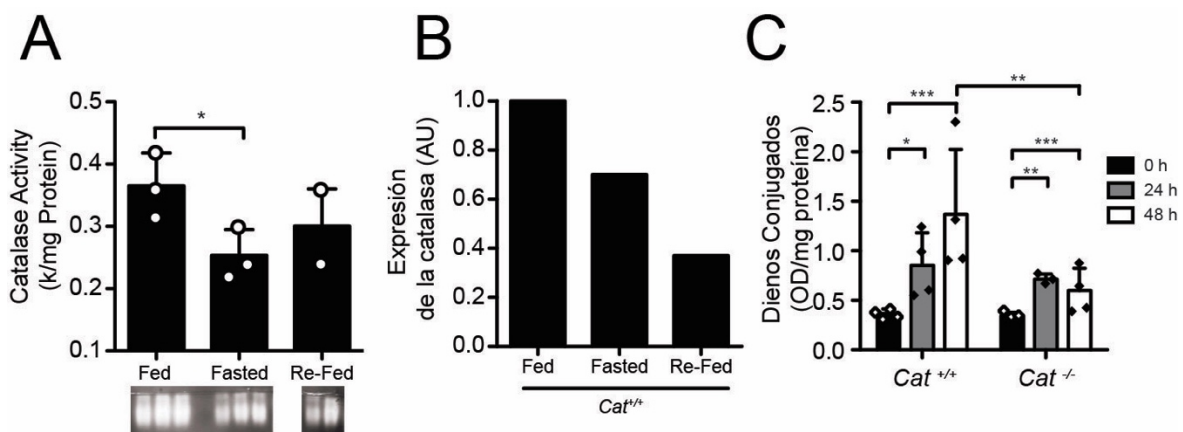


Figura 23. La actividad de la catalasa y el nivel de la expresión de su gen en el hígado disminuye por el efecto del ayuno mientras se incrementa la lipoperoxidación en los ratones *Cat*^{+/+}. Actividad de la catalasa (A) y el nivel de expresión de su gen (B) en el hígado de los ratones silvestres alimentados, los ayunados por 24 horas y los realimentados por 12 horas. (C) Dienes conjugados del hígado de los ratones *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-} ayunados. Promedio \pm SD, n= 3.

El ayuno, como era esperado, causó pérdida del peso corporal de los animales, fenómeno que fue similar entre los ratones *Cat*^{-/-} y *Cat*^{+/+} (Figura 24A); el mismo comportamiento se observó en la glucemia y los niveles séricos de los triacilglicéridos y del colesterol (Figura 24B-D). Tal y como se esperaba, el contenido del glucógeno del hígado se afectó fuertemente por el ayuno, pues desde las 24 horas se agotó y, similar a las comparaciones de parámetros determinados en los ratones viejos, no hubo diferencias entre los ratones *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-} (Figura 24E).

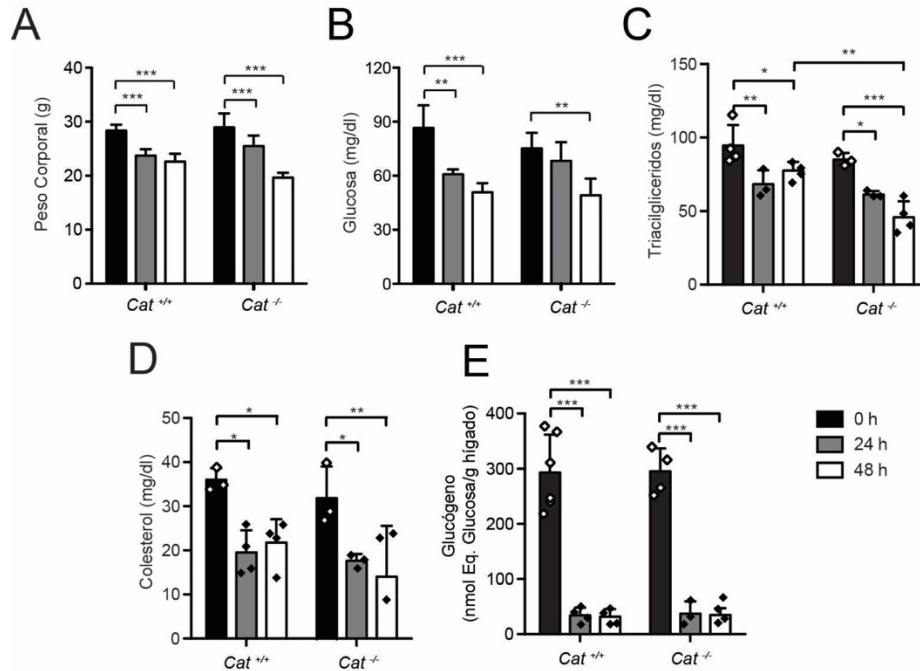


Figura 24. Alteraciones metabólicas en los ratones $Cat^{+/+}$ y $Cat^{-/-}$ ayunados por 24 o 48 horas. (A) Peso corporal. (B) Glucemia. Niveles séricos de los triacilglicéridos (C) y del colesterol (D) de los ratones $Cat^{+/+}$ y $Cat^{-/-}$ ayunados por 24 y 48 horas. (E) Contenido del glucógeno en el hígado de los ratones $Cat^{+/+}$ y $Cat^{-/-}$ ayunados por 24 y 48 horas. Promedio \pm SD, n= 3-5.

Al medir el contenido de los triacilglicéridos y del colesterol total en el hígado de los ratones ayunados, se encontró que se redujo el contenido de los primeros en los ratones $Cat^{-/-}$ (Figura 25A), pero no el del colesterol total (Figura 25B). En línea con estos cambios, los niveles de los cuerpos cetónicos circulantes se incrementaron en los ratones $Cat^{+/+}$ ayunados por 48 horas al igual que en 2 de 4 de los ratones $Cat^{-/-}$ (Figura 25C), mientras que 2 de 4 de los ratones $Cat^{-/-}$ ayunados se encontraron claramente disminuidos (puntos rojos en la figura 25C). El bajo nivel de los cuerpos cetónicos coincidió con falta de movilidad y una respuesta a estímulos por estos animales, y también con el intestino necrótico observado al momento de la disección (Figura 25D). Si bien el número de animales analizados en este trabajo fue bajo, resultados recientes del laboratorio confirman que bajos niveles de cuerpos cetónicos coincide con intestino necrótico (datos no mostrados). Lo anterior sugiere que los bajos niveles de los cuerpos cetónicos y el intestino necrótico que se presentaron en los ratones $Cat^{-/-}$ ayunados podrían ser un signo

de muerte inminente, por lo que los ratones que no tienen catalasa son más sensibles a ayunos prolongados, ya que ninguno de los ratones silvestres presentó este fenotipo.

En conjunto los resultados de ayuno y las observaciones en animales viejos sugirieron que la ausencia de la catalasa podría causar alteraciones importantes en la homeostasis del metabolismo, en especial el de las grasas, alteración que podrían ser a nivel del transporte, la síntesis y/o en el almacenamiento de ellas.

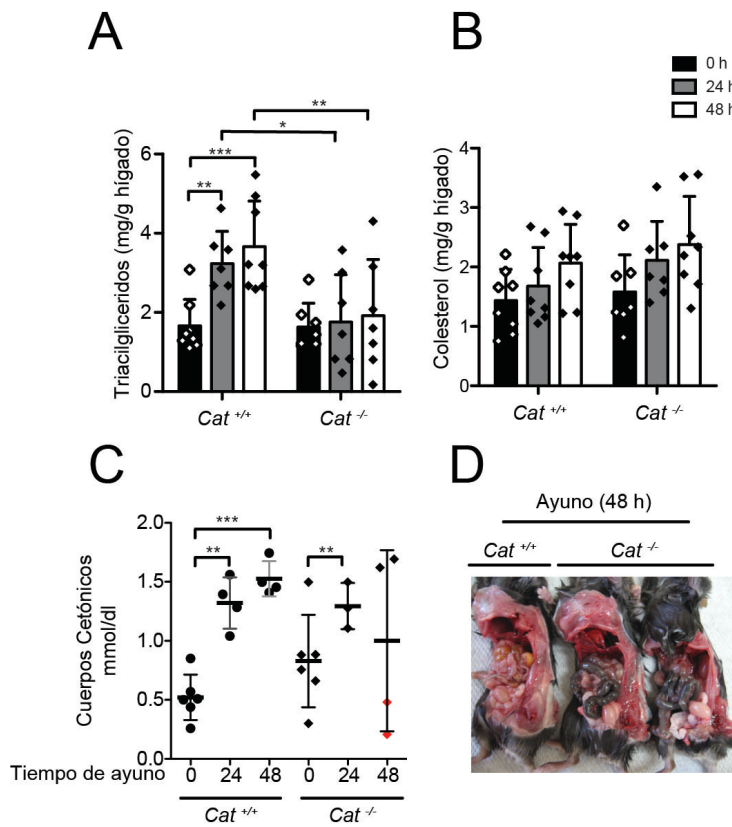


Figura 25. En los ratones *Cat*^{-/-} la acumulación de las grasas disminuye en el ayuno. (A) Tinción de rojo oleoso en cortes histológicos de hígado de ratones *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-} alimentados y ayunados. Contenido de los triacilglicéridos (B) y del colesterol (C) del hígado de los ratones *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-} alimentados y ayunados por 24 y 48 horas. Promedio ± SD, n= 3-8.

6.4 Los niveles de expresión de los genes del metabolismo se afectan por la ausencia de la catalasa.

Para determinar si la ausencia de la catalasa causó alteraciones en el metabolismo, posiblemente con mayor impacto en el de las grasas, se determinó el nivel de la expresión, en el hígado, de los principales genes de la glucólisis, la gluconeogénesis y la síntesis y degradación de las grasas.

En la condición de ayuno, tal y como se esperaba, el nivel de expresión de los genes metabólicos en el hígado se alteró. El nivel de la expresión de la *Gck*, gen que codifica para la primera enzima de la glucólisis, disminuyó por el ayuno, y la realimentación permitió su recuperación, efecto que se observó tanto en el hígado de los ratones silvestres como en el de los *Cat*^{-/-} (Figura 26). Contrario al comportamiento del gen *Gck*, el nivel de expresión de los genes de la gluconeogénesis *Pck1* y *G6pc* se incrementaron por el ayuno y regresaron a sus niveles basales por la realimentación, aunque sólo en la *Pck1* el efecto fue significativo; el incremento por el ayuno fue mayor en el hígado de los ratones silvestres comparado con el observado en los ratones mutantes (Figura 26). Por su parte, el nivel de expresión de los genes de la lipogénesis: *Fas*, *Spot14*, *Scd1* y *Ppar* γ 2, disminuyeron por el ayuno y sus niveles se reestablecieron parcialmente por la realimentación. Con excepción de *Scd1*, el nivel de expresión de estos genes fue menor en el hígado de los ratones *Cat*^{-/-} desde la condición alimentada y el ayuno causó todavía una disminución mayor (Figura 26). Al analizar la expresión de los genes de la oxidación de las grasas: *Acox1*, *Ctp1a*, *Ppar* α y *Fgf21*, se encontró que su nivel de expresión se incrementó en el hígado en respuesta al ayuno y disminuyó por la realimentación; solo en el caso de *Ppar* α se vió que la respuesta al ayuno en el hígado de los ratones *Cat*^{-/-} fue en menor proporción que lo que mostraron los hígados de los ratones silvestres (Figura 26 y 27). Estos datos indicaron que la respuesta al ayuno, medida por el nivel de la expresión de genes del metabolismo, se mantiene en ausencia de la catalasa, lo que sugiere que la regulación de la insulina-glucagón que sucede en el ayuno-realimentación, no está afectada por la falta de la catalasa, y que los bajos niveles de expresión de los genes de la lipogénesis podría explicar, en parte, la menor acumulación de las grasas en el hígado durante el ayuno, aunque se trataría de una condición pre-existente.

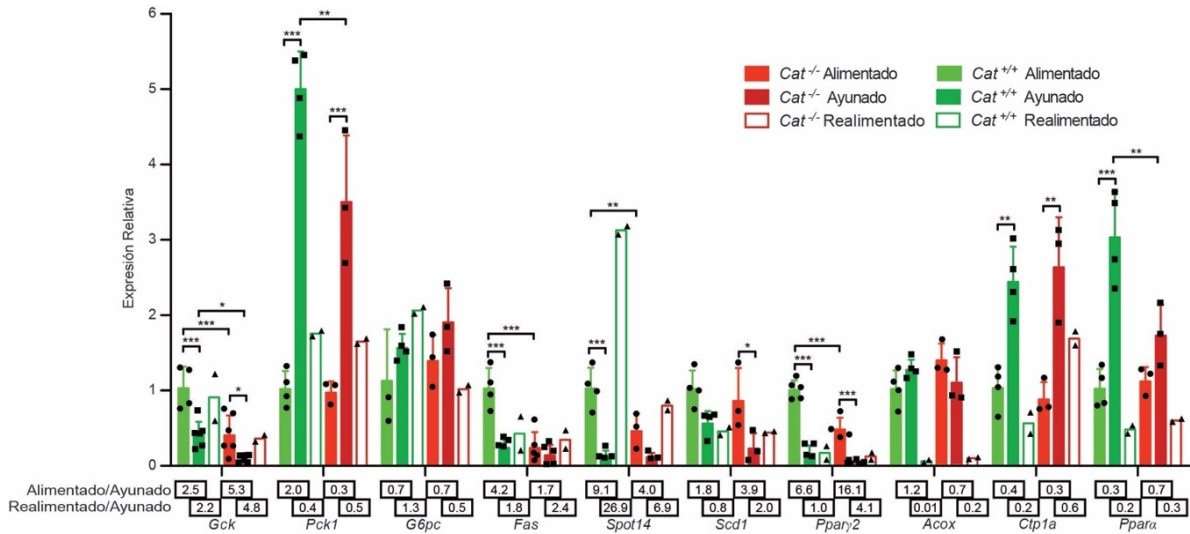


Figura 26. Los niveles de expresión de los genes del metabolismo en los ratones *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-} ayunados. La expresión se determinó por medio de qRT-PCR. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado de los ratones alimentados y ayunados por 24 horas, otro grupo de ratones se ayunó por 24 horas y se realimentaron durante 12 horas. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*. Promedio ± SD, n= 2-5.

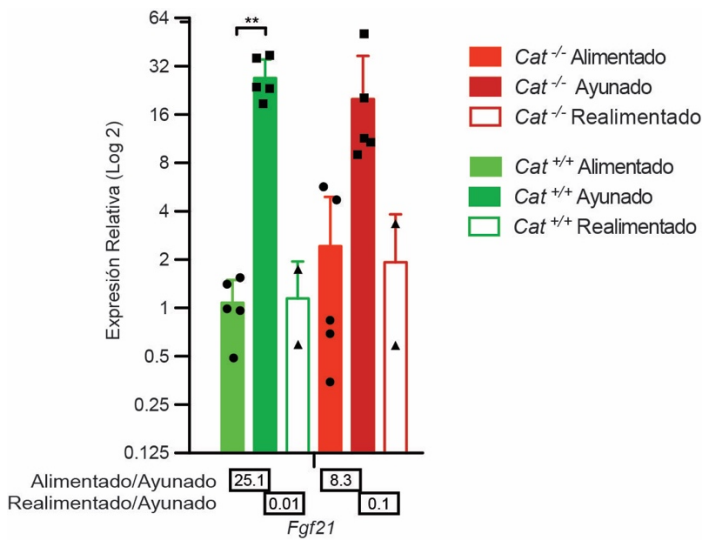


Figura 27. El nivel de expresión de *Fgf21* en ratones *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-} ayunados. El nivel de expresión de *Fgf21* se determinó por medio de qRT-PCR. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado de los ratones alimentados y ayunados por 24 horas, otro grupo de ratones se ayunó por 24 horas y se realimentaron durante 12 horas. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*. Promedio ± SD, n= 2-5.

Previamente ya se había observado que los ratones *Cat^{-/-}* desarrollaban menos esteatosis cuando se alimentaban con la HFD (Pérez-Estrada, 2010). La esteatosis es causada, en parte, por incremento en la lipogénesis (Li *et al.*, 2011; Matsusue *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2012). Por lo tanto, menor expresión de genes lipogénicos podría explicar la disminución de la esteatosis en los ratones *Cat^{-/-}*. Para probar esta idea, se midió el nivel de expresión de los genes del metabolismo en el hígado de los ratones alimentados con la HFD por 3 meses, utilizando como muestra una mezcla de cDNA de tres individuos por condición. Similar a lo que se observó en el ayuno, en los ratones *Cat^{-/-}* todos los genes involucrados en la lipogénesis tuvieron niveles de expresión más bajos en comparación con los niveles que se observaron en el hígado de ratones silvestres (Figura 28). En otras vías metabólicas, como la glucólisis, no se observaron cambios importantes en los niveles de la expresión de sus genes asociados, salvo en la expresión de la *Gck*, pues en los ratones *Cat^{-/-}* se incrementó; en sentido contrario se observó menor expresión de la piruvato carboxilasa (*Pck1*) y de la *Pkm2* (Figura 28). La mayoría de los genes de la gluconeogénesis disminuyeron su nivel de expresión o no cambiaron en los ratones *Cat^{-/-}*, pero uno que llamó la atención fue *Nr4a1* que se ha identificado como un regulador de esta vía (Chao *et al.*, 2007). Contrario con la expectativa, el menor nivel de expresión de los genes de la lipogénesis no correlacionó completamente con el incremento en el nivel de expresión de los genes de la degradación de las grasas en los ratones *Cat^{-/-}*, pues mientras *Acox1* y *Fgf21* se incrementaron, *Ppar γ* , *Pgc α* , *Cyt-c* y *Ctp1* se disminuyeron (Figura 28).

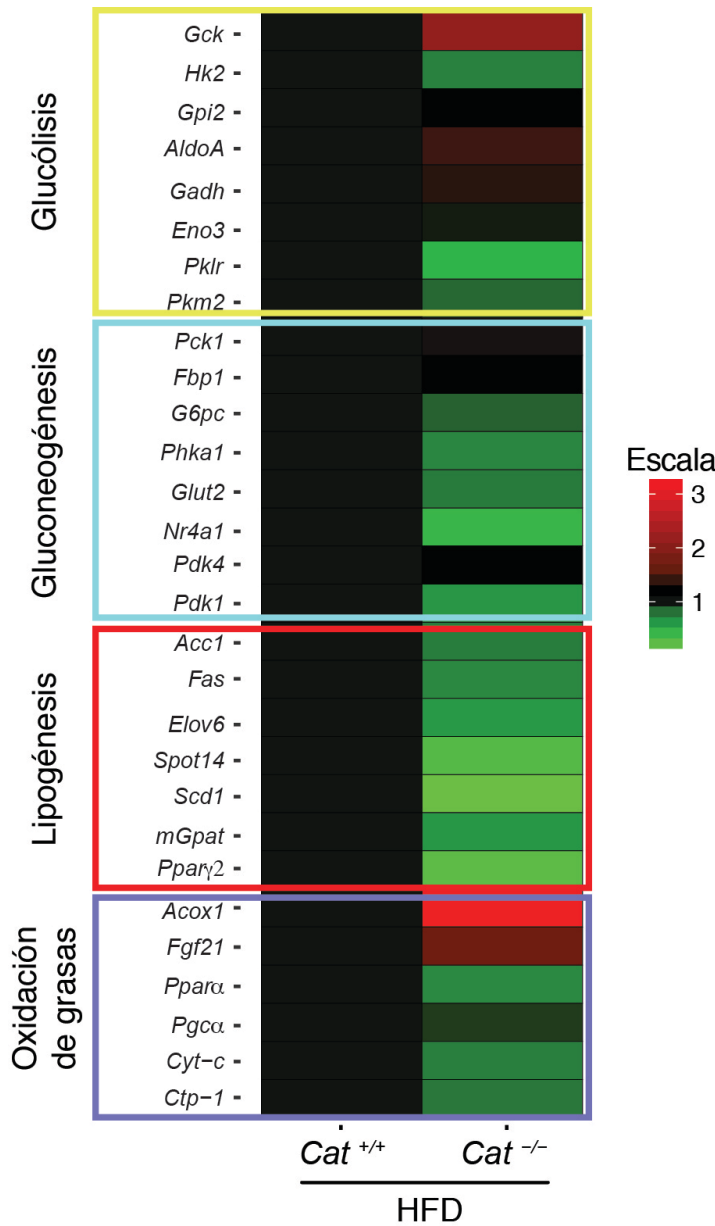


Figura 28. El nivel de expresión de los genes de la lipogénesis se afecta por la ausencia de la catalasa en los ratones alimentados con la HFD. El nivel de expresión de los genes se midió utilizando qRT-PCR en una mezcla de cDNA del hígado de 3 ratones de cada genotipo alimentados con HFD por 3 meses. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*. Los datos se muestran en un “HeatMap” construido con en el software R utilizando el paquete NeatMap.

Debido a que los resultados de la condición de alimentación con la HFD por 3 meses sólo mostraron el efecto de la ausencia de la catalasa en la alimentación con la HFD, pero no la respuesta a la alimentación en si, se alimentó un grupo de ratones por 15 días con la HFD y la dieta baja en grasa, o control, de similar composición de nutrientes, pero con diferente contenido de grasas (ver Anexo II). Este diseño experimental, además, podría permitir determinar si el bajo nivel de expresión de los genes de la lipogénesis se mantiene en la alimentación con una dieta de bajo contenido de grasas, similar a lo que ocurrió con la dieta estándar (Figura 26). Como se muestra en la figura 29, los niveles de la expresión

de la mayoría de los genes analizados fue la misma entre los ratones de ambos genotipos alimentados con la dieta baja en grasas (dieta control), sin embargo, por efecto de la HFD, el nivel de expresión de la *Gck* se incrementó notoriamente, pero la respuesta fue menor en el hígado de los ratones *Cat*^{-/-}, mientras que los genes de la gluconeogénesis *Pck1* y *G6pc* no se afectaron por la dieta o el genotipo. Como era esperado, la HFD indujo un incremento en el nivel de la expresión de los genes de la lipogénesis *Fas*, *Spot14* y *Pparγ2* en los ratones silvestres (Figura 29). En los ratones *Cat*^{-/-}, el nivel de expresión de la *Fas* y el *Spot14* no se incrementaron en respuesta a la HFD, pero sí para *Pparγ2*, aunque en la proporción fue menor al que presentaron los ratones silvestres (Figura 29). Los niveles de la expresión de los genes asociados a la degradación de los lípidos, *Acox* y *Fgf21*, no se afectaron por el genotipo o el tipo de alimentación (Figura 29). Estos datos, junto con las observaciones en el ayuno, indican que la ausencia de la catalasa afecta negativamente los niveles de expresión de los genes de la lipogénesis.

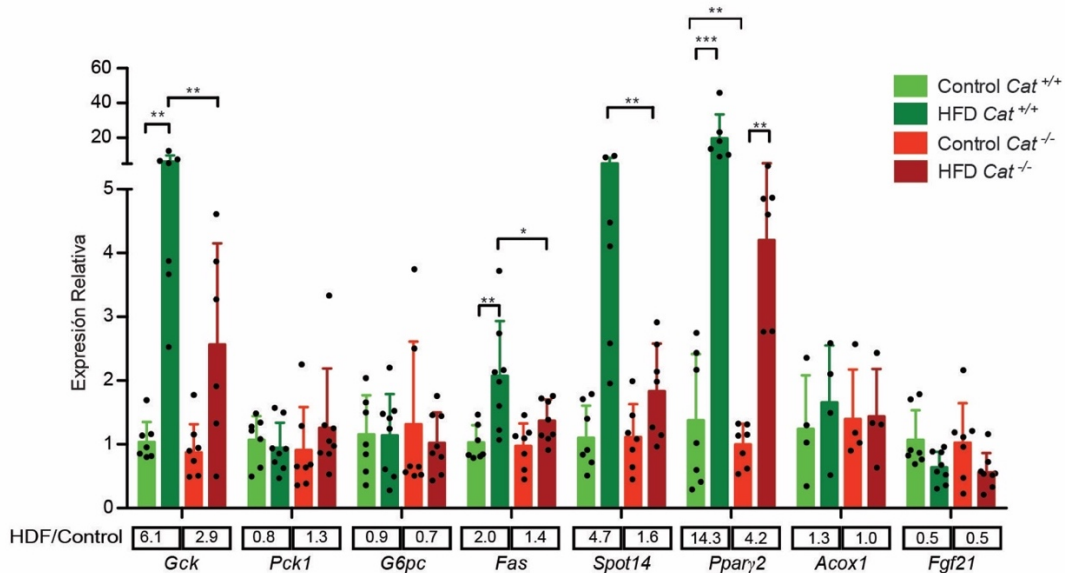


Figura 29. Los niveles de expresión de los genes de la lipogénesis se incrementan por la alimentación con la HFD en los ratones *Cat*^{+/+} pero no en los ratones *Cat*^{-/-}. El nivel de expresión se determinó por medio de qRT-PCR. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado de los ratones alimentados con una dieta control o con la dieta HFD. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*. Promedio ± SD, n= 3-7.

Diferente a lo que se observó en el ayuno, en la condición de alimentación con la dieta control por 15 días, que sería equivalente a la condición alimentada en los experimentos

de ayuno, no se encontraron diferencias en los niveles de la expresión de los genes de la lipogénesis entre los roedores silvestres y mutantes, por lo que se hizo un análisis comparando los niveles de expresión en el hígado de ratones que recibieron la dieta estándar o la dieta baja en grasa. Como se puede apreciar en la Figura 30, el patrón de la expresión de los genes del metabolismo fue distinto dependiendo de la dieta. Aunque en general se mantienen bajos niveles de expresión de los genes lipogénicos en los ratones *Cat*^{-/-}, se observaron cambios contrastantes en *Ppara*, *Acox1*, *Fgf21* y *Ctp1a*, que están asociados a la oxidación de grasas, pues su comportamiento fue dependiente de la dieta que recibieron los ratones *Cat*^{-/-}. Mientras que en el hígado de ratones que recibieron la dieta control los niveles de expresión disminuyeron, en el de los ratones que recibieron la dieta estándar se sobre-expresaron (Figura 30). Estos resultados indican que la composición de los macronutrientes de la dieta es determinante para el efecto. Pues, mientras la dieta control contiene grasa animal (manteca) y vegetal (aceite de soya), la estándar solo contiene grasa vegetal (Anexo II). Los carbohidratos también son distintos entre las dietas, ya que en la dieta control el componente principalmente es la sacarosa, un disacárido, y en la dieta estándar es un polisacárido, el almidón de maíz (Anexo II). Las diferencias entre las dietas sin duda influyeron en el experimento, por lo que deberían ser variantes importantes para considerar en cualquier diseño experimental.

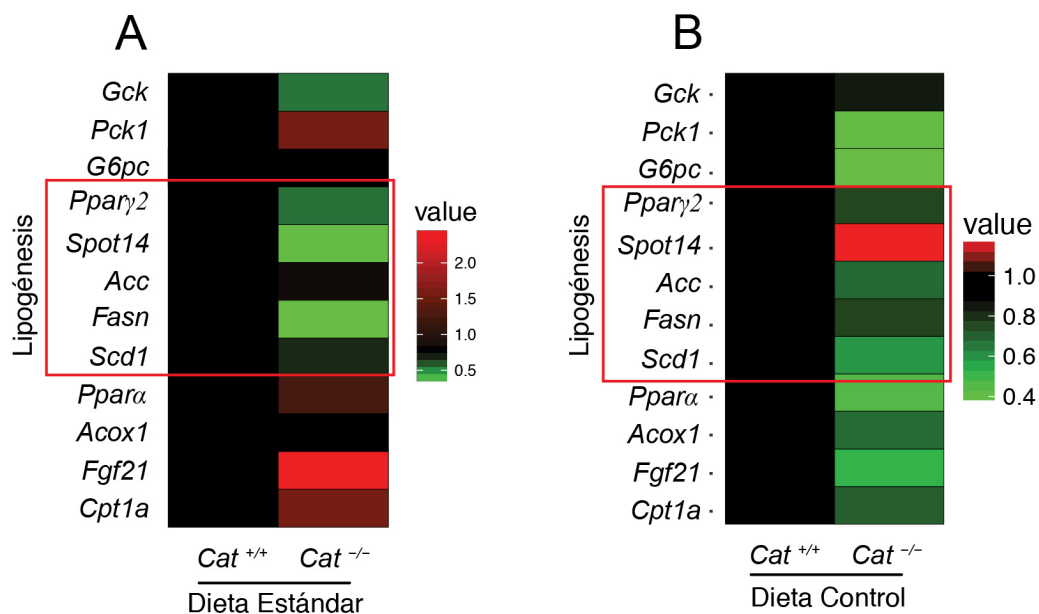


Figura 30. Expresión de los genes del metabolismo se afecta por el tipo de dieta. La expresión se determinó por medio de qRT-PCR. (A) Patrón de expresión en los ratones alimentados con la dieta estándar. (B) Patrón de expresión en los ratones alimentados con la dieta baja en grasa o control. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado de los ratones de tres meses de edad alimentados con dieta estándar durante toda su vida y de un segundo grupo de la misma edad, pero alimentados con la dieta control durante 15 días antes del sacrificio. Los datos se muestran en un “HeatMap” construido con el promedio de expresión de al menos tres ratones utilizando el software R y el paquete NeatMap.

Los datos indican que la alteración en los niveles de expresión de los genes de la lipogénesis en el hígado por la ausencia de la catalasa tanto en la alimentación con la HFD como en el ayuno coinciden con una menor acumulación de las grasas en el hígado, sugiriendo que la principal vía alterada por la ausencia de la catalasa es la lipogénesis, aunque no se identifica cual podría ser el efector determinante de este fenómeno.

6.5 La actividad de la AMPK se encuentra incrementada en los ratones *Cat*^{-/-}.

Hasta la fecha no se ha descrito que la catalasa regule el metabolismo, por lo que los bajos niveles de expresión de los genes de la lipogénesis en el hígado de los ratones *Cat*^{-/-} tendría que ser consecuencia de la alteración de algún regulador de la lipogénesis. Se conoce que la AMPK, una cinasa dependiente del AMP, es un regulador negativo del anabolismo (Hardie *et al.*, 2012; Long and Zierath, 2006), y en especial de la lipogénesis (Cantó and Auwerx, 2010; Mihaylova and Shaw, 2011). La activación farmacológica de AMPK revierte la esteatosis hepática causada por la alimentación con una HFD al disminuir los niveles de la expresión de los genes de la lipogénesis (Li *et al.*, 2011), similar a como sucedió en los ratones *Cat*^{-/-}. Por lo tanto, la AMPK es un fuerte candidato de los efectos de la ausencia de la catalasa en la lipogénesis.

Al determinar en el hígado la forma fosforilada de la AMPK por inmunodetección (fosforilación de la treonina 179 de la subunidad α), que es una forma activa de la enzima, se encontró que se incrementó significativamente en los ratones *Cat*^{-/-} alimentados con la dieta baja en grasa, tanto en los ratones que se alimentaron por 15 días con las dietas, como en aquellos que se alimentaron durante tres meses (Figura 31A, B). Si bien en los

ratones alimentados con la HFD también se observó un incremento en la abundancia de la pAMPK, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 31A, B).

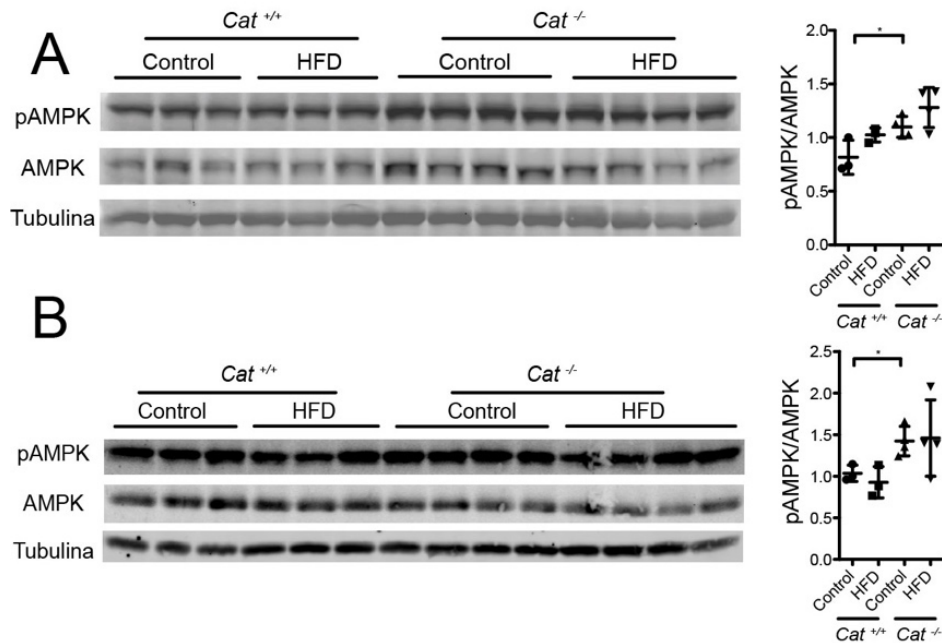


Figura 31. La forma activa de la AMPK se incrementa en los ratones $Cat^{-/-}$ en condiciones de alimentación con la dieta control o la HFD. (A) Condición de alimentación con la dieta control y la HFD por 15 días. (B) Condición de alimentación con la dieta control y la HFD por 3 meses. La determinación de la abundancia de la pAMPK y la AMPK se identificó por inmunodetección en un extracto total de proteínas obtenida del hígado de los ratones. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio \pm SD, n= 3-4.

El aumento de la pAMPK en los ratones $Cat^{-/-}$ sugiere que la disminución en los niveles de la expresión de los genes de la lipogénesis, y en consecuencia de la acumulación de las grasas en el hígado, se debe al aumento de la actividad de esta cinasa, sin embargo, aún es posible que otros reguladores estuvieran involucrados. Uno de ellos podría ser la cinasa sensible de rapamicina mTOR. mTOR es una cinasa que entre sus funciones está la de promover el anabolismo (Laplante and Sabatini, 2009, 2012, 2013). Al analizar la forma fosforilada de la mTOR (fosforilación en la serina 2448), no se encontraron alteraciones en los ratones $Cat^{-/-}$, ni por efecto de la mutación ni por la alimentación con la dieta alta o la baja en grasa (Figura 32), lo que sugiere que esta cinasa no está involucrada en la regulación negativa de la lipogénesis por la ausencia de la catalasa.

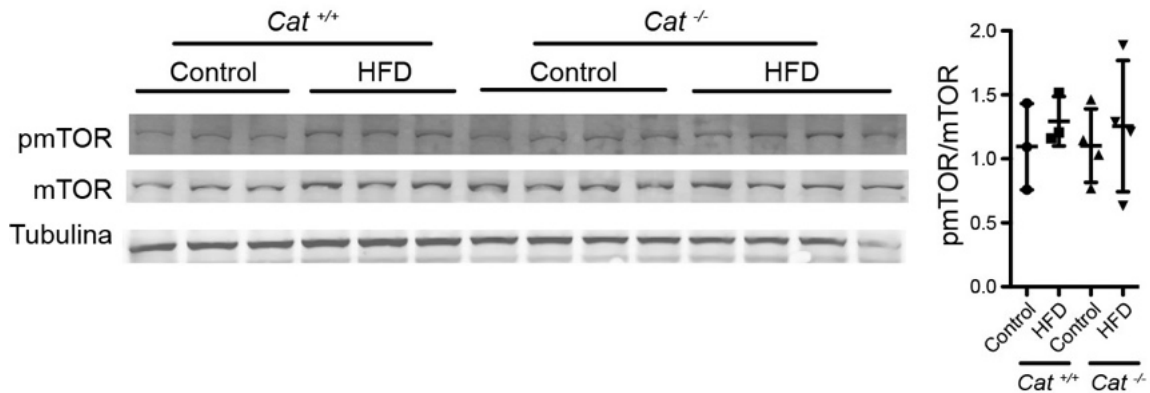


Figura 32. La mTOR no se afecta por la falta de la catalasa en condiciones de alimentación con la dieta control o la HFD. La determinación de la abundancia de pmTOR y mTOR en la condición de alimentación con la dieta control y la HFD por 15 días identificada por inmunodetección en un extracto total de proteínas obtenida del hígado de los ratones. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio \pm SD, n= 3-4.

Con el fin tener más evidencia sobre cómo podría estar actuando la AMPK en el hígado de ratones carentes de catalasa, se midió su activación en el hígado durante el ayuno, condición catabólica en la que se favorece la actividad de la AMPK (Bujak *et al.*, 2015; Cantó *et al.*, 2010). Se observó que en la condición alimentada el nivel de la pAMPK ya era mayor en los ratones *Cat*^{-/-} y aunque se incrementó por el ayuno, solo se trató de un cambio discreto (Figura 33). En los ratones silvestres el ayuno también incrementó la abundancia de la pAMPK, pero no llegó a los niveles que se observaron en los ratones mutantes de la catalasa (Figura 33). Al determinar la pmTOR, se encontró, como en la HFD, que no se alteró su abundancia. Al analizar la abundancia de las proteínas de la lipogénesis ACC, FAS y ATP Citrato-L, todas ellas disminuyeron por el ayuno en los ratones silvestres (Figura 33). De acuerdo con la expectativa, en los ratones *Cat*^{-/-} la abundancia de las proteínas de la lipogénesis fue menor desde la condición alimentada y el efecto se exacerbó con el ayuno, lo que estuvo acorde con las observaciones encontradas cuando se midieron los niveles de expresión de los genes del metabolismo. Los resultados refuerzan la hipótesis de que la AMPK podría ser el regulador de la expresión de los genes de la lipogénesis en la ausencia de la catalasa y, aunque en los ratones *Cat*^{-/-} la AMPK ya está activa, aún responde a estímulos que la inducen, como por ejemplo el ayuno.

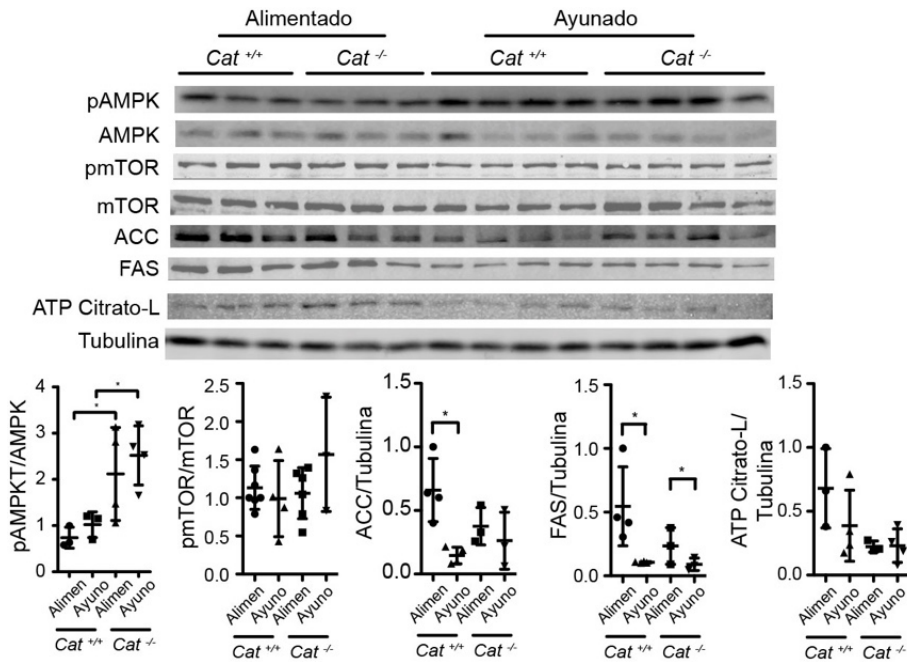


Figura 33. En el ayuno la activación de la AMPK se incrementa mientras disminuye la abundancia de las proteínas de la lipogénesis sin aparente participación de la mTOR. Las determinaciones de la abundancia de las proteínas en el hígado se detectaron utilizando inmunodetección en un extracto total de proteínas obtenida del hígado de los ratones de 3 meses de edad. Los ratones se ayunaron por 24 horas. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio \pm SD, n= 3-4.

6.6 La señalización de la insulina no se afecta por la falta de la catalasa

El efecto de la falta de la catalasa sobre la lipogénesis se puede explicar por la mayor actividad de la AMPK, sin embargo, como se ha mostrado en este y en un trabajo previo (Pérez-Estrada, 2010), la ausencia de la catalasa también causó alteraciones en la glucemia de los ratones, ya que en la condición de alimentación con la HFD se previno la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y la intolerancia a la glucosa de los ratones *Cat*^{-/-} (Pérez-Estrada, 2010), además, en el envejecimiento se evitó la hiperglucemia asociada con la edad (Figura 17A). Lo anterior sugirió que podría haber afectaciones en la vía de señalización de la insulina, al ser de los principales factores que regulan la homeostasis de la glucosa (Plum *et al.*, 2006). En el hígado, los niveles de la AKT fosforilada en la treonina 308 (pAKT), que se relacionan con la activación de esta cinasa por la acción de la insulina (Chakraborty *et al.*, 2010), no se alteraron en los ratones alimentados con la dieta control y la HFD por tres meses, y tampoco por el alelo de la catalasa (Figura 34).

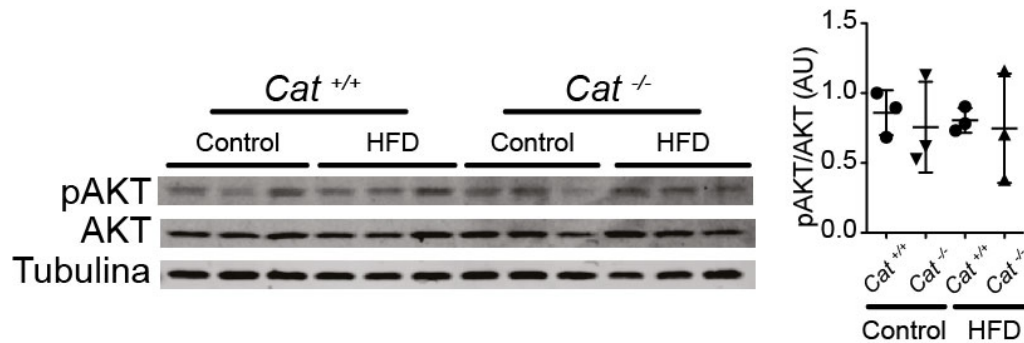


Figura 34. La activación de la AKT en condiciones basales no se altera por la ausencia de la catalasa en condiciones de alimentación con una dieta baja en grasa o la HFD. Las determinaciones de la abundancia de las proteínas en el hígado se detectaron utilizando inmunodetección en un extracto total de proteínas obtenida del hígado de los ratones de 3 meses de edad alimentados por 15 días con la dieta baja en grasa (control) o la HFD. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio \pm SD, n= 3-4.

El resultado anterior no permite concluir que la vía de la insulina no está afectada, pues un estímulo con insulina podría evidenciar un fenómeno diferente. Para determinar directamente si la falta de la catalasa causa diferencias en la respuesta a insulina, se inyectó insulina en ratones de 2 meses de edad alimentados con una dieta estándar. Los ratones previamente se ayunaron por 12 horas para disminuir, en la medida posible, el nivel de la pAKT basal. El estímulo con la insulina causó hipoglicemia en todos los animales, indicando que la acción de la insulina no se altera por la ausencia de la catalasa (Figura 35A). Al analizar la abundancia de la pAKT en el hígado de estos ratones, se observó que se incrementó su abundancia considerablemente por la acción de la insulina, sin embargo, no se encontraron cambios entre ratones silvestres y mutantes (Figura 35B). Aún es necesario analizar si en condiciones de alimentación con la HFD el estímulo con insulina no altera los niveles de pAKT en los ratones *Cat*^{-/-}, aunque preliminarmente los datos en su conjunto sugieren que la respuesta a la insulina determinada por los niveles de la pAKT no se alteró por la falta de la catalasa, y que las alteraciones en la glucemia tanto en la alimentación con la HFD como en el envejecimiento probablemente se debieron a un efecto secundario por la alteración de la lipogénesis.

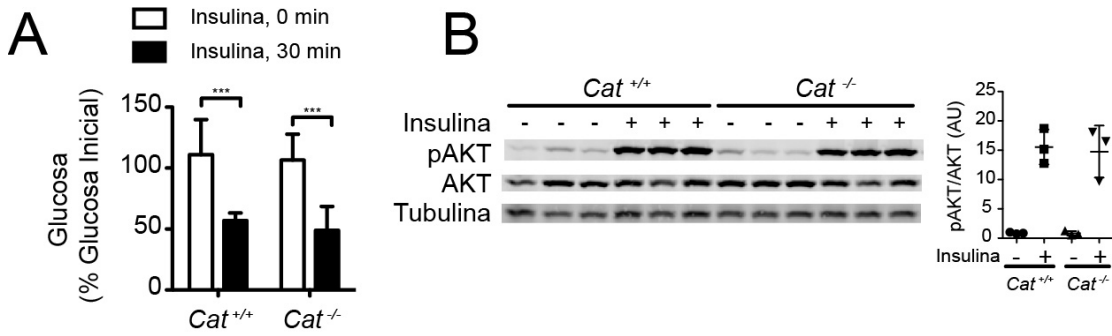


Figura 35. La inducción de la activación de la AKT por la insulina no se afecta por la ausencia de la catalasa. (A) Glucemia de los ratones después de la inyección con insulina vía ip. (B) Inmunodetección de pAKT y AKT total. Las determinaciones de la abundancia de las proteínas en el hígado se detectaron utilizando inmunodetección en un extracto total de proteínas obtenida del hígado de ratones de 2 meses de edad alimentados dieta estándar. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio \pm SD, n= 3-4.

6.7 La autofagia y la actividad lisosomal parecen estar afectadas por la ausencia de la catalasa

Como se mencionó, la AMPK es un regulador positivo de la actividad catabólica en general, lo que también incluye a la autofagia (Mihaylova and Shaw, 2011). Las ROS también inducen la autofagia (Filomeni *et al.*, 2015). Para determinar si la autofagia podría haberse alterado por la ausencia de la catalasa, se midió la abundancia de las proteínas p62 y las formas I y II de LC3 en el hígado, que participan en la autofagia. En la condición de alimentación con la dieta control y con la HFD por 15 días no se observaron cambios significativos en la abundancia de la p62, pero sí un incremento en LC3-II, fenómeno que fue principalmente notorio en la dieta control (Figura 36). Debido a que la autofagia puede degradar específicamente orgánulos como los peroxisomas (Katarzyna and Suresh, 2016), y a que la catalasa es una enzima peroxisomal, es posible que se afecte la cantidad de peroxisomas. Para determinar posibles alteraciones en la abundancia de los peroxisomas en el hígado, se midió la proteína peroxisomal PMP70 como un indicador de la abundancia de estos orgánulos. Los resultados mostraron que no se alteró significativamente la abundancia de la PMP70, aunque solo como tendencia pareció ser mayor en los ratones *Cat*^{-/-} (Figura 36). Los resultados, por lo tanto, indican que por la ausencia de la catalasa la autofagia no se alteró con la alimentación con la dieta baja en grasa o con la HFD.

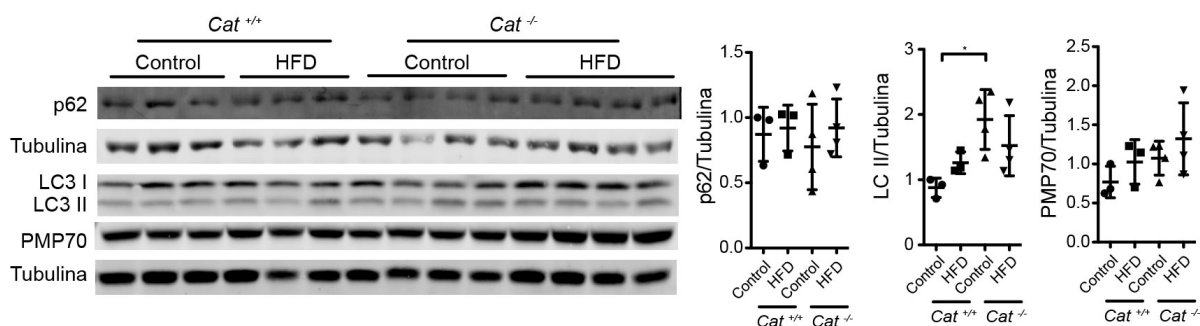


Figura 36. La autofagia y el marcador de peroxisomas PMP70 no se afecta en los ratones carentes de catalasa alimentados con una dieta baja en grasa o con la HFD. Las determinaciones de la abundancia de las proteínas en el hígado se determinaron utilizando inmunodetección en un extracto de proteínas totales de hígado de ratones de 3 meses de edad alimentados por 15 días con la dieta baja en grasa (control) o la HFD. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio \pm SD, n = 3-4.

Si bien en ratones alimentados con la HFD se han encontrado alteraciones en la autofagia (Singh *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010), el tiempo de alimentación ha sido más largo. Lo anterior podría ser una razón por la cual en este caso sólo se observaron cambios discretos en los ratones alimentados con la dieta control y con la HFD por 15 días, sin embargo, el ayuno es conocido que induce la autofagia (Takagi *et al.*, 2016b). Por lo tanto, se midió la abundancia de p62 y LC3 en esta condición. De acuerdo con la expectativa, p62 disminuyó en el ayuno de 24 y 48 horas (Figura 37), aunque, no se observaron cambios entre los ratones silvestres y mutantes. La isoforma LC3-II se incrementó en los ratones ayunados de ambos genotipos (Figura 37), no obstante, en los ratones *Cat*^{-/-} se encontró en mayor abundancia que en los ratones silvestres, similar a como sucedió en la condición de alimentación con HFD. Si bien los cambios no fueron significativos, si se observaron tendencias que podrían indicar alteraciones en la autofagia por la ausencia de la catalasa, y que será importante analizar con mayor detalle en un futuro.

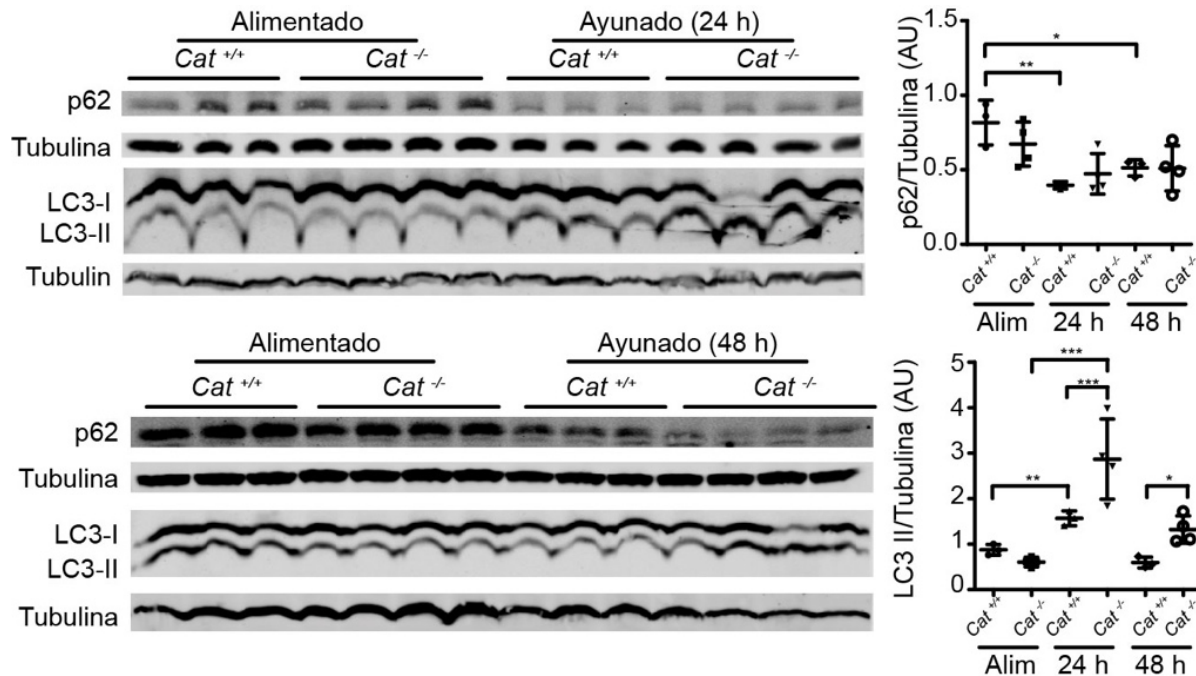


Figura 37. La autofagia se incrementa con el ayuno. Las determinaciones de la abundancia de las proteínas importantes de la autofagia se determinaron utilizando inmunodetección en un extracto de proteína total del hígado de ratones de 3 meses de edad que se ayunaron por 24 horas. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio ± SD, n= 3-4.

Los cambios observados en la autofagia en la condición de ayuno también podrían afectar el contenido de peroxisomas, por lo que se determinó la abundancia de la PMP70 en esta condición. Sin embargo, no se observaron alteraciones importantes, pues solo a las 24 horas de ayuno en los ratones silvestres la PMP70 pareció disminuir, mientras que a las 48 horas la abundancia de PMP70 fue similar a la condición alimentada, tanto en ratones silvestres como en los mutantes (Figura 38). Estos datos sugieren que, a pesar de la falta de la catalasa, e independientemente del ayuno o la alimentación con la HFD, no hay afectación relevante en el número de peroxisomas.

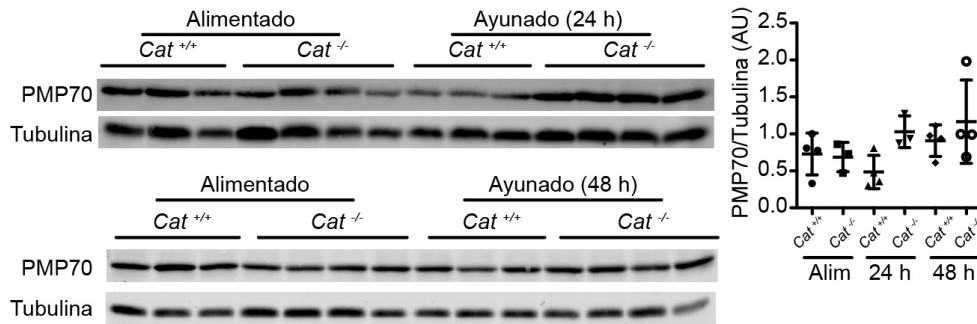


Figura 38. El marcador de peroxisomas PMP70 no se altera por el ayuno en los ratones *Cat*^{-/-}. Las determinaciones de la abundancia de la PMP70 se realizaron por inmunodetección en un extracto total de proteínas del hígado de ratones de 3 meses de edad que se ayunaron por 24 y 48 horas. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio \pm SD, n= 3-4.

La posible participación de la autofagia en alteraciones por la ausencia de la catalasa en el hígado, también se analizó mediante la determinación de los niveles de expresión de los genes que codifican para proteínas de la autofagia. Los niveles de expresión de los genes *Atg5*, *Atg7*, *LC3B* y *p62* se incrementaron considerablemente a las 24 horas de ayuno, mientras que a las 48 horas algunos de ellos disminuyeron su nivel de expresión de manera discreta, sin embargo, en términos generales el comportamiento fue similar entre ratones silvestres y los mutantes (Figura 39). Estos resultados confirmaron la inducción de la autofagia por el ayuno que, en forma aparente, se observó por la inmunodetección de las proteínas, pero no evidenció alteraciones importantes por la ausencia de la catalasa.

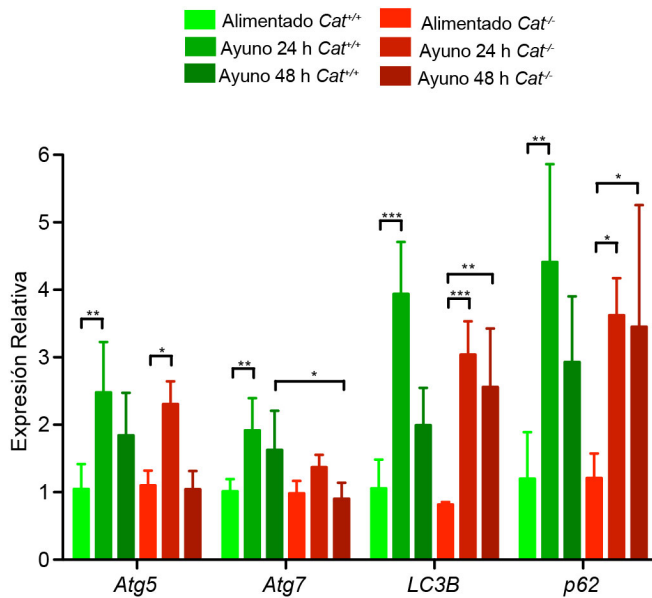


Figura 39. Los niveles de la expresión de los genes de la autofagia se incrementan en respuesta al ayuno.

Los niveles de la expresión se determinaron por medio de qRT-PCR. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado de los ratones alimentados o ayunados. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*. Promedio \pm SD, n= 3-4.

La autofagia requiere de los lisosomas en su fase final, además, los lisosomas pueden tener un papel determinante en la degradación de grasas (Settembre and Ballabio, 2014). Así que se determinó el efecto de la falta de la catalasa sobre la abundancia de las proteínas del lisosoma LAMP1 y LAMP2, además de la chaperona HSP70 (también conocida como HSC70) que se relaciona, entre otros procesos, con la autofagia mediada por chaperonas (Zuiderweg *et al.*, 2017). La abundancia de LAMP1 en el hígado se mantuvo sin cambios después de que los ratones silvestres se sometieron a 24 horas de ayuno, mientras que el mismo tratamiento en los ratones $Cat^{-/-}$ causó una disminución (Figura 40A). A las 48 horas se observó que LAMP1 incrementó en el hígado de los ratones $Cat^{+/+}$, pero no así en los ratones $Cat^{-/-}$ (Figura 40A). Por su parte LAMP2 en el hígado se mantuvo en niveles similares entre la condición alimentada y el ayuno de 24 horas independientemente del genotipo, pero incrementó a las 48 horas de ayuno tanto en los ratones $Cat^{+/+}$ como en los $Cat^{-/-}$ (Figura 40A). Inesperadamente HSP70 tuvo un comportamiento interesante, pues a las 24 horas de ayuno disminuyó considerablemente, sobre todo en los ratones silvestres, y continuó en bajos niveles en estos animales hasta las 48 horas de ayuno, no obstante, en los ratones $Cat^{-/-}$, si bien disminuyó a las 24 horas,

a las 48 horas sus niveles fueron comparables a los detectados en la condición alimentada (Figura 40A). Al analizar los niveles de expresión del gen *Lamp2* se observó incrementado a las 24 horas, y se mantuvo en el mismo nivel hasta a las 48 horas, indicando que, si bien el ayuno promueve su expresión, los mecanismos que determinan la abundancia de su proteína no coinciden completamente con su mRNA (Figura 40B). Solo como un indicador de la actividad de la degradación de proteínas vía proteosoma, se determinó el nivel de expresión de *Atrogin*, que codifica para una E3 ligasa necesaria para la proteólisis vía proteosoma. El nivel de expresión de *Atrogin* se incrementó a las 24 horas de ayuno y así se mantuvo hasta las 48 horas, tanto en ratones mutantes como en los silvestres (Figura 40B). Estos datos sugieren que posiblemente la formación de los lisosomas no se afecta por la ausencia de la catalasa durante el ayuno, aunque la alteración en la abundancia de HPS70 en los ratones carentes de la catalasa ayunados por 48 horas podría sugerir alteraciones en su actividad o algún proceso que requiera su actividad, como la autofagia mediada por las chaperonas.

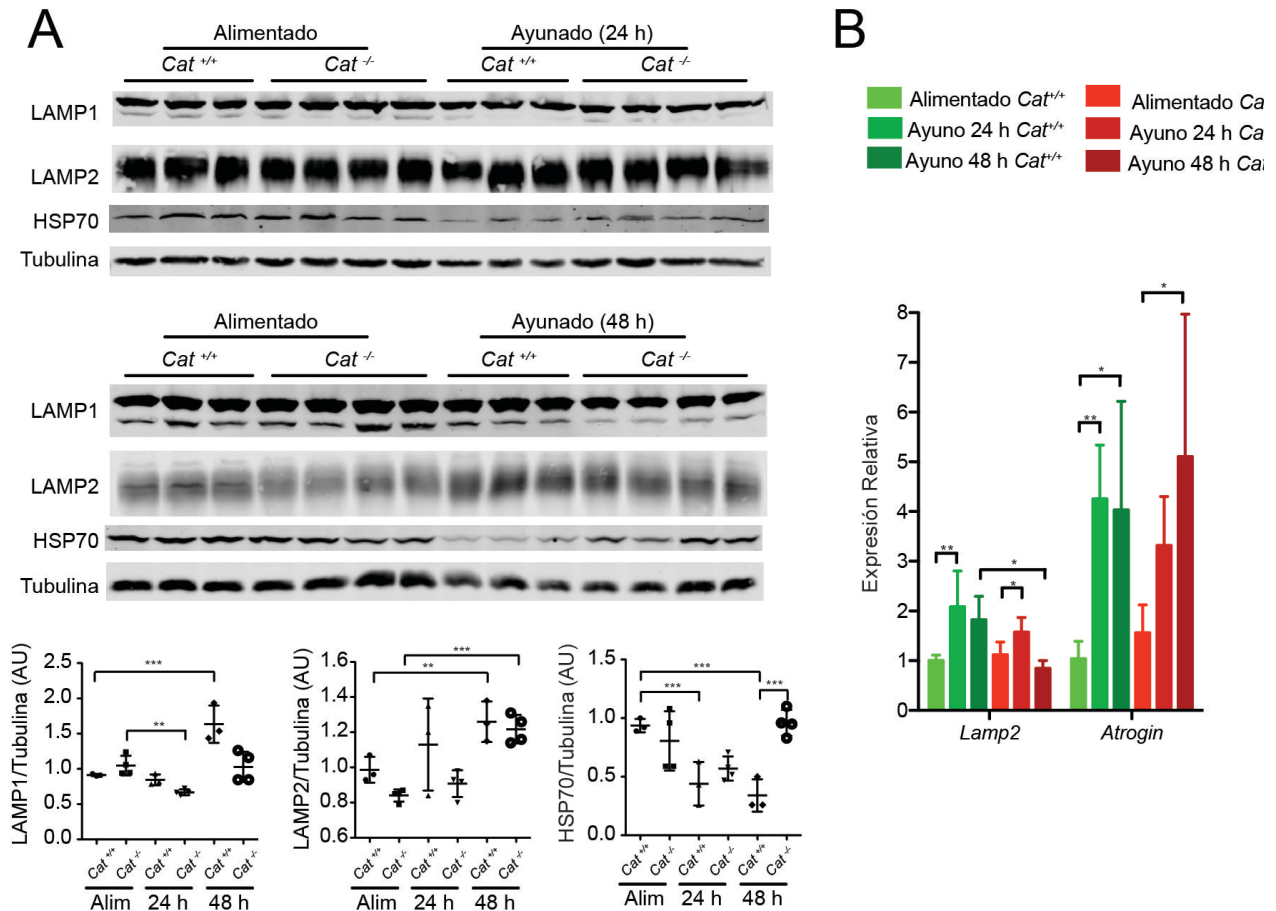


Figura 40. La ausencia de la catalasa afecta la abundancia de las proteínas del lisosoma y de la chaperona HSP70 en el ayuno. (A) Abundancia de las proteínas de interés en el hígado. (B) Niveles de expresión de *Lamp2* y de *Atrogin*, que codifica para una de las E3 ligasa involucrada en la degradación de proteínas vía proteosoma. Las proteínas de interés se detectaron utilizando inmunodetección en un extracto total de proteínas obtenida del hígado de los ratones de 3 meses de edad ayunados por 24 y 48 horas. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio \pm SD, n= 3-4.

Para tener indicios de posibles alteraciones en la actividad lisosomal, se exploró directamente el efecto de la falta de catalasa. Cortes frescos del hígado de ratones ayunados se tiñeron con LysoTracker, un marcador fluorescente que detecta orgánulos con pH ácido. Como se puede ver en la Figura 41, en los ratones silvestres se logró identificar un incremento discreto de la tinción del LysoTracker, mientras que en los animales *Cat*^{-/-} desde la condición alimentada fue mayor y se exacerbó por el ayuno; además, el patrón de la marca de lysoTracker fue distinto al de los ratones silvestres, pues se apreció lo que podrían ser lisosomas más grandes (Figura 41). Si bien estos datos son preliminares,

sugieren que puede haber alteraciones en la actividad lisosomal asociado a la ausencia de la catalasa.

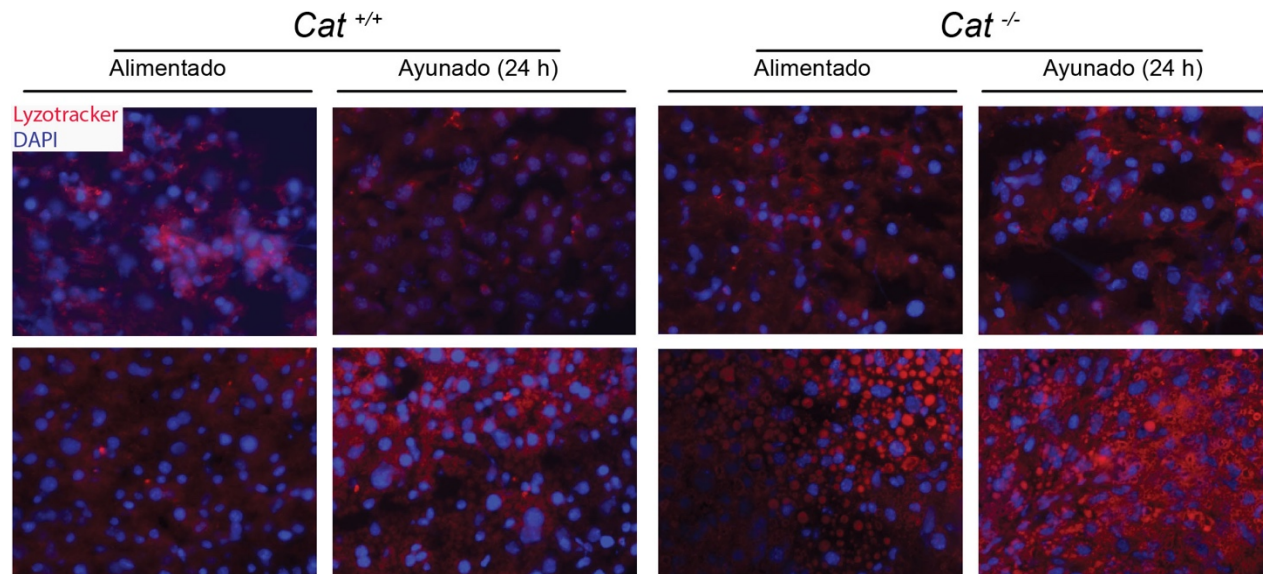


Figura 41. La actividad lisosomal incrementa en los ratones carentes de la catalasa. La tinción con el marcador fluorescente Lyzotracker se hizo en cortes frescos de hígado de ratones alimentados y ayunados por 24 horas.

Con el fin de tener más evidencias de alteraciones de la actividad lisosomal por la ausencia de la catalasa, se realizó un cultivo primario de hepatocitos de los ratones *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-}. En estos cultivos se simularon las condiciones de ayuno reemplazando el medio de mantenimiento con una solución de HBSS, la cual solo contiene glucosa como fuente de energía y sales. El resultado obtenido fue similar al observado en los cortes de hígado, pues los hepatocitos obtenidos de los ratones *Cat*^{-/-} mostraron mayor tinción con Lyzotracker en comparación con los obtenidos de los ratones silvestres. El fenómeno se presentó desde las 4 horas de estar incubados en HBSS, y se incrementó a las 6 horas de cultivo con HBSS (Figura 42). En conjunto los datos de inmunodetección, de expresión de genes y de Lyzotracker, sugieren que la ausencia de la catalasa posiblemente altera la actividad lisosomal, que podrían estar asociados a los cambios discretos en la autofagia, pero sin claras afectaciones en los peroxisomas, por lo que serán aspectos interesantes para analizar en mayor detalle en el futuro.

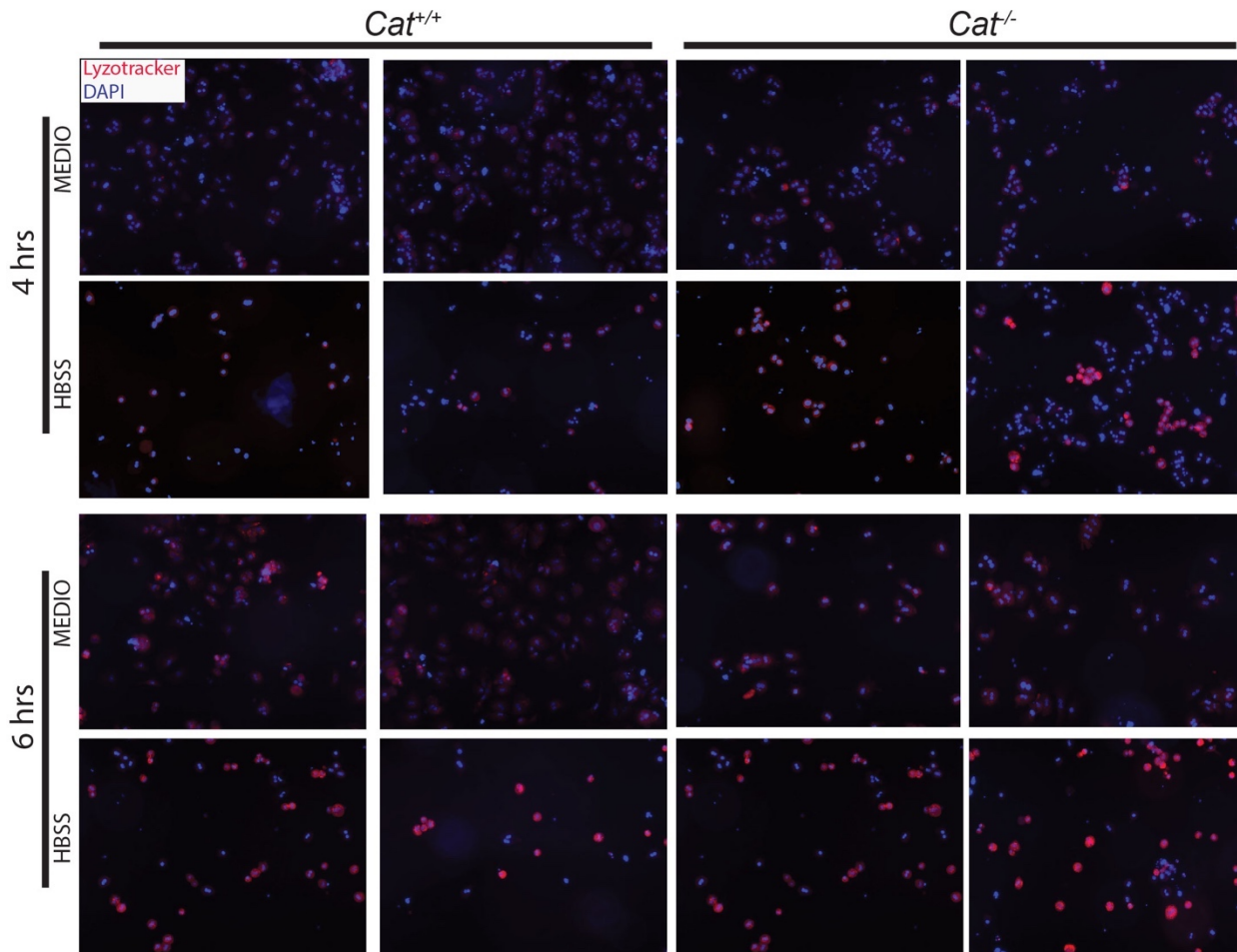


Figura 42. La actividad lisosomal se incrementa en los hepatocitos de los ratones carentes de la catalasa. La tinción con el marcador fluorescente LysoTracker se hizo en el cultivo primario de hepatocitos una vez retirado el medio de cultivo y reemplazado con la solución HBSS por 4 o 6 horas.

6.8 La ausencia de la catalasa afecta a la viabilidad de los ratones neonatos en condiciones de ayuno

Los resultados descritos hasta el momento mostraron que en los ratones *Cat*^{-/-} se alteró la acumulación de las grasas en el hígado. Además, las observaciones en el ayuno a las 48 muestran indicios de que es posible que este fenómeno comprometa la viabilidad de estos animales, pues sólo en los ratones *Cat*^{-/-} se observaron cambios severos en los niveles de los cuerpos cetónicos y en el aspecto de los intestinos (Figura 25D, E). En los ratones neonatos la cantidad de las reservas de energía como el glucógeno y el metabolismo de los cuerpos cetónicos, así como la autofagia, son necesarios para la supervivencia en

condiciones de ayuno (Cotter *et al.*, 2011; Efeyan *et al.*, 2013; Hufton and Wharton, 1982; Lei *et al.*, 1996), por lo que los cambios metabólicos observados en los ratones adultos carentes de la catalasa podría disminuir su viabilidad en la etapa neonatal. Para demostrar lo anterior, ratones neonatos *Cat^{-/-}* se sometieron a ayuno. Se encontró que el tiempo de supervivencia media de los ratones neonatos que no recibieron alimento previo al ayuno fue de 15 horas con 45 minutos para los ratones *Cat^{-/-}* y de 18 horas con 30 minutos para los ratones silvestres (Figura 43A). El mismo fenómeno se observó en los animales que se alimentaron de forma natural con leche materna durante 12 horas (Figura 43B), aunque en este caso los tiempos de supervivencia media fueron de 37 y 41 horas para los ratones *Cat^{-/-}* y *Cat^{+/+}*, respectivamente. La disminución de la supervivencia de los ratones neonatos *Cat^{-/-}* en ambas condiciones probadas sugieren que la catalasa es necesaria para la supervivencia en la condición de falta de alimento.

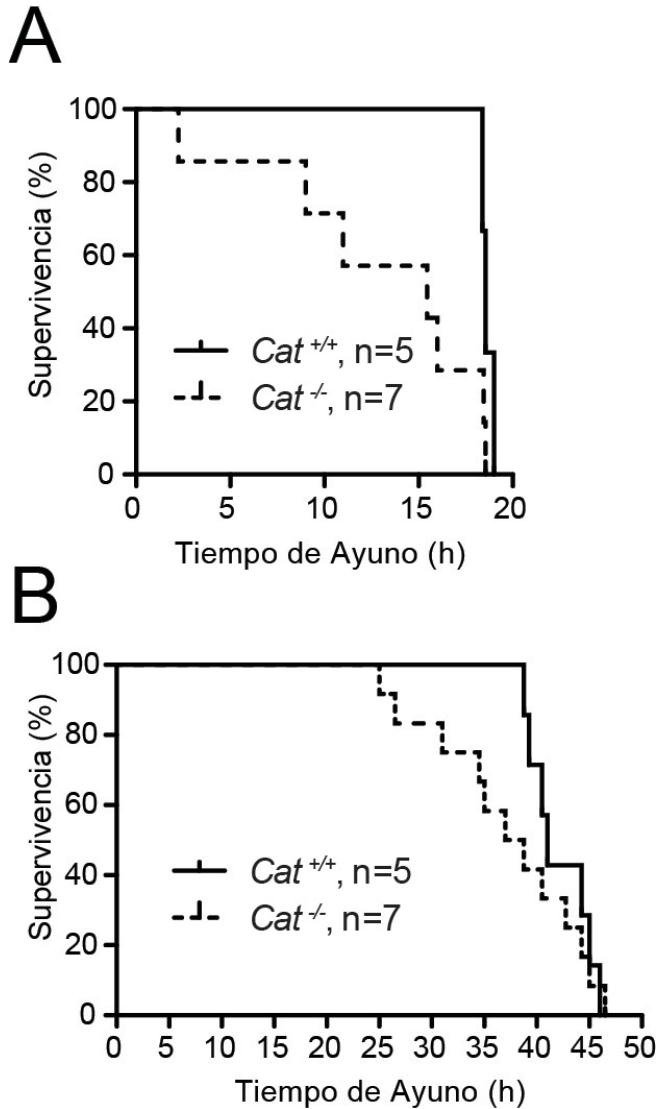


Figura 43. La ausencia de la catalasa causa disminución de la supervivencia de los ratones neonatos en condiciones de ayuno. (A) Ratones neonatos obtenidos por cesárea y ayunados inmediatamente. (B) Ratones neonatos que nacieron de forma natural y se les inició el ayuno después de 12 horas de estar alimentados por la madre.

A nivel fisiológico se observó que los cuerpos cetónicos de los neonatos *Cat*^{-/-} disminuyeron considerablemente desde las 6 horas de ayuno, mientras que en los ratones *Cat*^{+/+} la disminución se observó hasta las 12 horas (Figura 44A). Similar a este comportamiento, en los ratones *Cat*^{-/-} los niveles de la glucosa se redujeron a las 2 horas de ayuno, pero niveles similares entre ratones silvestres y mutantes se observaron a las 6 y 12 horas de ayuno (Figura 44B). Los efectos en la glucemia no correlacionaron con el contenido del glucógeno en el hígado, pues fue similar entre los ratones de ambos genotipos (Figura 44C). A diferencia de lo que sucedió en los ratones adultos, en los ratones neonatos no se detectaron cambios en el contenido de los triacilglicéridos en el

hígado, con excepción del colesterol total, que se incrementó significativamente en los ratones *Cat*^{-/-} con 12 horas de ayuno (Figura 44D, E).

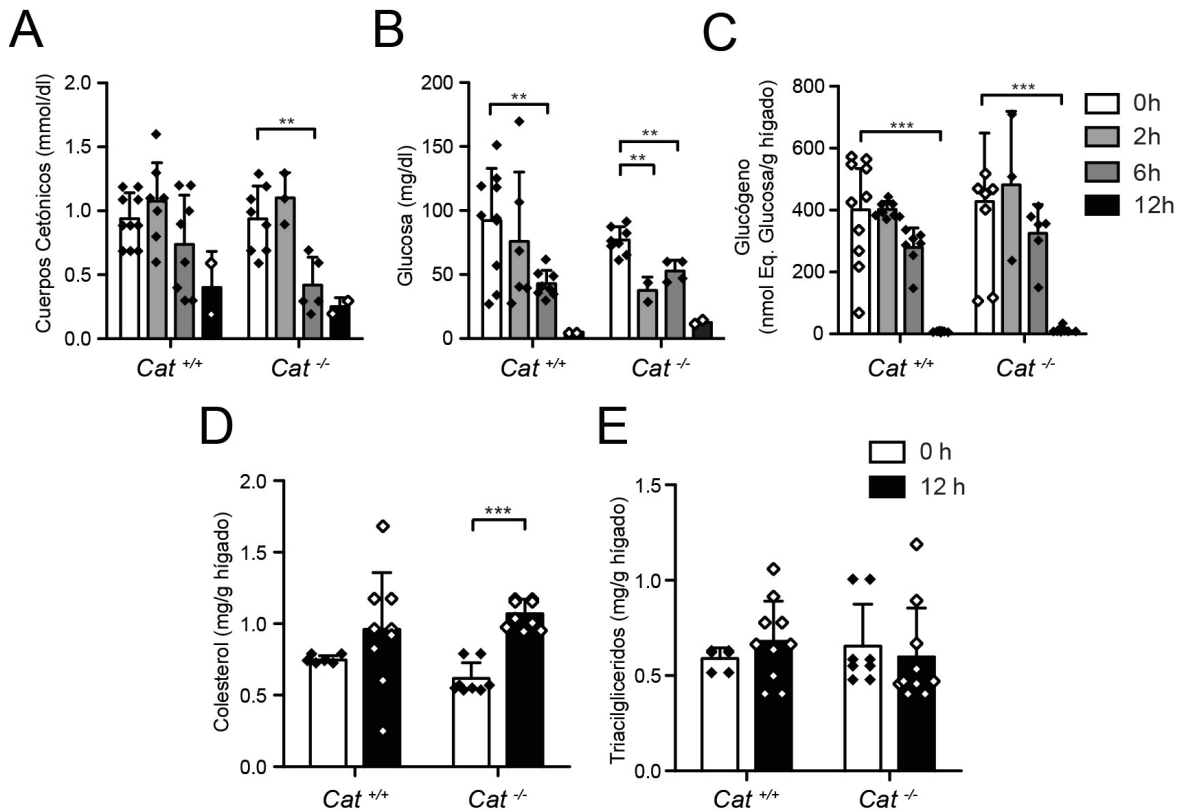


Figura 44. Efecto del ayuno en los ratones neonatos *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-}. Niveles de los cuerpos cetónicos (A) y de la glucosa (B) de los ratones neonatos silvestres y mutantes ayunados a diferentes tiempos. (C) Contenido del glucógeno en el hígado de los ratones neonatos silvestres y mutantes ayunados a diferentes tiempos. Contenido del colesterol (D) y de los triglicéridos (E) en el hígado de ratones neonatos ayunados por 12 horas. Promedio \pm SD, n= 2-10.

Para determinar si los efectos en la supervivencia de los ratones neonatos podrían correlacionar con alteraciones en la expresión de los genes del metabolismo en el hígado, se determinaron los niveles de expresión de los genes que previamente se había visto afectados en los ratones adultos. El nivel de expresión de la catalasa tuvo un comportamiento similar a como ocurrió en los adultos, disminuyó por el ayuno en los ratones silvestres (Figura 45A). Por su parte la *Gck* no tuvo cambios en ratones neonatos *Cat*^{+/+} ayunados, pero en los *Cat*^{-/-} se observó una fuerte disminución de su nivel de expresión (Figura 45A). De los genes de la lipogénesis, el nivel de expresión de la *Fas*

disminuyó por el ayuno en todos los ratones sin importar el genotipo, no obstante, la expresión de *Pparγ2* y *Spot14* no se alteró en promedio, pero mostró mucha variabilidad entre individuos (Figura 45A). En el caso de la *Acox* no se detectaron cambios en su nivel de expresión por efecto del ayuno o el genotipo, pero sí en *Fgf21*, que se sobre-expresó tanto en ratones silvestres como en mutantes (Figura 45A). De la vía de la gluconeogénesis llamó la atención el comportamiento de la *Pck*, pues su inducción por el ayuno fue de al menos dos órdenes de magnitud, lo que sugiere que la gluconeogénesis es una vía importante para la supervivencia de los ratones neonatos en condiciones de ayuno y es un mecanismo que se mantiene aún en ausencia de la catalasa (Figura 45B).

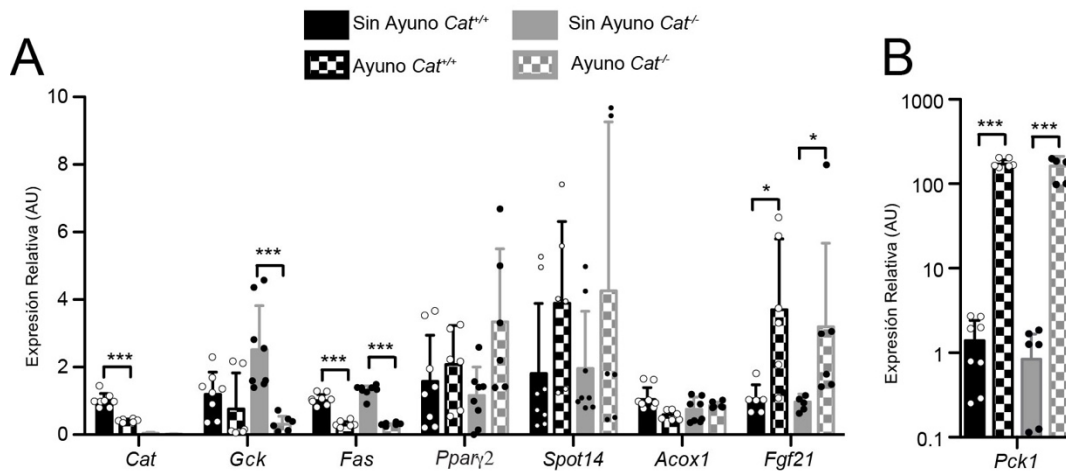


Figura 45. Efecto del ayuno en la expresión de los genes del metabolismo en los ratones neonatos *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-}. La expresión se determinó por medio de qRT-PCR. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado de los ratones neonatos en condiciones de sin ayuno o ayunados. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*. Promedio ± SD, n= 2-4.

Como se mencionó, la autofagia también está involucrada en la supervivencia de ratones neonatos en ausencia de alimento. Para tener un indicio de posibles alteraciones en este proceso por la falta de catalasa en ratones neonatos, se determinaron los niveles de expresión de los genes de la autofagia y de marcadores de los lisosomas en el hígado de los ratones neonatos al inicio del ayuno y después de 12 horas de ayuno. Los niveles de expresión de *Atg5*, *Atg7* y *Lamp2* no se afectaron por el genotipo o la condición (Figura 36), mientras en el caso de *Lc3b* se observó un incremento por el ayuno en los ratones silvestres, pero no así en los ratones *Cat*^{-/-}, en parte debido a que en estos últimos en la

condición alimentada el nivel de expresión fue tendiente a ser mayor que la de los silvestres (Figura 46). A diferencia de lo anterior, en el caso del *Atrogin*, necesario en la proteólisis vía proteosoma, se observó que su expresión incrementó en los ratones silvestres y mutantes ayunados, lo que está de acuerdo con la importante proteólisis que debe ocurrir durante el ayuno de ratones neonatos (Figura 46). En conjunto estos resultados muestran que la ausencia de la catalasa afectó la viabilidad de los ratones neonatos por el ayuno. No fue posible identificar alteraciones contundentes que permitiera relacionar este fenotipo con defectos en la acumulación de grasas, sin embargo, la dinámica de producción de cuerpos cetónicos sí pudiera afectarse por la ausencia de catalasa.

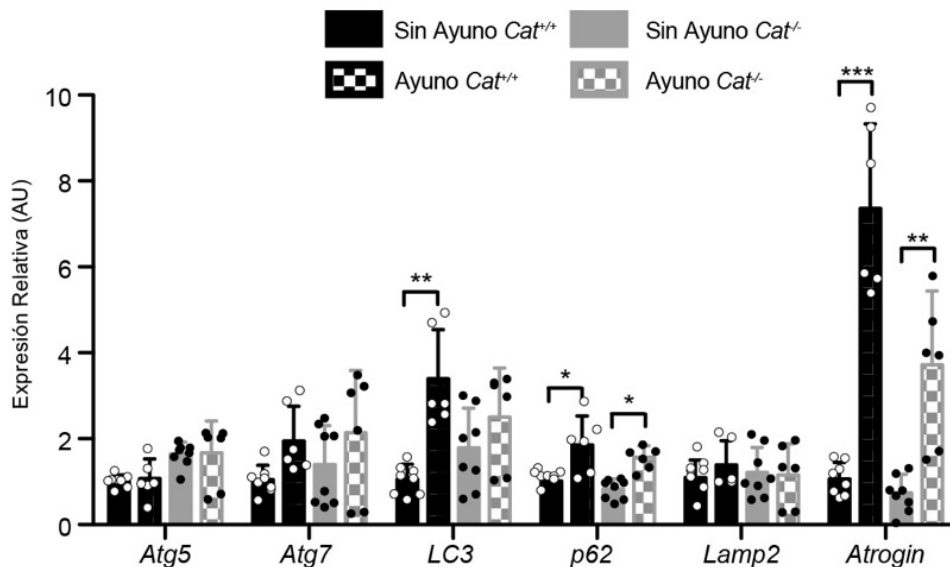


Figura 46. El nivel de expresión de los genes de la autofagia en los ratones neonatos *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-}. La expresión se determinó por medio de qRT-PCR. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado de los ratones neonatos en condiciones de sin ayuno o ayunados. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*. Promedio \pm SD, n= 2-4.

6.9 En los ratones viejos también se altera la expresión de los genes del metabolismo, la actividad de la AMPK y la actividad lisosomal.

Es posible que los niveles de expresión de los genes del metabolismo en el hígado también se hayan afectado en los ratones viejos debido a la falta de la catalasa. Al respecto, los niveles de expresión de los genes de la gluconeogénesis *Pck1* y *G6pc* se incrementaron fuertemente por la edad en los ratones de ambos genotipos; el mismo efecto se observó

para los genes de la lipogénesis *Fas* y *Scd1* y en los de la degradación de lípidos los *Ctp1a* y *Fgf21*. En sentido opuesto, el nivel de expresión de *Gck*, *Pparγ2*, y *Acox* disminuyeron por la edad, mientras que los de *Spot14* y *Pparα* no cambiaron. Aunque en general el patrón de expresión fue similar entre los ratones silvestres y mutantes. El nivel de expresión de *Pparγ2* se vio claramente más disminuido en los ratones *Cat^{-/-}* (Figura 47), por lo que se trató del único gene del cual su comportamiento fue acorde con lo observado en la condición de alimentación con la HFD y en el ayuno, sugiriendo que PPAR γ 2 podría ser uno de los componentes determinantes del fenotipo asociado a la ausencia de la catalasa.

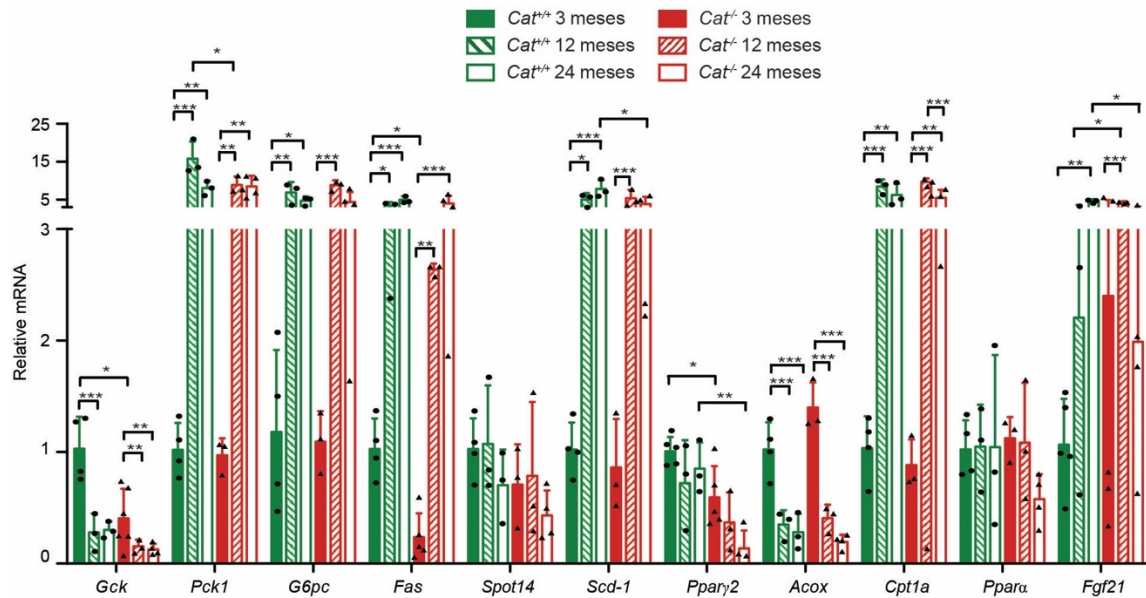


Figura 47. El nivel de expresión de los genes del metabolismo de los ratones viejos *Cat^{+/+}* y *Cat^{-/-}*. El nivel de expresión se determinó por medio de qRT-PCR. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado de los ratones silvestres y mutantes de edad de 3, 12 y 24 meses. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*. Promedio \pm SD, n= 2-4.

Para determinar si los cambios en los niveles de expresión que se observaron obedecían a alteraciones en la activación de la AMPK o la autofagia, se determinó la abundancia de la pAMPK, la p62 y LC3 en el hígado de los ratones viejos. Mientras a los 12 meses de edad la forma fosforilada de la AMPK fue similar en el hígado de los ratones silvestres o mutantes, a los 24 meses de edad la cantidad de la pAMPK fue mayor en el hígado de los

ratones *Cat*^{-/-} (Figura 48). En el caso de la p62 se observó una tendencia de mayor cantidad en el hígado de los ratones *Cat*^{-/-} a la edad de 12 meses, y el de los ratones viejos de 24 meses de edad, independientemente del genotipo. Un fenómeno similar se observó en la cantidad de LC3-II, sin embargo, la diferencia entre los ratones viejos de 24 y 12 meses de edad no fue estadísticamente significativa (Figura 48). A pesar de lo anterior, una observación interesante fue la detección de una banda de LC3 muy similar en peso molecular a LC3-I (asterisco en Figura 48) solo en los ratones *Cat*^{-/-}, tanto en los animales de 12 como en los de 24 meses de edad. Si bien se han reportado que existen isoformas y formas modificadas de LC3 distintas a las clásicas I y II (Wang *et al.*, 2013b), el patrón de cómo se debiera observar en una inmunodetección no es el que se ha descrito, por lo que es posible que se trate de una isoforma que sólo está presente en ausencia de la catalasa.

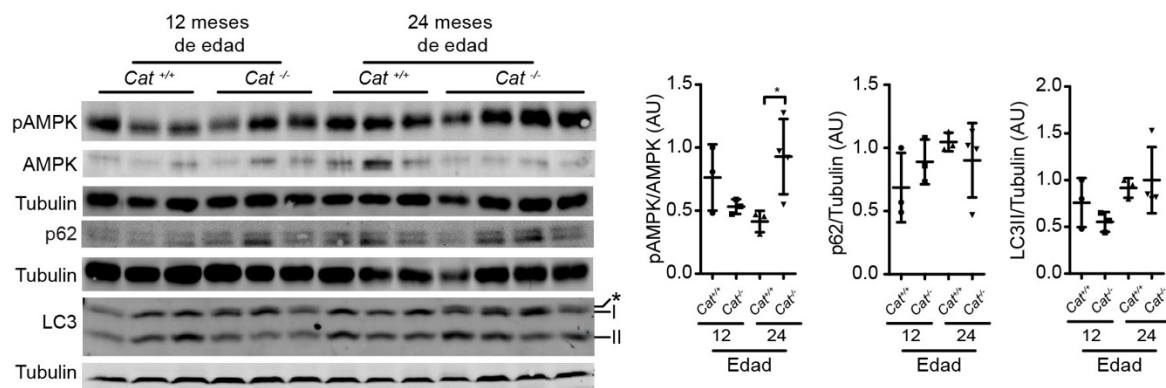


Figura 48. La actividad de la AMPK y la autofagia parecen alteradas en los ratones viejos *Cat*^{-/-}. Las determinaciones de la abundancia de las proteínas en el hígado se detectaron utilizando inmunodetección en un extracto total de proteínas del hígado de los ratones de 12 y 24 meses de edad. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio \pm SD, n= 3-4.

Los lisosomas se han relacionado con el envejecimiento y la longevidad (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2016) , y debido a que en el ayuno se encontraron alteraciones discretas en la actividad de estos orgánulos, se determinó la abundancia de las proteínas del lisosoma LAMP1 y LAMP2, además de la chaperona HSP70 en el hígado de los ratones viejos. Se encontró que la abundancia de estas proteínas pareció incrementar en los ratones de 24 meses de edad, aunque más bien se debió a que la cantidad de la tubulina disminuyó (Figura 49). No se logró determinar si los cambios en la abundancia de la

tubulina se debieron al experimento o al efecto de la edad, por lo que será necesario realizar más evaluaciones para determinar si hay afectaciones en las proteínas del lisosoma por efecto de la edad y la ausencia de la catalasa.

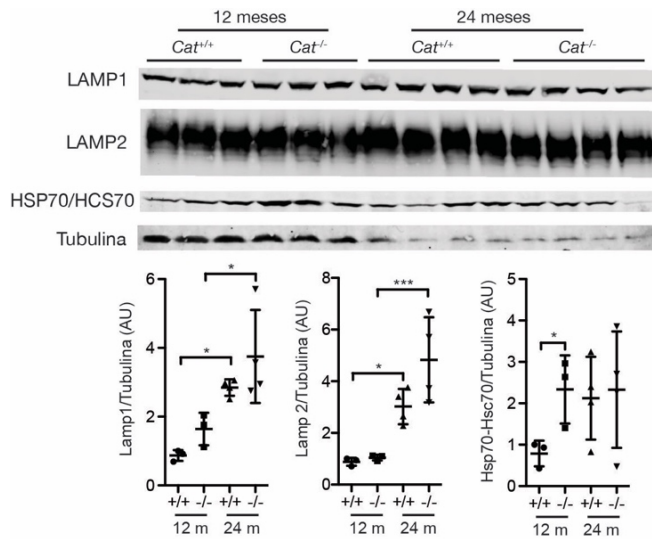


Figura 49. La abundancia de las proteínas del lisosoma LAMP1, LAMP2 y de la chaperona HSP70 se alteran por la edad y la ausencia de la catalasa. La determinación de la abundancia de las proteínas se determinó por inmunodetección en un extracto total de proteínas del hígado. La cuantificación de las bandas de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. Promedio ± SD, n= 3-4.

La β-galactosidasa es una enzima lisosomal, razón por la cual su actividad óptima es a pH ácido, mientras que su actividad a pH 6 se ha relacionado con la senescencia celular, aún no está claro si en la senescencia la cantidad de enzima se incrementa a tal grado que es posible detectarla a pH 6, que no es el óptimo, o si se debe a que la enzima sufre algún cambio (p. ej. modificaciones postraduccionales) que altera sus características cinéticas, pues no se conocen genes o isoformas adicionales que pudiera explicar el fenómeno. Debido a que en los ratones viejos se observó una discrepancia entre la tinción de β-galactosidasa a pH 6 y la expresión de los marcadores de la senescencia (Figura 20 y 21). Además, también basados en los cambios detectados en las proteínas de lisosoma en el ayuno, podría ser que la actividad de la β-galactosidasa que se observó en los viejos a pH 6 no se tratara de actividad asociada a la senescencia, si no a afectaciones en los lisosomas que no se logró observar cuando se determinó la abundancia de las proteínas lisosomales. Por lo anterior, y al no contar con muestras frescas de ratones viejos para realizar la tinción con Lysotracker, se determinó la actividad de β-galactosidasa a pH 4 en cortes histológicos de hígado. De forma inesperada se observó que tanto la cantidad de

puntos azules como el área azul disminuyeron conforme avanzó la edad, aunque el tamaño de puntos azules se mantuvo sin cambios aparentes, además de que no se encontraron diferencias entre los ratones silvestres y mutantes (Figura 50). Si bien la cantidad de los puntos azules y el área azul total fue mayor en los cortes de hígado a pH 4 comparados con los de pH 6 (Figura 20), algo esperado debido a que el pH ácido es el óptimo para la actividad de la enzima, los resultados no indicaron mayor actividad lisosomal en los ratones *Cat*^{-/-} viejos. Por lo tanto, otras metodologías, como la tinción con LysoTracker, serán necesarias de implementar para determinar si hay afectación en la actividad lisosomal en los ratones viejos.

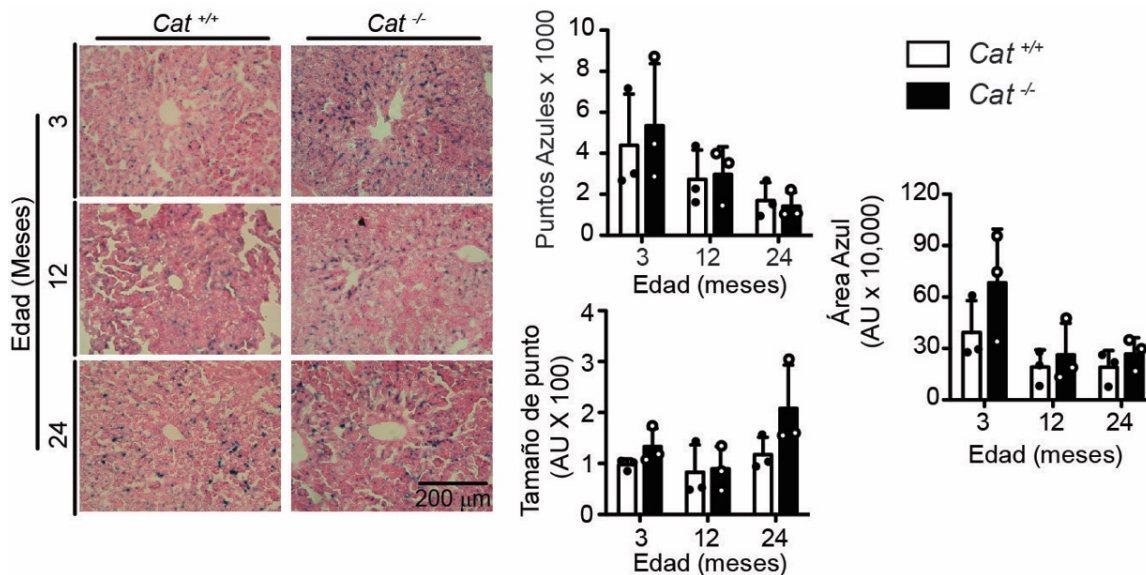


Figura 50. Actividad de la β -galactosidasa en pH 4 disminuye por la edad. La tinción de la β -galactosidasa se realizó en cortes histológicos de 10 μ m de hígado de los ratones *Cat*^{+/+} y *Cat*^{-/-} a pH 4. Los cortes se contra tiñeron con eosina. La cuantificación de la tinción se hizo contando los puntos azules, el tamaño promedio de los puntos y el área azul total mediante análisis de imágenes con el software ImajeJ. Cada dato es el promedio tres imágenes de un ratón. Los datos se expresan como promedio \pm SD, n= 3-4.

Se ha determinado que el número de peroxisomas se ve afectado en fibroblastos senescentes (Legakis *et al.*, 2002) y la proteína de membrana de los peroxisomas PMP70 se incrementa en el hipocampo de ratones viejos (Cipolla and Lodhi, 2017). Por lo tanto, éstos fenómenos podrían estar alterados en los ratones carentes de la catalasa. Por lo menos hasta los 24 meses, la abundancia de la proteína peroxisomal PMP70 sólo mostró

una ligera y aparente disminución en los ratones *Cat*^{+/+}, mientras que en los ratones *Cat*^{-/-} no se notó ninguna diferencia asociada con la edad (Figura 51A). La inmuno-fluorescencia para PMP70 en cortes del hígado de ratones de 24 meses mostró el patrón punteado esperado sin notables diferencias entre las muestras provenientes de los ratones con o sin catalasa (Figura 51B). Si bien estos datos sugieren que no hay alteraciones en el número de los peroxisomas, la alta variabilidad en estos experimentos, considerando sobre todo el bajo número de animales y la baja resolución de las inmuno-fluorescencias, no permite llegar a esta conclusión de manera definitiva, y obliga a realizar más experimentos para establecer claramente el efecto de la falta de la catalasa sobre el número de peroxisomas en los ratones viejos.

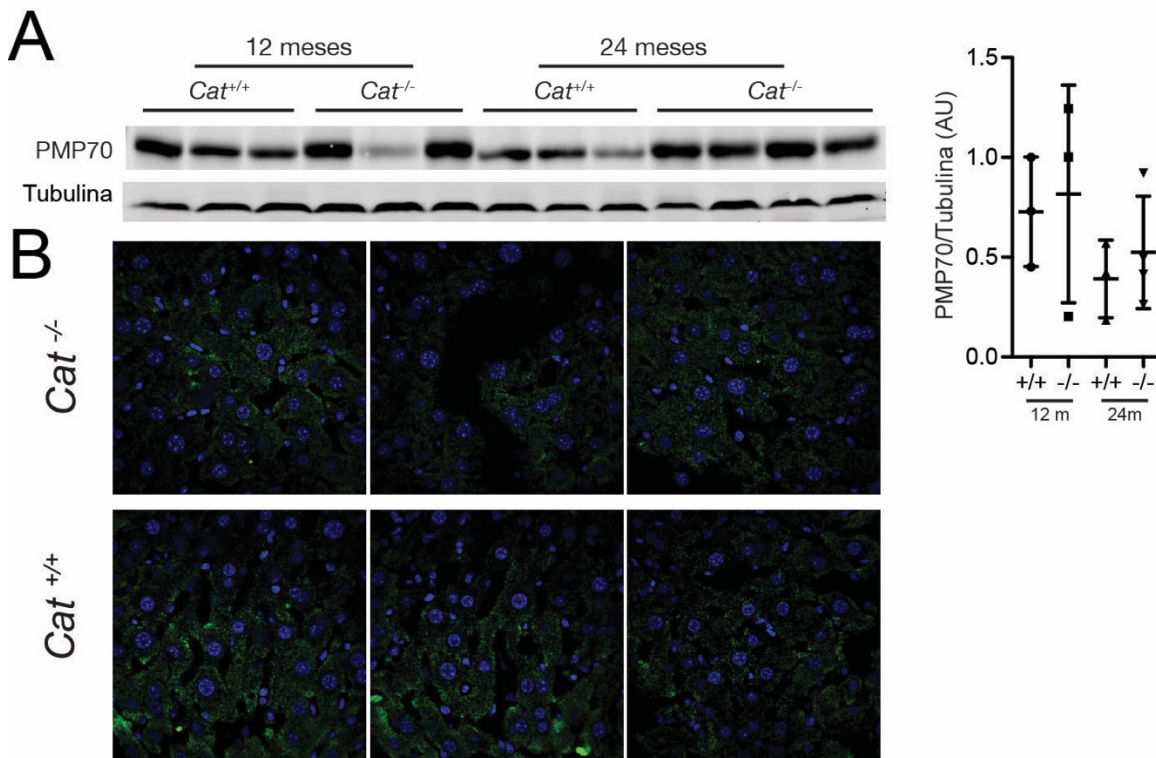


Figura 51. La cantidad de los peroxisomas no se altera por la ausencia de la catalasa o la edad. (A) La determinación de la abundancia de PMP70 se identificó por inmunodetección en un extracto total de proteínas del hígado de los ratones viejos. La cuantificación de la inmunodetección se realizó por densitometría con el software ImageJ. (B) Inmunofluorescencia de PMP70 en cortes de hígado de 10 μ m de ratones silvestres y mutantes de 24 meses de edad. Como marcador de núcleos se utilizó DAPI. Promedio \pm SD, n= 3-4.

6.10 *Klotho*: un candidato causante del fenotipo de los ratones por la ausencia de la catalasa.

Como se ha descrito, la lipogénesis parece ser la principal vía metabólica afectada por la ausencia de la catalasa. En línea con esta observación, PPAR γ 2, un regulador positivo de la lipogénesis, parece ser común denominador en todas las condiciones probadas. PPAR γ podría ser determinante de la longevidad de los ratones (Argmann *et al.*, 2009). Además, *Klotho*, un gen cuya ausencia provoca envejecimiento prematuro y una menor longevidad (Kuro-o *et al.*, 1997), está regulado a nivel de expresión por la actividad de PPAR γ 2 en el riñón (Zhang *et al.*, 2008). Se han identificado al menos dos genes de *Klotho*, el α -*Klotho* (también conocido como *Klotho*) y el β -*Klotho*; si bien el primero es el que se ha relacionado con el envejecimiento prematuro, su expresión en el organismo es limitada, ya que se encuentra especialmente en el riñón. Por su parte, β -*Klotho* se expresa de forma más ubicua y es el más abundante en el hígado. *Klotho* regula el metabolismo al permitir la señalización por FGF19, FGF21 y FGF23. *Klotho* forma complejos de proteínas con los receptores de los FGF (FGFR), permitiendo la unión de los FGF. Por ejemplo, en el hígado de ratones, FGF15 (FGF19 en humanos) induce la síntesis de sales biliares al señalar a través del complejo β -*Klotho*-FGFR4 (Inagaki *et al.*, 2005). Un mecanismo similar sucede con la señalización de FGF21, que requiere de β -*Klotho* y el FGFR1c para señalar y ejercer sus efectos metabólicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Bookout *et al.*, 2014; Kharitonov *et al.*, 2008). Estas evidencias sugirieron la posibilidad de que los bajos niveles expresión de *Ppar* γ 2 tuviera como consecuencia menor expresión de *Klotho* en el hígado lo que, además, explicaría la disminución de la longevidad de los ratones *Cat*^{-/-}. Para demostrar esta posibilidad, se midió la expresión de α -*Klotho* y de β -*Klotho* en el hígado de los ratones viejos. En primera instancia, se encontró que la abundancia del mRNA de α -*Klotho* fue menor en al menos tres órdenes de magnitud comparado con β -*Klotho* (Figura 52A). A pesar de estas diferencias en la abundancia de las dos isoformas, se encontró que la expresión de ambos se incrementó por efecto de la edad, sin embargo, no se observaron cambios significativos asociados al genotipo (Figura 52B).

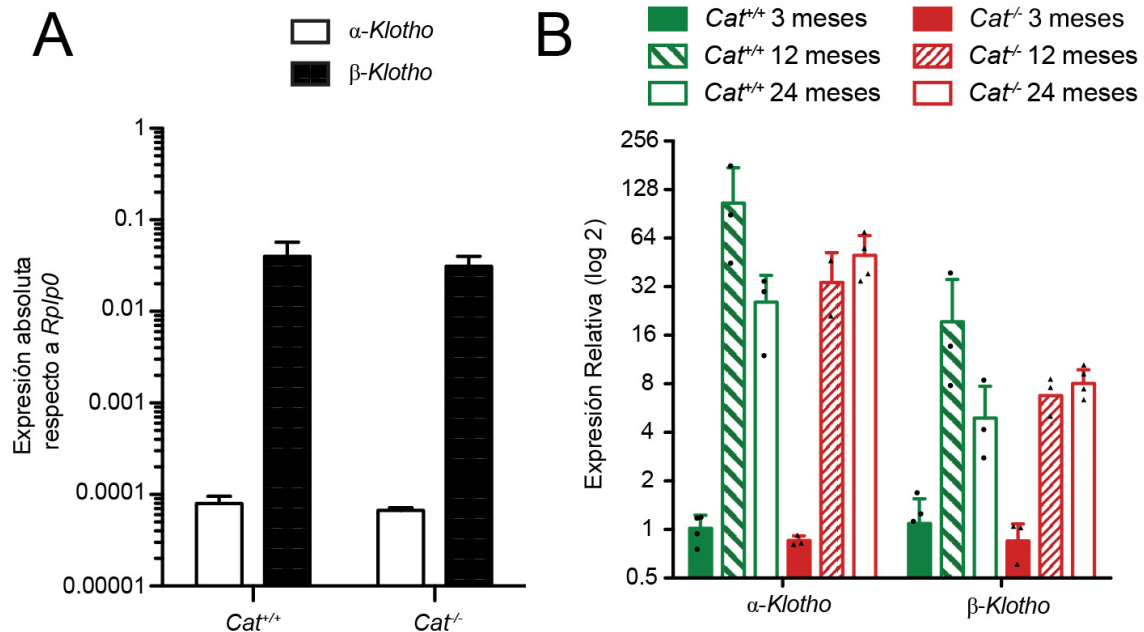


Figura 52. Los niveles de expresión de *Klotho* se incrementan con la edad. (A) Niveles de expresión de α -*Klotho* y de β -*Klotho* absolutos con respecto a la expresión de *Rplp0* en el hígado de los ratones silvestres y mutantes de tres meses de edad. El resultado evidencia que la abundancia del mRNA de α -*Klotho* en el hígado es menor al de β -*Klotho* en al menos tres órdenes de magnitud y es independiente del genotipo. (B) Niveles de expresión relativa de α -*Klotho* y de β -*Klotho* en los ratones silvestres y mutantes viejos. Los niveles de expresión se midieron por medio de qRT-PCR. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado de los ratones. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*. Promedio \pm SD, n= 3-4.

Debido a que *Klotho* participa en la regulación del metabolismo a través de los FGF, se determinó si sus niveles de expresión en el hígado se alteraron en los ratones alimentados con la dieta baja en grasa y con la HFD, además de en el ayuno. Contrario con la expectativa, no se encontraron diferencias en los niveles de la expresión de ambas isoformas por la alimentación con la HFD tanto en ratones silvestres como en $Cat^{-/-}$ (Figura 53A, B). De manera similar, en el ayuno no se encontraron alteraciones contundentes en los niveles de expresión de α -*Klotho* y de β -*Klotho* (Figura 53C, D). Por lo tanto, con la determinación de los niveles de expresión, no fue posible concluir si *Klotho* participa en las alteraciones metabólicas causadas por la ausencia de la catalasa. A pesar de estos datos, aún no se puede descartar completamente la participación de *Klotho* en las diferentes condiciones metabólicas probadas, ya que será necesario analizar otros órganos o tejidos,

sobre todo por el hecho de que a pesar de la limitada expresión de α -Klotho, principalmente en el riñón, su ausencia causa envejecimiento prematuro (Kuro-o *et al.*, 1997; Lindberg *et al.*, 2014), indicando que tiene efectos importantes a nivel sistémico.

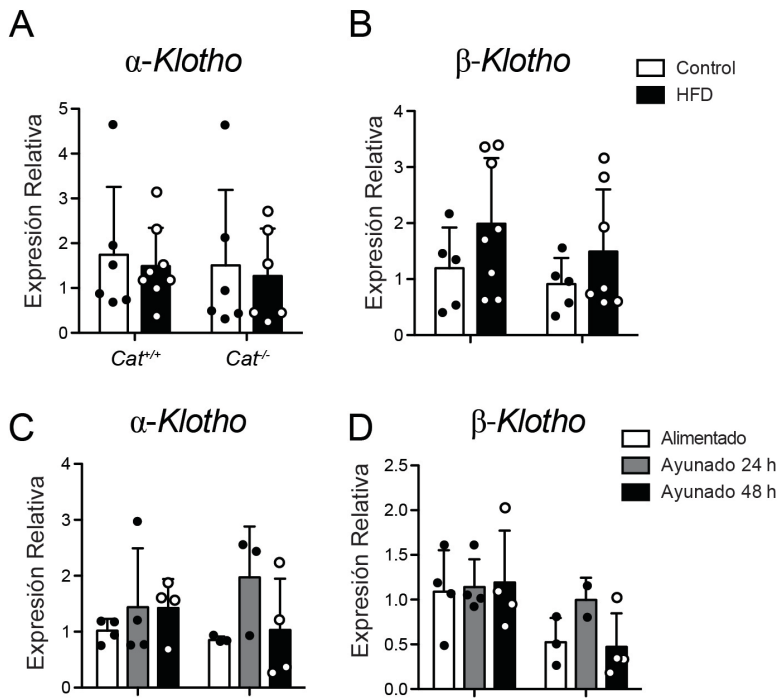


Figura 53. La expresión de Klotho no se altera por la alimentación con la HFD o del ayuno. Expresión de α -Klotho (A y C) y la β -Klotho (D y D), en condiciones de alimentación con dieta control y con la HFD por 15 días (A y B), además de en el ayuno (C y D). La expresión se determinó por medio de qRT-PCR. El cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído del hígado de los ratones de las diferentes condiciones. El gen de referencia utilizado fue el *Rplp0*. Promedio \pm SD, n= 3-5.

7 DISCUSIÓN

Tradicionalmente las ROS se han considerado moléculas dañinas para la célula, sin embargo, los resultados de este trabajo de tesis sugieren que las ROS tienen un papel determinante en la regulación del metabolismo. A partir de los datos se propone que el incremento en los niveles del H_2O_2 resultado de la ausencia de catalasa, más que causar daño oxidante general de las macromoléculas, participa en la regulación del metabolismo de las grasas. La falta de catalasa disminuye la lipogénesis y, en consecuencia, provoca modificaciones en la fisiología de la célula y en general del organismo, alterando el proceso de envejecimiento y la longevidad natural en ratones.

7.1 Teoría del envejecimiento debida a las especies reactivas del oxígeno: ¿Vigente?

La teoría del envejecimiento debida a las ROS establece que el incremento de la concentración de las ROS provoca daño oxidante a las macromoléculas promoviendo el envejecimiento (Harman, 1956). En consecuencia, cualquier manipulación experimental dirigida a incrementar el daño oxidante debería causar envejecimiento. En este trabajo se mostró que en ratones la ausencia de la catalasa, una enzima antioxidante, provocó disminución de la vida media de los animales. No obstante, la menor longevidad de los ratones *Cat*^{-/-} no correlacionó con un incremento en el daño oxidante ni con un fenotipo generalizado que indicara envejecimiento prematuro, salvo una cifosis más prominente. Los hallazgos de este proyecto sugieren, como en otros modelos de ratón con afectaciones en enzimas antioxidantes, que no hay correlación entre la ausencia de la catalasa y lo que predice la teoría del envejecimiento debida a las ROS. Por lo tanto la longevidad disminuída de los ratones *Cat*^{-/-} podría ser causa de otro fenómeno que no está asociado al aumento de la actividad pro-oxidante. Debido a que la actividad de la catalasa sólo se ha visto limitada a la descomposición del H_2O_2 , es posible que esta molécula participe activamente en la actividad fisiológica de las células, afectando la longevidad pero sin causar daño oxidante. Lo anterior se refuerza por el hecho de que en los ratones nulos para la catalasa, la actividad pro-oxidante inducida por la alimentación con la HFD o por el ayuno no se exacerbó e incluso se disminuyó, fenómeno que además no pareció ser debido a la compensación por otros sistemas antioxidantes (Figura 19). Este panorama

puede indicar que la ausencia de la catalasa causa un fenómeno de hormesis por un incremento moderado pero persistente de la concentración del H_2O_2 , que podría preparar y hacer más resistentes a los ratones $Cat^{-/-}$ a un estímulo pro-oxidante como lo es la alimentación con la HFD o el ayuno.

A pesar de que no hubo incremento en el daño oxidante en los ratones $Cat^{-/-}$, se afectó la acumulación de las grasas en estos animales, fenómeno que podría ser benéfico en condiciones adversas, como en la alimentación con dieta alta en grasa pero con efectos negativos en el ayuno o en la longevidad. Por lo tanto, la actividad antioxidante de la catalasa puede ser necesaria para mantener un adecuado balance de la cantidad del H_2O_2 para que, entre otras cosas, actúe no como inductor de daño, sino como regulador del metabolismo. Por lo tanto, tal vez la participación de las ROS en la fisiología de los organismos es por un mecanismo diferente al de daño, y más bien están involucradas en la regulación del metabolismo.

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados la posible participación de las ROS en la regulación del metabolismo, es necesario replantear la teoría del envejecimiento debida a las ROS. Al respecto tanto Pérez *et al.* (Pérez *et al.*, 2010) como Gems y Doonan (Gems and Doonan, 2009) se cuestionan sobre la vigencia de la teoría, aunque solo Gems y Doonan proponen que puede haber tres escenarios (Figura 54). El primero es que **la teoría aún es válida**, lo que quiere decir que las especies reactivas que causan daño no son el H_2O_2 o el $O_2^{\cdot-}$, y aunque éstas podrían participar no son las más importantes, por lo que aquellas que verdaderamente causan daño aún no se han identificado. Esta propuesta da origen a lo que denominan la **nueva teoría del daño oxidante**. El segundo escenario es que la teoría es **parcialmente cierta**, por lo que proponen que el envejecimiento se debe a diversos tipos de estrés, incluyendo la actividad oxidante, que causan daño molecular y en consecuencia el envejecimiento. A este posible fenómeno lo denominan como la **teoría molecular del daño**. El último escenario es que la teoría es falsa y que el envejecimiento no es debido al daño, sino a un fallo a nivel celular de los tejidos, y que el daño en todo caso sólo correlaciona con él. A este escenario lo proponen como la **teoría de la disfunción supra-molecular**. En la última propuesta, los mecanismos como la señalización de la insulina o la actividad de la mTOR podrían ser ejemplos representativos

que pueden afectar a los organismos a nivel de tejidos y/o órganos, ya que pueden alterar la fisiología general, como la resistencia a la insulina (Gems and Doonan, 2009). Tomando como base la propuesta de Gems y Doonan, los resultados de este trabajo, en conjunto con los diversos estudios en los que se evalúa la longevidad y el envejecimiento en condiciones que alteran el metabolismo, se propone que el metabolismo es uno de los factores determinantes que mantienen funcional a los organismos, y que su desregulación es el que da lugar al envejecimiento y/o la longevidad, siendo las ROS a su vez uno de los reguladores del metabolismo.

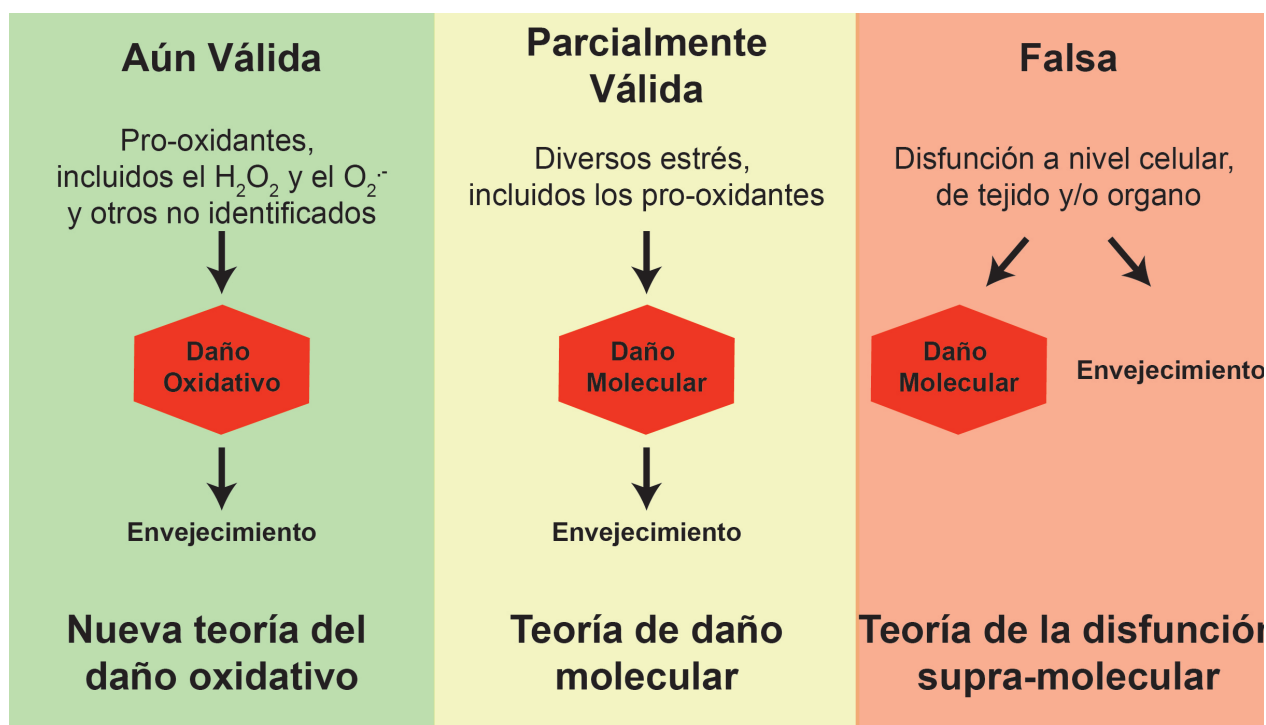


Figura 54. Posibles escenarios sobre la teoría del envejecimiento causada por las ROS según Gems y Doonan. La teoría aún es válida pero los agentes pro-oxidantes que causan daño no se han identificado aún completamente. La teoría es parcialmente válida porque el envejecimiento es causa de diferentes tipos de estrés, incluido el estrés oxidante. La teoría es falsa debido a que el envejecimiento es resultado de una disfunción a nivel celular, de tejido y/o a nivel de órgano. Modificado de: Gems y Doonan, 2009.

7.2 Alteración del metabolismo por la ausencia de la catalasa

Previamente se había encontrado que la alimentación con la HFD no causaba esteatosis hepática en los ratones *Cat^{-/-}* (Pérez-Estrada, 2010) y los hallazgos presentados en este trabajo sugieren que se debe a la disminución de la lipogénesis, que se ha demostrado es

relevante para el desarrollo de la esteatosis hepática provocado por la HFD (Farese *et al.*, 2012). La ausencia de la catalasa provocó una menor inducción de la expresión de los genes lipogénicos como *Acox*, *Fas*, *Spot14* y *Ppar γ 2* en el hígado de los ratones *Cat^{-/-}* en respuesta a la HFD. Además, los niveles de la AMPK activa fueron mayores en el hígado de los ratones carentes de la catalasa, sugiriendo que la actividad de la AMPK contribuye a que haya menor nivel de expresión de los genes lipogénicos. Si bien no se midió, es posible que la actividad del factor de transcripción SCREBP-1c, que es necesario para el desarrollo de la esteatosis hepática (Moon *et al.*, 2012), esté regulado negativamente por la AMPK en el hígado de los ratones *Cat^{-/-}* alimentados con la HFD, similar a como sucede en ratones silvestres alimentados con HFD pero tratados con activadores de la AMPK (Li *et al.*, 2011).

Por otro lado, la lipogénesis disminuida en los ratones *Cat^{-/-}* podría no solo ser consecuencia de la vía de SCREBP-1c, sino también de la actividad de PPAR γ 2, un regulador importante de la lipogénesis y del almacenamiento de las grasas. El gen que codifica a este factor se encontró menos expresado en el hígado de los ratones *Cat^{-/-}*. PPAR γ 2 podría también estar afectado por la AMPK, ya que en células cancerosas la AMPK regula negativamente su actividad transcripcional (Sozio *et al.*, 2011).

La menor acumulación de las grasas en el hígado de los ratones *Cat^{-/-}* no fue una particularidad de la alimentación con la HFD. En el ayuno, otra condición que promueve la acumulación de los lípidos en el hígado también disminuyó los depósitos de grasas este órgano. A diferencia de la alimentación con la HFD, la acumulación de las grasas en el hígado durante el ayuno depende principalmente de los lípidos que se liberan por la lipólisis del tejido adiposo, y que son transportados y captados por el hígado vía el torrente sanguíneo, mientras que al mismo tiempo se disminuye la lipogénesis en el hígado (Lee *et al.*, 2016). Si bien en el ratón no se ha determinado, un estudio en el visón americano, un mamífero de la familia de los mustélidos, muestra que durante los primeros tres días de ayuno los niveles de la expresión de los genes lipogénicos se mantienen sin cambios, pero hay un incremento a los 5 y 7 días de ayuno, indicando que en tiempos largos de ayuno es necesaria la lipogénesis de *novo* en el hígado, que consecuentemente causaría acumulación de las grasas en este órgano (Rouvinen-Watt *et al.*, 2012). Por lo tanto, la

acumulación de las grasas en el hígado durante el ayuno podría ser un mecanismo que les permite a los seres vivos contar con reservas de energía para contender con situaciones de escases del alimento. En los ratones *Cat^{-/-}* no se encontraron alteraciones en el nivel de expresión de los genes involucrados en la oxidación de las grasas, fenómeno que puede explicar la disminución de la acumulación de grasa en el hígado. Por lo tanto, el efecto encontrado se puede deber, en parte, al bajo nivel de expresión de los genes lipogénicos previo al ayuno (Figura 26). A pesar de lo anterior, no se pueden descartar otros fenómenos como defectos en la secreción de lípidos del tejido adiposo o en el transporte de las grasas al interior de los hepatocitos, pues solo se determinaron los niveles séricos de los triacilglicéridos y el colesterol (Figura 24). Será necesario determinar los niveles de ácidos grasos libres en un futuro.

Por otro lado, la falta de *Atg5*, un gene necesario para la autofagia, provoca disminución en la acumulación de lípidos en los ratones durante el ayuno. El mecanismo al parecer se debe a la activación de NRF2. El fenotipo de menor acumulación de vesículas lipídicas en el hígado de los animales *Atg5^{-/-}* se re-establece cuando además carecen de *Nrf2*, indicando que la acumulación de grasas en el ayuno está regulada positivamente por la autofagia y negativamente por NRF2 (Li *et al.*, 2018). NRF2 es un factor de transcripción que controla la respuesta antioxidante. Su actividad se regula, entre otros factores, por las ROS. KEAP, una proteína que se mantiene unido a NRF2, provoca su degradación vía proteosoma, sin embargo, al incrementar las ROS, KEAP se oxida en algunos residuos de cisteína ocasionando que se disocie de NRF2 y entonces este último se puede transportar al núcleo y promover la expresión de sus genes blanco (Deshmukh *et al.*, 2017). Por lo tanto, se puede especular que el incremento en la degradación de los ácidos grasos en el ayuno en ausencia de la catalasa podría incrementar la concentración del H₂O₂ a un nivel que no causa daño oxidante, pero sí aumento en la actividad de NRF2, disminuyendo la acumulación de las grasas durante el ayuno. En consecuencia, es posible que en los ratones silvestres la disminución de la actividad de la catalasa, como se observó (Figura 23), sea necesaria como un mecanismo para regular la acumulación de las grasas en el hígado durante esta condición, evitando así un aumento exacerbado de los lípidos que podría ser perjudicial para el hígado y el organismo en general.

7.3 Los peroxisomas y el metabolismo de las grasas en ausencia de la catalasa

La ausencia de la catalasa no solo podría afectar el metabolismo de las grasas mediante AMPK, PPAR γ y NFR2, sino que la catalasa podría alterar la función de los peroxisomas, principales orgánulos en donde se encuentra, y en consecuencia afectar el metabolismo de las grasas (Colasante *et al.*, 2017). Aunque los defectos en los peroxisomas no se detectaron al medir la abundancia de la proteína peroxisomal PMP70 por inmunodetección o por la inmunotinción de cortes histológicos de hígado. La posibilidad de que la ausencia de la catalasa no afecte la biogénesis de los peroxisomas podría entenderse por estudios en células con mutación en *Pex2*. *Pex2* es un gene que codifica una proteína de membrana y necesaria para la formación de peroxisoma. En células con ausencia de *Pex2* se forman partículas tipo-peroxisoma que no tienen catalasa (Fujiwara *et al.*, 2002). Lo anterior indica que a pesar de que la catalasa es una enzima peroxisomal podría no ser necesaria para la biogénesis de los peroxisomas, pero no descarta su función catabólica para el buen funcionamiento del peroxisoma. Por lo tanto, si la función peroxisomal se afectó por la ausencia de la catalasa, el efecto en la actividad metabólica de la célula puede tener repercusiones importantes, ya que los peroxisomas pueden ser los encargados de la síntesis de los ligandos naturales de PPAR γ (Lodhi and Semenkovich, 2014; Lodhi *et al.*, 2012). Además la β -oxidación de los ácidos grasos en el peroxisoma es un requisito para la posterior síntesis de lípidos (Ferdinandusse *et al.*, 2009; Wanders *et al.*, 2010). Por lo tanto, algunas de las consecuencias de defectos en la actividad metabólica de los peroxisomas podría incluir alteraciones en producción de grasas específicas como los eterofosfolípidos, los ácidos biliares y precursores esenciales del colesterol (Ferdinandusse *et al.*, 2009; Lodhi and Semenkovich, 2014) (Figura 55).

Algunas evidencias experimentales sugieren que las ROS producidas dentro del peroxisoma por falta de la catalasa afectan el estado redox del mismo peroxisoma y además de la mitocondria. Sin embargo, los peroxisomas son resistentes a las ROS producidas en otras partes de la célula, incluyendo las que se producen dentro de la mitocondria (Ivashchenko *et al.*, 2011). Esto puede explicar por qué la ausencia de la catalasa no causó un incremento en el daño oxidante tanto en la alimentación con la HFD como en el ayuno, pues a pesar de que el H₂O₂ sí se hubiera incrementado, quizás el daño

oxidante se quedó localizado entre los peroxisomas y las mitocondrias. También abre la posibilidad de que el estado redox del peroxisoma tenga efectos en la mitocondria, tal que pueda contribuir a los defectos metabólicos observados (Figura 55).

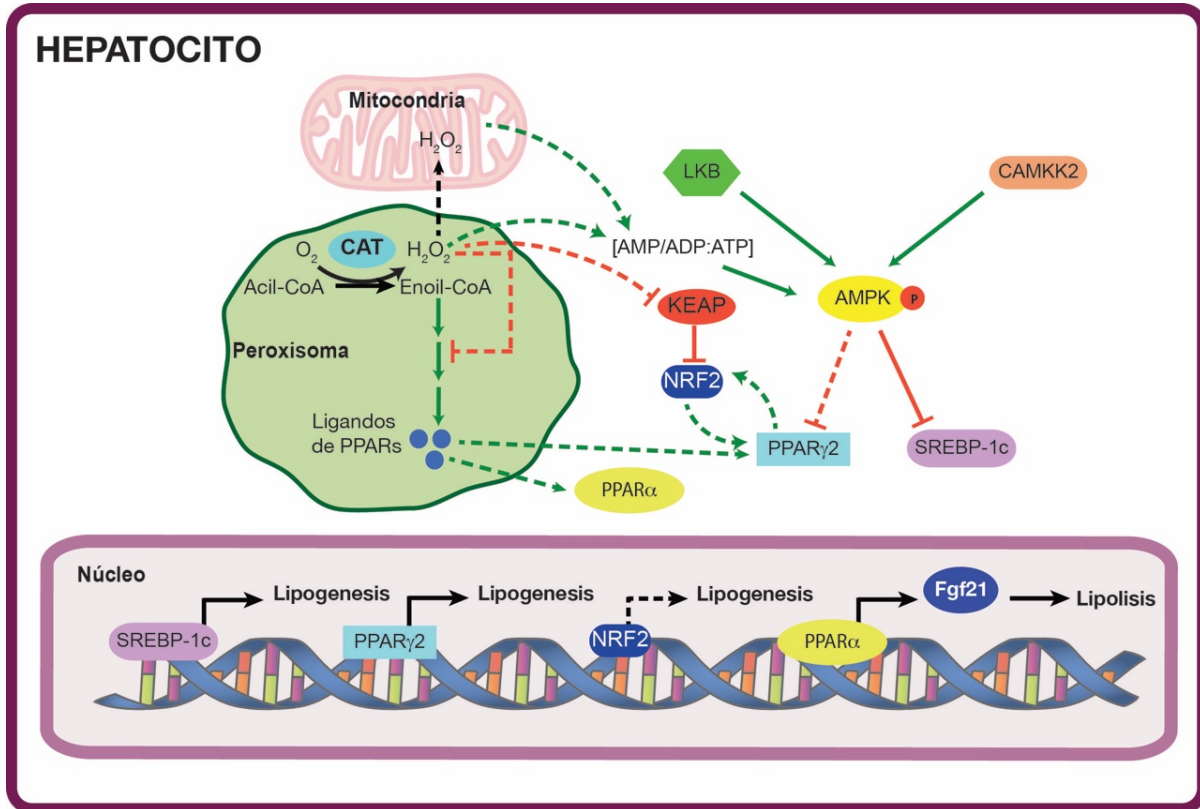


Figura 55. Posible mecanismo de regulación del metabolismo en los hepatocitos. El H_2O_2 producido por la β -oxidación de los ácidos grasos puede inhibir la síntesis de los ligandos de los PPAR en el peroxisoma y además de alterar el balance de AMP/ADP:ATP causando la activación de la AMPK para regular negativamente la lipogénesis. El H_2O_2 formado en el peroxisoma además puede contribuir al estado redox de la mitocondria afectando la regulación del metabolismo. Por otro lado, el H_2O_2 producido por la β -oxidación de los ácidos grasos de los peroxisomas también puede causar la inhibición de KEAP promoviendo la actividad de NRF2.

7.4 La autofagia en ausencia de la catalasa

La autofagia se activa por una amplia variedad de señales, incluidas las ROS (Scherz-Shouval *et al.*, 2007). Además, la degradación selectiva de la catalasa parece ser necesaria en la muerte celular inducida por la autofagia (Yu *et al.*, 2006). Adicionalmente, la autofagia participa activamente en el metabolismo de las grasas (Li *et al.*, 2018; Yang

et al., 2010; Zhang et al., 2009b). Por lo tanto, la ausencia de la catalasa en ratones pudo causar alteraciones en la autofagia. Al analizar este proceso en las distintas condiciones metabólicas, tanto por el nivel de expresión de sus genes como por la detección de la abundancia de las proteínas p62 y LC3-I/LC3-II, sólo se encontraron diferencias discretas que indicaron que es posible que la autofagia se haya incrementado en el hígado de los ratones *Cat^{-/-}*. Sin embargo, para conocer en detalle la participación de la autofagia en el fondo genético sin catalasa, aún es necesario analizar más el fenómeno. Por ejemplo, con una estrategia en la cual se inhibe el flujo de la autofagia con drogas como la cloroquina o el spautin-1 se puede determinar la participación de la autofagia en las alteraciones metabólicas de los ratones *Cat^{-/-}*.

De los tres tipos de autofagia que se han descrito, en este trabajo sólo se analizó la macroautofagia, pero la acumulación de la proteína HSP70 durante el ayuno en los ratones *Cat^{-/-}* sugiere que la autofagia afectada por la ausencia de la catalasa fue la mediada por chaperonas (CMA, por sus siglas en inglés). Este tipo de autofagia, entre otras diferencias, se caracteriza por ser más selectiva que la macroautofagia (Cuervo, 2011). HSP70 es indispensable para la CMA donde participa uniéndose a las proteínas que tienen el motivo tipo-KFERQ (Kaushik and Cuervo, 2012). Una vez que la proteína blanco se une a HSP70, el complejo se transporta al lisosoma donde se internaliza por medio de LAMP2, que al igual que la HSP70, es necesaria para la CMA (Kaushik and Cuervo, 2018). HSP70 se localiza tanto en el citoplasma como en el lumen del lisosoma; ambas provienen del mismo mRNA, pero sus características bioquímicas pueden ser diferentes. Por ejemplo, el punto isoeléctrico de la HSP70 del lumen es mayor a pH ácido que la del citoplasma (Agarraberes *et al.*, 1997). Debido a que la abundancia de HSP70 se incrementó en el hígado de los ratones *Cat^{-/-}* (Figura 40), se puede suponer que en estos animales la CMA se afectó. Por lo tanto, es importante determinar si hay cambios en el perfil de proteínas con el motivo tipo-KFERQ en el hígado de los ratones *Cat^{-/-}*, así como analizar las proteínas que específicamente se degradan por esta vía para elucidar si el comportamiento de la HSP70 se asocia con los cambios en la CMA.

Es importante resaltar que HIF1 α , un factor de transcripción que responde a la hipoxia y al estado redox de la célula (Koh and Powis, 2012), además de que se degrada por vía del

proteosoma, también se degrada específicamente con la CMA (Ferreira *et al.*, 2015; Hubbi *et al.*, 2013). Lo anterior sugiere que otras isoformas de los HIF, como HIF2 α , también se puede degradar por esta vía (DePavia *et al.*, 2016). Es importante hacer notar que HIF1 α y HIF2 α tienen la capacidad de regular el metabolismo. Por ejemplo, en células de hepatoblastoma (Huh7), HIF1 α promueve la acumulación de las grasas al inducir la expresión de Lipina 1 (Mylonis *et al.*, 2012). La esteatosis hepática inducida con el alcohol en ratones se previene con la falta de HIF1 α en el hígado (Nath *et al.*, 2011). De manera similar, la ausencia de VHL, el regulador negativo de HIF, causa esteatosis hepática en los ratones, efecto que se asocia al incremento en la actividad de HIF2 α (Qu *et al.*, 2011). Por otra parte, en el hígado HIF2 α induce específicamente la degradación de los peroxisomas (Walter *et al.*, 2014). Estas evidencias sugieren que el aumento de la HSP70 en el hígado de los ratones *Cat*^{-/-}, tal vez sea parte de un mecanismo para que, por medio de CMA, se regule la actividad de HIF1 α y/o HIF2 α , y en consecuencia la acumulación de grasas. Adicionalmente, es esperado que un aumento en la CMA requiere mayor actividad lisosomal. De acuerdo con esta expectativa, preliminarmente se observó que en el hígado y en los cultivos primarios de los hepatocitos de los ratones *Cat*^{-/-} la actividad lisosomal se incrementó. Por lo tanto, las observaciones sugieren una participación relevante de la CMA en las alteraciones metabólicas que sufren los ratones carentes de la catalasa.

7.5 Las grasas: lo bueno, lo malo; su papel en la enfermedad, la supervivencia, la longevidad y el envejecimiento

Actualmente es común opinar que las grasas se consideran dañinas para la salud, sobre todo por el aumento de la obesidad y de enfermedades asociadas como el hígado graso, la diabetes tipo II y la aterosclerosis. Además, la acumulación de grasas es un factor de riesgo para el desarrollo de otro tipo de enfermedades como el cáncer (Bornfeldt and Tabas, 2011; Lennon *et al.*, 2016; Tang, 2016). Sin embargo, las grasas son necesarias para el buen funcionamiento de los organismos. Su función más reconocida es la de servir como una de las reservas de energía más importantes, especialmente cuando el alimento es escaso. Las grasas, además proveen de precursores para la síntesis de hormonas y, a nivel celular, son parte indispensable para formar las membranas celulares (Holthuis and Menon, 2014; Muro *et al.*, 2014)

Las alteraciones en la lipogénesis y la actividad de la AMPK parecen ser suficientes para explicar por qué los ratones *Cat^{-/-}* desarrollaron menos esteatosis hepática cuando se alimentaron con una HFD. Otros efectos negativos de la alimentación con una HFD, como la intolerancia a la glucosa e hiperinsulemia, tampoco se observaron en los ratones *Cat^{-/-}*, lo cual podría estar relacionado con la menor acumulación de grasa en el hígado, ya que la esteatosis hepática disminuida está de acuerdo con una mejora en la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa ante una HFD (Li *et al.*, 2011; Moon *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2009; Yamazaki *et al.*, 2015). Es relevante resaltar que el incremento en la actividad de la AMPK en el hígado de los ratones *Cat^{-/-}* es una condición preexistente, por tanto, los ratones *Cat^{-/-}* tal vez respondan mejor a la HFD, posiblemente por un fenómeno de hormesis, evitando así los efectos negativos de la HFD.

La supervivencia de los ratones *Cat^{-/-}* adultos se comprometió a tiempos largos de ayuno (48 horas) y, de manera similar, la supervivencia de los ratones neonatos *Cat^{-/-}* se redujo en ausencia de alimento. Los mamíferos y otros organismos invertebrados como el nemátodo *C. elegans*, requieren de reservas energéticas como el glucógeno o las grasas para sobrevivir cuando el alimento es escaso (Adeva-Andany *et al.*, 2016; Lang-Ouellette *et al.*, 2014; Narbonne and Roy, 2009; Werthebach *et al.*, 2019). El glucógeno, por ejemplo, es la reserva que se utiliza para mantener los niveles de glucosa durante el ayuno y el ejercicio físico extenuante en los mamíferos. Mutaciones que afectan su formación causan sensibilidad al ayuno e incluso compromete la vida (Adeva-Andany *et al.*, 2016; Lei *et al.*, 1996). Una vez que el glucógeno se agota, si el ayuno persiste, el organismo hace uso de las grasas para obtener energía, formando a partir de ellas los cuerpos cetónicos que, en especial, proveen de energía al cerebro. Por lo tanto, las grasas son indispensables para resistir ayunos prolongados (Fukao *et al.*, 2004).

La necesidad de las grasas como fuente de energía también se evidencia en la hibernación. Los mamíferos como los osos o los murciélagos acumulan una gran cantidad de grasas que utilizan como fuente de energía durante la hibernación, permitiéndoles sobrevivir por largos periodos de letargo (Clark and Krynsky, 1983; Stenvinkel *et al.*, 2013). En el caso de invertebrados como el *C. elegans*, la ausencia de alimento y otros factores estresantes bloquean el desarrollo larvario e ingresan a un estado denominado

“dauer”, un estado similar a la hibernación para lo que se requieren reservas suficientes de grasas para mantenerse latentes (Narbonne and Roy, 2009; Xie and Roy, 2012). Por lo tanto, las grasas son una reserva de energía preponderante que los organismos utilizan para sobrevivir ante la ausencia de alimento.

Los resultados de este trabajo indicaron que la disminución en la acumulación de las grasas en el hígado no parece del todo ventajosa para los ratones *Cat^{-/-}*, pues éstos muestran un incremento en la susceptibilidad a morir por falta de alimento. El riesgo de muerte por falta de alimento correlacionó con bajos niveles de los cuerpos cetónicos y el desarrollo de un intestino necrótico al final del ayuno en los ratones adultos. La importancia de los cuerpos cetónicos para la supervivencia en el ayuno ha quedado demostrada en los ratones neonatos que no cuentan con la capacidad para degradar estos metabolitos (Cotter *et al.*, 2011), y que mueren con un patrón similar al que se observó en los ratones neonatos *Cat^{-/-}*. Por razones bioéticas no se realizaron ayunos más prolongados que de 48 horas, pero la expectativa es que la deficiencia en los cuerpos cetónicos en los ratones adultos *Cat^{-/-}* se haga más evidente en etapas críticas del ayuno cuando la muerte del animal es inminente. Por lo tanto, es posible que la razón por la que los ratones *Cat^{-/-}* son más sensibles al ayuno sea porque acumulan menos grasas en el hígado, afectando a su vez la producción de los cuerpos cetónicos durante el ayuno.

Los efectos de la acumulación de las grasas en el hígado, así como la activación de la AMPK y la expresión de los genes metabólicos, no sólo se afectaron con el ayuno y la alimentación con la HFD, también en el envejecimiento la falta de la catalasa causó disminución en la acumulación de las grasas en el hígado, correlacionando con mayor activación de la AMPK y menor nivel de expresión del *Ppar γ 2*. Aunque no fue posible determinar la causa de la muerte de los ratones *Cat^{-/-}*, se propone que los defectos en la acumulación de las grasas están participando. La propuesta deriva de los estudios en *C. elegans*, en los que la ausencia de células germinales incrementa la acumulación de las grasas de manera notable y correlaciona positivamente con un aumento en la longevidad (Wang *et al.*, 2008). DAF-16, un gene homólogo a FOXO de los mamíferos, se requiere para el incremento de la longevidad inducida por falta de células germinales (Wang *et al.*, 2008). En el mismo sentido, DAF-2, un promotor clásico de la longevidad, requiere de la

actividad de DAF-16 (Lin *et al.*, 2001). DAF-16, al parecer, regula la homeostasis de los lípidos en ausencia de células germinales, por lo que su actividad es determinante para la longevidad (Amrit *et al.*, 2016). Además de lo anterior, es interesante que SKN1, un gene homólogo funcional de *Nrf2* de los mamíferos, es necesario para extender la longevidad en *C. elegans* limitando la acumulación de grasas (Steinbaugh *et al.*, 2015). La bifuncionalidad de *Nrf2/SKN* en la respuesta antioxidante y el metabolismo de los lípidos sugiere que el almacenamiento de las grasas está estrechamente relacionado con el estado redox de la célula, pudiendo ser ésta la razón por lo que la falta de la catalasa afecta tanto el metabolismo de los lípidos como la longevidad.

Adicional a lo anterior, el mecanismo por el cual la catalasa participa en la regulación de la acumulación de las grasas y la supervivencia se puede relacionar con las observaciones en *C. elegans* deficientes de *ctl-2*, el gen que codifica para la catalasa peroxisomal en este organismo. Los gusanos deficientes de *ctl-2*, al igual que los ratones *Cat^{-/-}*, tienen una esperanza de vida reducida y menor daño oxidante (Petriv and Rachubinski, 2004). Además, en el estado dauer, la ausencia de la catalasa peroxisomal o el H₂O₂ que deriva de la β-oxidación de los ácidos grasos, rescata a los *C. elegans* de la muerte por la falta de AMPK. _a ausencia de la AMPK en este organismo incrementa el catabolismo de las grasas en larvas en estado dauer, teniendo como consecuencia la disminución de la supervivencia de las larvas en esta condición (Xie and Roy, 2012). Por lo tanto, las grasas son determinantes para la supervivencia de *C. elegans* en el estado dauer y en el incremento de la longevidad.

Las observaciones en *C. elegans* muestran que la catalasa peroxisomal participa en la regulación del metabolismo de las grasas, específicamente manteniendo las reservas de estos metabolitos. De acuerdo con lo anterior y las observaciones mostradas en este trabajo, en el ratón la catalasa afectaría la longevidad debido a la disminución de la acumulación de las grasas, por lo que la participación de las grasas en la longevidad y supervivencia al ayuno pueden relacionarse a un mecanismo, el cual está conservado entre organismos tan distantes como son el *C. elegans* y el ratón.

Debido a que la catalasa no se le conoce otro sustrato natural más que el H_2O_2 , los efectos en la lipogénesis debieran ser causados por esta el H_2O_2 , el cual ha mostrado tener la capacidad de actuar como un segundo mensajero (Di Marzo *et al.*, 2018; Rhee, 2013; Sies, 2014). Si bien el H_2O_2 puede actuar en cualquier sitio de la célula, al ser la catalasa una enzima principalmente peroxisomal, es probable que los efectos observados se originen desde en el peroxisoma. De acuerdo con esta posibilidad, la ausencia de la catalasa peroxisomal CTL-2, y no la citosólica CTL-1, provoca una disminución de la longevidad en *C. elegans* (Petriv and Rachubinski, 2004).

En resumen, los datos permiten proponer que la catalasa es una enzima que, mediante la regulación de los niveles de H_2O_2 , participa activamente en la regulación del metabolismo y el hecho de que se encuentre conservada en los mamíferos como la única enzima de su tipo, posiblemente se debe a una ventaja evolutiva que les permite a los mamíferos lidiar y adaptarse a condiciones adversas comunes de la vida silvestre como es la falta de alimento. En contraste, la catalasa puede generar efectos negativos cuando hay abundancia de alimento, especialmente aquel con alto contenido energético como las grasas (Figura 56).

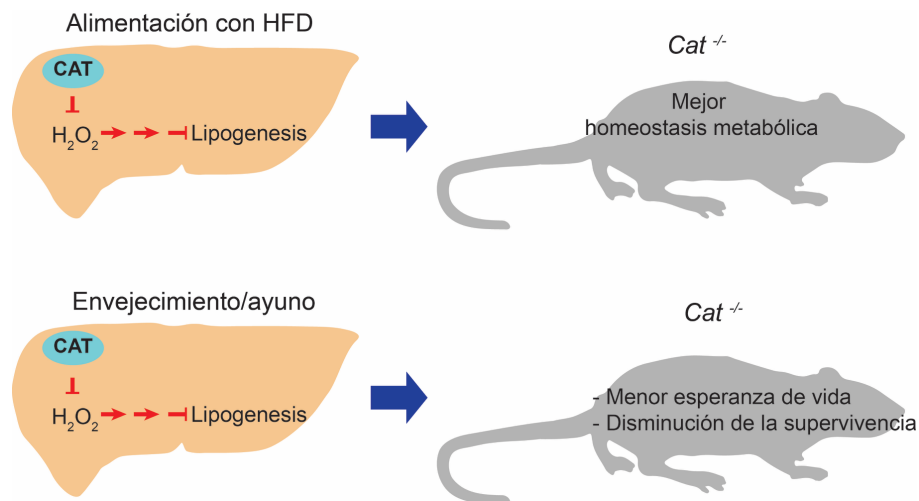


Figura 56. La falta de la catalasa tiene efectos benéficos o perjudiciales dependiente de la condición. En la alimentación con la HFD la ausencia de la catalasa permite que los animales respondan mejor a los efectos negativos de la dieta como la hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa y la esteatosis hepática. Sin embargo, en el ayuno o el envejecimiento provoca mayor susceptibilidad a morir por falta de alimento o por el envejecimiento.

7.6 Diferencias entre ratones mutantes de la catalasa: La importancia del fondo genético

Previo a este trabajo, en el 2004 se publicó un estudio en el que se describe la generación de una línea de ratones sin catalasa (Ho *et al.*, 2004). Los autores encontraron que el ratón *Cat*^{-/-} se desarrolla de manera normal y el pulmón no es más susceptible a situaciones oxidantes como la hiper-oxigenación o el tejido ocular a las reacciones pro-oxidantes inducidas con la luz. Los autores no hallaron compensación con otros sistemas antioxidantes, similar a los hallazgos en el ratón *Cat*^{-/-} generado en nuestro laboratorio y descrito en este y otros estudios previos (Cuevas-Benítez, 2007; Hernández-García, 2009; Pérez-Estrada, 2010). Sin embargo, en dos trabajos publicados recientemente se encontraron resultados completamente contrastantes a los descritos en el estudio descrito aquí.

En el 2017, Heit *et al.* describieron que los ratones *Cat*^{-/-} muestran un fenotipo pre-diabético, que incluye incremento en la acumulación de las grasas en el musculo y el hígado, lo que coincide con un incremento en la expresión de *Ppar* γ . Además, encontraron que los ratones desarrollan esteatosis hepática e intolerancia a la glucosa (Heit *et al.*, 2017). Similar a éste estudio, en otra publicación se describe que los ratones *Cat*^{-/-} alimentados con una dieta alta en grasa ganan peso más rápido comparado con los ratones silvestres (Piao *et al.*, 2017). También se muestra que el nivel de los triacilglicéridos y de la insulina en el plasma de los ratones *Cat*^{-/-} fué más alto en comparación con los ratones silvestres. El fenómeno coincidió con mayor acumulación de grasas en el hígado, inflamación y estrés oxidante, aunque no encontraron diferencias en la fosforilación de AKT, pero si cambios en la fosforilación de la GSKb (Piao *et al.*, 2017). La línea de ratones utilizados por Heit *et al.* y Piao *et al.* fue la desarrollada por Ho *et al.* en el 2004, y aunque no se menciona claramente, salvo en el estudio de Piao *et al.*, el fondo genético de los ratones en los tres estudios muy probablemente se trata de la cepa C57BL/6J (6J), que es diferente a la cepa que se utilizó en este trabajo, la C57BL/6JN (6N).

La cepa de ratones JN es una sub-línea de la cepa 6J, que se separó de la segunda en 1951 (Jackson Laboratory). Aunque en aspecto son similares, genéticamente estas cepas

son distintas. Una de las muchas diferencias es la falta del gene *Nnt* en los ratones 6J. La *Nnt* codifica para la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (NNT), proteína que se encuentra en la mitocondria y que está encargada de la producción del NADPH a partir del NADH. La actividad de esta enzima depende del gradiente de protones formado por la cadena respiratoria, es decir, el formado por la oxidación del NADH (Figura 57).

De manera relevante para este estudio, se han descrito resultados completamente distintos dependiendo de si se usa la cepa 6J o la 6N. Por ejemplo, en la cepa 6J se encontró que la hepato-toxicidad del paracetamol en los ratones incrementa cuando está ausente la cinasa JNK2 (*Jnk2^{-/-}*). Sin embargo, los ratones *Jnk2^{-/-}* en el fondo genético 6N, muestran menor hepato-toxicidad por paracetamol con respecto a su contraparte silvestre. Los autores determinaron que la hepato-toxicidad del paracetamol es mayor en los ratones silvestres 6N que en los ratones silvestres 6J, incluso más que en los ratones 6J con *Junk2* mutado. Por lo tanto, mientras en los ratones 6J JNK protege de la hepato-toxicidad del paracetamol, en los ratones 6N la promueve (Bourdi *et al.*, 2011).

En 1998 se reportó que los ratones carentes del gene *Ppara α* (*Ppara α ^{-/-}*) desarrollan obesidad (Costet *et al.*, 1998). En este estudio los autores especifican que la línea se generó a partir de la mutación de *Ppara α* en una línea de células troncales embrionarias derivadas de la cepa 129Sv, y que los ratones quiméricos obtenidos se cruzaron con ratones C57BL/6J por varias generaciones. En un estudio posterior, también se reportó un ratón mutante para *Ppara α* . En contraste con el anterior, los autores encontraron alteraciones en el metabolismo de los lípidos pero los animales no desarrollaron obesidad (Akiyama *et al.*, 2001). El ratón *Ppara α ^{-/-}* del segundo estudio también se generó a partir de células troncales embrionarias derivadas de la cepa 129Sv, pero en la metodología se especifica claramente que las quimeras se cruzaron con ratones C57BL/6N por 10 generaciones. Akiyama *et al.*, refieren sobre la diferencia de sus resultados con los de Costet *et al.*, pero la asocian a la variabilidad entre laboratorios, aunque la diferencia es tan contrastante que es muy probable que se deba al fondo genético, como en el caso de los ratones *Cat^{-/-}*.

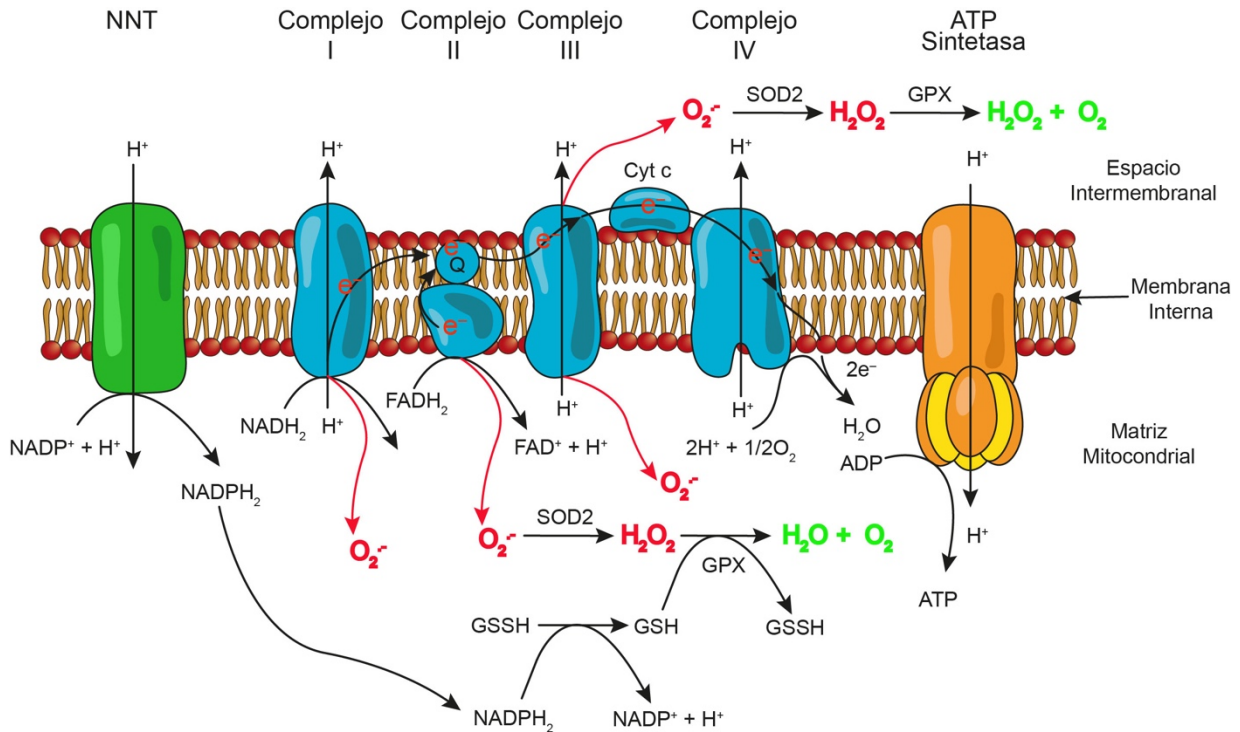


Figura 57. Participación de la NNT en la formación del NADPH_2 necesario para la actividad antioxidante. La NNT, una enzima transmembranal localizada en la membrana interna de la mitocondria utiliza el gradiente de protones formado por la cadena respiratoria para formar NADPH_2 . El NADPH_2 dentro de sus funciones es ser la capacidad reductora para mantener la actividad antioxidante en la célula.

La cepa 6J y la 6N son genéticamente similares, pero, al parecer, sus diferencias pueden dar lugar a respuestas fisiológicas muy contrastantes. La cepa 6J es más susceptible al desarrollo de la obesidad, la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina que la cepa 6N en condiciones de alimentación con HFD (Nicholson *et al.*, 2011). El fenotipo de ambas cepas se reafirma con el hecho de que en respuesta a la glucosa la secreción de la insulina es menor en los ratones 6J (Attané *et al.*, 2016; Fergusson *et al.*, 2014). Además, el nivel de esteatosis hepática desarrollada con una alimentación con HFD es mayor en los ratones 6J que en los 6N (Navarro *et al.*, 2017). La actividad pro-oxidante y antioxidante también es diferente entre las cepas, pues está aumentada en la cepa 6J tanto en el hígado y en el músculo, pero sobre todo en este último (Fisher-Wellman *et al.*, 2016). Asimismo, el desarrollo de arterioesclerosis experimental se exagera en los ratones 6J alimentados con una HFD (Vozenilek *et al.*, 2018) y la constricción transversal de la aorta (TAC, por sus siglas en inglés) tiene efectos pro-oxidantes más severos en los

ratones de la cepa 6N que en los de la cepa 6J (Nickel *et al.*, 2015). En el mismo sentido, el cerebro de los roedores 6J se afecta menos que el de los 6N después de una isquemia (Wolf *et al.*, 2016). En un estudio reciente, se describió que la capacidad de producción de las ROS en las mitocondrias del hígado es dos veces mayor en los ratones 6N en comparación con los de la cepa 6J. El fenómeno, en parte, se puede deber a que la abundancia de la catalasa y la GPX en las mitocondrias de los ratones 6J es mayor que en las de los ratones 6N (Oldford *et al.*, 2019). No obstante, la producción de las ROS en las mitocondrias aisladas del corazón es mayor en los ratones de la cepa 6J (Oldford *et al.*, 2019). Por lo tanto, la capacidad antioxidante y pro-oxidante es distinta entre las cepas 6J y 6N, lo que puede explicar por qué la carencia de la catalasa provoca distintas respuestas fisiológicas ante diversos retos.

En conjunto, las evidencias anteriores sugieren que las diferencias encontradas entre el ratón *Cat*^{-/-} descritas en este trabajo y lo mostrado en otros trabajos se debe a la cepa utilizada. Mientras que en la cepa 6J se evaluó tanto la ausencia de la catalasa, como de la NNT, en la cepa 6N sólo se determinó el efecto de la ausencia de la primera. Por consiguiente, se debe tener especial cuidado en el fondo genético seleccionado, especialmente cuando se analizan los efectos de los alelos de genes como el *Cat* cuya influencia es pleiotrópica ante diferentes condiciones ambientales. Se ha propuesto que para los experimentos que involucran una alteración en el metabolismo mitocondrial se debe preferir la cepa 6N, pues es lo más parecido a una mitocondria funcional, semejante a la del humano (Figueira, 2013).

7.7 La importancia de la catalasa en la fisiología general del ratón

La catalasa es una enzima antioxidante tetramérica que tiene un grupo hemo en cada una de sus subunidades. Su función se limita a la degradación de H₂O₂ convirtiéndolo en oxígeno y agua sin necesidad de algún donador de electrones, ya que utiliza una molécula de H₂O₂ como donador y otra como aceptor de electrones (Kirkman and Gaetani, 2007). Esto contrasta con las peroxidasas (p. ej. glutatión peroxidasas), que utilizan el poder reductor de un substrato (p. ej. el glutatión) para degradar el H₂O₂. La catalasa se encuentra entre las enzimas más eficientes de la naturaleza, al ser prácticamente

insaturable por el sustrato (Vainshtein *et al.*, 1981). A diferencia de las plantas, hongos o animales invertebrados como *C. elegans*, que cuentan con más de una catalasa (Chelikani *et al.*, 2004; Mhamdi *et al.*, 2010), en mamíferos sólo existe un gen que codifica para esta enzima y, aunque se ha encontrado en también en las mitocondrias, el citoplasma e incluso en el núcleo, principalmente se localiza en el peroxisoma (Kirkman and Gaetani, 2007). Al parecer la catalasa es ubícua, pero su abundancia es dependiente del tejido en donde se encuentra. Es más abundante en el hígado, y hay una menor abundancia en el cerebro, el riñón y el corazón. La expresión de *Cat* y su amplia distribución desde etapas muy tempranas del desarrollo del ratón sugieren una participación relevante en la formación de muchos tejidos. Como se describió en estudios previos del laboratorio y también de otro grupo de investigación, su ausencia no es letal en el ratón (Hernández-García, 2009; Ho *et al.*, 2004).

A pesar de que el fenotipo de ausencia de la catalasa no parece ser importante a simple vista, su ausencia sí causó alteraciones importantes como la disminución de la vida media en el ratón, un incremento en la cifosis asociada con la edad, así como resistencia a la hiperglucemia en el envejecimiento y durante la alimentación con una HFD. Estos fenómenos se asociaron con alteraciones metabólicas en el hígado, pero es posible que otros órganos o tejidos también se vean afectados y contribuyan a los fenotipos observados en el presente estudio. En particular, la cifosis de los ratones *Cat*^{-/-} puede resultar de una alteración por falta de catalasa que ocurre directamente en los huesos. La cifosis normalmente se presenta como consecuencia de una osteoesclerosis, osteoporosis ó distrofia muscular (Burkin *et al.*, 2001; Dabovic *et al.*, 2002; Iba *et al.*, 2001). Es interesante que, en los ratones con defectos en el metabolismo de los lípidos originado por la carencia de *Cpt1*, un gen que codifica para un transportador de ácidos grasos hacia la mitocondria para su degradación, desarrollan cifosis de manera acelerada cuando los animales se alimentan con una dieta cetogénica (Mourier *et al.*, 2014). Por tanto, la cifosis que se observó en los ratones *Cat*^{-/-} viejos podría ser consecuencia de las alteraciones en el metabolismo de los lípidos.

PPAR γ es un factor determinante en la regulación del metabolismo de las grasas (Ferre, 2004) pero además regula la diferenciación de las células mesenquimales para formar el

tejido adiposo y los osteoblastos (Hu *et al.*, 2018; Rosen and MacDougald, 2006). Lo anterior explica por qué, en los ratones los activadores de PPAR γ incrementan el tejido adiposo y disminuyen la formación de osteoclastos originando la pérdida del tejido óseo (Zou *et al.*, 2016). Los pacientes que se medican con tiazolidinedionas, activadores de PPAR γ utilizados para el tratamiento de la diabetes tipo II, llegan a presentar baja densidad en los huesos (Kaku and Hashiramoto, 2011), confirmando la participación de PPAR γ en la formación de este tejido. Si bien lo que se observó en el hígado de los ratones *Cat*^{-/-} fue un menor nivel de expresión de *Ppar γ 2*, es posible que su regulación sea tejido-específica. Al respecto, mientras en el hígado la actividad de PPAR γ promueve resistencia a la insulina y esteatosis hepática (Zhang *et al.*, 2004), en el tejido adiposo induce sensibilidad a la insulina, pero su ausencia total (isoforma 1 y 2) específicamente en este tejido causa esteatosis hepática (Jones *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013a). Por lo tanto, se puede pensar que la ausencia de la catalasa tal vez incrementa la actividad de PPAR γ en el tejido adiposo causando cifosis pero, al mismo tiempo, promueve mayor sensibilidad a la insulina, aunque esto debió derivar en mayor acumulación de tejido adiposo, fenómeno no se ha observado en los ratones *Cat*^{-/-}. Por otra parte, la catalasa se encuentra abundantemente en el tejido adiposo (Okuno *et al.*, 2008), y su actividad puede ser relevante en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos en este tejido (Crane and Masters, 1984). Además, se ha descrito que la expresión de la catalasa podría estar regulada positivamente por PPAR γ (Okuno *et al.*, 2008) (Figura 58). Estas evidencias sugieren que se debe analizar posibles afectaciones en el tejido adiposo de los ratones *Cat*^{-/-}, lo que tal vez permita entender más sobre el fenotipo que se observó.

Si bien la actividad de la catalasa en el hígado y el tejido adiposo es abundante en comparación con otros órganos y tejidos, no se debe descartar el papel de otros órganos con menor actividad de la catalasa en la regulación metabólica estudiada. Por ejemplo, α -*Klotho* prácticamente sólo se expresa en el riñón, y su ausencia reduce la longevidad y promueve el envejecimiento. El riñón produce cantidades significativas de catalasa y sintetiza cantidades importantes de cuerpos cetónicos. PPAR γ regula la expresión de α -*Klotho* en este órgano, por tanto, es posible que la falta de catalasa disminuya la expresión de PPAR γ en el riñón y, en consecuencia, reduzca los niveles de α -*Klotho* y se acorte la

esperanza de vida (Figura 55). También es necesario considerar otras funciones del hígado que podrían estar afectadas por la falta de la catalasa y contribuir al fenotipo observado en los ratones *Cat^{-/-}*. Por ejemplo, la función de los peroxisomas en la síntesis de ácidos biliares sugiere que una disminución en la producción de estos compuestos puede repercutir negativamente en la absorción de las grasas en el intestino y ser una de las causa de los efectos de la falta de la catalasa cuando se alimentan con la HFD.

En resumen, aún queda mucho por explorar para entender cómo la catalasa regula el metabolismo y la fisiología general del organismo, así como identificar claramente cuáles son los órganos y los tejidos que activamente participan en esta regulación. Estrategias que involucren mutaciones tejido-específicas en el gene *Cat* podrían ayudar a comprender en detalle la función de esta enzima en los mamíferos.

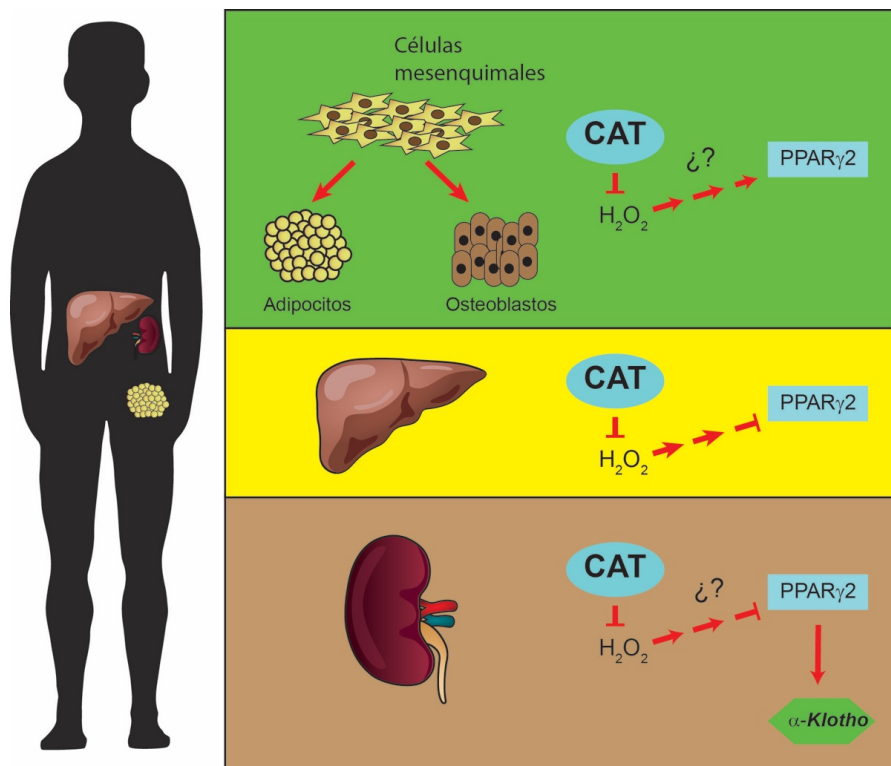


Figura 58. La catalasa regula el metabolismo en múltiples órganos y tejidos, pero con efectos distintos. En las células mesenquimales y en los adipocitos el H₂O₂ proveniente del peroxisoma podría inducir la actividad de PPAR_γ induciendo la diferenciación hacia adipocitos afectando la formación de osteoblastos. Sin embargo, en el hígado el H₂O₂ inhibe la actividad de PPAR_γ, y el mismo mecanismo puede ocurrir en el riñón evitando la expresión de α-Klotho en éste órgano.

8 CONCLUSIONES

- La ausencia de la catalasa provoca disminución de la longevidad de ratones C57BL/6JN sin un franco envejecimiento prematuro.
- La catalasa regula, muy probablemente a través de modular los niveles de H_2O_2 y la AMPK, el metabolismo de los lípidos.
- Los efectos de la catalasa sobre la acumulación de grasas en el hígado posiblemente es el mecanismo que determina la supervivencia de los ratones en el ayuno.
- El mantenimiento de las reservas energéticas en forma de lípidos podría ser un factor determinante de la longevidad del ratón, un mecanismo conservado en varias especies.
- El efecto de la ausencia de la catalasa en el ratón posiblemente depende del fondo genético.

9 PERSPECTIVAS

Hasta el momento sólo se ha analizado el hígado, por lo tanto, aún es necesario explorar otros órganos o tejidos, en especial el tejido adiposo, en donde se ha reportado que el nivel de la actividad de la catalasa podría ser comparable al del hígado. Esto sumado a las alteraciones en el metabolismo de los lípidos, apuntan como obligado el análisis del tejido adiposo. En el mismo sentido, la mutación específica de la catalasa en el hígado ayudaría a elucidar si éste es el órgano determinante de los cambios encontrados hasta el momento.

Los resultados claramente indican que la lipogénesis está afectada por la ausencia de la catalasa, y un regulador posible es la AMPK, sin embargo, es necesario analizar otros mecanismos con mayor detalle, como el de la autofagia o la vía de NRF2. Uno de los mayores retos de este proyecto fueron los aspectos técnicos que representa el uso de organismos completos como lo es el ratón, sobre todo por los tiempos que se requieren y la variabilidad intrínseca del animal completo. Una opción es utilizar cultivos primarios de hepatocitos o líneas celulares. El cultivo primario de hepatocitos puede ser útil para analizar en detalle el papel de la ausencia de la catalasa en la autofagia y la acumulación de los lípidos. Debido a que este tipo de experimentos aún requiere de los ratones como fuente celular, las líneas celulares de origen hepático como las HepG2 y la AML12 que son de humano y ratón, respectivamente, también serían de gran utilidad.

Otras condiciones metabólicas también podrían ayudar a entender la función de la catalasa en el metabolismo y el envejecimiento. Una de ellas que puede arrojar información interesante es el ejercicio físico. Aunque algunos cambios metabólicos son similares a los que suceden en el ayuno, hay otras exigencias metabólicas como, por ejemplo, un metabolismo en el músculo y el corazón más acelerado. Debido a que no se ha logrado identificar la causa de la muerte de los ratones viejos que carecen de la catalasa y que además parece suceder repentinamente, una posibilidad es un infarto cardiaco, por lo que esta condición podría ayudar a revelar si ésta es una causa posible.

10 ANEXOS

Anexo I Determinación del genotipo de los ratones mutantes de la catalasa

Método para genotipificación por la descomposición del H₂O₂

Se recolecta una muestra de sangre de la cola de los ratones (5 µl). La muestra se agrega a un tubo que contiene 50 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. La muestra de sangre que no causa la formación de burbujas de oxígeno por la descomposición del H₂O₂ indica que se trata de un ratón homocigoto para la mutación de la catalasa (*Cat*^{-/-}). Este método sólo se utilizó para identificar los ratones homocigotos para la mutación, pues es poco confiable para los ratones heterocigotos (*Ca*^{+/-}).

Método para genotipificación por PCR

El segundo método utilizado fue la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR). Para la reacción se extrajo el DNA de aproximadamente 3 mm de la punta de la cola de los roedores. El tejido se colocó en un tubo Eppendorf de 500 µL y se agregaron 100 µl de una solución de lisis (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 100 mM, SDS 1%, pH 8) para luego incubarse por 20 minutos a 95 °C. Pasado el tiempo las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se les agregó 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml). La solución se mezcló por inmersión y se incubó a 55° C por 5 horas. Después del tiempo de incubación se homogenizó vigorosamente en Vortex durante aproximadamente 5 segundos, y entonces se inactivó la proteinasa K incubando las muestras a 95 °C por 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 13, 000 g por 20 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante del cual se usó directamente para la reacción de PCR.

Reacción de PCR

Los oligonucleótidos utilizados para la genotipificación se muestran en la Tabla 1. Para cada reacción de la PCR se preparó una mezcla de reacción en un tubo de PCR como sigue:

Mezcla de reacción

- Oligonucleótido 5' (0.1 µg/µL)	0.3 µl
- Oligonucleótido 3' (0.1 µg/µL)	0.3 µl
- dNTP's 10mM	0.3 µl
- Buffer Taq 10x	1.5 µl
- Fast Taq DNA polimerasa (Roche)	0.01 µl
- Muestra de DNA	1.5 µl
- Agua	11.09 µl

La reacción se realizó en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, USA), de acuerdo con las temperaturas y tiempos que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1 Secuencia de los oligonucleótidos para la genotipificación del alelo mutante y silvestre *Cat*.

Alelo	Secuencia 5' - 3'	Secuencia 3' - 5'
Mutante	TGTCATTCTATTCTGGGGGG	GGACGACACTTATGAAGCAATC
Silvestre	TTGTTACCGCTTTCCTAAACTCC	TGACTTCCTTGGTCAGATCAAATG

Tabla 2 Condiciones de PCR para la genotipificación de ratones silvestres y mutantes *Cat*.

Paso	Alelo mutado	Alelo silvestre	Tiempo
1	94 °C	94 °C	3 minuto (desnaturalización inicial)
2	94 °C	94 °C	30 segundos
3	56 °C	54 °C	30 segundos
4	72 °C	72 °C	30 segundos (se repite del paso 2-4 35 ciclos)
5	72 °C	72 °C	7 min (elongación final)

Anexo II Composición de las dietas utilizadas

La composición de los nutrientes de las dietas utilizadas se muestran en las Tablas 3-5

Tabla 3 Macronutrientes de las dietas

Nutriente	Ingrediente	Control, (D12450D, Diets Research)	HFD (D12492, Diets Research)	Alimento Estándar (2018s, Envigo)
Proteína	Caseína (%)	18.96	25.84	18.6
Proteína	Cisteína (%)	0.28	0.39	---
Carbohidratos	Lodex 10 (%)	3.32	16.15	---
Carbohidratos	Sacarosa (%)	33.55	9.41	---
Carbohidrato	Almidón de maíz (%)	29.85	---	44.2
Fibra	Celulosa (Solka Floc, FCC200) (%)	4.74	6.46	3.5
Grasa	manteca (%)	1.90	31.66	---
Grasa	Aceite de soya (%)	2.37	3.23	6.2
Mineral	S10026B (%)	4.74	6.46	3.5

Tabla 4 Contenido calórico por macronutriente

Nutriente	Control, (D12450D, Diets Research)	HFD (D12492, Diets Research)	Alimento Estándar (2018s, Envigo)
Proteína (%):	20	20	24
Grasa (%):	10	60	18
Carbohidratos (%):	70	20	58
Densidad energética (kcal/g)	3.82	5.21	3.1

Tabla 5 Perfil de los ácidos grasos y del colesterol de las dietas

Ácido graso	Control, (D12450D, Diets Research)	HFD (D12492, Diets Research)	Alimento Estándar (2018s, Envigo)
Palmítico C16:0 (g/kg)	6.5	49.9	7
Palmítico C16:1 (g/kg)	0.3	3.4	---
Esteárico C18:0 (g/kg)	3.1	26.9	2
Oleico C18:1w9 (g/kg)	12.6	86.6	12
Oleico C18:2w6 (g/kg)	18.3	73.1	31
Oleico C18:3w3 (g/kg)	2.2	5.2	3
Araquidónico C20:4n6 (g/kg)	0.1	0.7	---
Saturados totales (g/kg)	9.6	76.8	9
Mono insaturados totales (g/kg)	12.6	86.6	13
Poliinsaturados totales (g/kg)	20.6	79	34
Colesterol (mg/kg)	18	300.8	--

Anexo III Determinación de los triacilglicéridos y del colesterol en el suero

1. En una placa de 96 pozos se colocan 2 μ l de suero de cada muestra por duplicado por pozo.
2. Con base a la concentración del patrón (200 mg/dl para el colesterol o de triacilglicéridos) se prepara una curva estándar que va desde 200 y hasta 1000 mg/dl de colesterol o de triacilglicéridos, colocando en cada pozo 1, 2, 4, 6 y 5 μ l del estándar por duplicado.
3. Se agregan 200 μ l de reactivo para los triacilglicéridos o el colesterol (Biosystems, Costa Brava, Barcelona, España) por pozo con ayuda de una pipeta multicanal. Se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.

4. Se lee la absorbancia a 480 nm con un lector de placas.
5. La concentración de los triacilglicéridos o el colesterol se obtiene interpolando el promedio de la absorbancia del duplicado de cada muestra en la curva estándar.

Anexo IV Determinación del colesterol, los triglicéridos y los dienos conjugados en el hígado

Extracción de los lípidos

1. Se pesan 50 mg de tejido en la balanza analítica.
2. El tejido se homogeneiza en 1 ml de PBS con ayuda de un homogeneizador con pistilo.
3. El homogeneizado se mezcla con 4 ml de reactivo de folch (metanol-cloroformo 1:2) y se da Vortex por 15 segundos a máxima velocidad.
4. La mezcla se centrifuga a 3,500 rpm por 10 minutos.
5. De la fase orgánica (la inferior) se tomó 2 ml, 1.6 ml se transfieren a un vial de vidrio de 5 ml (para el colesterol y los triglicéridos) y los 400 μ L restantes se transfieren a un vial de vidrio de 1 ml (para los dienos conjugados).
6. Ambos viales se incuban en baño María a 37 °C por toda la noche hasta sequedad.

Determinación de los triacilglicéridos y el colesterol:

1. Una vez evaporado todo el solvente los lípidos del vial de 5 ml se resuspenden en 500 μ l de desoxicolato de sodio al 1%.
2. En una placa de 96 pozos se coloca en cada pozo 10 μ l de la suspensión por duplicado para cada muestra.
3. Con base en la concentración del patrón (2 μ g/ μ l misma concentración para el colesterol o los triacilglicéridos) se realiza una curva estándar desde 2 hasta 10 μ g de colesterol o de los triacilglicéridos, colocando en cada pozo 1, 2, 3, 4 y 5 μ l del estándar por duplicado.

4. Se agregan 200 μ l de reactivo para los triacilglicéridos o para el colesterol (Biosystems, Costa Brava, Barcelona, España) por pozo y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.
5. Se lee la absorbancia a 480 nm con un lector de placa.

Consideraciones para los cálculos:

- Se encuentran 50 mg de tejido en 2 ml de fase orgánica (1.6 ml + 0.4 ml), por lo que sólo hay 40 mg en 1.6 ml.
- La concentración de los triglicéridos o el colesterol se obtiene interpolando el valor de absorbancia del promedio de los duplicados de cada muestra en la curva estándar y se expresa en μ g/g de tejido.

Determinación de los dienos conjugados

1. Del vial de 1 ml se le agrega 1 ml de ciclohexano y se mezcla utilizando un Vortex. Se mide la absorbancia a 233 nm.

Consideraciones para los cálculos:

- Se encuentran 10 mg de tejido en los 400 μ l de la fase orgánica.
- Las OD se expresan como OD/10 mg de tejido

Anexo V Determinación del glucógeno

1. Pesar de 25-50 mg de tejido en un tubo de capacidad de 2 ml.
2. Agregar 500 μ l de KOH 30% e incubar por 30 min a 95 °C.
3. Esperar a que se enfríen los tubos y agregar 100 μ l de solución de Na₂SO₄ al 20%
4. Agregar 1 ml de etanol absoluto y mezclar con Vortex. Incubar los tubos por 6 horas a -20 °C.
5. Centrifugar a 3,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se desecha el sobrenadante por decantación.
6. Resuspender el precipitado en 1 ml de etanol al 70% e incubar 30 min a -20 °C.

7. Centrifugar a 3,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se desecha el sobrenadante por decantación. Repetir el paso 5 al 6 dos veces más.
8. Secar el precipitado a 37 °C por el tiempo necesario.
9. Una vez seco el precipitado (polvo) se puede almacenar a 4 °C.
10. Al polvo (glucógeno) se le agregan 500 µl de una solución de acetatos 0.2 M pH 4.8 que contiene 5 U de enzima amiloglucosidasa (Cat. A1602, Sigma) y se incuban a 55 °C por un periodo de 8 hrs aproximadamente.

IMPORTANTE: Se deben hacer pruebas de actividad de la enzima para determinar el tiempo mínimo necesario para que la enzima degrade todo el glucógeno. Para esto se toman muestras de la solución de glucógeno-enzima a diferentes tiempos y mide glucosa hasta que el valor no varíe.

11. Se determina glucosa de la solución utilizando el método espectrofotométrico de glucosa oxidada y se expresa el contenido de glucógeno en equivalentes de glucosa por mg de tejido.

Anexo VI Determinación de la actividad de la catalasa

Determinación de la actividad de la catalasa utilizando geles de actividad

Soluciones

Solución de lisis (10 mL)

- | | |
|---------------------------|------------|
| - HEPES 400 mM pH 8 | 5 ml |
| - DTT 100 mM | 100 µl |
| - Desferoxamina 10 mM | 100 µl |
| - Inhibidor de proteasas | 1 pastilla |
| - Aforar a 10 ml con agua | |

Solución de carga (10 ml)

- | | |
|-----------------------|--------|
| - Azul de bromofenol | 40 mg |
| - Tris 500 mM, pH 6.8 | 2.5 ml |
| - Glicerol | 3 ml |

- Agua Bidestilada 2 ml

* NOTA: Es preferible hacer alícuotas de 1 ml y almacenarlas a 4 °C

Solución de corrida (1 l)

- Tris base 250 mM 30.3 g

- Glicina 192 mM 144 g

Procedimiento

Extracto de proteína de tejido (hígado)

1. Pesar 50 mg de tejido en un tubo eppendorf de 1.5 ml y agregar 300 µl de solución de lisis.
2. Hacer un homogeneizado del tejido con ayuda de un homogeneizador con pistilo.
3. Agregar 300 µl más de la solución de lisis al homogeneizado.
4. Incubar el homogeneizado en agitación por 30 min a 4 °C.
5. Centrifugar a 12,000 g por 20 minutos en refrigeración.
6. Recuperar el sobrenadante.
7. Cuantificar el extracto de las proteínas por el método de Bradford.

Extracto de proteínas de células

1. Lavar tres veces de las células previamente con PBS. Se recomienda un cultivo confluyente o semiconfluyente.
2. Succionar la mayor cantidad posible de PBS del plato de cultivo.
3. Agregar 200 µl de buffer de lisis al plato de cultivo y con ayuda de un "Cell Scraper" despegar la mayor cantidad de células posibles. Recuperar la suspensión celular en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
4. Agregar 100 µl más de buffer de lisis al plato de cultivo para recuperar la mayor cantidad de células. Recuperar la suspensión celular restante.
5. Sonicar las células durante 60 segundos, con pulsos de intervalos de 10 segundos.
6. Centrifugar a 12,000 g por 20 minutos a 4°C.
7. Recuperar el sobrenadante en otro tubo y determinar la cantidad de proteína por el método de Bradford.

NOTA: Todas las soluciones deben estar frías y la preparación se realiza en hielo de agua. Los volúmenes de solución de lisis varían dependiendo del tipo de tejido y para el caso de células en cultivo por número de células.

Preparación del gel de actividad de la catalasa en condiciones no desnaturizantes

1. Mezclar en un tubo falcon de 50 ml las siguientes soluciones para el gel:

- Tris 1.5 M pH 8.8	3.75 ml
- Persulfato de sodio (APS) 10%	50 μ l
- TEMED	10 μ l
- Acrilamida/bisacrilamida 30%	4.0 ml
- Agua	7.25 ml

2. Montar los cristales para preparar un gel de acrilamida de 1.0 mm de grosor (mini, Bio-rad).

3. Agregar la solución del gel hasta llenar un 75% de la capacidad del cristal.

4. Agregar con mucho cuidado 500 μ l de isobutanol sobre la solución del gel. Esto ayuda a que se forme el gel completamente horizontal y sin imperfecciones.

5. Esperar 30 minutos a que polimerice.

6. Mezclar en un tubo falcon las siguientes soluciones para el gel concentrador:

- Tris 0.5 M pH 6.8	3.75 ml
- Persulfato de amonio (APS) 10%	25 μ l
- TEMED	5 μ l
- Acrilamida/bisacrilamida 30%	0.65 ml
- Agua	3.1 ml

7. Agregar la solución del punto 6 al gel que se preparó del punto 1-5 (Gel separador), colocar un peine de 1 mm de grosor y con número de pozos deseado.

8. Esperar a que polimerice el gel superior (concentrador).

9. Montar los geles en la cámara de electroforesis (Biorad) y agregar la solución de corrida.

10. En un tubo Eppendorf mezclar de 20-40 μ g de extracto de proteína con 5 μ L de solución de carga, aforar a 15 μ l con solución de lisis.

11. Cargar la muestra (extracto de proteína con buffer de carga) en los pozos del gel montado en la cámara de electroforesis. Usar como control positivo 10 U de catalasa bovina.
12. Iniciar corrida a 45 mA (+/- 5 mA) durante 180 minutos en cuarto frío a 4°C (Cuidar que no aumente la temperatura de la solución de corrida y que se mantenga el amperaje)
13. Terminada la corrida retirar el gel y hacer un lavado con agua destilada por 5 min.
14. Preparar una solución de H₂O₂ al 0.01 % mezclando 10 µl de H₂O₂ en solución (30% w/w) con 50 ml de agua destilada. Incubar el gel con la solución de H₂O₂ durante 15 minutos en agitación moderada.
15. Enjuagar con agua durante 10 segundos.
16. Agregar simultáneamente las soluciones de Cl₃Fe al 1% y K₃Fe(CN)₆ al 1% al gel, ambas preparadas al momento, y agitar inmediatamente, manteniendo la agitación durante 60 segundos. El gel se tornará de color azul pero las zonas con actividad de la catalasa se mantendrán transparentes.
17. Hacer 5 lavados de 5 minutos con agua destilada.
18. Tomar la foto del gel en un transiluminador con luz blanca.
19. Realizar densitometría de las zonas transparentes del gel para determinar la actividad de la catalasa.

Determinación de la actividad de la catalasa por cinética enzimática

Soluciones

- Solución de fosfatos (PB) 50 mM, pH 7.8
 - Solución de reacción H₂O₂ 30 mM
1. Realizar un extracto de proteína siguiendo el mismo procedimiento que para gel de actividad de la catalasa con la variante de que la solución de lisis es una solución de fosfatos 50 mM, pH 7.8 con inhibidores de proteína.
 2. En un tubo falcon de 15 ml se agregan 3 ml de la solución de fosfatos (PB) y 50 µg de extracto total de proteína (procurando que la concentración de proteína que se agregue sea mayor a 2 µg/µl para no alterar el volumen total que se utilizará)

3. Ajustar en el espectrofotómetro en opción de cinética enzimática la longitud de onda de 240 nm y tiempo de reacción de 120 segundos, con lecturas cada 30 segundos.
4. En una celda de cuarzo se agrega 1ml de la solución de proteína en PB (preparado en el paso 1) y se añaden 500 μ l de PB pipeteando tres veces para homogenizar la solución. Ajustar el espectrofotómetro a “blanco”.
5. Se retira la celda del espectrofotómetro y se lava 3 veces con PB.
6. Se coloca la celda en el espectrofotómetro y se agrega 1 ml de la solución de proteína preparada en el paso 1 y se añaden 500 μ l de la solución de reacción H_2O_2 y se mezcla con 3 pipeteos. (Al ser una reacción muy rápida la mezcla se debe hacer lo más rápido posible, pero sin generar burbujas).
7. Inmediatamente iniciar el programa de cinética del espectro.
8. Como control positivo se usan 1-10 U de catalasa bovina.

NOTA: El comportamiento de la cinética enzimática de la catalasa es de decaimiento exponencial.

Análisis de datos

Se grafican las absorbancias obtenidas y se ajustan a una curva exponencial y se obtiene la ecuación del comportamiento. Para esto se recomienda Microsoft Excel.

La ecuación de la gráfica será:

$$\text{Abs}_{240} = \text{Abs}_0 e^{-d}$$

Donde:

Abs₂₄₀ = Absorbancia al tiempo t

Abs₀ = Absorbancia Inicial

e = número irracional e

d = constante de decaimiento

La actividad (K) de la catalasa será igual a:

$$K_{\text{total}} = d (\text{Volumen total de reacción (ml)} / \text{Volumen de la muestra (ml)})$$

Para este procedimiento el volumen total de reacción es de 1.5 ml (1 ml del paso 1 más la solución de peróxido de hidrógeno). El volumen de la muestra será la mitad del volumen agregado en la solución del paso 1.

Anexo VII Tinción de rojo oleoso

Soluciones

Stock rojo oleoso

Rojo Oleoso	0.5 g
Isopropanol	100 ml

Solución de trabajo rojo oleoso (Para 2ml)

Stock rojo oleoso	1.2 ml
Agua destilada	8 ml

Solución saturada de LiCl

Diluir LiCl en agua agregando hasta que ya no se disuelva más.

PBS/Glicerol

Relación 1:1

Procedimiento

1. Se hacen cortes en el criostato de 10 micras.
2. Cubrir los cortes con la solución de trabajo del rojo oleoso y se incuba durante 10 min.
3. Lavar con agua destilada (solo sumergiéndolo).
4. Teñir con hematoxilina durante 2 min.
5. Se lava con agua de la llave (sumergiéndolas).
6. Teñir con LiCl (sumergirlas y sacarlas).
7. Se lava con agua de la llave (sumergiéndolas).
8. Montar en PBS/Glicerol.

Anexo VIII Tinción de β -galactosidasa

Soluciones

- | | |
|---|--------------------------------|
| - Beta-Galactosidase Tissue Fixative Solution | Merk-Millipore Catalogo BG-5-C |
| - Beta-Galactosidase Rinse solution A | Merk-Millipore Catalogo BG-6-B |
| - Beta-Galactosidase Rinse Solution B | Merk-Millipore Catalogo BG-7-B |
| - Beta-Galactosidase Stain Base Solution | Merk-Millipore Catalogo BG-2-C |

Procedimiento

1. Los cortes de tejido montados en portaobjetos se fijan en Beta-Galactosidase Tissue Fixative Solution (Merk-Millipore) por 45 min en frío (4°C).
2. Se hace un lavado con la solución A de 5 minutos y posteriormente otro de 30 minutos.
3. Se hacen dos lavados con la solución B de 5 minutos.
4. Se retira la solución B y se agrega la Beta-Galactosidase Stain Base Solution.
5. Se incuban las laminillas a 37°C en la oscuridad. La tinción se hace visible después de 1 h. Se recomienda observar constantemente el desarrollo de color y establecer el tiempo de tinción, pues varía dependiendo del tipo de muestra y condición.
6. Se hacen tres lavados con PBS 1X de 5 minutos
7. Para la contra-tinción con eosina las laminillas se sumergen en etanol al 50% por 3 minutos, posteriormente en etanol al 70% por 3 minutos seguido de la tinción en eosina por un minuto, y un lavado con etanol al 96% por 5 minutos y al final un lavado en etanol absoluto por 3 minutos.
8. Las laminillas se montan con estellan y se observan al microscopio.

Anexo IX Detección de proteínas por medio de inmunodetección

Soluciones:

Solución de RIPA 2x (10 ml)

- | | |
|----------------|-------------|
| - NaCl 1 M | 3 ml |
| - Triton X-100 | 200 μ l |

- Desoxicolato de sodio 1 % 100 mg
- SDS 10% 200 μ l
- Tris 1 M, pH 8 1 ml
- Agua 5.6 ml

Solución de RIPA 2x con 1% de SDS (10 ml)

- NaCl 1 M 3 ml
- Triton X-100 200 μ l
- Desoxicolato de sodio 1 % 100 mg
- SDS 10% 2 ml
- Tris 1 M, pH 8 1 ml
- Agua 3.7 ml

Solución de lisis RIPA (10 ml)

- 5 mL RIPA 2X
- 1 pastilla de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)
- 1 pastilla de inhibidores de fosfatasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)
- Aforar con agua a 10 ml

Nota: La solución de lisis se prepara al momento.

Laemmli Buffer 4X (10 ml)

- SDS 10% 4 ml
- 2-Mercaptoetanol 1 ml
- Azul de bromofenol 40 mg
- Tris 500 mM, pH 6.8 2.5 ml
- Agua Bidestilada 2 ml

* NOTA: Es preferible hacer alícuotas de 1 ml y almacenarlas a 4 °C

Solución de Corrida 10x (1 l)

- Tris base 250 mM 30.3 g
- Glicina 192 mM 144 g
- SDS 1% 10 g

- Aforar a un litro con agua bidestilada.

Solución de Transferencia (1 l), Ref. Manual cámara de transferencia semiseca, Hoffer.

- Tris Base 25 mM 3.0 g
- Glicina 192 mM 14.4 g
- SDS 0.1% 1.0 g
- Metanol 20% 200 ml

Solución de Transferencia (500 ml)

- Tris Base 48 mM 2.9 g
- Glicina 39 mM 1.46 g
- Metanol 20 % 100 ml
- SDS 0.04% 0.2 g

Solución TBS 10x (1 l)

- Tris Base 24.23 g
- NaCl 80.06 g
- Aforar a un litro con agua bidestilada, ajustar el pH a 7.6

TBST (1 l)

- TBS 10x 100 ml
- Tween20 1 ml
- Aforar a 1 litro con agua bidestilada

Rojo de Ponceau (40 ml)

- Rojo de Ponceau 40 mg
- Ácido acético glacial 2 ml
- Aforar a 40 ml con agua bidestilada.

Solución de "Stripping" ácida (Ref. Manual Millipore)

- 25 mM glicina-HCl, pH2
 - 1% SDS
-

Solución de "Stripping" básica

- NaOH 0.2 N

Solución de anticuerpo primario (5 ml)

- Anticuerpo primario (En base a la hoja técnica, normalmente se inicia con una dilución 1:1000)
- BSA 50 mg

* Nota: El anticuerpo se puede rehusar mientras no se observen precipitados o deje de funcionar, para preservarlo mejor es recomendable agregar azida de sodio.

Solución de anticuerpo secundario (10 ml)

- TBST 10 ml
- SDS 10% 10 μ L

- El anticuerpo secundario anti-conejo 680 nm se usa 1:10,000 y el anti-conejo 780 1:5,000

* Nota: Para anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos infrarrojos es recomendable utilizar el SDS para disminuir la señal de ruido.

Para dos geles 1.5 mm (Bio-rad)

Tabla 6 Gel separador 1.5 mm

Solución	Gel separador				Gel concentrador
	8%	10%	12%	15%	
Tris 1.5M pH 8.8 (ml)	3.75	3.75	3.75	3.75	--
Tris 0.5M pH 6.8 (ml)	---	---	---	---	1.25
APS 10% (μ l)	50	50	50	50	25
SDS 10% (μ l)	150	150	150	150	50
TEMED (μ l)	10	10	10	10	5
Acilamida 30% (ml)	4	5	6	7.5	0.65
H2O (ml)	7.1	6.1	5.1	3.6	3.05

Para dos geles de 1 mm (Bio-rad)

Tabla 7 Gel separador 1 mm

Solución	Gel separador				Gel concentrador
	8%	10%	12%	15%	
Tris 1.5M pH 8.8 (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	--
Tris 0.5M pH 6.8 (ml)	---	---	---	---	1.25
APS 10% (μl)	33.3	33.3	33.3	33.3	25
SDS 10% (μl)	100.0	100.0	100.0	100.0	50
TEMED (μl)	6.7	6.7	6.7	6.7	5
Acrilamida 30% (ml)	2.7	3.3	4.0	5.0	0.65
H2O (mL)	4.7	4.1	3.4	2.4	3.05

Procedimiento

Extracto de proteína de tejido (hígado)

9. Pesar 50 mg de tejido en un tubo eppendorf de 1.5 ml y agregar 300 μl de RIPA.
10. Homogenizar el tejido con ayuda de un homogenizador con pistilo.
11. Agregar 300 μl más de RIPA al homogenado.
12. Incubar el homogenado en agitación por 30 min a 4 °C.
13. Sonicar la muestra durante 180 segundos, con pulsos de 30 segundos y 10 segundos de reposo.
14. Centrifugar a 12, 000 g por 20 minutos en refrigeración.
15. Recuperar el sobrenadante.
16. Cuantificar el extracto de proteína por el método de Bradford.

Extracto de proteína de células

1. Lavar tres veces con PBS las células previamente cultivadas a confluencia o semiconfluencia.
2. Succionar la mayor cantidad posible de PBS del plato de cultivo.
3. Agregar 50 μl de RIPA al plato de cultivo y con ayuda de un "Cell Scraper" despegar la mayor cantidad de células posibles. Recuperar la suspensión celular en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
4. Agregar 50 μl más de RIPA al plato de cultivo para recuperar la mayor cantidad de células. Recuperar la suspensión celular restante.

5. Sonicar las células durante 60 segundos, con pulsos de intervalos de 10 segundos.
6. Centrifugar las células a 12, 000 g por 20 minutos a 4°C.
7. Recuperar el sobrenadante en otro tubo y determinar la cantidad de proteína por el método de Bradford.

NOTA: Todas las soluciones deben estar frías y la preparación se realiza en hielo de agua.

Procedimiento

1. Para preparar el gel separador SDS-PAGE realizar una mezcla de soluciones en un tubo tipo falcon de 50 ml de acuerdo con la Tabla 6 o Tabla 7, según el porcentaje, cantidad y grosor de los geles deseados.
2. Montar los cristales para preparar un gel de acrilamida seleccionando los cristales según el grosor deseado (mini, Bio-rad).
3. Agregar la solución del gel hasta llenar un 75% de la capacidad del cristal.
4. Agregar con mucho cuidado 500 μ l de isobutanol sobre la solución del gel para que el gel se forme completamente horizontal.
5. Esperar 30 minutos a que polimerice.
6. Para preparar el gel concentrador haciendo una mezcla de soluciones en un tubo tipo falcon de 50 ml de acuerdo con la Tabla 6 o Tabla 7.
7. Agregar la solución sobre el gel separador ya polimerizado (retirar antes el isobutanol) y colocar el peine según el número de pozos deseados.
8. Esperar a que polimerice el gel concentrador.
9. Montar los geles en la cámara de electroforesis (Biorad) y agregar la solución de corrida.
10. En un tubo Eppendorf mezclar de 20-40 μ g de extracto de proteína y añadir la solución de carga en una relación 4:1 (4 de proteína y 1 de solución de carga).
11. Cargar la muestra (extracto de proteína con solución de carga) en los pozos del gel montado en la cámara de electroforesis. Añadir marcador de peso molecular PageRuler (Termo Scientific)
12. Correr la electroforesis a 120 V durante 120 minutos. Detenerla en cuanto el frente de corrida esté a aproximadamente 95% del gel.

13. Terminada la corrida retirar el gel sumergirlo en solución de transferencia por 10 minutos.
14. Activar la membrana de PVDF en metanol 100% durante 5 minutos, posteriormente retirar el metanol y agregar solución de transferencia e incubar 10 minutos.
15. Montar el gel y la membrana de PVDF en la cámara de transferencia semiseca (Hoffer, TE70X) con tres papeles filtro en la parte superior y tres en la inferior previamente sumergidos en solución de transferencia.
16. Correr la transferencia a 250 mA por hora.
17. Colocar la membrana de PVDF en solución de Ponceau para visualizar las bandas de proteínas, incubar por 5 minutos.
18. Hacer tres lavados de 5 minutos cada uno con TBST en agitación.
19. Bloquear la membrana con la solución de bloqueo Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) por una hora a temperatura ambiente y en agitación.
20. Eliminar la solución de bloqueo y agregar el anticuerpo primario. Incubar durante toda la noche.
21. Retirar el anticuerpo primario y hacer tres lavados de 5 minutos cada uno con TBST en agitación.
22. Agregar el anticuerpo secundario e incubar por una hora a temperatura ambiente en agitación.
23. Retirar el anticuerpo secundario y hacer tres lavados de 5 minutos cada uno con TBST en agitación.
24. Escanear las membranas con Odyssey Classic Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).
25. Si se desea hacer "stripping" incubar la membrana en 5 ml de solución de "stripping" durante 5 minutos en agitación. Se recomienda utilizar la solución básica.
26. Retirar la solución de "stripping" y hacer tres lavados de 5 minutos cada uno con TBST en agitación.
27. Repetir los pasos del 19 al 24.

Anexo X Anticuerpos utilizados para inmunoblot.

Los datos de los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 8, incluyendo marca, catálogo y la dilución utilizada para el inmunoblot.

Tabla 8 Relación de anticuerpos utilizados para inmunodetección

Anticuerpo	Dilución	Marca	Catálogo
α -AMPK	1:500	Cell Signaling	#2532
α -pAMPK	1:1.000	Cell Signaling	#2535
α -AKT	1:1.000	Cell Signaling	#9272
α -pAKT	1:1.000	Cell Signaling	#2965
α -LC3B	1:1,000	Cell Signaling	#3868
α -p62	1:500	Cell Signaling	#8025
α -mTOR	1:1.000	Cell Signaling	#2983
α -pmTOR	1:1,000	Cell Signaling	#5536
α -FAS	1:1,000	Cell Signaling	#3180
α -ACC	1:1,000	Cell Signaling	#3676
α -ATP Citrato-Liase	1:1,000	Cell Signaling	#4332
α -PMP70	1:1,000	Sigma-Aldrich	P0497-200UL
α -Tubulin	1:7,000	Cell Signaling	#3873
α -LAMP1	1:1,000	Sigma-Aldrich	L1418-200UL
α -LAMP2	1:1,000	Sigma-Aldrich	L0668-200UL
α -HSP70	1:1,000	Santa Cruz Biotechnology	SC-24
α -mouse 680	1:10,000	Licor	926-68022
α -rabbitt 780	1:5,000	Licor	926-32211
α -Tubulina	0.4 μ g/ml	DSHB	AA4.3

Anexo XI Extracción de RNA total para RT-qPCR

Hay al menos dos opciones para extraer RNA total del tejido, la primera es homogenizar el tejido en el reactivo para extraer RNA utilizando un homogenizador con pistilo, la segunda es pulverizar el tejido en mortero y entonces hacer la extracción, se prefirió la segunda opción por representar la mejor alternativa.

Reactivos:

1. Si se hace de tejido fresco congelar previamente en nitrógeno líquido. El tejido congelado se coloca en un mortero previamente enfriado en hielo seco.
2. Con ayuda del pistilo se pulveriza obteniendo un polvo lo más homogéneo posible.
3. El polvo se transfiere a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agrega 1 ml de Trizole, se incuba por 5 minutos.
4. Se agregan 200 μ l se cloroformo y se agita vigorosamente por 15 segundo. NO usar Vortex.
5. Centrifugar a 12,000 g por 15 minutos a 4 °C.
6. Transferir la fase superior a un tubo nuevo. Tener mucho cuidado de no tomar nada de la interfase.
7. Agregar 0.5 ml de isopropanol y mezclar por inversión por 15 segundo. Incubar a -20 °C al menos por 6 horas.
8. Centrifugar a 12,000 g por 30 minutos a 4 °C.
9. Eliminar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol 75% preparado en agua DEPC. Mezclar con Vortex durante 10 segundos.
10. Centrifugar a 6,000 g por 5 minutos a 4 °C.
11. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado a temperatura ambiente. Se recomienda secar en la campana de flujo laminar para evitar lo más posible la contaminación del RNA.
12. Resuspender el RNA en agua previamente tratada con DEPC. Utilizar entre 30 y 100 μ l dependiendo de la cantidad de RNA obtenido.
13. Cuantificar el RNA en espectrofotómetro.

14. Realizar la electroforesis de 1 μg en un gel de agarosa al 1% en TAE. La solución de carga recomendada es urea 10 M con azul de bromofenol. Se obtienen mejores resultados si el RNA previamente mezclado con la solución de carga (1:1) se calienta a 65 °C y se enfría en hielo inmediatamente y se carga.

15. Se deben visualizar las bandas de los RNAs ribosomales.

Consideraciones importantes:

- El volumen de la muestra no deber ser mayor al 10% del total del reactivo de extracción, es decir, para 1 ml de reactivo máximo se pueden usar 100 mg de muestra. Se recomienda que sean 50 mg de muestra por cada ml de reactivo.
- Se recomienda que todo el material este completamente limpio y estéril (tubos, puntas de pipeta, etcétera)
- Se recomienda limpiar la mesa de trabajo y pipetas con SDS al 1%.
- Es recomendable el uso de cubrebocas y guantes nuevos durante la extracción.
- El agua previamente tratada con DEPC se recomienda esterilizarla por autoclave y hacer alícuotas de 1 ml, las cuales se usan para resuspender el RNA.
- El agua tratada con DEPC se puede reemplazar con agua grado milli-Q previamente filtrada con filtro de 0.22 μm y esterilizada en autoclave.

Anexo XII Síntesis de cDNA utilizando HyperScrip, GeneAll

El siguiente protocolo es para la síntesis de cDNA utilizando la MVL-Reverso transcriptas HyperScrip de GeneAll Cat: 601-100

1. Preparar la siguiente mezcla (Mezcla 1) por cada muestra:

Mezcla1

RNA Total	500 ng
Random Primer, 50 ng/ μl	1 μl
dNTP's 10 mM	1 μl
H2O	Ajustar a 14 μl

2. Incubar por 5 min a 65 °C

3. Inmediatamente enfriar en hielo 5 min.
4. Preparar la Mezcla 2 como sigue para cada una de las muestras:

Mezcla 2

Buffer RT 10x	2 μ l
DTT 0.1 M	2 μ l
Hyper RT	0.5 μ l
H ₂ O	1.5 μ l

5. Mezclar la mezcla 1 con la 2.
6. Incubar a 25 °C 10 minutos.
7. Incubar a 55 °C 60 minutos.
8. Almacenar el cDNA a -20 °C

Anexo XIII Reacción de qPCR

La reacción de PCR se realizó utilizando el Universal Master Mix de Kapa Biosystems (Cat: KK4600). La mezcla se realizó directamente en tubos de PCR para el rotor de 72 del Rotor Gene-Q (Qiagene).

Mezcla de reacción:

Universal Master Mix	5 μ l
Primer 5' (1 μ M)	1 μ l
Primer 5' (1 μ M)	1 μ l
cDNA	0.5 μ l
Agua	2.5 μ l

Ciclo de PCR

1. Activación	95 °C	5 minutos
2. Alineación	60 °C	20 segundos
3. Síntesis	72 °C	20 segundos
4. Desnaturalización	95 °C	20 segundos

Se repite del 2 al 4 39 ciclos

Curva de desnaturalización: desde 55 °C incrementos de 2 grados cada 20 segundos hasta 85 °C.

Anexo XIV Oligonucleótidos para RT-qPCR

Los oligonucleótidos utilizados para qPCR se encuentran en la Tabla 8. Algunos de los pares de oligonucleótidos se obtuvieron de trabajos previamente publicados y otros se diseñaron en la aplicación en línea Primer Blast3.

Tabla 9 Relación de Oligonucleótidos utilizados en qRT-PCR

Gene	Oligonucleotido 5'	Oligonucleotido 3'	Referencia
<i>p21</i>	ACTACCAGCTGTGGGGTGAG	GTGCCTGTGGCACCTTTTAT	***
<i>p16</i>	CCCAACGCCCCGAAGT	GCAGAAGAGCTGCTACGTGAA	(Edwards <i>et al.</i> , 2007)
<i>P53</i>	TAGGGGGCACCTAGCATTCA	ATGGCAGTCATCCAGTCTTCG	***
<i>Cat</i>	CGCTGAGAAGCCTAAGAACG	TCCATCCAGCGTTGATTACA	***
<i>Atg5</i>	GCCCCTGAAGATGGAGAGAA	GTGGTTCCATCTAGCGAGGA	***
<i>Atg7</i>	TGCCTATGATGATCTGTGTC	CACCAACTGTTATCTTTGTCC	(Aydin <i>et al.</i> , 2015)
<i>Lc3b</i>	CGATACAAGGGGGAGAAGCA	ACTTCGGAGATGGGAGTGGA	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2015)
<i>p62</i>	TGCTCTTCGGAAGTCAGCAA	CCCGACTCCATCTGTTCCCTC	
<i>Lamp2</i>	TAGGAGCCGTTTCAGTCCAAT	GTGTGTCGCCTTGTCAGGTA	
<i>Atrogin</i>	AGGAGCGCCATGGATACTGT	GAAGTTCTTTTGGGCGATGC	
<i>Gck</i>	CCCTGAGTGGCTTACAGTTC	ACGGATGTGAGTGTTGAAGC	(Dentin <i>et al.</i> , 2004)
<i>Pck1</i>	CTGCATAACGGTCTGGACTTC	CAGCAACTGCCCGTACTCC	(Chiang <i>et al.</i> , 2009)
<i>G6pc</i>	TGCAAGGGGAGAACTCAGCAA	GGACCAAGGAAGCCACAATG	(Bernal-Mizrachi <i>et al.</i> , 2003)
<i>Fasn</i>	GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT	AGAGACGTGTCACTCCTGGACT T	(Jin <i>et al.</i> , 2011)
<i>Scd1</i>	TTCTTGCGATACTCTGGTGC	CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT	(Tan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pparγ2</i>	TCGCTGATGCACTGCCTATG	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT	(Chiang <i>et al.</i> , 2009)
<i>Acox1</i>	GCCTGCTGTGTGGGTATGTCAT T	GTCATGGGCGGGTGCAT	
<i>Pck1</i>	CTGCATAACGGTCTGGACTTC	CAGCAACTGCCCGTACTCC	
<i>Rplp0</i>	CACTGGTCTAGGACCCGAGAA	AGGGGGAGATGTTTCAGCATGT	
<i>Ctp1a</i>	CTCCGCCTGAGCCATGAAG	CACCAGTGATGATGCCATTCT	
<i>Pparaα</i>	CTGCAGAGCAACCATCCAGAT	GCCGAAGGTCCACCATTTT	(Proctor <i>et al.</i> , 2006)
<i>Fgf21</i>	CCTCTAGGTTTCTTTGCCAACA G	AAGCTGCAGGCCTCAGGAT	(Inagaki <i>et al.</i> , 2007)

<i>Klotho</i> <i>a</i>	GGCTTTCCTCCTTTACCTGAAA A	CACATCCCACAGATAGACATTC G	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
<i>klothob</i>	CCAGGAGGCTCTGAAAGCATA	GACTTCTGTTCTCAGCGGGG	***
<i>Spot14</i>	ATGCAAGTGCTAACGAAACGC	CCTGCCATTCCTCCCTTGG	(Adams <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pkm1</i>	GCTGTTTGAAGAGCTTGTGC	TTATAAGAGGCCTCCACGCT	(Sun <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pkm2</i>	TGTCTGGAGAAACAGCCAAG	TCCTCGAATAGCTGCAAGTG	
<i>Fbp1</i>	TCTGCACCGCGATCAAAG	GTTGAGCCAGCGATACCATAGA G	(Nonogaki <i>et al.</i> , 2007)
<i>Elovl6</i>	GAAAAGCAGTTCAACGAGAACG	AGATGCCGACCACCAAAGATA	(Liu <i>et al.</i> , 2012)
<i>mGpat</i>	CGACATCCTCGTCATACCCG	ACTCCAGAGGCTCTCGTTCT	***

*** Oligonucleótidos diseñados en este trabajo utilizando PrimerBlast de NCBI.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, A.C., Astapova, I., Fisher, F.M., Badman, M.K., Kurgansky, K.E., Flier, J.S., Hollenberg, A.N., and Maratos-Flier, E. (2010). Thyroid hormone regulates hepatic expression of fibroblast growth factor 21 in a PPAR α -dependent manner. *J. Biol. Chem.* 285, 14078–14082.
- Adeva-Andany, M.M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., and Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* 5, 85–100.
- Agarraberes, F.A., Terlecky, S.R., and Dice, J.F. (1997). An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J. Cell Biol.* 137, 825–834.
- Agathocleous, M., and Harris, W.A. (2013). Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol.* 23, 484–492.
- Akiyama, T.E., Nicol, C.J., Fievet, C., Staels, B., Ward, J.M., Auwerx, J., Lee, S.S.T., Gonzalez, F.J., and Peters, J.M. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor- α regulates lipid homeostasis, but is not associated with obesity. Studies with congenic mouse lines. *J. Biol. Chem.* 276, 39088–39093.
- Amelina, H., Sjödin, M.O.D., Bergquist, J., and Cristobal, S. (2011). Quantitative subproteomic analysis of age-related changes in mouse liver peroxisomes by iTRAQ LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879, 3393–3400.
- Amrit, F.R.G., Steenkiste, E.M., Ratnappan, R., Chen, S.W., McClendon, T.B., Kostka, D., Yanowitz, J., Olsen, C.P., and Ghazi, A. (2016). DAF-16 and TCER-1 Facilitate Adaptation to Germline Loss by Restoring Lipid Homeostasis and Repressing Reproductive Physiology in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 12.
- An, Z., Wang, H., Song, P., Zhang, M., Geng, X., and Zou, M.H. (2007). Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes: A role for oxidant stress. *J. Biol. Chem.* 282, 26793–26801.
- André, A., Juanéda, P., Sébédio, J.L., and Chardigny, J.M. (2006). Plasmalogen metabolism-related enzymes in rat brain during aging: Influence of n-3 fatty acid intake. *Biochimie* 88, 103–111.
- Andziak, B., and Buffenstein, R. (2006). Disparate patterns of age-related changes in lipid peroxidation in long-lived naked mole-rats and shorter-lived mice. *Aging Cell* 5, 525–532.
- Andziak, B., O'Connor, T.P., and Buffenstein, R. (2005). Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Mech. Ageing Dev.* 126, 1206–1212.
- Andziak, B., O'Connor, T.P., Qi, W., Dewaal, E.M., Pierce, A., Chaudhuri, A.R., Van Remmen, H., and Buffenstein, R. (2006). High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell* 5, 463–471.
- Anson, R.M., Guo, Z., de Cabo, R., Iyun, T., Rios, M., Hagepanos, A., Ingram, D.K., Lane, M.A., and Mattson, M.P. (2003). Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 6216–6220.

- Argmann, C., Dobrin, R., Heikkinen, S., Auburtin, A., Pouilly, L., Cock, T.A., Koutnikova, H., Zhu, J., Schadt, E.E., and Auwerx, J. (2009). Ppar γ 2 is a key driver of longevity in the mouse. *PLoS Genet.* 5.
- Attané, C., Peyot, M.L., Lussier, R., Zhang, D., Joly, E., Madiraju, S.R.M., and Prentki, M. (2016). Differential insulin secretion of high-fat diet-fed C57BL/6NN and C57BL/6NJ mice: Implications of mixed genetic background in metabolic studies. *PLoS One* 11, 1–11.
- Aydin, E., Kloos, D.P., Gay, E., Jonker, W., Hu, L., Bullwinkel, J., Brown, J.P., Manukyan, M., Giera, M., Singh, P.B., et al. (2015). A hypomorphic Cbx3 allele causes prenatal growth restriction and perinatal energy homeostasis defects. *J. Biosci.* 40, 325–338.
- Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., and Evans, R.M. (1999). PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* 4, 585–595.
- Bernal-Mizrachi, C., Weng, S., Feng, C., Finck, B.N., Knutsen, R.H., Leone, T.C., Coleman, T., Mecham, R.P., Kelly, D.P., and Semenkovich, C.F. (2003). Dexamethasone induction of hypertension and diabetes is PPAR-alpha dependent in LDL receptor-null mice. *Nat. Med.* 9, 1069–1075.
- Bhattacharya, K., Maiti, S., and Mandal, C. (2016). PTEN negatively regulates mTORC2 formation and signaling in grade IV glioma via Rictor hyperphosphorylation at Thr1135 and direct the mode of action of an mTORC1/2 inhibitor. *Oncogenesis* 5, e227–e227.
- Bonekamp, N.A., Völkl, A., Fahimi, H.D., and Schrader, M. (2009). Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance. *BioFactors* 35, 346–355.
- Bonkowski, M.S., Rocha, J.S., Masternak, M.M., Al Regaiey, K.A., and Bartke, A. (2006). Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 7901–7905.
- Bookout, A.L., Groot, M.H.M. De, Owen, B.M., Lee, S., Lawrence, H.L., Ding, X., Elmquist, J.K., Joseph, S., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2014). FGF21 regulates circadian behavior and metabolism by acting on the nervous system. *Nat. Med.* 19, 1147–1152.
- Bornfeldt, K.E., and Tabas, I. (2011). Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab.* 14, 575–585.
- Bouillaud, F. (2009). UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1787, 377–383.
- Bourdi, M., Davies, J.S., and Pohl, L.R. (2011). Mispairing C57BL/6 substrains of genetically engineered mice and wild-type controls can lead to confounding results as it did in studies of JNK2 in acetaminophen and concanavalin a liver injury. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 794–796.
- Boveris, A., and Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707–716.
- Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*

128, 617–630.

Braverman, N.E., and Moser, A.B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822, 1442–1452.

Brennan, T.A., Egan, K.P., Lindborg, C.M., Chen, Q., Sweetwyne, M.T., Hankenson, K.D., Xie, S.X., Johnson, F.B., and Pignolo, R.J. (2014). Mouse models of telomere dysfunction phenocopy skeletal changes found in human age-related osteoporosis. *Dis. Model. Mech.* 7, 583–592.

Bujak, A.L., Crane, J.D., Lally, J.S., Ford, R.J., Kang, S.J., Rebalka, I.A., Green, A.E., Kemp, B.E., Hawke, T.J., Schertzer, J.D., et al. (2015). AMPK Activation of Muscle Autophagy Prevents Fasting-Induced Hypoglycemia and Myopathy during Aging. *Cell Metab* 21, 883–890.

Burkin, D.J., Wallace, G.Q., Nicol, K.J., Kaufman, D.J., and Kaufman, S.J. (2001). Enhanced expression of the $\alpha7\beta1$ integrin reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice. *J. Cell Biol.* 152, 1207–1218.

Cantó, C., and Auwerx, J. (2010). AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3407–3423.

Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056–1060.

Cantó, C., Jiang, L.Q., Deshmukh, A.S., Matak, C., Coste, A., Lagouge, M., Zierath, J.R., and Auwerx, J. (2010). Interdependence of AMPK and SIRT1 for Metabolic Adaptation to Fasting and Exercise in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* 11, 213–219.

Carmona-Gutierrez, D., Hughes, A.L., Madeo, F., and Ruckenstein, C. (2016). The crucial impact of lysosomes in aging and longevity. *Ageing Res. Rev.* 32, 2–12.

Catania, C., Binder, E., and Cota, D. (2011). mTORC1 signaling in energy balance and metabolic disease. *Int. J. Obes.* 35, 751–761.

Catterson, J.H., Khericha, M., Dyson, M.C., Vincent, A.J., Callard, R., Haveron, S.M., Rajasingam, A., Ahmad, M., and Partridge, L. (2018). Short-Term, Intermittent Fasting Induces Long-Lasting Gut Health and TOR-Independent Lifespan Extension. *Curr. Biol.* 28, 1714-1724.e4.

Cavallini, G., Donati, A., Gori, Z., and Bergamini, E. (2008). Towards an Understanding of the Anti-Aging Mechanism of Caloric Restriction. *Curr. Aging Sci.* 1, 4–9.

Chakraborty, A., Koldobskiy, M.A., Bello, N.T., Maxwell, M., Potter, J.J., Juluri, K.R., Maag, D., Kim, S., Huang, A.S., Dailey, M.J., et al. (2010). Inositol pyrophosphates inhibit akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain. *Cell* 143, 897–910.

Chakravarthy, M. V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J.G., Coleman, T., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2005). “New” hepatic fat activates PPAR α to maintain glucose, lipid, and cholesterol

homeostasis. *Cell Metab.* *1*, 309–322.

Chakravarthy, M. V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R. V, Xu, H.E., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2009). Identification of a Physiologically Relevant Endogenous Ligand for PPARgamma in Liver. *Cell* *138*, 476–488.

Chao, L.C., Zhang, Z., Pei, L., Saito, T., Tontonoz, P., and Pilch, P.F. (2007). Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* *21*, 2152–2163.

Chelikani, P., Fita, I., and Loewen, P.C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* *61*, 192–208.

Chen, Q., and Ames, B.N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells (replicative castion/mophol /DNA damage/p53 cell cycle checkpoint). *Cell Biol.* *91*, 4130–4134.

Chiang, S.H., Bazuine, M., Lumeng, C.N., Geletka, L.M., Mowers, J., White, N.M., Ma, J.T., Zhou, J., Qi, N., Westcott, D., et al. (2009). The Protein Kinase IKKe Regulates Energy Balance in Obese Mice. *Cell* *138*, 961–975.

Chin, R.M., Fu, X., Pai, M.Y., Vergnes, L., Hwang, H., Diep, S., Lomenick, B., Meli, V.S., Monsalve, G.C., Whelan, S. a, et al. (2014). The metabolite alpha-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting the ATP synthase and TOR. *Nature* *510*, 397–401.

Chotechuan, N., Azzout-Marniche, D., Bos, C., Chaumontet, C., Gausserès, N., Steiler, T., Gaudichon, C., and Tomé, D. (2009). mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am. J. Physiol. Metab.* *297*, E1313–E1323.

Cipolla, C.M., and Lodhi, I.J. (2017). Peroxisomal Dysfunction in Age-Related Diseases. *Trends Endocrinol Metab* *28*, 297–308.

Clancy, D.J., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leevers, S.J., et al. (2001). Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a Drosophila Insulin Receptor Substrate Protein. *Science* (80-.). *292*, 104–106.

Clark, D.R., and Krynitsky, A.J. (1983). DDE in brown and white fat of hibernating bats. *Environ. Pollution. Ser. A, Ecol. Biol.* *31*, 287–299.

Colasante, C., Chen, J., Ahlemeyer, B., Bonilla-Martinez, R., Karnati, S., and Baumgart-Vogt, E. (2017). New insights into the distribution, protein abundance and subcellular localisation of the endogenous peroxisomal biogenesis proteins PEX3 and PEX19 in different organs and cell types of the adult mouse.

Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* *130*, 223–233.

Costet, P., Legendre, C., Moré, J., Eddar, A., Galtier, P., and Pineau, T. (1998). Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha-Isoform Deficiency Leads to Progressive Dyslipidemia with Sexually Dimorphic Obesity and Steatosis. *J. Biol. Chem.* *273*, 29577–29585.

- Cotter, D.G., Avignon, D.A., Wentz, A.E., Weber, M.L., and Crawford, P.A. (2011). Obligate role for ketone body oxidation in neonatal metabolic homeostasis. *J. Biol. Chem.* 286, 6902–6910.
- Crane, D., and Masters, C. (1984). On the role of catalase in the oxidation of tissue fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 229, 104–111.
- Csibi, A., Fendt, S.M., Li, C., Pouligiannis, G., Choo, A.Y., Chapski, D.J., Jeong, S.M., Dempsey, J.M., Parkhitko, A., Morrison, T., et al. (2013). The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell* 153, 840–854.
- Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off Autophagy: Cellular self-digestion with a purpose. 21, 142–150.
- Cuevas-Benítez, O. (2007). Efecto de los niveles de catalasa sobre el estrés oxidativo, la senescencia replicativa, la muerte celular y el envejecimiento del organismo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dabovic, B., Chen, Y., Colarossi, C., Obata, H., Zambuto, L., Perle, M.A., and Rifkin, D.B. (2002). Bone abnormalities in latent TGF- β binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF- β bioavailability. *J. Cell Biol.* 156, 227–232.
- Dentin, R., Pégorier, J.P., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferré, P., Fauveau, V., Magnuson, M.A., Girard, J., and Postic, C. (2004). Hepatic Glucokinase Is Required for the Synergistic Action of ChREBP and SREBP-1c on Glycolytic and Lipogenic Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 279, 20314–20326.
- DePavia, A., Jonasch, E., and Liu, X. De (2016). Autophagy degrades hypoxia inducible factors. *Mol. Cell. Oncol.* 3, 1–2.
- Deshmukh, P., Unni, S., Krishnappa, G., and Padmanabhan, B. (2017). The Keap1–Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophys. Rev.* 9, 41–56.
- Dillin, A., Hsu, A.-L., Arantes-Oliveira, N., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A., Kamath, R., Ahringer, J., and Kenyon, C. (2002). Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* (80-.). 298, 2398–2401.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- De Duve, C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46, 323–357.
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839–848.
- Edrey, Y.H., Hanes, M., Pinto, M., Mele, J., and Buffenstein, R. (2011). Successful aging and sustained good health in the naked mole rat: A long-lived mammalian model for biogerontology and biomedical research. *ILAR J.* 52, 41–53.

- Edwards, M.G., Anderson, R.M., Yuan, M., Kendzierski, C.M., Weindruch, R., and Prolla, T.A. (2007). Gene expression profiling of aging reveals activation of a p53-mediated transcriptional program. *BMC Genomics* 8, 1–13.
- Efeyan, A., Zoncu, R., Chang, S., Gumper, I., Snitkin, H., Wolfson, R.L., Kirak, O., Sabatini, D.D., and Sabatini, D.M. (2013). Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature* 493, 679–683.
- Engelking, L.J., Kuriyama, H., Hammer, R.E., Horton, J.D., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Liang, G. (2004). Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J. Clin. Invest.* 113, 1168–1175.
- Esworthy, R.S., Ho, Y.S., and Chu, F.F. (1997). The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 340, 59–63.
- Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S.D., Gendron, C.M., and Longo, V.D. (2001). Regulation of Longevity and Stress Resistance by Sch9 in Yeast. *Science* (80-). 292, 288 LP – 290.
- Fan, C.Y., Pan, J., Usuda, N., Yeldandi, A. V., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1998). Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-Coa oxidase: Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J. Biol. Chem.* 273, 15639–15645.
- Fan, W., Waizenegger, W., Lin, C.S., Sorrentino, V., He, M.X., Wall, C.E., Li, H., Liddle, C., Yu, R.T., Atkins, A.R., et al. (2017). PPAR δ Promotes Running Endurance by Preserving Glucose. *Cell Metab.* 25, 1186–1193.e4.
- Farah, B.L., Landau, D.J., Sinha, R.A., Brooks, E.D., Wu, Y., Fung, S.Y.S., Tanaka, T., Hirayama, M., Bay, B.H., Koeberl, D.D., et al. (2016). Induction of autophagy improves hepatic lipid metabolism in glucose-6-phosphatase deficiency. *J. Hepatol.* 64, 370–379.
- Farese, R. V., Zechner, R., Newgard, C.B., and Walther, T.C. (2012). The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Cell Metab.* 15, 570–573.
- Fedorenko, A., Lishko, P. V., and Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* 151, 400–413.
- Ferdinandusse, S., Denis, S., Faust, P.L., and Wanders, R.J.A. (2009). Bile acids: the role of peroxisomes. *J. Lipid Res.* 50, 2139–2147.
- Fergusson, G., Éthier, M., Guévremont, M., Chrétien, C., Attané, C., Joly, E., Fioramonti, X., Prentki, M., Poitout, V., and Alquier, T. (2014). Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Mol. Metab.* 3, 848–854.
- Ferre, P. (2004). The Biology of Peroxisome Proliferator–Activated Receptors. *Diabetes* 53, 43–50.
- Ferreira, J.V., Soares, A.R., Ramalho, J.S., Pereira, P., and Girao, H. (2015). K63 linked ubiquitin chain

formation is a signal for HIF1A degradation by Chaperone-Mediated Autophagy. *Sci. Rep.* 5, 1–13.

Figueira, T.R. (2013). A word of caution concerning the use of Nnt -mutated C57BL/6 mice substrains as experimental models to study metabolism and mitochondrial pathophysiology. *Exp. Physiol.* 98, 1643–1643.

Filomeni, G., De Zio, D., and Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* 22, 377–388.

Fisher-Wellman, K.H., Ryan, T.E., Smith, C.D., Gilliam, L.A.A., Lin, C. Te, Reese, L.R., Torres, M.J., and Neuffer, P.D. (2016). A direct comparison of metabolic responses to high-fat diet in C57BL/6J and C57BL/6NJ mice. *Diabetes* 65, 3249–3261.

Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A.G., and Panayiotidis, M.I. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 266, 6–11.

Fujiwara, C., Imamura, A., Hashiguchi, N., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., Imanaka, T., Tsukamoto, T., and Osumi, T. (2002). Catalase-less Peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 275, 37271–37277.

Fukao, T., Lopaschuk, G.D., and Mitchell, G.A. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: On the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 70, 243–251.

Garcia, D., and Shaw, R.J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol. Cell* 66, 789–800.

Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J.J., Johnson, L., Dietz, K.R., Nicol, C.J., Vinson, C., Gonzalez, F.J., and Reitman, M.L. (2003). Liver Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Contributes to Hepatic Steatosis, Triglyceride Clearance, and Regulation of Body Fat Mass. *J. Biol. Chem.* 278, 34268–34276.

Gems, D., and Doonan, R. (2009). Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: Is the oxidative damage theory of aging wrong? *Cell Cycle* 8, 1681–1687.

Gladyshev, V.N. (2012). On the cause of aging and control of lifespan. *BioEssays* 34, 925–929.

Gowans, G.J., Hawley, S.A., Ross, F.A., and Hardie, D.G. (2013). AMP is a true physiological regulator of amp-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab.* 18, 556–566.

Green, D.R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2014). Metabolic control of cell death. *Science* (80-.). 345.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.

Haddad, J.J.E., Olver, R.E., and Land, S.C. (2000). Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity: Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 21130–21139.

Hagiwara, A., Cornu, M., Cybulski, N., Polak, P., Betz, C., Trapani, F., Terracciano, L., Heim, M.H., Rüegg,

M.A., and Hall, M.N. (2012). Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab.* 15, 725–738.

Haigis, M.C., Mostoslavsky, R., Haigis, K.M., Fahie, K., Christodoulou, D.C., Murphy, A.J.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Karow, M., Blander, G., et al. (2006). SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells. *Cell* 126, 941–954.

Hampton, A.L., Hish, G.A., Aslam, M.N., Rothman, E.D., Bergin, I.L., Patterson, K.A., Naik, M., Paruchuri, T., Varani, J., and Rush, H.G. (2012). Progression of ulcerative dermatitis lesions in C57BL/6Crl mice and the development of a scoring system for dermatitis lesions. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 51, 586–593.

Hansen, M., Chandra, A., Mitic, L.L., Onken, B., Driscoll, M., and Kenyon, C. (2008). A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 4.

Hardie, D.G., Ross, F. a., and Hawley, S. a. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262.

Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.

Harman, D. (1972). The Biologic Clock: The Mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 20, 145–147.

Hauner, H. (2002). The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 18, 10–15.

Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., and Hardie, D.G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2, 9–19.

Heit, C., Marshall, S., Singh, S., Yu, X., Charkoftaki, G., Zhao, H., Orlicky, D.J., Fritz, K.S., Thompson, D.C., and Vasiliou, V. (2017). Catalase deletion promotes prediabetic phenotype in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 103, 48–56.

Hernández-García, D.L. (2009). Participación del estrés oxidativo en la muerte celular programada. Universidad Nacional Autónoma de México.

Herzig, S., Quinn, R., Montminy, M., Rudolph, D., Long, F., Spiegelman, B., Yoon, C., Hedrick, S., Jhala, U.S., Schutz, G., et al. (2002). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179–183.

Ho, Y.S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., and Ho, D.S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J. Biol. Chem.* 279, 32804–32812.

Holthuis, J.C.M., and Menon, A.K. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510, 48–57.

Hornbrook, R., and Lyon, J.B. (1970). THE REGULATION OF GLYCOGEN METABOLISM IN MOUSE LIVER. *Biochim. Biophys. Acta* 215, 29–38.

Howell, J.J., Hellberg, K., Turner, M., Talbott, G., Kolar, M.J., Ross, D.S., Hoxhaj, G., Saghatelian, A., Shaw, R.J., and Manning, B.D. (2017). Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab.* 25, 463–471.

Hryb, D.J., and Hogg, J.F. (1979). Chain length specificities of peroxisomal and mitochondrial β -oxidation in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 1200–1206.

Hu, L., Yin, C., Zhao, F., Ali, A., Ma, J., and Qian, A. (2018). Mesenchymal stem cells: Cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 19.

Hubbi, M.E., Hu, H., Kshitiz, Ahmed, I., Levchenko, A., and Semenza, G.L. (2013). Chaperone-mediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1 β (HIF-1 β) for lysosomal degradation. *J. Biol. Chem.* 288, 10703–10714.

Hufton, B.R., and Wharton, B.A. (1982). Glycogen storage disease (type 1) presenting in the neonatal period. *Arch. Dis. Child.* 57, 309–311.

Iba, K., Durkin, M.E., Johnsen, L., Hunziker, E., Damgaard-Pedersen, K., Zhang, H., Engvall, E., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (2001). Mice with a targeted deletion of the tetranectin gene exhibit a spinal deformity. *Mol Cell Biol* 21, 7817–7825.

Ikeda, S., Miyazaki, H., Nakatani, T., Kai, Y., Kamei, Y., Miura, S., Tsuboyama-Kasaoka, N., and Ezaki, O. (2002). Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 395–400.

Imai, T., Takakuwa, R., Marchand, S., Dentz, E., Bornert, J., Messaddeq, N., Wahli, W., Chambon, P., Metzger, D., Wendling, O., et al. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4543–4547.

Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., et al. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2, 217–225.

Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., et al. (2007). Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab.* 5, 415–425.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival phosphorylation decreases the ability of TSC2 to inhibit the phosphorylation of ribosomal S6 kinase (S6K) and eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1 (4EBP1). *Cell* 115, 577–590.

Inoue, M., Ohtake, T., Motomura, W., Takahashi, N., Hosoki, Y., Miyoshi, S., Suzuki, Y., Saito, H., Kohgo, Y., and Okumura, T. (2005). Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 215–222.

Ivashchenko, O., Van Veldhoven, P.P., Brees, C., Ho, Y.-S., Terlecky, S.R., and Fransen, M. (2011).

Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar cross-talk. *Mol. Biol. Cell* 22, 1440–1451.

Jiang, S., Wang, W., Miner, J., and Fromm, M. (2012). Cross Regulation of Sirtuin 1, AMPK, and PPAR γ in Conjugated Linoleic Acid Treated Adipocytes. *PLoS One* 7, 1–11.

Jin, X., Moskophidis, D., and Mivechi, N.F. (2011). Heat shock transcription factor 1 is a key determinant of HCC development by regulating hepatic steatosis and metabolic syndrome. *Cell Metab.* 14, 91–103.

Jones, J.R., Barrick, C., Kim, K.-A., Lindner, J., Blondeau, B., Fujimoto, Y., Shiota, M., Kesterson, R.A., Kahn, B.B., and Magnuson, M.A. (2005). Deletion of PPAR γ in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6207–6212.

Jones, O.R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C.G., Schaible, R., Casper, B.B., Dahlgren, J.P., Ehrlén, J., García, M.B., Menges, E.S., et al. (2014). Diversity of ageing across the tree of life. *Nature* 505, 169–173.

Jonker, J.W., Suh, J.M., Atkins, A.R., Ahmadian, M., Li, P., Whyte, J., He, M., Juguilon, H., Yin, Y.-Q., Phillips, C.T., et al. (2012). A PPAR γ -FGF1 axis is required for adaptive adipose remodelling and metabolic homeostasis. *Nature* 485, 391–394.

Judge, S., Leeuwenburgh, C., Review, I., Judge, S., and Leeuwenburgh, C. (2007). Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1983-92.

Kaku, K., and Hashiramoto, M. (2011). Thiazolidinediones and bone fractures. *J. Diabetes Investig.* 2, 354–355.

Katarzyna, Z.-R., and Suresh, S. (2016). Autophagic degradation of peroxisomes in mammals. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 431–440.

Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. 22, 407–417.

Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 365–381.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103, 1489–1498.

Kharitonov, A., Dunbar, J.D., Bina, H.A., Bright, S., Moyers, J.S., Zhang, C., Ding, L., Micanovic, R., Mehrbod, S.F., Knierman, M.D., et al. (2008). FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by β Klotho. *J. Cell. Physiol.* 215, 1–7.

Kim, Y.D., Park, K., Lee, Y., Park, Y., Kim, D., Nedumaran, B., Jang, W.G., Cho, W., Ha, J., Lee, I., et al. (2008). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes* 57, 306–314.

- Kirkman, H.N., and Gaetani, G.F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem. Sci.* 32, 44–50.
- Koh, M.Y., and Powis, G. (2012). Passing the baton: The HIF switch. *Trends Biochem. Sci.* 37, 364–372.
- Koo, S.H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Sreaton, R.A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P., et al. (2005). The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437, 1109–1114.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* 114, 1299–1307.
- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., et al. (2005). Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *309*, 481–485.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiisa, T., and Mizushima, N. (2019). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Handb. Famine, Starvation, Nutr. Deprivation* 432, 2083–2101.
- Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., et al. (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45–51.
- Lamia, K.A., Sachdeva, U.M., DiTacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., Vasquez, D.S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R.J., et al. (2009). AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 326, 437–440.
- Lang-Ouellette, D., Richard, T.G., and Morin, P. (2014). Mammalian hibernation and regulation of lipid metabolism: A focus on non-coding RNAs. *Biochem.* 79, 1161–1171.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 122, 3589–3594.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 1713–1719.
- Lee, C., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L., Olefsky, J.M., Gonzalez, F.J., Ham, J., Kang, H., Peters, J.M., et al. (2006). PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Pnas* 103, 3444–3449.
- Lee, J., Choi, J., Scafidi, S., and Wolfgang, M.J. (2016). Hepatic Fatty Acid Oxidation Restrains Systemic Catabolism during Starvation. *Cell Rep.* 16, 201–212.
- Lee, J.M., Seo, W.Y., Song, K.H., Chanda, D., Kim, Y.D., Kim, D.K., Lee, M.W., Ryu, D., Kim, Y.H., Noh, J.R., et al. (2010). AMPK-dependent repression of hepatic gluconeogenesis via disruption of CREB·CRTC2 complex by orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *J. Biol. Chem.* 285, 32182–32191.

Legakis, J.E., Koepke, J.I., Jedeszko, C., Barlaskar, F., Terlecky, L.J., Edwards, H.J., Walton, P.A., and Terlecky, S.R. (2002). Peroxisome Senescence in Human Fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 13, 4243–4255.

Lei, K.J., Chen, H., Pan, C.J., Ward, J.M., Mosinger, B., Lee, E.J., Westphal, H., Mansfield, B.C., and Chou, J.Y. (1996). Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-1a mouse. *Nat. Genet.*

Lennon, H., Sperrin, M., Badrick, E., and Renehan, A.G. (2016). The Obesity Paradox in Cancer: a Review. *Curr. Oncol. Rep.* 18, 1–8.

Leone, T.C., Weinheimer, C.J., and Kelly, D.P. (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7473–7478.

Li, S., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3441–3446.

Li, Y., Huang, T.-T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M., Berger, C., Chan, P.H., et al. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 10, 196–201.

Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.J., et al. (2011). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 13, 376–388.

Li, Y., Chao, X., Yang, L., Lu, Q., Li, T., Ding, W.X., and Ni, H.M. (2018). Impaired Fasting-Induced Adaptive Lipid Droplet Biogenesis in Liver-Specific Atg5-Deficient Mouse Liver Is Mediated by Persistent Nuclear Factor-Like 2 Activation. *Am. J. Pathol.* 188, 1833–1846.

Lin, K., Hsin, H., Libina, N., and Kenyon, C. (2001). Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* 28, 139–145.

Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., and Kenyon, C. (2013). daf-16 : An HNF-3 / forkhead Family Member That Can Function to daf-16 : An HNF-3 / forkhead Family Member That Can Function to Double the Life-Span of *Caenorhabditis elegans*. 1319.

Lindberg, K., Amin, R., Moe, O.W., Hu, M.-C., Erben, R.G., Ostman Wernerson, A., Lanske, B., Olauson, H., and Larsson, T.E. (2014). The Kidney Is the Principal Organ Mediating Klotho Effects. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 2169–2175.

Liu, Y., Zhou, D., Zhang, F., Tu, Y., Xia, Y., Wang, H., Zhou, B., Zhang, Y., Wu, J., Gao, X., et al. (2012). Liver Ptt1 deficiency protects male mice from age-associated but not high-fat diet-induced hepatic steatosis. *J. Lipid Res.* 53, 358–367.

Lodhi, I.J., and Semenkovich, C.F. (2014). Peroxisomes: A nexus for lipid metabolism and cellular signaling.

Cell Metab. 19, 380–392.

Lodhi, I.J., Yin, L., Jensen-Urstad, A.P.L., Funai, K., Coleman, T., Baird, J.H., El Ramahi, M.K., Razani, B., Song, H., Fu-Hsu, F., et al. (2012). Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms thermogenesis and PPAR γ activation to decrease diet-induced obesity. *Cell Metab.* 16, 189–201.

Long, Y.C., and Zierath, J.R. (2006). AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* 116, 1776–1783.

Longo, V.D., and Mattson, M.P. (2014). Fasting: Molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab.* 19, 181–192.

López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153.

Mariño, G., Ugalde, A.P., Salvador-Montoliu, N., Varela, I., Quirós, P.M., Cadiñanos, J., Van der Pluijm, I., Freije, J.M.P., and López-Otín, C. (2008). Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2196–2211.

Martin, B., Pearson, M., Kebejian, L., Golden, E., Keselman, A., Bender, M., Carlson, O., Egan, J., Ladenheim, B., Cadet, J.L., et al. (2007). Sex-dependent metabolic, neuroendocrine, and cognitive responses to dietary energy restriction and excess. *Endocrinology* 148, 4318–4333.

Martinez-Lopez, N., Tarabra, E., Toledo, M., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Coletto, L., Batista-Gonzalez, A., Barzilai, N., Pessin, J.E., Schwartz, G.J., et al. (2017). System-wide Benefits of Intermeal Fasting by Autophagy. *Cell Metab.* 26, 856-871.e5.

Di Marzo, N., Chisci, E., and Giovannoni, R. (2018). The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells* 7, 156.

Matsusue, K., Haluzik, M., Lambert, G., Yim, S.H., Gavrilova, O., Ward, J.M., Brewer, B., Reitman, M.L., and Gonzalez, F.J. (2003). Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J. Clin. Invest.* 111, 737–747.

Mattson, M.P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Res. Rev.* 7, 1–7.

Maughan, R.J., Fallah, J.S., and Coyle, E.F. (2010). The effects of fasting on metabolism and performance. *Br. J. Sports Med.* 44, 490–494.

McDonald, R.B., and Ruhe, R.C. (2011). Aging and longevity: Why knowing the difference is important to nutrition research. *Nutrients* 3, 274–282.

Meidenbauer, J.J., Ta, N., and Seyfried, T.N. (2014). Influence of a ketogenic diet, fish-oil, and calorie restriction on plasma metabolites and lipids in C57BL/6J mice. *Nutr. Metab.* 11, 1–13.

Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., and Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: A focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 61, 4197–

4220.

Mihaylova, M.M., and Shaw, R.J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1016–1023.

Mitchell, S.J., Bernier, M., Mattison, J.A., Aon, M.A., Kaiser, T.A., Anson, R.M., Ikeno, Y., Anderson, R.M., Ingram, D.K., and de Cabo, R. (2019). Daily Fasting Improves Health and Survival in Male Mice Independent of Diet Composition and Calories. *Cell Metab.* *29*, 221–228.e3.

Moon, Y.A., Liang, G., Xie, X., Frank-Kamenetsky, M., Fitzgerald, K., Kotliansky, V., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Horton, J.D. (2012). The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab.* *15*, 240–246.

Mourier, A., Matic, S., Ruzzenente, B., Larsson, N.G., and Milenkovic, D. (2014). The respiratory Chain supercomplex organization is independent of COX7A2L isoforms. *Cell Metab.* *20*, 1069–1075.

Muller, F.L., Song, W., Liu, Y., Chaudhuri, A., Pieke-Dahl, S., Strong, R., Huang, T.T., Epstein, C.J., Roberts, L.J., Csete, M., et al. (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic. Biol. Med.* *40*, 1993–2004.

Muro, E., Atilla-Gokcumen, G.E., and Eggert, U.S. (2014). Lipids in cell biology: how can we understand them better? *Mol. Biol. Cell* *25*, 1819–1823.

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* *417*, 1–13.

Mylonis, I., Sembongi, H., Befani, C., Liakos, P., Siniosoglou, S., and Simos, G. (2012). Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J. Cell Sci.* *125*, 3485–3493.

Narayan, V., Ly, T., Pourkarimi, E., Murillo, A.B., Gartner, A., Lamond, A.I., and Kenyon, C. (2016). Deep Proteome Analysis Identifies Age-Related Processes in *C. elegans*. *Cell Syst.* *3*, 144–159.

Narbonne, P., and Roy, R. (2009). *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. *Nature* *457*, 210–214.

Narkar, V.A., Downes, M., Yu, R.T., Emblar, E., Wang, Y.X., Banayo, E., Mihaylova, M.M., Nelson, M.C., Zou, Y., Juguilon, H., et al. (2008). AMPK and PPARdelta Agonists Are Exercise Mimetics. *Cell* *134*, 405–415.

Nath, B., Levin, I., Csak, T., Petrasek, J., Mueller, C., Kodys, K., Catalano, D., Mandrekar, P., and Szabo, G. (2011). Hepatocyte-specific hypoxia-inducible factor-1 α is a determinant of lipid accumulation and liver injury in alcohol-induced steatosis in mice. *Hepatology* *53*, 1526–1537.

Navarro, C.D.C., Figueira, T.R., Francisco, A., Dal'Bó, G.A., Ronchi, J.A., Rovani, J.C., Escanhoela, C.A.F., Oliveira, H.C.F., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (2017). Redox imbalance due to the loss of mitochondrial NAD(P)-transhydrogenase markedly aggravates high fat diet-induced fatty liver disease in mice. *Free Radic. Biol. Med.* *113*, 190–202.

- Nguyen, S.D., Baes, M., and Van Veldhoven, P.P. (2008). Degradation of very long chain dicarboxylic polyunsaturated fatty acids in mouse hepatocytes, a peroxisomal process. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1781, 400–405.
- Nguyen, T., Nioi, P., and Pickett, C.B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284, 13291–13295.
- Nicholson, A., Reifsnnyder, P.C., Malcolm, R., Lucas, C. a, Grant, R., Zhang, W., Leiter, E.H., and Harbor, B. (2011). Diet induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (Nnt) gene. *Obes. (Silver Spring)* 18, 1902–1905.
- Nickel, A.G., Von Hardenberg, A., Hohl, M., Löffler, J.R., Kohlhaas, M., Becker, J., Reil, J.C., Kazakov, A., Bonnekoh, J., Stadelmaier, M., et al. (2015). Reversal of mitochondrial transhydrogenase causes oxidative stress in heart failure. *Cell Metab.* 22, 472–484.
- Nicolaije, C., Diderich, K.E.M., Botter, S.M., Priemel, M., Waarsing, J.H., Day, J.S., Brandt, R.M.C., Schilling, A.F., Weinans, H., van der Eerden, B.C., et al. (2012). Age-related skeletal dynamics and decrease in bone strength in DNA repair deficient male trichothiodystrophy mice. *PLoS One* 7.
- Noboru Mizushima, Yamamoto, A., Makoto Matsui, T.Y., and Ohsumi, Y. (2003). In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Mol. Biol. Cell* 14, 2876–2889.
- Nonogaki, K., Nozue, K., and Oka, Y. (2007). Social isolation affects the development of obesity and type 2 diabetes in mice. *Endocrinology* 148, 4658–4666.
- Okuno, Y., Matsuda, M., Kobayashi, H., Morita, K., Suzuki, E., Fukuhara, A., Komuro, R., Shimabukuro, M., and Shimomura, I. (2008). Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPARgamma-responsive region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 698–704.
- Oldford, C., Kuksal, N., Gill, R., Young, A., and Mailloux, R.J. (2019). Estimation of the hydrogen peroxide producing capacities of liver and cardiac mitochondria isolated from C57BL/6N and C57BL/6J mice. *Free Radic. Biol. Med.* 135, 15–27.
- Osumi, T., and Hashimoto, T. (1978). Acyl-CoA oxidase of rat liver: A new enzyme for fatty acid oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 479–485.
- Pajvani, U.B., Qiang, L., Kangsamaksin, T., Kitajewski, J., Ginsberg, H.N., and Accili, D. (2013). Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTorc1 stability. *Nat. Med.* 19, 1054–1060.
- Park, H., and Ahima, R.S. (2014). Leptin signaling. *F100Prime Reports* 6.
- Park, S.H., Gammon, S.R., Knippers, J.D., Paulsen, S.R., Rubink, D.S., and Winder, W.W. (2015). Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J. Appl. Physiol.* 92, 2475–2482.

- Partridge, L., and Gems, D. (2002). Mechanisms of ageing: Public or private? *Nat. Rev. Genet.* 3, 165–175.
- Pérez-Estrada, J.R. (2010). Efecto de la reducción en catalasa en el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de ratones alimentados con una dieta rica en grasas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Perez, V.I., Buffenstein, R., Masamsetti, V., Leonard, S., Salmon, A.B., Mele, J., Andziak, B., Yang, T., Edrey, Y., Friguet, B., et al. (2009). Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3059–3064.
- Pérez, V.I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C.J., Vijg, J., and Richardson, A. (2009). The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* 8, 73–75.
- Pérez, V.I., Bokov, A., Remmen, H. Van, Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y., and Richardson, A. (2010). Is the Oxidative Stress Theory of Aging Dead? *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1005–1014.
- Périchon, R., and Bourre, J.M. (1995). Peroxisomal β -oxidation activity and catalase activity during development and aging in mouse liver. *Biochimie* 77, 288–293.
- Périchon, R., Bourre, J.M., Kelly, J.F., and Roth, G.S. (1998). The role of peroxisomes in aging. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 641–652.
- Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., et al. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the sreb pathway. *Cell* 146, 408–420.
- Petriv, O.I., and Rachubinski, R.A. (2004). Lack of Peroxisomal Catalase Causes a Progeric Phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 279, 19996–20001.
- Piao, L., Choi, J., Kwon, G., and Ha, H. (2017). Endogenous catalase delays high-fat diet-induced liver injury in mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 21, 317–325.
- Plum, L., Belgardt, B., and Bruning, J.C. (2006). Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116.
- Ponugoti, B., Kim, D.H., Xiao, Z., Smith, Z., Miao, J., Zang, M., Wu, S.Y., Chiang, C.M., Veenstra, T.D., and Kemper, J.K. (2010). SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 285, 33959–33970.
- Pópulo, H., Lopes, J.M., and Soares, P. (2012). The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 1886–1918.
- Proctor, G., Jiang, T., Iwahashi, M., Wang, Z., Li, J., and Levi, M. (2006). Regulation of renal fatty acid and cholesterol metabolism, inflammation, and fibrosis in Akita and OVE26 mice with type 1 diabetes. *Diabetes* 55, 2502–2509.
- Pyo, J.-O., Yoo, S.-M., Ahn, H.-H., Nah, J., Hong, S.-H., Kam, T.-I., Jung, S., and Jung, Y.-K. (2013). Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat. Commun.* 4, 2300.
-

Qu, A., Taylor, M., Xue, X., Matsubara, T., Metzger, D., Chambon, P., Gonzalez, F.J., and Shah, Y.M. (2011). Hypoxia-inducible transcription factor 2a promotes steatohepatitis through augmenting lipid accumulation, inflammation, and fibrosis. *Hepatology* 54, 472–483.

Raghunath, A., Sundarraj, K., Nagarajan, R., Arfuso, F., Bian, J., Kumar, A.P., Sethi, G., and Perumal, E. (2018). Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biol.* 17, 297–314.

Ran, Q., Liang, H., Ikeno, Y., Qi, W., Prolla, T.A., Roberts, L.J., Wolf, N., Vanremmen, H., and Richardson, A. (2007). Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 932–942.

Reddy, J.K., and Mannaerts, G.P. (1994). Peroxisomal Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 343–370.

Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S.R., Alderson, N.L., Baynes, J.W., Epstein, C.J., Huang, T.-T., et al. (2004). Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol. Genomics* 16, 29–37.

Rhee, S.G. (2013). Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* 31, 53–59.

Del Río, L.A., and López-Huertas, E. (2016). ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant Cell Physiol.* 57, 1364–1376.

Roberts, M.N., Wallace, M.A., Tomilov, A.A., Cortopassi, G.A., Ramsey, J.J., Alberto Lopez-Dominguez, J., Zhou, Z., Marcotte, G.R., Tran, D., Perez, G., et al. (2017). Ketogenic diet extends longevity and healthspan in adult mice. *Cell Metab.*

Rosen, E.D., and MacDougald, O. a (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 885–896.

Rouvinen-Watt, K., Harris, L., Dick, M., Pal, C., Lei, S., Mustonen, A.M., and Nieminen, P. (2012). Role of hepatic de novo lipogenesis in the development of fasting-induced fatty liver in the American mink (*Neovison vison*). *Br. J. Nutr.* 108, 1360–1370.

Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell* 148, 852–871.

Sandalio, L.M., Romero-puertas, C., Luis, A.R., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., and Del Río, L.A. (2013). Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism.

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 26, 1749–1760.

Schmeisser, S., Priebe, S., Groth, M., Monajembashi, S., Hemmerich, P., Guthke, R., Platzer, M., and Ristow, M. (2013). Neuronal ROS signaling rather than AMPK/sirtuin-mediated energy sensing links dietary restriction to lifespan extension. *Mol. Metab.* 2, 92–102.

Schrader, M., and Fahimi, H.D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763, 1755–1766.

Scialò, F., Sriram, A., Fernández-Ayala, D., Gubina, N., Löhmus, M., Nelson, G., Logan, A., Cooper, H.M., Navas, P., Enríquez, J.A., et al. (2016). Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Transport Extend Animal Lifespan. *Cell Metab.* 23, 725–734.

Settembre, C., and Ballabio, A. (2014). Lysosome: Regulator of lipid degradation pathways. *Trends Cell Biol.* 24, 743–750.

Sharma, A.M., and Staels, B. (2007). Review: Peroxisome proliferator-activated receptor γ and adipose tissue - Understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 386–395.

Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 3329–3335.

Sies, H. (2014). Role of Metabolic H₂O₂ Generation. *J. Biol. Chem.* 289, 8735–8741.

Singh, I., Moser, A.E., Goldfischer, S., and Moser, H.W. (1984). Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 4203–4207.

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135.

Solon-Biet, S.M., McMahon, A.C., Ballard, J.W.O., Ruohonen, K., Wu, L.E., Cogger, V.C., Warren, A., Huang, X., Pichaud, N., Melvin, R.G., et al. (2014). The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. *Cell Metab.* 19, 418–430.

Son, S.M., Park, S.J., Lee, H., Siddiqi, F., Lee, J.E., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2019). Leucine Signals to mTORC1 via Its Metabolite Acetyl-Coenzyme A. *Cell Metab.* 29, 192-201.e7.

Sozio, M.S., Lu, C., Zeng, Y., Liangpunsakul, S., and Crabb, D.W. (2011). Activated AMPK inhibits PPAR- α and PPAR- γ transcriptional activity in hepatoma cells. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 301, G739–G747.

Spindler, S.R. (2001). Calorie restriction enhances the expression of key metabolic enzymes associated with protein renewal during aging. *Heal. Aging Funct. Longev.* 296–304.

Stark, R., Ashley, S.E., and Andrews, Z.B. (2013). AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol. Cell. Endocrinol.* 366, 215–223.

Steinbaugh, M.J., Narasimhan, S.D., Robida-Stubbs, S., Moronetti Mazzeo, L.E., Dreyfuss, J.M., Hourihan, J.M., Raghavan, P., Operaña, T.N., Esmailie, R., and Blackwell, T.K. (2015). Lipid-mediated regulation of SKN-1/Nrf in response to germ cell absence. *Elife* 4, 1–30.

- Stenvinkel, P., Jani, A.H., and Johnson, R.J. (2013). Hibernating bears (Ursidae): Metabolic magicians of definite interest for the nephrologist. *Kidney Int.* 83, 207–212.
- Sun, Q., Chen, X., Ma, J., Peng, H., Wang, F., Zha, X., Wang, Y., Jing, Y., Yang, H., Chen, R., et al. (2011). Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4129–4134.
- Takagi, A., Kume, S., Kondo, M., Nakazawa, J., Chin-Kanasaki, M., Araki, H., Araki, S.I., Koya, D., Haneda, M., Chano, T., et al. (2016a). Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation. *Sci. Rep.* 6, 1–9.
- Takagi, A., Kume, S., Kondo, M., Nakazawa, J., Chin-Kanasaki, M., Araki, H., Araki, S.I., Koya, D., Haneda, M., Chano, T., et al. (2016b). Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation. *Sci. Rep.* 6, 1–9.
- Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G.B., and Kondo, S. (2005). Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res.* 65, 3336–3346.
- Tan, C.K., Leuenberger, N., Tan, M.J., Yan, Y.W., Chen, Y., Kambadur, R., Wahli, W., and Tan, N.S. (2011). Smad3 deficiency in mice protects against insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet. *Diabetes* 60, 464–476.
- Tanemura, M., Ohmura, Y., Deguchi, T., Machida, T., Tsukamoto, R., Wada, H., Kobayashi, S., Marubashi, S., Eguchi, H., Ito, T., et al. (2012). Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo. *Am. J. Transplant.* 12, 102–114.
- Tang, Q.-Q. (2016). Lipid metabolism and diseases. *Sci. Bull.* 61, 1471–1472.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2503–2518.
- Terlecky, S.R., Koepke, J.I., and Walton, P.A. (2006). Peroxisomes and Aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1749–1754.
- Titorenko, V.I., and Terlecky, S.R. (2011). Peroxisome Metabolism and Cellular Aging. *Traffic* 12, 252–259.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., and Falkenberg, M. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *429*, 417–423.
- Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169–174.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344.
- Tzamelis, I. (2012). The evolving role of mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 417–419.
- Vainshtein, B.K., Melik-Adamyanyan, W.R., Barynin, V. V., Vagin, A.A., and Grebenko, A.I. (1981). Three-

dimensional structure of the enzyme catalase. *Nature* 293, 411–412.

Voet, D., Voet, J.G., and Pratt, C. (2006). *Fundamentals of Biochemistry* (Wiley).

Vozenilek, A.E., Vetkoetter, M., Green, J.M., Shen, X., Traylor, G., Klein, R.L., Orr, A.W., Woolard, M.D., David, M., and Pathobiology, T. (2018). Absence of Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase in C57BL/6J Mice Exacerbates Experimental Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 255, 98–110.

De Waard, M.C., Van Der Pluijm, I., Zuiderveen Borgesius, N., Comley, L.H., Haasdijk, E.D., Rijkse, Y., Ridwan, Y., Zondag, G., Hoeijmakers, J.H.J., Elgersma, Y., et al. (2010). Age-related motor neuron degeneration in DNA repair-deficient Ercc1 mice. *Acta Neuropathol.* 120, 461–475.

Walczak, R., and Tontonoz, P. (2002). PPAR γ and PPAR δ : expanding roles for PPAR γ in the control of lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 43, 177–186.

Walter, K.M., Schonenberger, M.J., Trotzmüller, M., Horn, M., Elsasser, H.P., Moser, A.B., Lucas, M.S., Schwarz, T., Gerber, P.A., Faust, P.L., et al. (2014). Hif-2 α Promotes degradation of mammalian peroxisomes by selective autophagy. *Cell Metab.* 20, 882–897.

Wanders, R.J.A., Vreken, P., Ferdinandusse, S., Jansen, G.A., Waterham, H.R., Roermund, C.W.T. van, and Grunsvan, E.G. Van (2001). Peroxisomal fatty acid α - and β -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 250–267.

Wanders, R.J.A., Ferdinandusse, S., Brides, P., and Kemp, S. (2010). Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 272–280.

Wang, F., Mullican, S.E., DiSpirito, J.R., Peed, L.C., and Lazar, M.A. (2013a). Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPAR γ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 18656–18661.

Wang, M.C., Rourke, E.J.O., and Ruvkun, G. (2008). Fat Metabolism Links Germline Stem Cells and Longevity in *C. elegans*. *Science* (80-.). 322, 957–960.

Wang, W., Chen, Z., Billiar, T.R., Stang, M.T., and Gao, W. (2013b). The Carboxyl-Terminal Amino Acids Render Pro-Human LC3B Migration Similar to Lipidated LC3B in SDS-PAGE. *PLoS One* 8, 1–14.

Wang, Y.X., Lee, C.H., Tjep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H., and Evans, R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113, 159–170.

Wang, Y.X., Zhang, C.L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., Ham, J., Kang, H., and Evans, R.M. (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *PLoS Biol.* 2.

Werthebach, M., Stewart, F.A., Gahlen, A., Mettler-Altmann, T., Akhtar, I., Maas-Enriquez, K., Droste, A., Eichmann, T.O., Poschmann, G., Stühler, K., et al. (2019). Control of *Drosophila* Growth and Survival by the Lipid Droplet-Associated Protein CG9186/Sturkopf. *Cell Rep.* 27, 3726–3740.

Weydert, C.C.J., and Cullen, J.J. (2009). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione

peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat. Protoc.* 5, 51–66.

Wolf, S., Hainz, N., Beckmann, A., Maack, C., Menger, M.D., Tschernig, T., and Meier, C. (2016). Brain damage resulting from postnatal hypoxic-ischemic brain injury is reduced in C57BL/6J mice as compared to C57BL/6N mice. *Brain Res.* 1650, 224–231.

Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G.D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Curr. Biol.* 13, 2004–2008.

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., and Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2, 21–33.

Xie, M., and 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 Metab.* 16, 322–335.

Xie, K., Neff, F., Markert, A., Rozman, J., Aguilar-Pimentel, J.A., Amarie, O.V., Becker, L., Brommage, R., Garrett, L., Henzel, K.S., et al. (2017). Every-other-day feeding extends lifespan but fails to delay many symptoms of aging in mice. *Nat. Commun.* 8.

Xu, J., Lloyd, D.J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., Vonderfecht, S.N., Hecht, R., Li, L., Lindberg, R. a, et al. (2009). FGF21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure and Improves Insulin Sensitivity in Diet-induced Obese Mice. *Diabetes* 58, 250–259.

Yahagi, N., Katagiri, H., Yamada, T., Matsuzaka, T., Nishi, M., Kubota, M., Kataoka, K., Shikama, A., Masuda, Y., Izumida, Y., et al. (2013). Glycogen shortage during fasting triggers liver–brain–adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. *Nat. Commun.* 4.

Yajima, M., Kerr, K.F., Smith, K., Sutlief, E., Tung, H., Kaeberlein, M., Beyer, R.P., Treuting, P.M., Snyder, J.M., Gillespie, C.H., et al. (2016). Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *Elife* 5, 1–17.

Yamamoto, J., Kamata, S., Miura, A., Nagata, T., Kainuma, R., and Ishii, I. (2015). Differential adaptive responses to 1- or 2-day fasting in various mouse tissues revealed by quantitative PCR analysis. *FEBS Open Bio* 5, 357–368.

Yamazaki, H., Tsuboya, T., Tsuji, K., Dohke, M., and Maguchi, H. (2015). Independent association between improvement of nonalcoholic fatty liver disease and reduced incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 38, 1673–1679.

Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E.S., and Hotamisligil, G.S. (2010). Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 11, 467–478.

Yang, L., Zhang, Y., Wang, S., Zhang, W., and Shi, R. (2014). Decreased liver peroxisomal β -oxidation accompanied by changes in brain fatty acid composition in aged rats. *Neurol. Sci.* 35, 289–293.

- Yecies, J.L., Zhang, H.H., Menon, S., Liu, S., Yecies, D., Lipovsky, A.I., Gorgun, C., Kwiatkowski, D.J., Hotamisligil, G.S., Lee, C.H., et al. (2011). Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* 14, 21–32.
- Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Baehrecke, E.H., and Lenardo, M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4952–4957.
- Zhang, B.B., Zhou, G., and Li, C. (2009a). AMPK: An Emerging Drug Target for Diabetes and the Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* 9, 407–416.
- Zhang, H., Li, Y., Fan, Y., Wu, J., Zhao, B., Guan, Y., Chien, S., and Wang, N. (2008). Klotho is a target gene of PPAR- γ . *Kidney Int.* 74, 732–739.
- Zhang, J., Fu, M., Cui, T., Xiong, C., Xu, K., Zhong, W., Xiao, Y., Floyd, D., Liang, J., Li, E., et al. (2004). Selective disruption of PPAR 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 10703–10708.
- Zhang, Q., Yin, S., Liu, L., Liu, Z., and Cao, W. (2016). Rhein reversal of DNA hypermethylation-associated Klotho suppression ameliorates renal fibrosis in mice. *Sci. Rep.* 6, 1–11.
- Zhang, Y., Goldman, S., Baerga, R., Zhao, Y., Komatsu, M., and Jin, S. (2009b). Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (*atg7*) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19860–19865.
- Zhifeng Yang, and Lifecrypt, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 124–131.
- Zhou, B., Kreuzer, J., Kumsta, C., Wu, L., Kamer, K.J., Cedillo, L., Zhang, Y., Li, S., Kacergis, M.C., Webster, C.M., et al. (2019). Mitochondrial Permeability Uncouples Elevated Autophagy and Lifespan Extension. *Cell* 177, 299-314.e16.
- Zou, W., Rohatgi, N., Chen, T.H.-P., Schilling, J., Abu-Amer, Y., and Teitelbaum, S.L. (2016). PPAR- γ regulates pharmacological but not physiological or pathological osteoclast formation. *Nat. Med.* 22, 1203–1205.
- Zuiderweg, E.R.P., Hightower, L.E., and Gestwicki, J.E. (2017). The remarkable multivalency of the Hsp70 chaperones. *Cell Stress Chaperones* 22, 173–189.