



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del impacto de las dietas altas en glucosa y ácido palmítico en las respuestas fenotípicas y la expresión de factores de transcripción relacionados con genes de longevidad en *C. elegans*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
IBT. Cintia Soltero Echaury

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Juan Miranda Ríos
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Víctor Julián Valdés
Instituto de Fisiología Celular
Dra. Tzvetanka D. Dimitrova Dinkova
Facultad de Química

Ciudad de México. Mayo, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de investigación fue posible gracias a los apoyos recibidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Beca: 925285), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (proyectos: IN205818, IN205221). Además, quiero agradecer al posgrado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo académico que me brindaron durante mi estancia en el posgrado, al Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) y al Instituto Nacional de Pediatría (INP) por permitirme desarrollarme profesionalmente en sus instalaciones, al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM por su apoyo económico en mi asistencia al VII Congreso de la Rama de Transducción de Señales 2019.

Agradecimientos

A todo el personal de la Unidad de Genética de la Nutrición, 4to piso de la Torre de Investigación del INP, especialmente al Dr. Juan Miranda por su tutoría, apoyo y amistad a lo largo del desarrollo de este proyecto, a la QFB Martha Elva Pérez por su paciencia al capacitarme en el laboratorio y su apoyo en el desarrollo de los experimentos, a la MC. Ana Elena Peredo por ser una hermana científica que fue parte fundamental en el desarrollo y planteamiento de este proyecto, su sincera amistad, las risas y los buenos momentos compartidos durante esta etapa, así como con todos los integrantes del laboratorio. Al Sr. Matías y la Sra. Tere por su compromiso con el laboratorio, ya que siempre contaba con los materiales en el momento en que los requería, además de una buena charla.

A la Dra. Tzvetanka Dinkova y el Dr. Julián Valdés quienes fungieron como parte de mi comité tutorial, proporcionándome asesoría y seguimiento en mi trabajo de investigación. A la Dra. Leda Torres por su asesoría en la estandarización y desarrollo de las PCRs.

A mis abuelos Doña Marina y Don Manuel quienes son mis pilares y siempre estuvieron presentes a lo largo de este proceso a pesar de la distancia, a mis changos, a mi mamá y a Rubén por todo su apoyo. A Karlita y Haydee por su amistad durante mi estancia en Cdmx.

Y a todas las personas que promueven el conocimiento científico con especial mención a Alexandra Elbakyan.

A mis viejitos.

“Es crucial que no pares de hacerte preguntas. Hay que ser curioso para mantener este mundo a flote.”

-Albert Einstein

Resumen

Introducción Las dietas altas en glucosa son cada vez más comunes en los países desarrollados, provocando alteraciones en el metabolismo que desencadenan enfermedades como la obesidad y la diabetes, así como la reducción de la longevidad.

C. elegans es un excelente modelo experimental para estudiar las vías de señalización que controlan el almacenamiento y distribución de nutrientes, debido a que es un organismo capaz de proveer una visión integrada de la actividad, absorción de nutrientes, transporte, almacenamiento y utilización de la glucosa y lípidos. La suplementación con glucosa reduce la esperanza de vida de este nematodo por medio de la inhibición de la transcripción de genes de longevidad, sin embargo, poco se ha reportado del impacto de los lípidos en este organismo.

Se ha reportado que los factores de transcripción *daf-16*, *pha-4* y *skn-1*, factores de transcripción relacionados con la longevidad, respuesta a estrés y autofagia, y *alg-1* involucrado en la biogénesis de microRNAs en *Caenorhabditis elegans*, están relacionados con la regulación del tiempo de vida ante diferentes dietas y/o restricción dietaria.

De acuerdo con lo anterior, es de especial interés estudiar el efecto de dietas altas en glucosa y ácido palmítico en la sobrevivencia, talla, contenido lipídico y movilidad en *Caenorhabditis elegans*, así como en los niveles de expresión de mRNAs (*daf-16*, *pha-4*, *skn-1* y *alg-1*) relacionados con la expresión y regulación de genes de longevidad.

Resultados Los gusanos suplementados con ácido palmítico 0.5 mM, glucosa 40 mM y la combinación de estos, mostraron un aumento significativo en la longevidad, además su área y longitud también mostraron un incremento, por otro lado, estas dietas promovieron la acumulación de lípidos en el cuerpo del gusano. Contrario a lo esperado, estas dietas incrementaron la acumulación de mRNA de los genes de longevidad *daf-16* y *alg-1*, no obstante, en los genes *pha-4* y *skn-1* el efecto fue lo contrario, se observó una disminución en su expresión. Adicionalmente, las dietas altas en sacarosa, ácido esteárico y su combinación también tuvieron efectos sobre la expresión de estos genes. Sorprendentemente el ácido esteárico modificó al alza la acumulación de transcritos de estos genes de interés, sin embargo, las dietas altas en sacarosa y combinación provocaron pérdida en dicha acumulación.

Conclusiones Las dietas altas en lípidos y carbohidratos promueven la esperanza de vida, talla, movilidad y almacenamiento lipídico en *C. elegans*, además modifican la acumulación de transcritos de diferentes factores de transcripción que promueven longevidad, los que a su vez modulan diversos procesos como la respuesta a estrés, autofagia, regulación genética y respuesta antioxidante.

Palabras clave: *C. elegans* Longevidad Glucosa Ácido Palmítico Factor de transcripción

Índice

Índice	6
Índice de Figuras	8
Índice de Tablas	9
Lista de Abreviaturas	10
1. Introducción	13
1.1 Dietas altas en glucosa y lípidos	13
1.2 Metabolismo y almacenamiento de la glucosa y lípidos	13
1.3 Vía de señalización de la insulina	15
1.4 Vía de mTOR	16
1.5 Marcadores de envejecimiento	18
1.5.1 Detección de nutrientes	19
1.6 <i>C. elegans</i> como modelo de investigación	20
1.6.1 Vía señalización de la insulina y TOR en <i>C. elegans</i>	22
1.6.2 Factores de transcripción relacionados con genes de longevidad.....	23
1.6.3 Efecto de las dietas altas en glucosa en <i>C. elegans</i>	25
1.6.4 Efecto de las dietas altas en lípidos	27
1.6.4.1 Efecto de las dietas altas en lípidos en <i>C. elegans</i>	28
2. Antecedentes	29
2.1 Longevidad de larvas adultas expuestas a concentraciones crecientes de glucosa	29
2.2 Alteraciones en la talla de gusanos alimentados con glucosa	29
2.3 Perfil de expresión de factores de transcripción en <i>C. elegans</i> sometido a dietas altas en glucosa	30
2.4 Efectos de las dietas altas en ácido palmítico en el nematodo <i>C. elegans</i>	31
3. Justificación	32
4. Hipótesis	33
5. Objetivo general	33
5.1. Objetivos específicos.....	33
6. Estrategia experimental	34
6.1 Objetivo 1	34
6.2 Objetivo 2	34
6.3 Objetivo 3	35
7. Metodología	36
7.1 Cultivo de <i>C. elegans</i>	36
7.2 Sincronización	36

7.3 Cultivo de <i>C. elegans</i> con dietas altas en glucosa y lípidos	36
7.4 Extracción de RNA.....	37
7.5 RT-PCR	38
7.6 PCR en tiempo real (qPCR)	39
7.7 Curvas de longevidad	40
7.8 Determinación del movimiento corporal (body thrashes).....	40
7.9 Determinación de área y longitud	40
7.10 Tinción con rojo oleoso	41
7.11 Análisis bioinformático	41
8. Resultados.....	42
8.1 Ensayos en dietas altas en ácido palmítico y glucosa	42
8.1.1 Curva de supervivencia en dietas altas en ácido palmítico y glucosa	42
8.1.2 Evaluación del movimiento corporal (body thrashes) de gusanos crecidos en dietas altas en ácido palmítico y glucosa	43
8.1.3 Determinación de área y longitud de larvas crecidas en dietas altas en ácido palmítico y glucosa	44
8.1.4 Evaluación de la acumulación de lípidos en gusanos crecidos en dietas altas en ácido palmítico y glucosa.....	45
8.2 Cambios en la expresión de factores de transcripción en dietas altas en ácido palmítico y glucosa	46
8.3 Análisis bioinformático de los cambios en la expresión de factores de transcripción en dietas altas en ácido esteárico y sacarosa	49
9. Discusión	51
9.1 Los gusanos alimentados con glucosa y ácido palmítico aumentan su tiempo de vida	51
9.2 Los tratamientos de ácido palmítico y glucosa disminuyen la pérdida movimiento corporal respecto a la edad	53
9.3 Alteraciones en la talla de gusanos alimentados con ácido palmítico y glucosa	54
9.4 Aumento en el almacenamiento de lípidos en gusanos alimentados con ácido palmítico y glucosa.....	55
9.5 Las dietas altas en ácido palmítico y glucosa modulan la expresión de factores de transcripción relacionados con la longevidad	56
9.6 Las dietas altas en ácido esteárico y sacarosa modulan la expresión de factores de transcripción relacionados con la longevidad	57
10. Conclusiones	58
11. Perspectivas	59
12. Bibliografía.....	60
13. Anexos	66

Índice de Figuras

Figura 1. Metabolismo de la glucosa y lipogénesis.	14
Figura 2. Vía de señalización de la Insulina y su relación con mTOR y AMPK.	16
Figura 3. mTOR actúa como un sensor de nutrientes coordinando las funciones celulares como la proliferación, crecimiento y supervivencia.	17
Fig 4. Marcadores de Envejecimiento (Tomada de López-Otín et al, 2013).....	18
Figura 5. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> (Tomada de WormAtlas).	21
Figura 6. Esquema de la vía de señalización de la insulina y TOR en <i>C. elegans</i>	22
Figura 7. Efecto de condiciones de alta glucosa en la longevidad de <i>C. elegans</i>	26
Figura 8. El ácido palmítico atenúa la señalización de la vía de la insulina a través de varios mecanismos	27
Figura 9. Reducción de la supervivencia en <i>C. elegans</i> con ácidos grasos adicionados en su dieta	28
Figura 10. Curva de longevidad para larvas adultas que fueron expuestas desde la etapa larvaria L1 hasta el final de su ciclo de vida a 20, 40, 80 o 100 mM glucosa.....	29
Figura 11. Longitud y área de gusanos alimentados con glucosa.....	30
Figura 12. Abundancia de mRNA de factores de transcripción de respuesta al estrés en larvas crecidas a diferentes concentraciones de glucosa	31
Figura 13. Estrategia experimental Objetivos 1 y 2.....	34
Figura 14. Estrategia experimental Objetivo 3.	34
Figura 15. Estrategia experimental Objetivo 4.	35
Figura 16. Curva de supervivencia de gusanos WT alimentados con glucosa (40 mM), ácido palmítico (0.5 mM) y combinación.....	42
Figura 17. Movimiento corporal (body thrashes) en medio líquido de gusanos alimentados con ácido palmítico y/o glucosa a los 1, 5 y 10 días de la etapa adulta.....	43
Figura 18. Longitud y área de gusanos alimentados con ácido palmítico y/o glucosa.....	44
Figura 19. Tinción con rojo oleoso de gusanos alimentados con ácido palmítico y/o glucosa.	45
Figura 20. Expresión relativa de genes marcadores de longevidad en gusanos alimentados con ácido palmítico y/o glucosa.	48
Figura 21. Expresión relativa de genes marcadores de longevidad en gusanos alimentados con ácido esteárico y/o sacarosa.....	50
Figura 22. Vías metabólicas lipídicas	52
Figura 23. Porcentaje de ácidos grasos totales, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados	53

Índice de Tablas

Tabla 1. Parámetros de PCR punto final.....	39
Tabla 2. Parámetros de qPCR.	39
Tabla 3. Secuencias de Primers.	68
Tabla 4. Analisis estadístico ensayo de supervivencia.....	69

Lista de Abreviaturas

°C	Grados Celsius.
μl	Microlitro.
μM	Micromolar.
<i>age-1</i>	fosfatidilinositol 3-cinasa.
<i>Akt</i>	RAC-beta serina / treonina-proteína cinasa.
AMP	Adenosín monofosfato.
ATP	Adenosín trifosfato.
cDNA	DNA copia.
<i>cep-1</i>	Factor de transcripción ortólogo de p53.
<i>daf-16</i>	Factor de transcripción formación Dauer anormal DAF-16.
<i>daf-18</i>	Factor de transcripción formación Dauer anormal DAF-18.
<i>daf-2</i>	Gen que codifica el IGF-I en <i>C. elegans</i> .
DEPC	Pirocarbonato de etilo.
DGCR8	Subunidad del complejo microprocesador.
DICER 1	Proteína de la región crítica del síndrome de Di George 8.
Dnasa	Desoxirribonucleasa.
dNTPs	Deoxinucleósido trifosfato.
dsRNA	RNA de doble cadena.
Fmol	Femtomo.
FOXO	Factor de transcripción forkhead box O.
FT	Factor de transcripción.
G	Gramo.
HGD	Dietas altas en glucosa.
HSF-1	Factor de transcripción de choque térmico 1.
IGF	Factor de crecimiento de la insulina.
IGF-I	Factor de crecimiento tipo 1 de la insulina.

IIS	Señalización de insulina / IGF-1.
IRS	Sustrato del receptor de insulina.
L	Litro.
M	Molar.
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno.
miRNA	MicroRNA.
ml	Mililitro.
mRNA	RNA mensajero.
mTOR	Blanco del complejo de rapamicina de mamífero.
N	Normalidad.
Ng	Nanogramo.
NGM	Medio de crecimiento de nematodos.
nM	Nanomolar.
NRF2	Factor nuclear tipo 2.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDK-1	Piruvato deshidrogenasa cinasa 1.
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa.
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-fosfato.
Pre-miRNA	Precursor-microRNA.
Pri-miRNA	MicroRNA primario.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa.
RD	Restricción dietaria
RISC	complejo de silenciamiento inducido por RNA.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNAsa	Ribonucleasa.
ROS	Especies de oxígeno reactivo.
Rpm	Revoluciones por minuto.

RT	Transcriptasa reversa.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
S	Svedberg.
<i>sbp-1</i>	Proteína de unión del elemento regulador de esterol.
SGK-1	Serina/treonina cinasa.
<i>skn-1</i>	Ortólogo de NRF-2.
SREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides.
TMB	Trimetil Bencidina.
TOR	Objetivo de rapamicina.
TORC1	Objetivo del complejo de rapamicina 1.
TORC2	Objetivo del complejo de rapamicina 2.
UTR	Región no traducida.

1. Introducción

1.1 Dietas altas en glucosa y lípidos

Actualmente en países industrializados, predominan las dietas con alto índice glucémico que incluyen una gran proporción de carbohidratos o azúcares procesados, que son fácilmente metabolizados en glucosa, provocando un rápido aumento del nivel de glucosa en la sangre, alterando su homeostasis, influyendo de manera negativa en el desarrollo, fertilidad y longevidad de los organismos (Mondoux et al., 2011).

La glucosa es necesaria para un gran número de reacciones biológicas, sin embargo, dietas ricas en glucosa generan especies reactivas de oxígeno, que pueden causar oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, generando alteraciones celulares tales como ruptura de membranas, cambios en la morfología mitocondrial, alteraciones en la estructura del retículo endoplásmico, entre otras, conduciendo a la muerte celular (Mondoux et al., 2011). Existe evidencia que sugiere que la hiperglucemia y un alto nivel de ácidos grasos promueven el estrés oxidativo y diversas patologías como la diabetes y la obesidad (Mondoux et al., 2011; Mak, 2012).

1.2 Metabolismo y almacenamiento de la glucosa y lípidos

La glucosa ocupa una posición central en el metabolismo, se puede almacenar como glucógeno, también es un precursor de diversas reacciones biosintéticas, a partir de la glucosa se pueden obtener aminoácidos, nucleótidos, coenzimas y ácidos grasos. La glucosa tiene tres destinos principales; puede ser almacenada (glucógeno), puede ser oxidada a piruvato por medio de la glucólisis o puede ser metabolizada por medio de la ruta de las pentosas fosfato (Nelson & Cox, 2011).

Cuando se lleva a cabo la glucólisis se produce piruvato, así como intermediarios metabólicos y energía (ATP), a su vez este piruvato puede ser oxidado, a través de una descarboxilación oxidativa del piruvato formando acetil-CoA un importante precursor de distintas rutas metabólicas como del ciclo del ácido cítrico o también llamado ciclo de Krebs, a partir de este proceso podemos obtener intermediarios metabólicos y energía. Así mismo, el acetil-CoA es un importante precursor en la biosíntesis de ácidos grasos. Debido a lo anterior, cuando se presenta un incremento en la síntesis de citrato y Acetil-CoA, se produce la activación de la biosíntesis de ácidos grasos, siendo esta otra ruta de almacenamiento de glucosa (Figura 1) (Nelson & Cox, 2011).

Los mamíferos poseen la capacidad de almacenar la grasa en forma de triglicéridos en el tejido adiposo, el almacenamiento de energía está regulado estrechamente a través de vías de señalización. Debido a que estas vías de almacenamiento de energía se asocian con el consumo, es importante comprender el proceso de absorción, almacenamiento y distribución de nutrientes (Hashmi et al., 2013).

La obesidad y el sobrepeso son enfermedades no transmisibles que son impulsadas por cambios en la absorción de nutrientes y su distribución. Esta condición aumenta el riesgo de enfermedades crónicas y potencialmente mortales como diabetes y enfermedades cardíacas. Actualmente la obesidad y la diabetes representan los mayores problemas de salud pública a nivel mundial (Hashmi et al., 2013).

El metabolismo de las grasas (almacenamiento y movilización) se relaciona con el desarrollo. Durante el desarrollo reproductivo animal, los lípidos son indispensables durante la ovogénesis y la embriogénesis temprana. Se ha considerado que el almacenamiento de lípidos sirve como conexión entre el desarrollo de tejidos somáticos y la línea germinal, debido a que la movilización de la grasa hacia las células germinales es un paso importante en esta interacción (Weaver et al., 2016)

Se ha reportado que la vía de señalización de la insulina/IGF, el blanco de rapamicina (mTOR) y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), regulan la acumulación y movilización de los lípidos, influyendo en la determinación del estado reproductivo y el mantenimiento del tejido somático con la edad (Templeman & Murphy, 2018; Weaver et al., 2016).

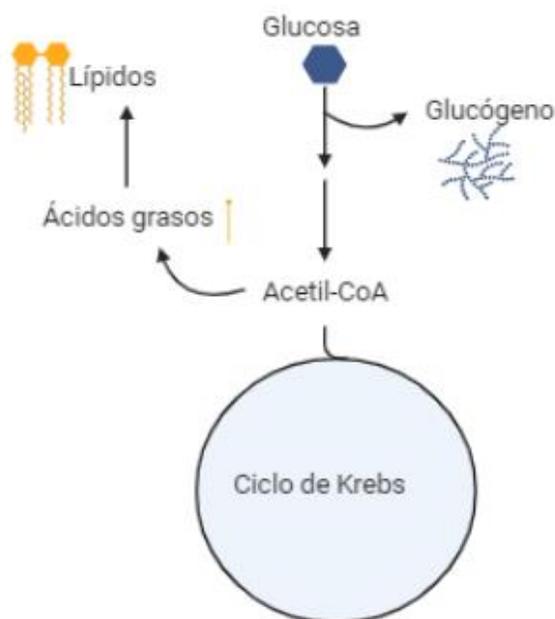


Figura 1. Metabolismo de la glucosa y lipogénesis.

La insulina es una hormona secretada por las células β pancreáticas en respuesta al aumento de las concentraciones de glucosa en la sangre, funciona como un regulador endócrino de la captación, transporte y metabolismo de la glucosa. Un alto nivel de insulina en la sangre promueve el almacenamiento del exceso de glucosa en glucógeno, almacenándolo en el hígado y los músculos (Hashmi et al., 2013).

Por otro lado, un exceso de glucosa en sangre que no se puede almacenar como glucógeno, se convierte en triglicéridos y se almacena en el tejido adiposo. La insulina funciona en una serie de vías de señalización en células musculares y grasa específicas, lo que permite que estas células aumenten su capacidad para absorber glucosa del torrente sanguíneo (Hashmi et al., 2013).

1.3 Vía de señalización de la insulina

La interacción de insulina con su receptor activa la cascada de señalización de esta vía donde la insulina y los receptores del factor de crecimiento tipo 1 de la insulina (IGF-1) fosforilan en un residuo de tirosina a las proteínas IRS (Sustrato del Receptor de Insulina) y éstas promueven el reclutamiento y activación de componentes de la cascada de señalización como la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K)/AKT, RAS/MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos) y las vías de mTOR (Figura 2) (Barbieri et al., 2003).

Se ha identificado la importancia de la vía de la insulina debido a su conexión con funciones de todo el sistema como el crecimiento, reproducción y control del envejecimiento (Barbieri et al., 2003). Estos componentes de la vía de la insulina se encuentran conservados en los metazoos por lo que el estudio de esta vía en el organismo *C. elegans* ha brindado conocimientos importantes sobre la función y regulación de esta vía (Barbieri et al., 2003).

Normalmente en los seres humanos la sensibilidad a la insulina se reduce con el envejecimiento y este es un factor de riesgo asociado a padecer enfermedades como la obesidad y diabetes. Se ha demostrado que los radicales libres juegan un papel clave en el desarrollo de estas enfermedades, por lo que esto sugiere un vínculo genético entre la vía de señalización similar de la insulina, el estrés oxidativo y la longevidad, por lo que es importante el estudio del mecanismo molecular que interrelacione estos tres factores (Barbieri et al., 2003).

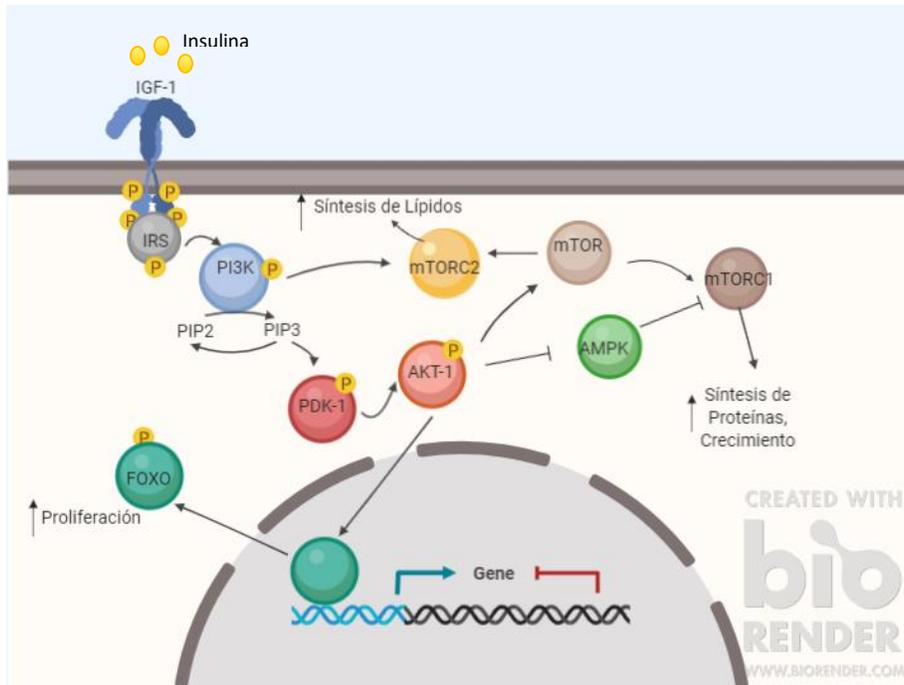


Figura 2. Vía de señalización de la Insulina y su relación con mTOR y AMPK.

1.4 Vía de mTOR

La proteína diana de rapamicina en células de mamíferos (mTOR) es un componente clave del metabolismo celular que integra la detección de nutrientes con los procesos celulares que estimulan el crecimiento y la proliferación celular. La rapamicina es una molécula aislada de *Streptomyces hygroscopicus* que fue descubierta en la isla de Rapa Nui en 1972. Posee propiedades antifúngicas, inmunosupresoras y anticancerígenas, que están mediadas por inhibición de su objetivo (mTOR). En consecuencia, a mTOR se le ha asociado con muchos de los procesos del envejecimiento, incluyendo senescencia celular, respuestas inmunes, regulación de células madre, autofagia, función mitocondrial y homeostasis de proteínas (proteostasis) (Papadopoli et al., 2019).

TOR es una serina / treonina cinasa que se conserva evolutivamente, y se encuentran homólogos en levaduras, nematodos, moscas, plantas y mamíferos. En eucariotas superiores, su producto proteico es un componente de dos complejos distintos: el complejo mTOR 1 (mTORC1) y 2 (mTORC2), que difieren funcionalmente, estructuralmente y en su sensibilidad a la rapamicina. Los dos complejos mTOR comparten los componentes mLST8 y DEPTOR (proteína que interactúa con mTOR que contiene el dominio DEP), mientras que RAPTOR y PRAS40 están presentes exclusivamente en mTORC1. A su vez, se encuentran RICTOR, mSIN1 y Protor-1/2 dentro de mTORC2 (Figura 3) (Papadopoli et al., 2019; Lapierre & Hansen, 2012).

mTORC1 responde a una gran cantidad de estímulos extracelulares e intracelulares, tales como a aminoácidos, hormonas, factores de crecimiento, estrés energético y oxígeno

(Papadopoli et al., 2019). Estos factores inician procesos anabólicos dependientes de mTOR como la síntesis de nucleótidos, lípidos y proteínas, al mismo tiempo inhiben la autofagia, lo que resulta en la estimulación de crecimiento celular y proliferación (Papadopoli et al., 2019; Lapierre & Hansen, 2012). Si bien está claro que al reducir la actividad de TORC1 se promueve la longevidad, algunos estudios han revelado un papel positivo de los componentes TORC1 durante el envejecimiento (Blackwell et al., 2019).

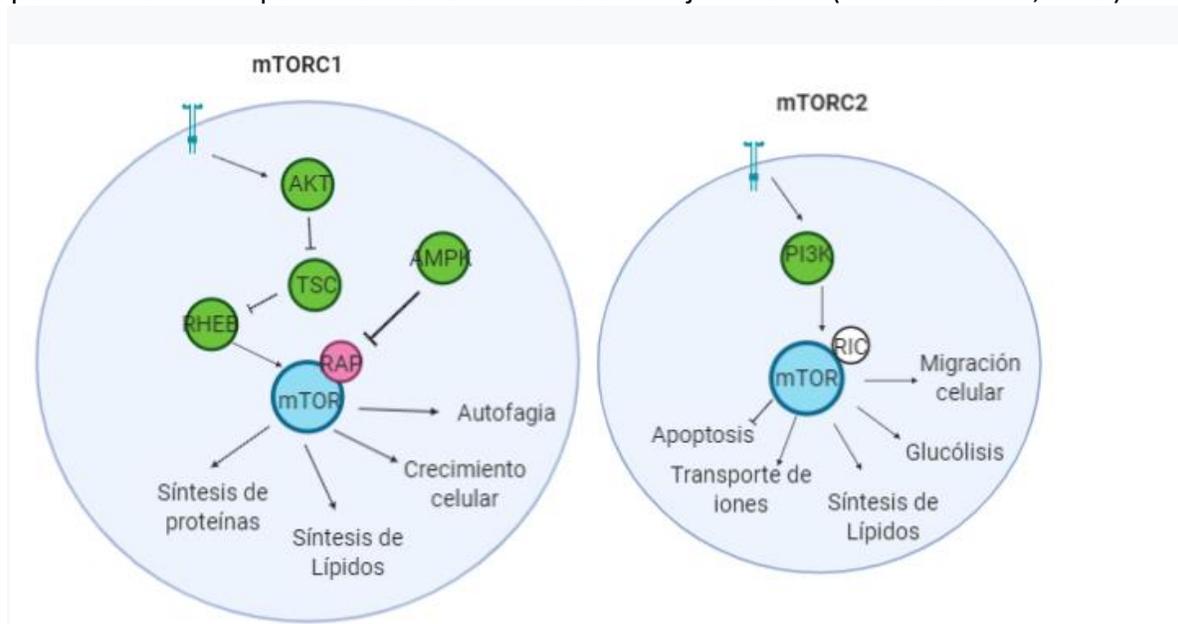


Figura 3. mTOR actúa como un sensor de nutrientes coordinando las funciones celulares como la proliferación, crecimiento y supervivencia.

mTORC2 regula la organización del citoesqueleto y ha sido implicado en la degradación de polipéptidos recién sintetizados. Participa en el metabolismo de la glucosa y los lípidos a través de AKT de manera dependiente e independiente, controla el transporte de iones a través del citoesqueleto y la migración celular a través de la proteína cinasa C alfa (PKC α). En la mayoría de las líneas celulares, mTORC2 es insensible al tratamiento de rapamicina a corto plazo. Se cree que la supresión del eje vía de señalización de la insulina/mTOR es uno de los mecanismos subyacentes de los efectos beneficiosos de la restricción dietaria (RD), que no solo prolonga la vida útil, sino que también retrasa la aparición de patologías relacionadas con la edad (Papadopoli et al., 2019).

Está claro que la vía señalización de insulina/IGF-1 y TOR convergen a nivel de factores de transcripción (DAF-16/FOXO y SKN-1/NRF) en *C. elegans*, sin embargo, esto parece ocurrir a través de mecanismos paralelos (Blackwell et al., 2019).

1.5 Marcadores de envejecimiento

El envejecimiento se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad fisiológica, que conduce a una función deteriorada y mayor vulnerabilidad a la muerte. Este deterioro es el principal factor de riesgo de las principales enfermedades humanas, que incluyen cáncer, diabetes, trastornos cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (López-Otín et al, 2013).

Por mucho tiempo el envejecimiento ha sido considerado como un proceso desregulado. Sin embargo, recientemente se sabe que diversas vías están involucradas en la regulación del proceso de envejecimiento, se ha reportado que estas vías pueden alargar el tiempo de vida en los organismos a través de diferentes mecanismos. (Nakamura & Yoshimori, 2018).

Se han descrito diversos marcadores distintivos del proceso de envejecimiento, dentro de los cuales se consideran los siguientes: inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, detección de nutrientes desregulada, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de las células madre y comunicación intercelular alterada (Figura 4) (López-Otín et al, 2013).

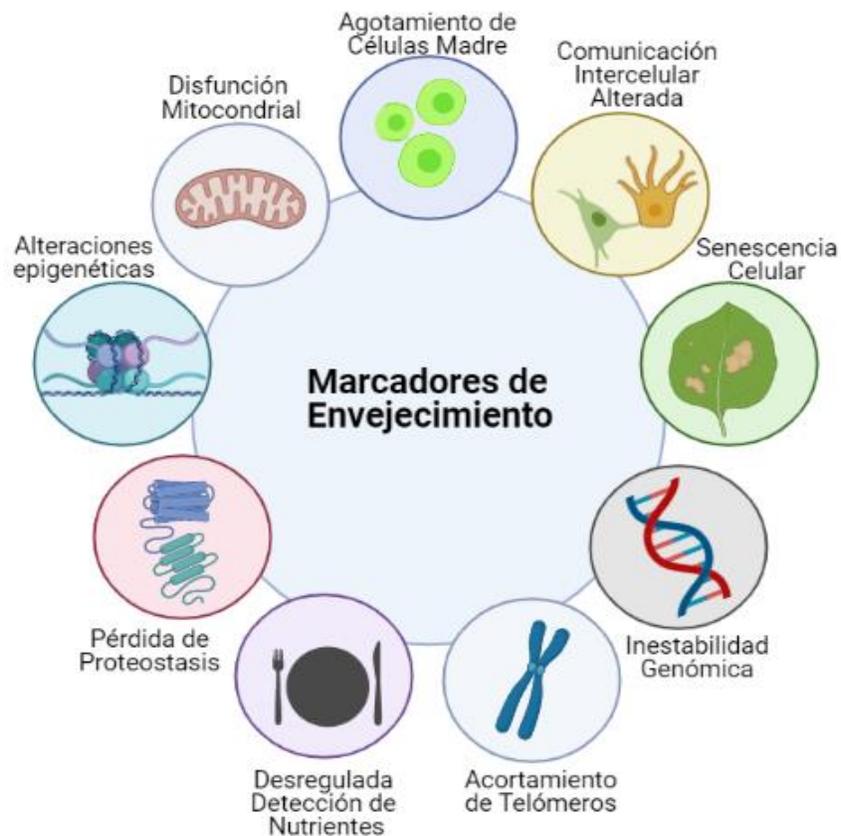


Figura 4. Marcadores de Envejecimiento (Tomada de López-Otín et al, 2013).

Estos marcadores han sido clasificados en tres categorías; marcadores primarios, antagónicos e integradores. Los marcadores primarios siendo invariablemente negativos podrían ser los factores desencadenantes cuyas consecuencias perjudiciales se acumulan progresivamente con el tiempo (daño genómico, pérdida de telómeros, mutaciones del DNA mitocondrial y proteostasis defectuosa) (López-Otín et al, 2013).

Los marcadores antagónicos, siendo en principio beneficiosos, se vuelven progresivamente negativos en un proceso que es parcialmente promovido o acelerado por los marcadores primarios (senescencia celular, producción de ROS, detección de nutrientes y anabolismo) (López-Otín et al, 2013).

Finalmente, los marcadores integradores surgen cuando el daño acumulado causado por los marcadores primarios y antagónicos no puede ser compensado por los mecanismos homeostáticos tisulares (agotamiento de las células madre y la comunicación intercelular alterada) (López-Otín et al, 2013). En el presente trabajo de investigación nos centraremos en la detección de nutrientes como marcador de envejecimiento.

1.5.1 Detección de nutrientes

Los organismos envejecidos fisiológica o patológicamente disminuyen la vía de señalización de la insulina en un intento de extender su vida útil. sin embargo, las respuestas defensivas contra el envejecimiento pueden tener el riesgo de convertirse eventualmente en deletéreas y agravar el envejecimiento. Por lo tanto, niveles extremadamente bajos de señalización de la vía de señalización de la insulina son incompatibles con la vida (Renner & Carnero, 2009).

Múltiples manipulaciones genéticas que atenúan la intensidad de la señalización en diferentes niveles de la vía de señalización de la insulina extienden consistentemente la vida útil de gusanos, moscas y ratones (Fontana et al., 2010). Los análisis genéticos indican que esta vía media parte de los efectos beneficiosos de la restricción dietaria (RD) sobre la longevidad de gusanos y moscas (Fontana et al., 2010). Entre los efectores posteriores de la vía de señalización de la insulina, el más relevante para la longevidad en gusanos y moscas es el factor de transcripción FOXO (Kenyon et al., 1993; Slack et al., 2011).

La regulación a la baja de la actividad de mTORC1 en levaduras, gusanos y moscas extiende la longevidad y atenúa los beneficios de la RD sobre la longevidad (Johnson et al., 2013). Otros dos sensores de nutrientes, AMPK y sirtuinas, actúan en la dirección opuesta a la vía de señalización de la insulina y mTOR, lo que significa que señalan escasez de nutrientes y catabolismo en lugar de abundancia de nutrientes y anabolismo. En consecuencia, su regulación positiva favorece un envejecimiento saludable (Johnson et al., 2013).

La activación de AMPK tiene múltiples efectos sobre el metabolismo y, sorprendentemente, apaga mTORC1 (Alers et al., 2012). En conjunto, la evidencia disponible actual apoya firmemente la idea de que la señalización anabólica acelera el envejecimiento y la disminución de la señalización de nutrientes prolonga la longevidad (Fontana et al., 2010).

1.6 C. elegans como modelo de investigación

Caenorhabditis elegans es un animal formado por 959 células somáticas siendo hermafrodita, es un modelo experimental ideal debido a la gran cantidad de herramientas genéticas, corto tiempo de generación, mantenimiento económico, fácil experimentación y codificación del genoma que contempla homólogos de muchos genes humanos asociados a enfermedades. Por esto, se ha considerado un modelo adecuado para el estudio de la genética de la nutrición y el metabolismo animal (Zecic et al., 2019).

C. elegans pasa a través de 4 etapas larvarias antes de alcanzar la edad adulta: L1, L2, L3 y L4 (Figura 5). Cuando los embriones eclosionan en ausencia de alimento, entran en una diapausa L1, pudiendo sobrevivir durante dos semanas aproximadamente. Si los gusanos L1 son sometidos a inanición, entran a una etapa mediada por la vía de señalización de la insulina llamada Dauer, deteniendo el desarrollo de la larva entre las etapas L1-L2. (Corsi et al., 2015) Durante esta etapa, las larvas no se alimentan ni se mueven, mostrando una frecuencia respiratoria baja, disminuyendo su consumo de ATP y presentando resistencia a condiciones extremas, mostrando que el gusano tiene numerosos mecanismos para alterar su metabolismo, progresión del desarrollo y vida útil en respuesta a diferentes señales, como cambios en su alimentación. Así mismo, dependiendo de la disponibilidad de alimentos, los gusanos alteran sus tasas de alimentación, puesta de huevos y locomoción (García-Segura et al., 2015; Jones & Ashrafi., 2009 & Hashmi et al., 2013).

Caenorhabditis elegans tiene requerimientos nutricionales similares a los de los seres humanos, incluyendo los mismos aminoácidos esenciales y vitaminas, así como respuestas metabólicas evolutivamente conservadas, tales como la de insulina y la vía de señalización mTOR, además se encuentran conservadas las vías del metabolismo de lípidos (lipólisis, β -oxidación, síntesis de ácidos grasos, entre otras) y carbohidratos (glucólisis, síntesis de glucógeno, gluconeogénesis, entre otras) (Zecic et al., 2019). Este organismo ofrece claras ventajas en comparación con los mamíferos para estudios a nivel de regulación metabólica y genética (García-Segura, 2015).

El organismo *Caenorhabditis elegans* ha sido un destacado sistema modelo para nuevos descubrimientos en el desarrollo animal, regulación metabólica, envejecimiento y funciones neuronales (Blackwell et al., 2019).

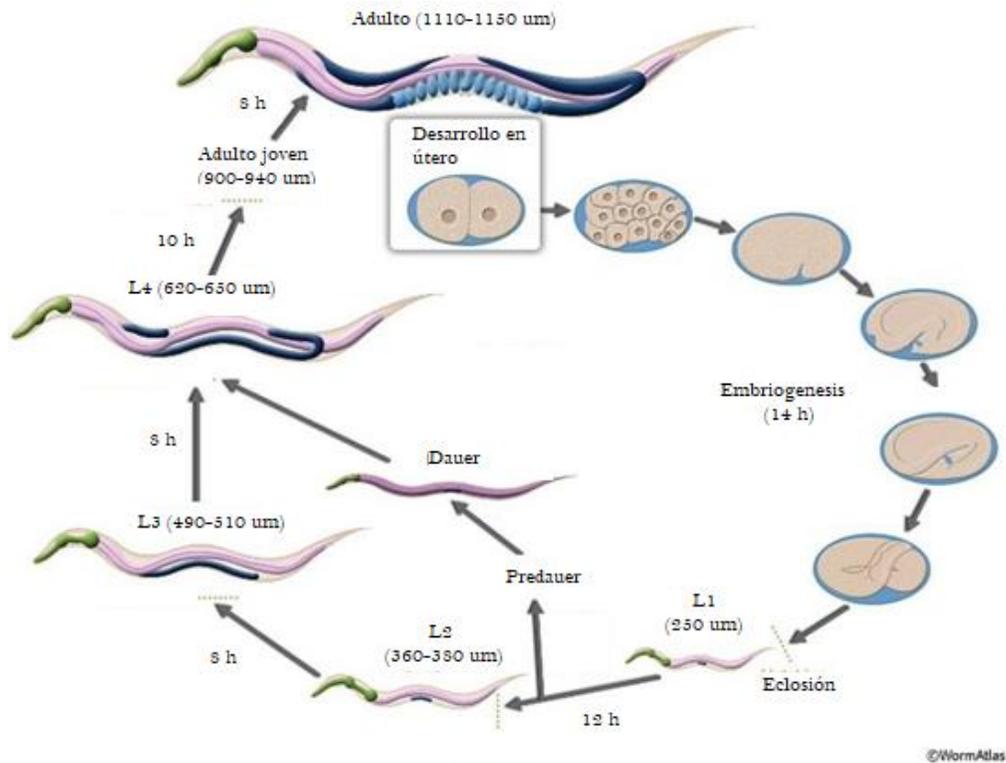


Figura 5. Ciclo de vida de *C. elegans* (Tomada de WormAtlas).

En *C. elegans* el almacenamiento y uso de la grasa, al igual que en mamíferos, depende de vías conservadas como la proteína activada por AMP, la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides (SREBP) y factores de transcripción (Hashmi et al., 2013).

A pesar de que la fisiología del gusano y los mamíferos son muy diferentes, debido a que *C. elegans* carece de tejidos adiposos dedicados, su intestino sirve como el sitio principal para el almacenamiento de grasa, muchos de los componentes reguladores del metabolismo de la grasa, así como reguladores neuronales y endócrinos, presentan funciones conservadas. Debido a esto, este organismo modelo puede ser útil para dilucidar los mecanismos de la regulación del metabolismo de la grasa (Jones et al., 2009, Mak, 2012).

La vía de señalización de la insulina ha sido un área activa de investigación en *C. elegans* debido a su relación con el metabolismo de los lípidos y el envejecimiento (Hashmi et al., 2013).

Similar a los mamíferos, *C. elegans* contiene una amplia gama de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, sin embargo, mientras los mamíferos presentan adipocitos, *C. elegans* almacena la grasa en gotitas en sus células intestinales y en células hipodérmicas. El genoma de este organismo codifica proteínas homólogas con componentes conservados de la síntesis y degradación de carbohidratos y lípidos (Ashrafi, 2007).

Debido a esta compleja interacción entre múltiples tejidos y vías de señalización que requiere el equilibrio energético, es conveniente contar con un organismo capaz de proveer una visión integrada del comportamiento de la alimentación, señalización neuroendocrina, absorción de nutrientes, transporte, almacenamiento y utilización para comprender los mecanismos de regulación de la grasa es por esto por lo que *C. elegans* es un excelente sistema para dilucidar estas complejas vías y su regulación.

1.6.1 Vía señalización de la insulina y TOR en *C. elegans*

En el nematodo *C. elegans*, la vía de señalización de insulina/IGF-I conecta la disponibilidad de nutrientes con el metabolismo, el desarrollo y la longevidad mediante la estimulación de la absorción de glucosa y la conducción de procesos anabólicos (Murphy & Hu, 2013; Lapierre & Hanses, 2012).

La cascada de señalización similar a la insulina se encuentra conformada por proteínas codificadas por los genes *daf-2*, *age-1*, *akt-1*, *akt-2*, *daf-16* y *daf-18*, las funciones de estos genes revelaron que la vía de señalización de la insulina es un regulador central del proceso de envejecimiento (Barbieri et al., 2003). El gen *daf-2* codifica a una proteína similar a la del receptor de insulina/IGF-1, por lo que podría tener un ancestro en común con el receptor de insulina humana (Barbieri et al., 2003).

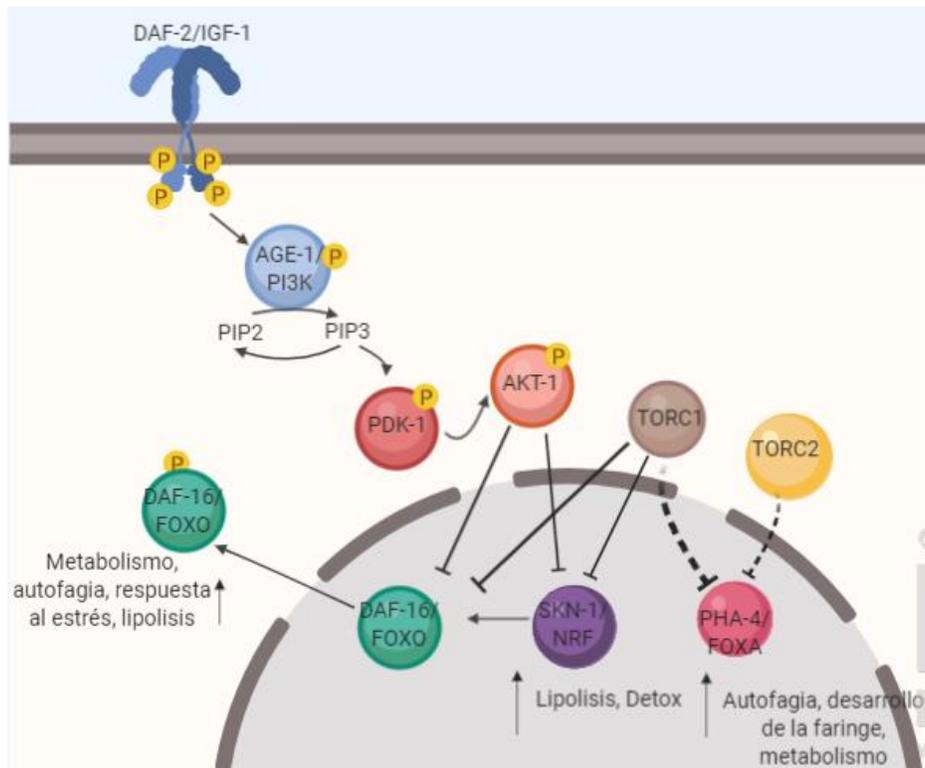


Figura 6. Esquema de la vía de señalización de la insulina y TOR en *C. elegans* (Imagen tomada de Lapierre & Hansen, 2012).

En el gusano (Figura 6), los péptidos similares a la insulina se unen al receptor DAF-2/IGR, reclutando y activando a la proteína fosfoinositol 3-cinasa AGE-1/PI3K. La proteína AGE-1/PI3K promueve la síntesis de fosfatidil inositol trifosfato (PIP3), molécula que activa la cascada de serina/treonina cinasas PDK-1 y AKT-1. AKT-1 realiza la fosforilación del factor de transcripción DAF-16/FOXO, provocando la translocación de este factor desde el núcleo hacia el citosol (Murphy & Hu, 2013). AKT-1/-2 también participan en el secuestro del factor de transcripción SKN-1/NRF2 que responde al estrés oxidativo (Murphy & Hu, 2013). DAF-16/FOXO interactúa con otros factores adicionales en el núcleo, como HSF-1 y SKN-1 (Murphy & Hu, 2013).

La eventual activación del factor de transcripción DAF-16 indica que la vía de señalización de insulina/IGF-I regula el envejecimiento por medio de la modulación de la expresión génica (Barbieri et al., 2003; Smith-Vikos et al., 2014).

La vía de TOR también participa en la regulación de factores de transcripción relacionados con el envejecimiento, el complejo TORC1 bloquea la actividad de DAF-16 por medio de AKT (Lapierre & Hansen, 2012). Además TORC1 y TORC2 inhiben a SKN-1, sin embargo, aún no se tiene claro cuál de los dos complejos regula al factor de transcripción PHA-4 (Lapierre & Hansen, 2012; Smith-Vikos et al., 2014). Por medio de los complejos TOR se inhibe la lipólisis (DAF-16), autofagia (PHA-4) y respuesta al estrés (SKN-1) en *C. elegans*, acelerando el proceso de envejecimiento (Lapierre & Hansen, 2012; Smith-Vikos et al., 2014).

Además, se sabe que DAF-16 promueve la longevidad mediante la regulación de la expresión de enzimas antioxidantes, proteínas antimicrobianas, autofagia, entre otros (Lee et al., 2003; Murphy et al., 2003; Oh et al., 2006; Sun et al., 2017).

1.6.2 Factores de transcripción relacionados con genes de longevidad

daf-16

Daf-16 es un gen presente en *C. elegans*, ortólogo de los genes FOXO1, FOXO3 y FOXO4 en mamíferos, regula los genes implicados en el control del crecimiento, apoptosis, reparación del DNA y estrés oxidativo (Birnenkamp & Coffey, 2003). Por medio de la vía DAF-2/receptor de insulina, DAF-16/FOXO regula la longevidad y el metabolismo en *C. elegans*, *Drosophila* y mamíferos (Finch & Ruvkun, 2001; Blüher et al., 2003), sugiriendo que DAF-16 actúa como un activador y un represor transcripcional, dependiendo del contexto (Wolkow et al., 2000; Lee et al., 2003).

Adicionalmente, funciona como regulador central para múltiples vías de señalización, resultando en la modulación de varios procesos biológicos como el envejecimiento, el desarrollo, el almacenamiento de grasa, la resistencia al estrés, la inmunidad innata y la reproducción. En *C. elegans*, *daf-16* se ha descrito como un regulador central del proceso de envejecimiento (Tissenbaum, 2018).

skn-1

El gen *skn-1* de *Caenorhabditis elegans* codifica para un factor de transcripción ortólogo al factor *Nrf-2* de mamífero y activa una respuesta de desintoxicación, promueve la resistencia al estrés oxidativo y aumenta la longevidad (Tullet et al., 2017).

Se ha reportado que la pérdida de *skn-1* acorta la vida útil y su sobre expresión generalmente aumenta la longevidad (Blackwell et al., 2015; Tang & Choe, 2015).

Por otro lado, se ha reportado que el gen *skn-1* regula transcripcionalmente a genes involucrados con otros procesos, por ejemplo, la autofagia, síntesis de colágeno y la vía de la insulina, procesos involucrados en el desarrollo del animal que podrían estar mediando esta respuesta ante el envejecimiento (Blackwell et al., 2015).

pha-4

En el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el factor de transcripción PHA-4 es ortólogo a la familia de factores de transcripción FOXA en mamíferos (Panowski et al., 2007). Este gen participa en la regulación de la producción del glucagón y la homeostasis de la glucosa, particularmente en el ayuno (Panowski et al., 2007). Con pérdida de actividad de *pha-4* se ha observado que el aumento en la longevidad en los gusanos sometidos a la restricción dietaria es suprimida, esto sugiere que *pha-4* es un gen esencial para mediar la longevidad por restricción dietaria (Panowski et al., 2007). Adicional a esto, se ha encontrado un aumento significativo en la expresión de *pha-4* en condiciones de restricción dietaria (Panowski et al., 2007).

En gusanos mutantes de *daf-16* con *pha-4* sobreexpresado, se observó un aumento en la longevidad de estos gusanos respecto a mutantes *daf-16* sin sobreexpresión de *pha-4*, esto sugiere que la regulación de la longevidad por *pha-4* es independiente a *daf-16*, podría ser incluso que ambos genes presenten actividad redundante debido a que comparten genes blancos como es el caso de la familia de genes *sod-1* y *sod-5* (Panowski et al., 2007).

Además, se ha reportado que *pha-4* se une a la región promotora de *unc-51/ulk1*, *bec1/becn1*, *lgg-1/LC3* dichos genes participan en la etapa temprana de la formación de autofagosomas, regulando positivamente a estos genes y activando la autofagia (Nakamura & Yoshimori, 2018). *Pha-4* es necesario para regular la longevidad mediante la inhibición de mTOR y la restricción de calorías, activando el proceso de la autofagia (Nakamura & Yoshimori, 2018).

alg-1

Los microRNAs (miRNA) son fragmentos cortos de RNA de una sola cadena con acción reguladora, se unen a la región 3' no traducida (UTR) de los RNA mensajeros, modulando la expresión de genes importantes (Smith-Vikos et al, 2014). El miRNA de cadena sencilla se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (Pandit et al., 2014). La proteína Argonauta forma parte del complejo RISC, es una proteína fundamental para el funcionamiento de los miRNAs como reguladores (Smith-Vikos et al, 2014; Pandit et al., 2014 & Lynn, 2009).

En *C. elegans* se han encontrado 25 diferentes AGOs, sin embargo, solamente tres parecen estar involucrados con la biogénesis de miRNAs (*alg-1*, *alg-2* y *alg-5*), *alg-1* y *alg-2* se expresan ampliamente y se unen a la mayoría de los miRNAs, mientras que *alg-5* está restringido a la línea germinal y se asocia con un pequeño grupo de miRNAs (Brown et al., 2017; Vásquez-Rifo et al., 2012).

Se ha observado que en mutantes de *alg-1* se presenta desregulación en la biogénesis de miRNAs, por lo que al parecer este gen es el principal AGO relacionado con esta vía (Zinovyeva et al., 2014; Zisoulis et al., 2010). Además, se ha observado que la actividad de miRNAs también es importante para la viabilidad del gusano adulto, se ha demostrado que el agotamiento de *alg-1* reduce el tiempo de vida de los gusanos adultos (Kato et al., 2011; Samuelson et al., 2007).

El aumento del tiempo de vida en la *mutante daf-2* que es dependiente de *daf-16*, se redujo significativamente en mutantes *alg-1*, concluyendo que *alg-1* promueve la longevidad. Además, ellos encontraron que la pérdida de *alg-1* provoca una disminución en la residencia nuclear de *daf-16*, disminuyendo a su vez la expresión de los principales genes blanco de este gen, sugiriendo que *alg-1* podría estar regulando a *daf-16* y promoviendo el aumento en la longevidad de los mutantes *daf-2* (Aalto et al., 2018).

1.6.3 Efecto de las dietas altas en glucosa en *C. elegans*

El nematodo *C. elegans*, ha sido utilizado en estudios de toxicidad inducida por glucosa. Se ha documentado que las dietas altas en glucosa afectan al crecimiento, fertilidad y longevidad de este organismo (Alcantar-Fernández et al., 2018).

Schlotterer y colaboradores (2009), reportaron que altas concentraciones de glucosa reducen la longevidad de *C. elegans* (Figura 7), debido a que, en condiciones de alto contenido de glucosa, la vida media se redujo un 10% y la vida máxima se redujo igualmente un 10%, concluyendo que las condiciones de alta glucosa dan como resultado un aumento constante en la formación de ROS y una reducción significativa en la longevidad (Schlotterer et al., 2009).

Igualmente, Choi en el 2011, reportó que las dietas altas en glucosa inducen la apoptosis, disminuyendo la longevidad de los gusanos y pérdida en la locomoción. Choi realizó un estudio con gusanos adultos, agregando 10 mg/L (55uM) de D-glucosa en el alimento de los gusanos. A los 10 días de adulto, se observó que solo el 60% de estos animales sobrevivieron, en comparación con el grupo control el cual presentaba un 90% de viabilidad, por lo que se concluyó que la glucosa actúa como un agente promotor del envejecimiento (Choi, 2011).

Se ha reportado que la suplementación con glucosa reduce la longevidad por medio de la inhibición de la transcripción de genes de longevidad mediada por DAF-16/FOXO (Lapierre & Hansen, 2012).

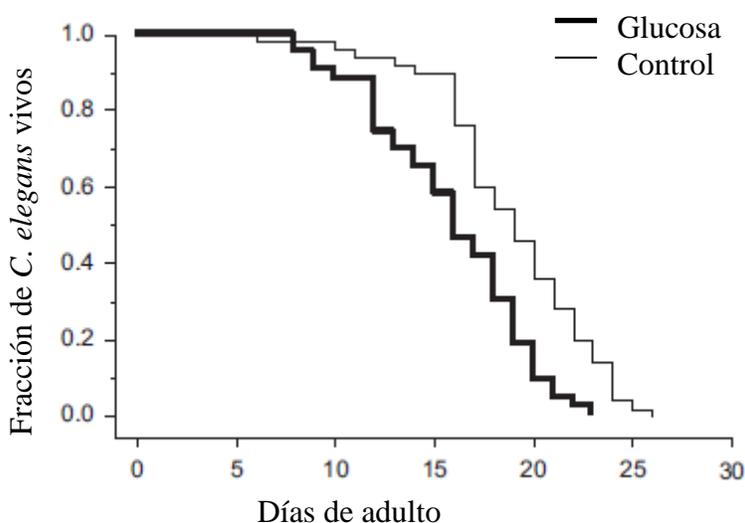


Figura 7. Efecto de condiciones de alta glucosa en la longevidad de *C. elegans* (Tomada de Schlotterer et al., 2009).

Por otro lado, Seo y colaboradores reportaron que los gusanos alimentados con glucosa al 2% (111 mM) presentan una disminución aumentada en la tasa de movimientos corporales en medio líquido, con respecto a los gusanos control. Así mismo, se observa que, a mayor envejecimiento del gusano, mayor es la pérdida del movimiento corporal (Seo et al., 2018).

De acuerdo con lo anteriormente reportado, se ha establecido que una disminución de la longevidad de los gusanos alimentados con glucosa es ocasionada en parte a la activación de la vía de señalización de insulina/IGF-1.

1.6.4 Efecto de las dietas altas en lípidos

Se ha revelado una adaptación metabólica provocada por una elevada tasa de ácidos grasos, esto implica un cambio en el equilibrio entre la glucólisis, la fosforilación oxidativa y la respuesta inmune, vinculando las dietas ricas en lípidos con la enfermedad inflamatoria sistémica. Las dietas occidentales son ricas en ácido palmítico, el ácido graso más común en animales y plantas (Palomer et al., 2018).

El ácido palmítico es una de las grasas más abundantes en el plasma. Se han descrito tres mecanismos principales en la resistencia a la insulina mediada por ácido palmítico en cultivos celulares de mamíferos:

1. Aumento de la síntesis de lípidos complejos nocivos.
2. Función deteriorada de orgánulos celulares.
3. Inflamación mediada por receptor.

El aumento de los niveles intracelulares de ácido palmítico supera su oxidación mitocondrial y es convertido en lípidos complejos como el diacilglicerol (DAG) y ceramidas (Palomer et al., 2018).

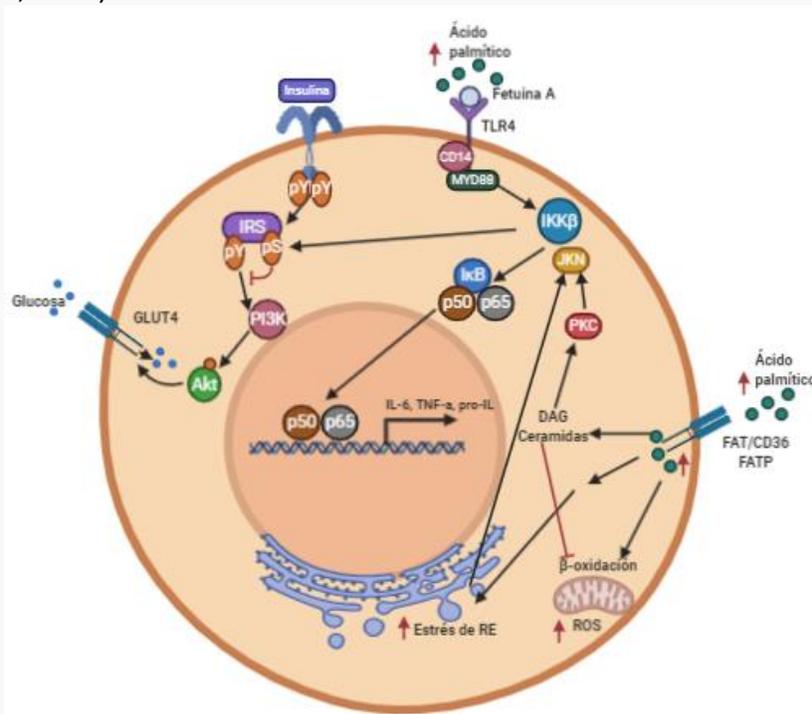


Figura 8. El ácido palmítico atenúa la señalización de la vía de la insulina a través de varios mecanismos (Palomer et al., 2018).

El aumento en el contenido intracelular de DAG causado por la exposición a altos niveles de ácido palmítico activa nuevas isoformas de la proteína cinasa C (PKC), como la PKC α en el músculo esquelético y PKC ϵ en el hígado, lo que finalmente atenúa la vía de señalización de insulina por fosforilación de residuos de serina en el sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1). PKC y PKC α , también pueden activar la cascada de señalización proinflamatoria. El aumento de la síntesis de ceramidas conduce a la resistencia a la

insulina a través de varios mecanismos, incluida la inhibición de Akt, las ceramidas también inducen estrés de retículo endoplásmico, inhibe la oxidación mitocondrial de ácidos grasos (Palomer et al., 2018).

La disfunción mitocondrial puede dar lugar a una capacidad oxidativa reducida que promueve la acumulación intracelular de lípidos complejos que activan vías que interfieren con la señalización de insulina e incrementan el estrés oxidativo. Así mismo, el ácido palmítico puede activar vías proinflamatorias a través de receptores de membrana como Toll-like receptor 4 (TLR4), a través de fetuína A, una proteína adaptadora que media la interacción entre ácidos grasos y TLR4. Poco se ha descrito sobre el efecto que tienen las dietas altas en ácido palmítico sobre *C. elegans* (Figura 8) (Palomer et al., 2018).

1.6.4.1 Efecto de las dietas altas en lípidos en *C. elegans*

En concordancia con lo descrito en mamíferos, Shmookleer y colaboradores, reportaron en 2011 que gusanos *C. elegans* N2 adultos que fueron alimentados con ácido palmítico (47 μ M) mostraron una reducción en su longevidad en comparación con los gusanos control (Figura 9) (Shmookleer et al., 2011).

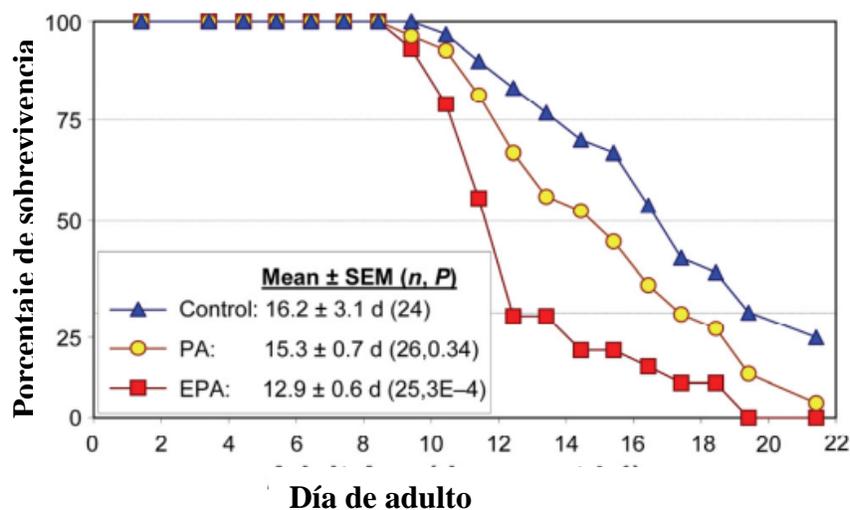


Figura 9. Reducción de la supervivencia en *C. elegans* con ácidos grasos adicionados en su dieta (imagen tomada de Shmookler et al, 2011).

El estudio del impacto de las dietas altas en ácido palmítico sobre el desarrollo y longevidad es un campo de investigación poco explorado que representa una gran oportunidad para el descubrimiento y desarrollo de futuras terapias contra patologías relacionadas con estas dietas.

2. Antecedentes

2.1 Longevidad de larvas adultas expuestas a concentraciones crecientes de glucosa

En el laboratorio del Dr. Juan Miranda recientemente se realizó un estudio sometiendo a *C. elegans* a dietas altas en glucosa, en dicho estudio se encontró que los altos niveles de acumulación de glucosa en el organismo promueven lipogénesis ya que se encontró un aumento en la reserva de triglicéridos. Estos gusanos alimentados con dietas altas en glucosa eran más grandes y gruesos en comparación con los controles (ausencia de glucosa). Igualmente se observó una reducción en la cantidad de huevos puestos, signos de envejecimiento acelerado y aumento en la lipoperoxidación en gusanos expuestos a glucosa. Dichos gusanos mostraron una longevidad disminuida dosis dependiente, siendo la concentración de 100 mM altamente tóxica para estos organismos, debido a que disminuyó la longevidad de los gusanos alrededor del 50% (Figura 10) (Alcántar-Fernández et al., 2018).

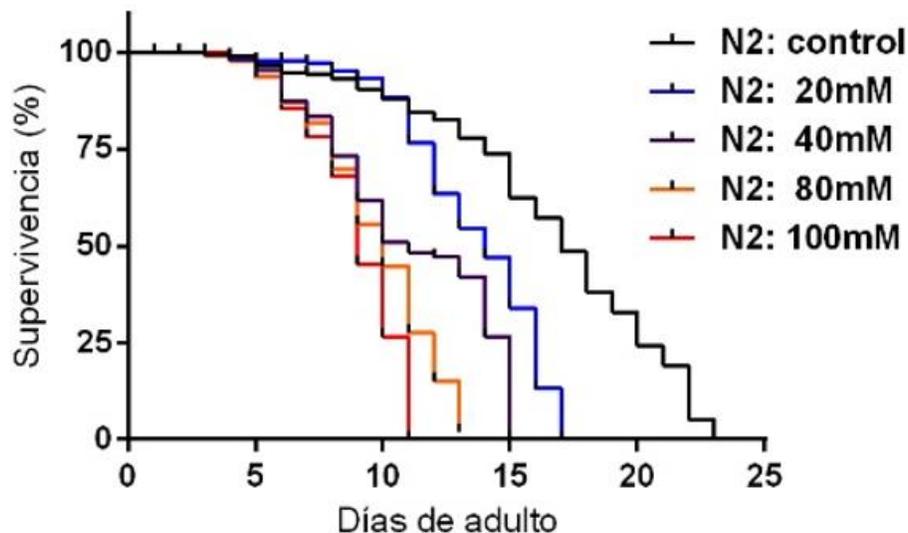


Figura 10. Curva de longevidad para larvas adultas que fueron expuestas desde la etapa larvaria L1 hasta el final de su ciclo de vida a 20, 40, 80 o 100 mM glucosa (Tomada de Alcántar-Fernández et al., 2018).

2.2 Alteraciones en la talla de gusanos alimentados con glucosa

Particularmente en *C. elegans* se ha documentado que la alimentación, así como, el ayuno son factores importantes que influyen en la talla (García-Segura et al., 2015; Alcántar-Fernández et al., 2018). Se ha reportado que se induce un aumento de talla en gusanos alimentados con glucosa a 20-100 mM (figura 11) (Alcántar-Fernández et al., 2018), por

otro lado, no se han encontrado reportes de alteraciones en la talla por ácido palmítico en el nematodo.

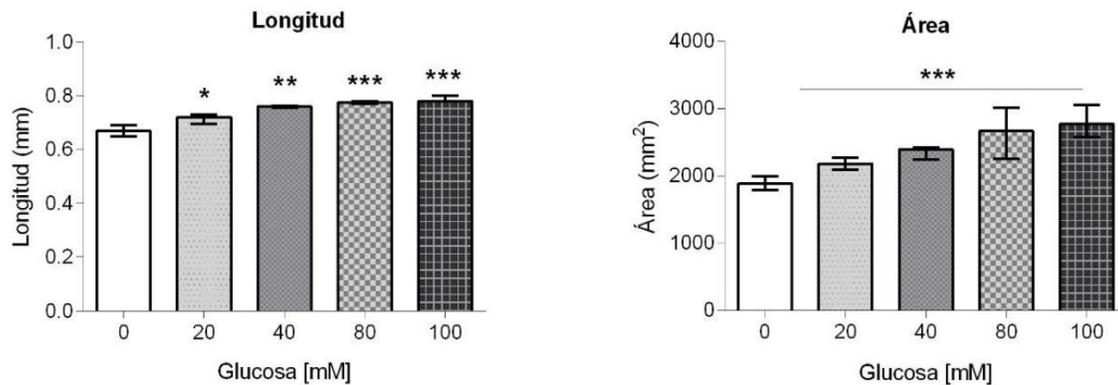
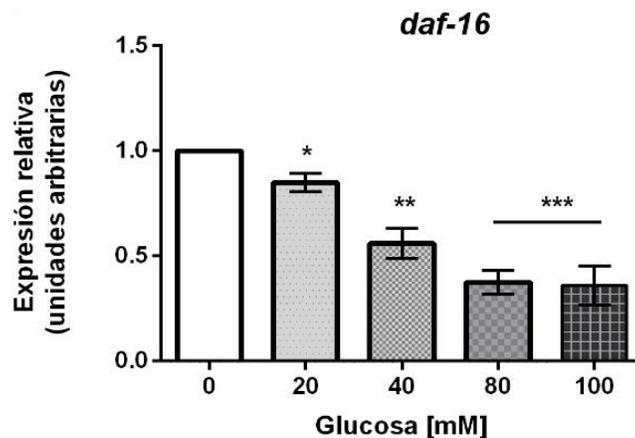


Figura 11. Longitud y área de gusanos alimentados con glucosa (Imagen tomada de Alcántar-Fernández et al., 2018).

2.3 Perfil de expresión de factores de transcripción en *C. elegans* sometido a dietas altas en glucosa

Se realizó un análisis de la acumulación de mRNAs de algunos factores de transcripción relacionados con el metabolismo y la longevidad en gusanos crecidos hasta el estadio L4 en concentraciones crecientes de glucosa (0, 20, 40, 80 y 100 mM). Se encontró que para *skn-1/NRF2* y *daf-16/FOXO*, la acumulación de RNA disminuyó en los gusanos alimentados con glucosa de una manera dependiente de la dosis (Alcántar-Fernández et al., 2018).



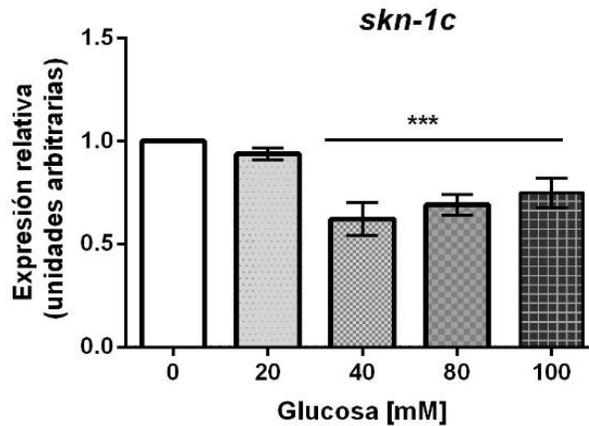


Figura 12. Abundancia de mRNA de factores de transcripción de respuesta al estrés en larvas crecidas a diferentes concentraciones de glucosa (Tomada de Alcántar-Fernández et al., 2018).

2.4 Efectos de las dietas altas en ácido palmítico en el nematodo *C. elegans*

En el laboratorio, se realizaron diversos análisis fenotípicos del impacto que tienen las dietas altas en ácido palmítico a concentraciones crecientes (0.25, 0.5 y 1.0 mM) (resultados no publicados). En gusanos adultos sometidos a estas dietas altas, se observó que en la concentración de 0.5 mM la sobrevivencia de los gusanos adultos se vio mejorada por un 53%.

La pérdida de movimiento corporal respecto a la edad resultó ser menor en los gusanos con tratamiento en comparación con los gusanos control, debido a que los gusanos crecidos en 0.5 mM de ácido palmítico mostraron una tasa de 75 movimientos/minuto al día 10 de adultos.

Además, se midió la longitud y el área de gusanos L4 crecidos en 0.5 mM de ácido palmítico, y se observó que los gusanos son más largos y anchos (con un promedio de 0.6 mm de longitud y 0.02 mm² de área) respecto a los gusanos control.

3. Justificación

Las dietas altas en glucosa son cada vez más comunes en los países desarrollados, provocando alteraciones en el metabolismo que desencadenan enfermedades como la obesidad y la diabetes, así como la reducción de la longevidad (Mondoux et al., 2011; Mak, 2012).

El estudio de las vías de señalización que controlan el almacenamiento y distribución de la glucosa y lípidos podría ayudar a conocer las alteraciones que se presentan en estas patologías (Templeman & Murphy, 2018; Weaver et al., 2016).

C. elegans es un excelente sistema para dilucidar estas complejas vías y su regulación, debido a que es un organismo capaz de proveer una visión integrada del comportamiento de la alimentación, absorción de nutrientes, transporte, almacenamiento y utilización de la glucosa y lípidos (Zecic et al., 2019). La suplementación con glucosa reduce la esperanza de vida de este nematodo por medio de la inhibición de la transcripción de genes de longevidad, sin embargo, poco se ha reportado del impacto de los lípidos en este organismo (Schlotterer et al., 2009, Choi, 2011)

Se ha reportado que los factores de transcripción *daf-16*, *pha-4* y *skn-1*, factores de transcripción relacionados con la longevidad, respuesta a estrés y autofagia, y *alg-1* participante en la biogénesis de microRNAs en *Caenorhabditis elegans*, están relacionados con la regulación de la longevidad ante diferentes dietas y/o restricción dietaria (Panowski et al., 2007; Aalto et al., 2018; Nakamura & Yoshimori, 2018; Blackwell et al., 2015; Tang & Choe, 2015; Finch & Ruvkun, 2001; Bluher et al., 2003)

De acuerdo con lo anterior, consideramos que es de especial interés conocer la respuesta fenotípica de *C. elegans* ante dietas altas en glucosa y ácido palmítico, así como identificar los cambios producidos por está en la expresión de estos factores de transcripción relacionados con la longevidad.

4. Hipótesis

- Las dietas con alto contenido en glucosa y ácido palmítico disminuirán la sobrevivencia y la calidad de vida del nematodo, afectando la expresión de *daf-16*, *pha-4*, *skn-1* y *alg-1*.

5. Objetivo general

- Estudiar el efecto de dietas altas en glucosa y ácido palmítico en la sobrevivencia, talla, contenido lipídico y movilidad en *Caenorhabditis elegans*, así como en los niveles de expresión de los mRNAs *daf-16*, *pha-4*, *skn-1* y *alg-1* relacionados con la expresión y regulación de genes de longevidad.

5.1. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de las dietas altas en glucosa y ácido palmítico sobre la sobrevivencia, talla, contenido lipídico y movilidad de las larvas.
2. Medir los niveles de expresión de mRNA de factores de transcripción relacionados con genes de longevidad (*skn-1*, *daf-16*, *pha-4* y *alg-1*).
3. Evaluar el efecto de otras dietas altas en carbohidratos y ácidos grasos sobre la expresión de los factores de transcripción de interés.

6. Estrategia experimental

6.1 Objetivo 1

1. Evaluar el efecto de las dietas altas en glucosa y ácido palmítico sobre la sobrevivencia, talla, contenido lipídico y movilidad de las larvas.

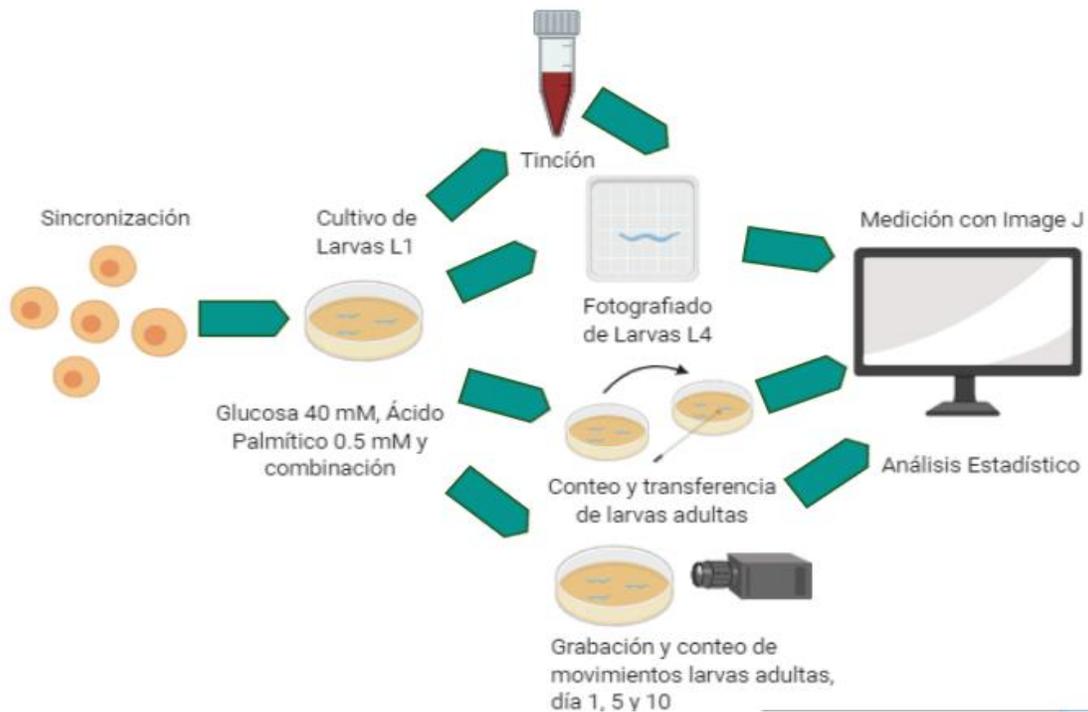


Figura 13. Estrategia experimental Objetivo 1.

6.2 Objetivo 2

2. Medir los niveles de expresión de mRNA de factores de transcripción relacionados con genes de longevidad (*skn-1*, *daf-16*, *pha-4* y *alg-1*).



Figura 14. Estrategia experimental Objetivo 2.

6.3 Objetivo 3

3. Evaluar el efecto de otras dietas altas en carbohidratos y ácidos grasos sobre la expresión de los factores de transcripción de interés.

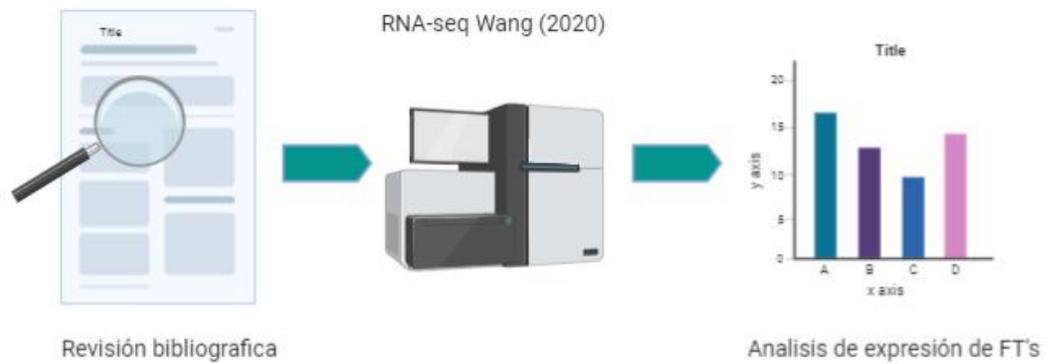


Figura 15. Estrategia experimental Objetivo 3.

7. Metodología

7.1 Cultivo de *C. elegans*

Los nematodos *C. elegans* de la cepa N2 se crecieron en cajas con medio de crecimiento de nematodos (NGM), a 18°C, fueron alimentados con *E. coli* OP50 y colesterol, se dejaron crecer hasta que los gusanos se encontraron grávidos, es decir, cuando la primera puesta de huevecillos había eclosionado.

7.2 Sincronización

A partir de nemátodos grávidos, los gusanos se separaron por tamaños, lavando las cajas de cultivo dos veces con 2 ml de buffer M9 el cual se recuperó en un tubo estéril, se dejó sedimentar a los gusanos grávidos, se retiró el sobrenadante, y se lavaron tres veces más con buffer M9.

Se retiró todo el M9 posible y se agregaron 2 ml de mezcla de lisis; se agitó en vortex por 30 segundos y se centrifugó a 8000 rpm. En este paso el botón de gusanos se tornó de color amarillo, se retiró el sobrenadante y se repitió el lavado, hasta que se obtuvo un botón blanco que contenía sólo los huevecillos, éste se lavó por lo menos 3 veces con buffer M9, hasta verificar que ya no hubiera presencia de cloro, transfiriendo el sobrenadante del último lavado a otro tubo y agregándole unas gotas de Trimetil Bencidina (TMB); si éste permanecía transparente indicaba ausencia de cloro, si se tornaba azul o amarillo era necesario hacer más lavados.

Los huevecillos se resuspendieron en 10 ml de buffer M9, se dejaron en agitación a 900 rpm durante toda la noche para su eclosión. Al día siguiente se observó al microscopio para confirmar la eclosión de los huevecillos, una vez confirmada, se prosiguió a centrifugarlos a 3600 rpm y retirar el sobrenadante.

7.3 Cultivo de *C. elegans* con dietas altas en glucosa y lípidos

Una vez que los huevecillos eclosionaron a larvas L1, se continuó con el sembrado en cajas con condiciones de estudio. A partir del medio de crecimiento de nematodos, se agregaron las siguientes condiciones experimentales: Control (medio NGM), Ácido palmítico (0.5 mM), Glucosa (40 mM) y combinación (Palmítico 0.5 mM + Glucosa 40 mM).

Los gusanos se dejaron crecer en el medio de cultivo condicionado hasta la etapa L4, después se realizaron 3 lavados con 2 ml de M9 en la caja de Petri, para recuperar los gusanos del medio, se dejaron precipitar en un tubo estéril y se realizaron 3 lavados posteriores con 1 ml de buffer M9 cada uno.

Después se centrifugaron a 3600 rpm y se retiró el buffer M9 excedente. Finalmente, los tubos se sumergieron en nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C. En el caso de las

muestras con ácido palmítico o glucosa + ácido palmítico, se realizó 1 o 2 lavados con tween al 0.1% en buffer M9 con agitación a 300 rpm durante un minuto, posterior a esto, se realizaron nuevamente 3 lavados con buffer M9.

7.4 Extracción de RNA

El RNA total se purificó a partir de gusanos cultivados en todas las condiciones probadas usando Trizol (Invitrogen™, 15596026), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se purificó adicionalmente usando el kit RNeasy MinElute Cleanup KIT (Cat. No. 74204). El RNA obtenido fue disuelto en agua libre de nucleasas (DEPC).

La integridad del RNA se verificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en el cual se observaron las bandas de rRNA 5S y 18S presentes en cada una de las muestras obtenidas, adicionalmente el RNA se cuantificó por medio de espectroscopia UV/VIS en el equipo Nanodrop ND1000 y la pureza del RNA se midió por medio de la relación de absorbancia 260/230 y 260/280 cuidando que la relación se encontrara entre 1.9-2.1. Todas las muestras fueron almacenadas a -70°C.

Purificación de RNAs >200 nucleótidos:

Se utilizaron muestras de larvas almacenadas a -70°C.

1. Se agregaron 700 µl de QIAzol (reactivo de lisis que contiene isotiocianato de guanidina y fenol), la muestra se homogenizó en vortex hasta que se descongeló la muestra. Una vez descongelado se sumergió en nitrógeno líquido hasta que todo el contenido del tubo quedó completamente congelado y nuevamente se descongeló a 37°C, este paso se repitió tres veces.
2. La muestra se agitó en vortex por 30 segundos y se dejó reposar 30 segundos hasta completar 5 ciclos.
3. Se agregaron 140 µl de cloroformo al contenido del tubo y se agitó vigorosamente durante 30 segundos, se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 minutos.
4. Después, se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos. Al término de la centrifugación en el contenido del tubo se observaron dos fases. La temperatura se aumentó a 20°C para las centrifugaciones posteriores.
5. La fase superior que contenía el RNA se transfirió a un tubo nuevo y se calculó el volumen para agregar un volumen similar de etanol al 70%. Se mezcló en vortex.
6. Se tomaron 500 µl de la mezcla anterior y se depositaron en una columna RNeasy MinElute colocada en un tubo de microcentrífuga de 2 ml y se centrifugó a 8,000 rpm por 15 segundos, este paso se repitió hasta pasar todo el volumen obtenido en el paso anterior.

7. Se lavó la columna con 700 μ l de buffer RWT, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos y se descartó el eluido de este paso.
8. Se hizo otro lavado con 300 μ l de buffer RWT, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos y se descartó el eluido.
9. Para evitar que la muestra estuviera contaminada con DNA se hizo un tratamiento con DNasa: se mezclaron en un tubo de 1.5 ml, 8 μ l de buffer DNasa 10x, 71 μ l de agua tratada con DEPC y 1 μ l de DNasa (Thermo Fisher, No. Cat. EN0521); se agregó la mezcla (80 μ l) a la columna y se incubó a 30°C por 15 minutos, se centrifugó por 5 segundos y se descartó el eluido.
10. Se agregaron 500 μ l de buffer RPE a la columna, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos, y se descartó el líquido obtenido, este paso se repitió.
11. La membrana de la columna se secó centrifugando a 13,000 rpm durante un minuto con la tapa de la columna abierta.
12. Esta columna se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se agregaron 15 μ l de agua DEPC, se cerró la columna y se centrifugó a 8,000 rpm, este paso se repitió para obtener un volumen total de 30 μ l.

7.5 RT-PCR

Se utilizó una concentración de RNA de 500 ng/ μ l para realizar la transcripción reversa de los mRNAs. Las condiciones para la transcripción reversa fueron las siguientes:

Se incubó la mezcla que contiene el cebador reverso a una concentración de 500 fmol/ μ l, el RNA y el agua, a 70°C por 5 minutos. Después a esta mezcla se le agregaron dNTPs, enzima transcriptasa reversa (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, Thermo Fisher No. Cat. EP0451), buffer 5x RT y agua; esta vez se incubó a 37°C por 5 minutos, posteriormente a 42°C por 1 hora y por último a 70°C por 10 minutos.

Para la PCR, a la mezcla anterior se le adicionaron los siguientes componentes: MgCl₂, dNTPs, oligonucleótidos reverso y delantero (concentración utilizada en cada reacción para mRNAs: 200 fmol/ μ l), cloruro de magnesio 25 mM, enzima Taq polimerasa (Taq DNA Polymerase, Recombinant, Thermo Fisher, No. Cat. 10342020), buffer 10x de la enzima y agua.

Programa de PCR punto final:

Tabla 1. Parámetros de PCR.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	2 min
40	95	15 seg
	60*	15 seg
	70	30 seg
1	70	5 min
1	4	∞

*La temperatura de alineamiento puede variar dependiendo del gen a evaluar, revisar anexos.

7.6 PCR en tiempo real (qPCR)

Para la qPCR de los mRNAs se tomaron 2 ul de cDNA y posteriormente se le agregó el Chai Green qPCR Master Mix 2x Cat #R02201S, el oligo delantero y el reverso a una concentración de 500 nM y agua libre de RNAsas, se centrifugó durante 10 segundos y se colocó en el equipo con la siguiente programación:

Tabla 2. Parámetros de qPCR.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
1	95	30
45	95	15
	60*	15
	72	30
1	95	1
	65	15
	95	1

*La temperatura de alineamiento puede variar dependiendo del gen a evaluar, revisar anexos.

7.7 Curvas de longevidad

Las larvas L1 sincronizadas previamente se cultivaron en medios NGM en condiciones control, suplementados con ácido palmítico (0.5 mM), glucosa (40 mM) y combinación (Glucosa 40 mM + Ácido palmítico 0.5 mM) hasta que alcanzaron la etapa L4, posteriormente, se sembraron 110 gusanos de cada condición en una nueva placa Petri correspondiente a la misma condición que se utilizó anteriormente.

Los gusanos fueron contados y transferidos diariamente (empleando un asa de platino) a nuevas placas de Petri con las mismas condiciones empleadas anteriormente, esto con la finalidad de eliminar los embriones y las larvas L1. Los gusanos muertos se contaron diariamente y los gusanos que se adhirieron a la pared de la placa de Petri, así como aquellos que se enterraron en el agar y no fue posible recuperarlos fueron contabilizados y posteriormente censurados durante el análisis estadístico. Los ensayos de longevidad se realizaron por triplicado.

7.8 Determinación del movimiento corporal (body thrashes)

Las larvas L1 sincronizadas previamente, se cultivaron en medios NGM en condiciones control y suplementados con palmítico (0.5 mM), glucosa (40 mM) y combinación (Glucosa 40 mM + Ácido palmítico 0.5 mM), hasta que alcanzaron la etapa L4. Posteriormente, se sembraron 130 gusanos de cada condición en dos cajas de Petri (65 gusanos por caja) correspondiente a la misma condición donde se crecieron anteriormente.

Los gusanos fueron contados y transferidos diariamente durante los primeros 5 días (empleando un asa de platino) a nuevas placas de Petri con las mismas condiciones empleadas anteriormente, esto con la finalidad de eliminar los embriones y las larvas L1. Los gusanos fueron grabados durante 1 minuto al día 1, 5 y 10 de adultos, colocándoles una gota de buffer M9 sobre el medio sólido NGM, permitiendo observar su movimiento corporal de acuerdo con la metodología reportada por Nawa, Huang y Seo (Nawa et al., 2012; Huang et al., 2017 & Seo et al., 2018). Se determinó la cantidad de curvas sinusoidales realizadas por cada gusano y se analizó estadísticamente. Los ensayos de body thrashes se realizaron por triplicado. Se omitió el uso de FUDR.

7.9 Determinación de área y longitud

Larvas L1 sincronizadas previamente se cultivaron en medios NGM en condiciones control, suplementados con ácido palmítico (0.5 mM), glucosa (40 mM) y combinación (Glucosa 40 mM + Ácido palmítico 0.5 mM) hasta que alcanzaron la etapa L4, posteriormente, se lavaron las cajas con buffer M9 y se montaron los gusanos sobre una cámara de Neubauer con azida de sodio al 10%, posteriormente se fotografiaron más de 50 gusanos. Se siguió esta misma metodología para los gusanos crecidos en glucosa 40 mM y combinación ácido

palmítico (0.5 mM) y glucosa (40 mM). Los gusanos fueron medidos utilizando el software image J y posteriormente se realizó un análisis estadístico. Los ensayos de área y longitud se realizaron por triplicado.

7.10 Tinción con rojo oleoso

Los gusanos en estadio L4 crecidos en medios NGM en condiciones control, suplementados con ácido palmítico (0.5 mM), glucosa (40 mM) y combinación (Glucosa 40 mM + Ácido palmítico 0.5 mM), se lavaron tres veces con buffer M9. Posteriormente los gusanos se resuspendieron en 120 ul de PBS 1X y un volumen igual de buffer MRWB 2X (150 ul) con paraformaldehído al 2%, se agitaron durante una hora a 1000 rpm. Posteriormente, los gusanos se dejaron sedimentar y se retiró el sobrenadante.

Después, se realizaron tres lavados con 1 ml de PBS 1X para eliminar el paraformaldehído. Se agregó 1 ml de isopropanol al 60% a las muestras y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, se retiró el isopropanol y se agregó 1 ml de solución de trabajo Rojo Oleoso, se incubaron nuevamente a temperatura ambiente durante toda la noche y en agitación a 1000 rpm. Al día siguiente, los gusanos se sedimentaron y se descartó el sobrenadante, las muestras se lavaron tres veces con 200 ul de PBStX 1X.

Por último, se colocaron 6 ul de gusanos en un portaobjetos, se observaron en el microscopio y se tomaron fotografías de los gusanos teñidos. Se midió la intensidad de la tinción con el programa image J, utilizando al menos 20 gusanos por cada condición siguiendo la metodología utilizada por Yen y colaboradores, este ensayo se realizó por triplicado (Yen et al., 2010).

7.11 Análisis bioinformático

Con base en los resultados del análisis transcriptómico (RNA-seq) realizado por Wang y colaboradores en gusanos alimentados con dietas altas en sacarosa (400 mM) y ácido esteárico (500 ug/mL, 1.75 mM), se realizó un análisis bioinformático de la expresión de los genes de interés del presente trabajo (*daf-16*, *pha-4*, *skn-1* y *alg-1*), además se realizó un análisis estadístico utilizando el programa graphpad, para conocer si la diferencia en la expresión de los genes bajo los diferentes tratamientos era estadísticamente significativa (Wang et al., 2020).

8. Resultados

8.1 Ensayos en dietas altas en ácido palmítico y glucosa

De acuerdo con los resultados mencionados en la sección de antecedentes, se tomaron las concentraciones de 40 mM de glucosa, 0.5 mM de ácido palmítico y combinación de estas, como condiciones para el presente estudio.

8.1.1 Curva de supervivencia en dietas altas en ácido palmítico y glucosa

Se corroboró que las dietas con altas concentraciones de glucosa (40 mM), ácido palmítico (0.5 mM) y su combinación, tenían un impacto en la longevidad de los gusanos (Figura 16). Se observó que la condición alta en glucosa aumentó la longevidad de los gusanos en un 28%. La condición probada de ácido palmítico (0.5 mM) aumento la longevidad de los gusanos en un 10% mientras que la combinación aumento en un 38%, condiciones comparadas contra la condición control. Del mismo modo, el tiempo de vida media incrementó bajo los tratamientos, observándose un aumento del 20% en gusanos alimentados con glucosa (40 mM) o ácido palmítico (0.5 mM), siendo el grupo con glucosa y ácido palmítico el que presentó un mayor incremento (50%) de sobrevivencia respecto al control. Únicamente el tratamiento con ácido palmítico y glucosa resultó estadísticamente significativo.

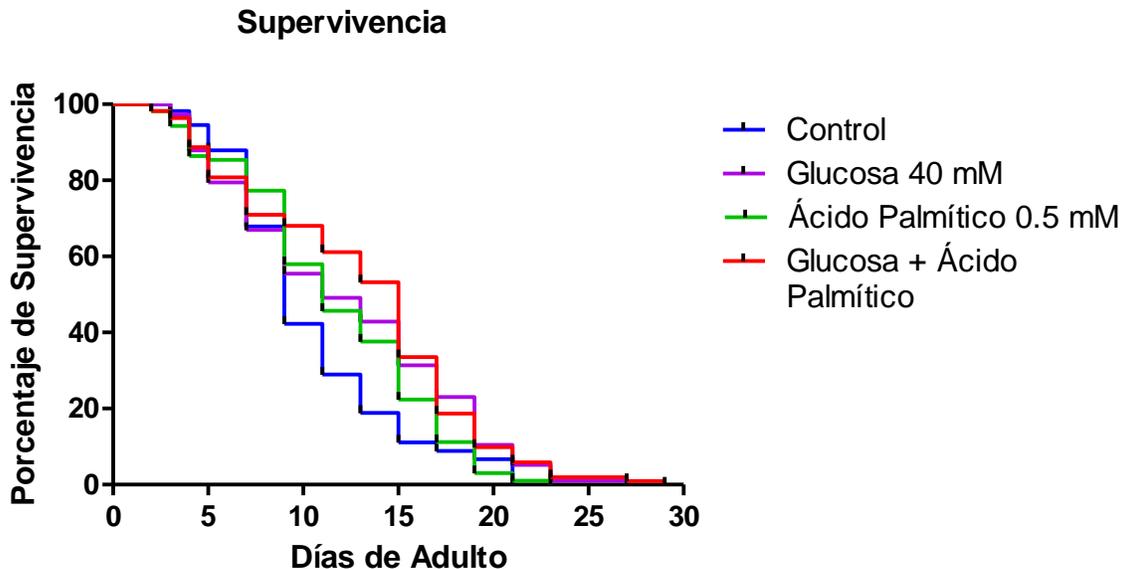


Figura 16. Curva de supervivencia de gusanos WT alimentados con glucosa (40 mM), ácido palmítico (0.5 mM) y una combinación de ambos. El presente experimento se realizó por triplicado.

8.1.2 Evaluación del movimiento corporal (body thrashes) de gusanos crecidos en dietas altas en ácido palmítico y glucosa

No se observaron diferencias entre los distintos tratamientos cuando se utilizaron animales de 1 de adulto en el ensayo de movimiento corporal, utilizando los tratamientos de ácido palmítico 0.5 mM, glucosa 40 mM y la combinación (Figura 17). Para el día 5, todos los tratamientos mostraron diferencias significativas en el movimiento corporal respecto al control, pudiéndose observar una tasa aumentada de movimientos por minuto. Al día 10 de vida de los gusanos, se observó la misma tendencia que en el día 5, en el tratamiento de glucosa 40 mM dicha diferencia fue estadísticamente significativa respecto al control. Por otro lado, el grupo de ácido palmítico 0.5 mM y combinación (glucosa + ácido palmítico), no presentaron diferencias significativas en la tasa de movimientos respecto al control. En el presente ensayo podemos observar que, a mayor envejecimiento del gusano, mayor es la pérdida de movilidad del nematodo de acuerdo con la gráfica conforme avanza la edad del gusano del día 1 al día 10, menor es la tasa de movilidad del gusano, no obstante, en algunos casos podemos observar que el tratamiento protege contra esta pérdida de movilidad.

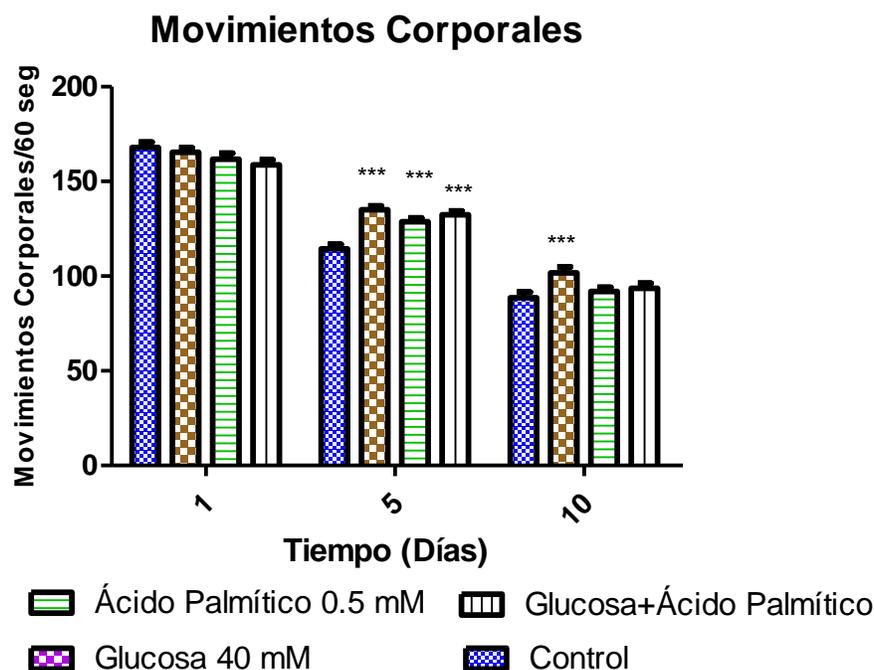


Figura 17. Movimiento corporal (body thrashes) en medio líquido de gusanos alimentados con ácido palmítico y/o glucosa a los 1, 5 y 10 días de la etapa adulta. Los gusanos se alimentaron desde la etapa larvaria L1 al día 10 de adultos con concentraciones de ácido palmítico (0.5 mM), glucosa (40 mM) o combinación, posteriormente se midió su movimiento corporal (body thrashes en inglés); los experimentos se realizaron en tres

repeticiones independientes. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones múltiples; los resultados se presentan como la media \pm SEM (n=17). P= *0.05, **0.01, ***0.001.

8.1.3 Determinación de área y longitud de larvas crecidas en dietas altas en ácido palmítico y glucosa

Se alimentaron gusanos con dietas suplementadas con concentraciones de 0.50 mM de ácido palmítico, 40 mM de glucosa y combinación para evaluar el efecto de estas dietas en el área y longitud del gusano. Todos los gusanos crecidos en estas dietas altas incrementaron su área y longitud con respecto a la condición control (Figura 18). Los gusanos crecidos en combinación de glucosa y ácido palmítico fueron los que aumentaron en su talla en mayor proporción, sugiriendo una sumatoria del efecto observado en los gusanos crecidos en glucosa y ácido palmítico individualmente. Todos los tratamientos presentan diferencias significativas respecto al control.

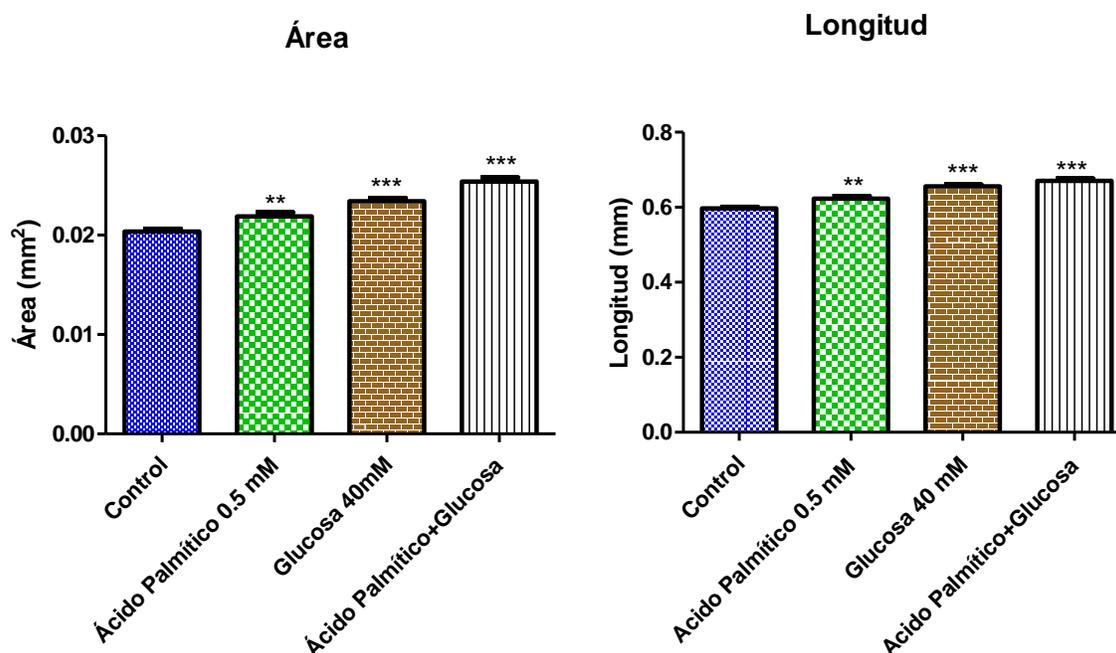


Figura 18. Longitud y área de gusanos alimentados con ácido palmítico y/o glucosa. Los gusanos se alimentaron desde la etapa larvaria L1 a L4 con concentraciones de 0.50 mM de ácido palmítico, 40 mM de glucosa y la combinación de ambos. Posteriormente se midió su área y longitud; los experimentos se realizaron en tres repeticiones independientes. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para evaluar las comparaciones múltiples. Los resultados se

presentan como la media \pm SEM (n=50). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * P<0.05, ** P<0.01 o *** P<0.001.

8.1.4 Evaluación de la acumulación de lípidos en gusanos crecidos en dietas altas en ácido palmítico y glucosa

El colorante Rojo Oleoso es capaz de teñir triglicéridos neutros. Su absorción máxima es a los 510 nm (Yen et al., 2010). Se ha utilizado en *C. elegans* donde se ha visto que la tinción de triglicéridos muestra una correlación con los niveles determinados por métodos bioquímicos. En la figura 19, podemos observar que al suplementar el medio con ácido palmítico y/o glucosa, los gusanos aumentaron sus tasas de almacenamiento de lípidos. En los gusanos crecidos con glucosa (40 mM) se observó la mayor intensidad de tinción de lípidos, seguido por los gusanos crecidos con ácido palmítico (0.5 mM) y por último la combinación de ambos tratamientos. Lo anterior podría sugerir que los gusanos están aumentando su absorción y almacenamiento de ácidos grasos. Todos estos resultados son estadísticamente significativos.

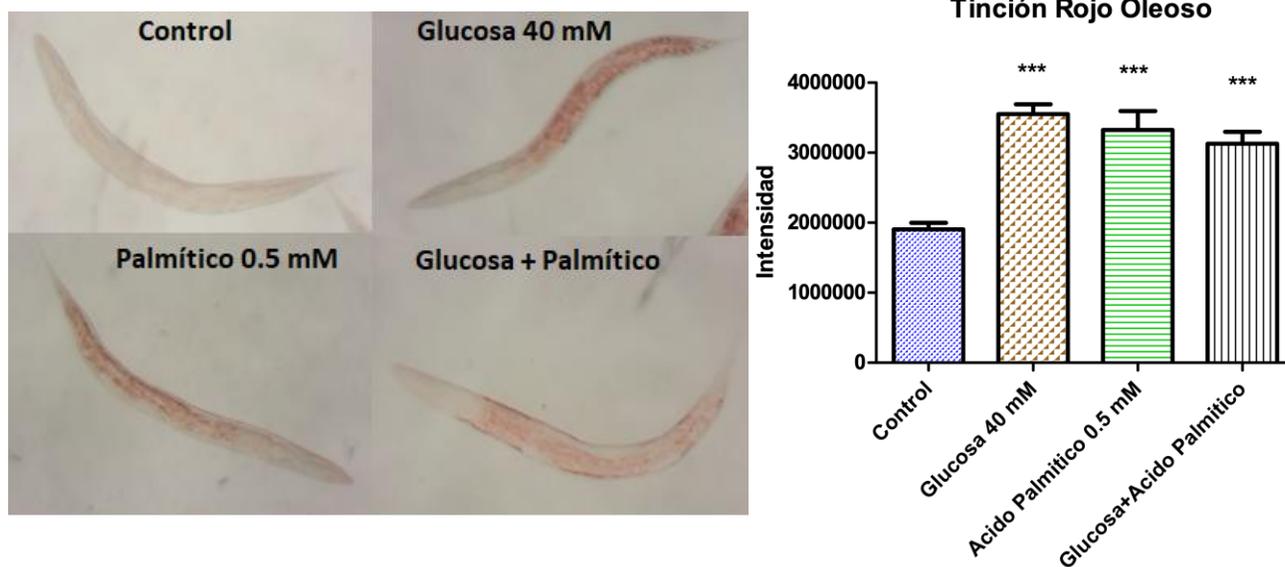


Figura 19. Tinción con rojo oleoso de gusanos alimentados con ácido palmítico y/o glucosa. Los gusanos se alimentaron hasta la etapa larvaria L4 con concentraciones de 0.50 mM de ácido palmítico, 40 mM de glucosa y combinación posteriormente fueron teñidos con el colorante oil-red; los experimentos se realizaron en tres repeticiones independientes. Los datos fueron analizados por medio de la t-Test para evaluar las comparaciones contra el control; los resultados se presentan como la media \pm SEM (n=20).

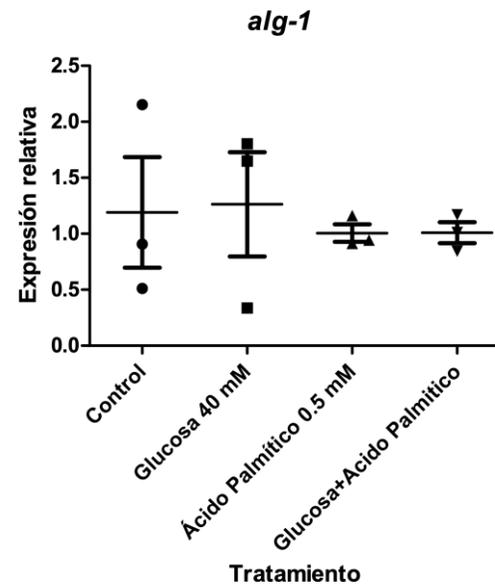
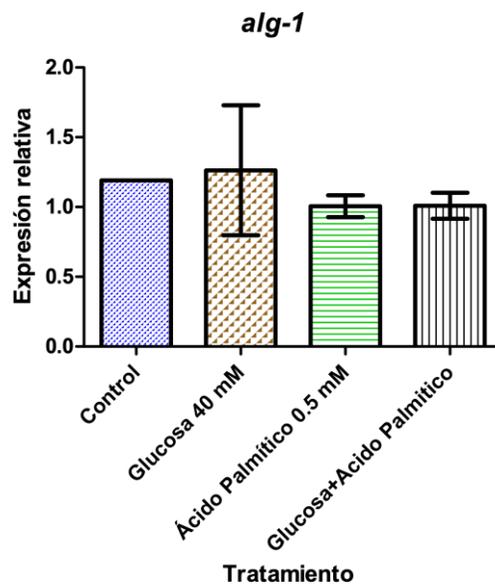
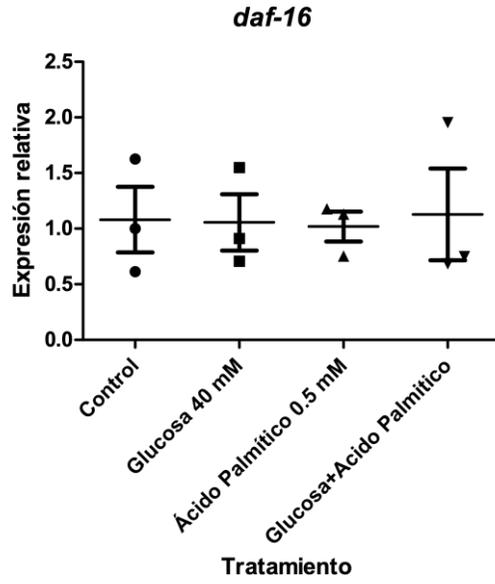
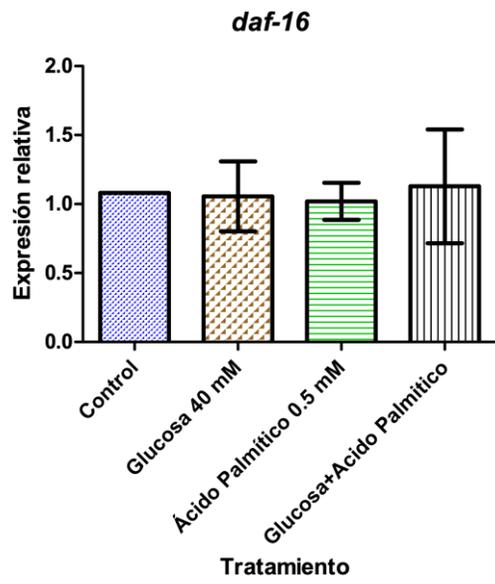
Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

8.2 Cambios en la expresión de factores de transcripción en dietas altas en ácido palmítico y glucosa

Se realizó el análisis de la expresión genética de los factores de transcripción relacionados con la longevidad, dichos resultados se muestran en la figura 20. El estudio fue realizado por medio de la técnica de RT-qPCR en gusanos alimentados con glucosa, ácido palmítico y combinación.

Para el gen *daf-16* no se observó cambio alguno, sin embargo, en la condición con ácido palmítico 0.5 mM se observa una leve tendencia al aumento de la expresión de este gen. En el caso de *alg-1*, se muestra una tendencia al aumento de la expresión en la condición de glucosa 40 mM respecto al control, las condiciones de ácido palmítico y combinación, también muestran una leve tendencia al aumento en la expresión, desafortunadamente ningún resultado es estadísticamente significativo.

Por otro lado, el gen *skn-1*, mostró una leve tendencia a la disminución de la expresión en los tratamientos de ácido palmítico 0.5 mM y combinación. Por último, *pha-4* mostró tener una leve tendencia a la disminución de la expresión de este gen con el tratamiento con ácido palmítico 0.5 mM y combinación (Glucosa + Ácido palmítico), pero ningún tratamiento resultó tener alguna diferencia significativa respecto al control.



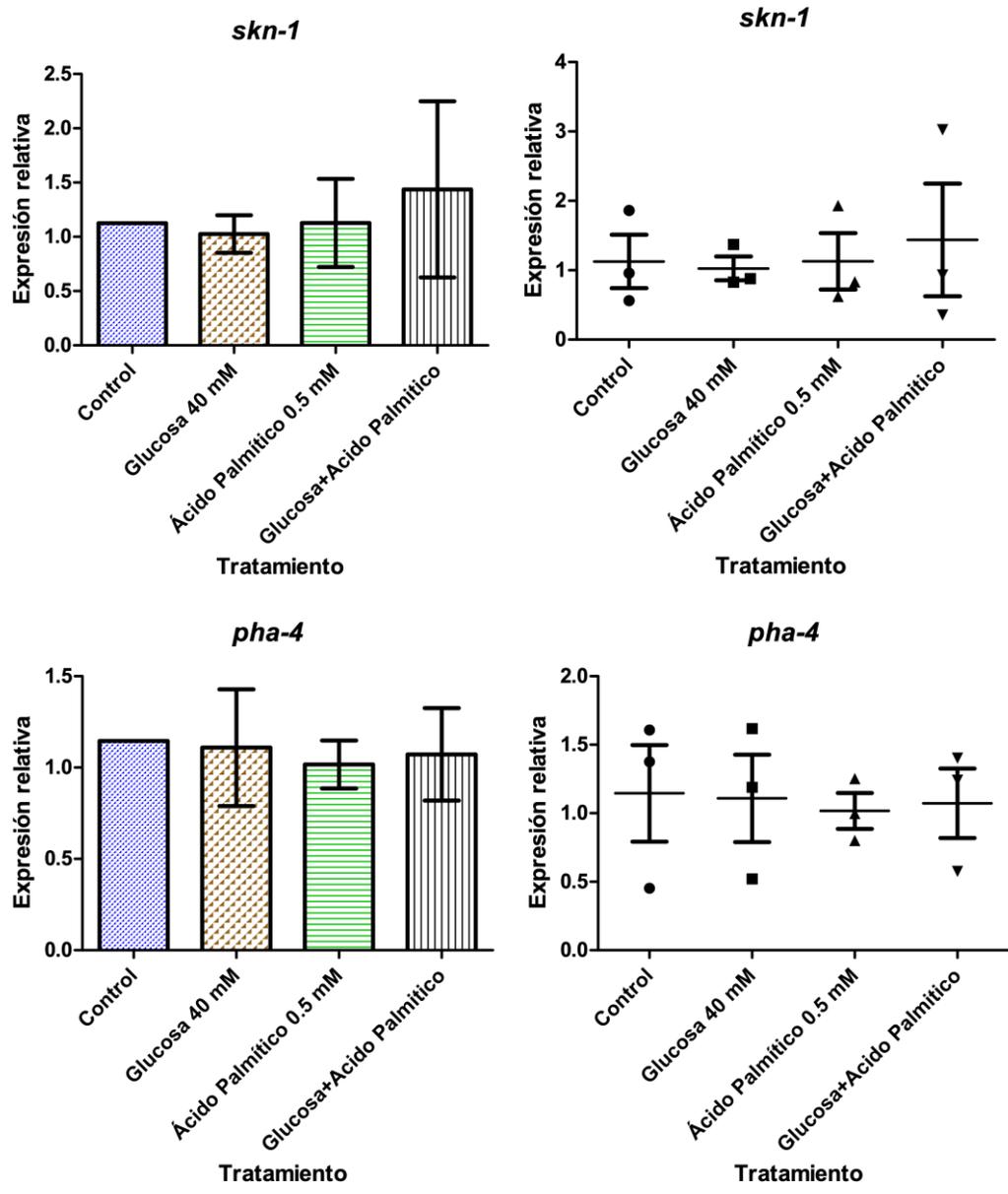


Figura 20. Expresión relativa de genes marcadores de longevidad en gusanos alimentados con ácido palmítico y/o glucosa. Los gusanos se alimentaron desde la etapa larvaria L1 a L4 con concentraciones de 0.50 mM de ácido palmítico, 40 mM de glucosa y combinación, posteriormente se realizó la extracción de RNA y la cuantificación de la expresión por medio de RT-qPCR. Además del lado derecho, se muestran gráficos de caja y bigotes para cada gen, esto con la finalidad de poder analizar las tendencias de dichos resultados. Los experimentos se realizaron en tres repeticiones independientes. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett para evaluar la comparación contra el control; los resultados se presentan como la media \pm SEM (n=3). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * P<0.05, ** P<0.01 o *** P<0.001.

8.3 Análisis bioinformático de los cambios en la expresión de factores de transcripción en dietas altas en ácido esteárico y sacarosa

Se realizó un análisis de la expresión de los genes de interés del presente trabajo (*daf-16*, *skn-1*, *pha-4* y *alg-1*) en los datos obtenidos del transcriptoma de gusanos alimentados con ácido esteárico y sacarosa, por Wang y colaboradores (Wang et al, 2020). sS propuso dicho análisis bioinformático dentro del alcance del presente trabajo para comparar nuestros resultados experimentales contra lo anteriormente reportado en la literatura.

Como podemos observar en la figura 21, los gusanos alimentados con ácido esteárico presentan un aumento en la acumulación del mRNA de *daf-16*, sin embargo, al realizar un análisis estadístico este no presenta significancia, del mismo modo para el gen *pha-4*, por otro lado, *skn-1* y *alg-1* presentan un aumento en la expresión con este tratamiento respecto al control, ambos presentando significancia estadística.

En el caso de los gusanos alimentados con sacarosa se puede observar un leve descenso en la expresión para los genes *daf-16* y *pha-4*, sin embargo, dicha disminución no presenta significancia estadística, el FT *alg-1* presentó un aumento en la expresión respecto al control, mostrando un nivel muy similar al tratamiento con ácido esteárico, en cambio *skn-1* disminuyó drásticamente en esta condición, ambos resultados siendo estadísticamente significativos.

Por último, los gusanos alimentados con ácido esteárico y sacarosa, presentaron una disminución en la acumulación del RNA de los factores de transcripción *skn-1*, *pha-4* y *daf-16* respecto al control, siendo los primeros dos estadísticamente significativos, finalmente *alg-1* mostró un leve aumento respecto al control dicho resultado no presenta significancia.

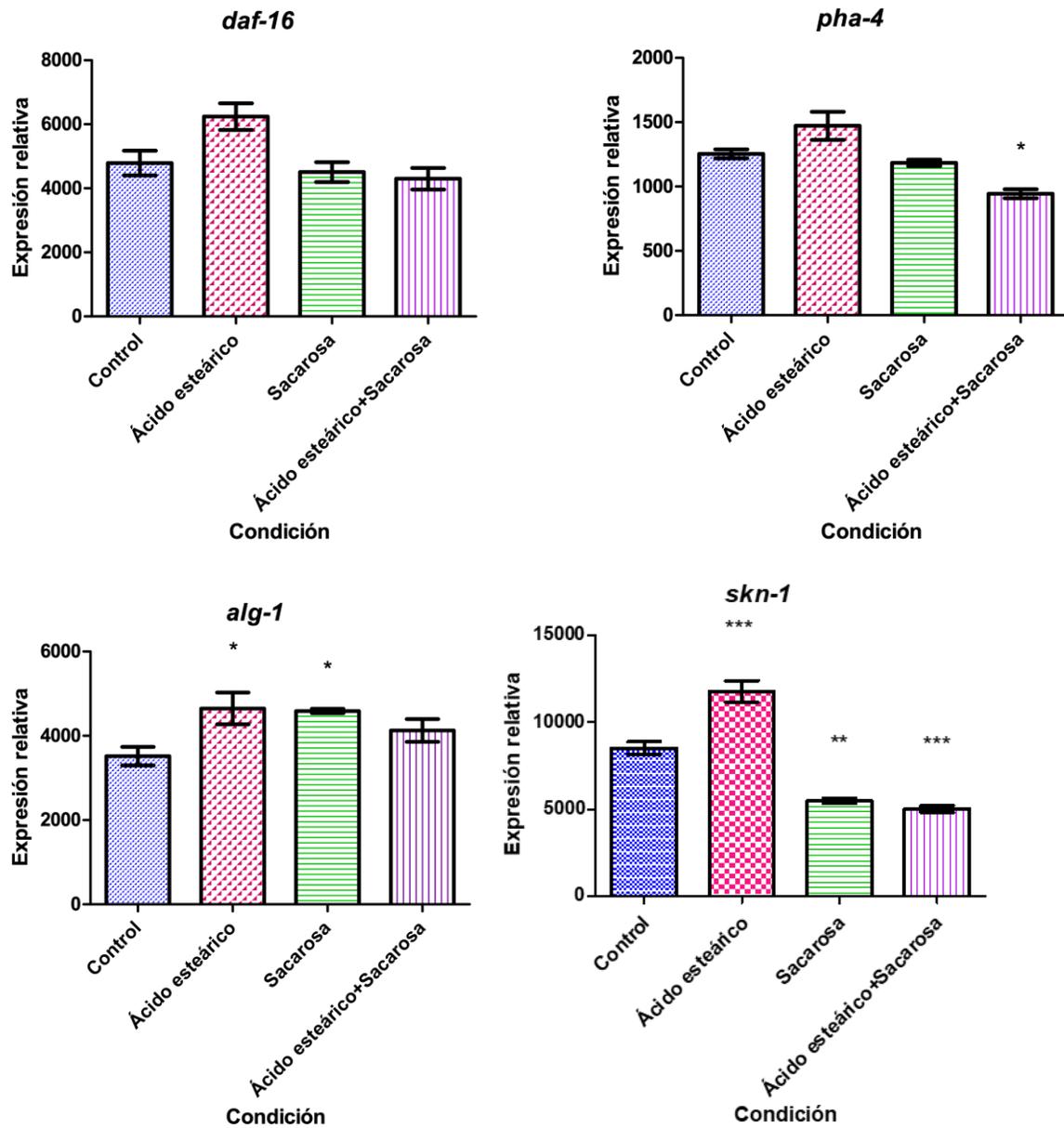


Figura 21. Expresión relativa de genes marcadores de longevidad en gusanos alimentados con ácido esteárico y/o sacarosa (Wang y colaboradores). Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett para evaluar la comparación contra el control; los resultados se presentan como la media \pm SEM (n=3). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$.

9. Discusión

En el presente trabajo analizamos los cambios generados por las dietas altas en glucosa, ácido palmítico y combinación sobre la fisiología, morfología y regulación genética del nematodo *C. elegans*. Específicamente se evaluó la longevidad, el movimiento y longitud corporal, acumulación de lípidos y expresión diferencial de genes relaciones con la longevidad. Nuestros resultados indican que estas dietas promovieron el crecimiento, desarrollo y longevidad de este organismo.

Dado que los nematodos necesitan consumir energía durante el crecimiento y el desarrollo, se utilizó glucosa (40 mM) y ácido palmítico (0.5 mM) para proporcionar nutrientes a los nematodos. Contrario a lo que supusimos, estos tratamientos alargaron la longevidad, mejoraron el movimiento corporal, generaron una mayor longitud corporal, así como acumulación lipídica.

Se ha especulado sobre si el uso de la bacteria *E. coli* podría estar ayudando o mejorando la asimilación de nutrientes en el gusano, sin embargo, se ha reportado en experimentos donde se utilizaron bacterias vivas y muertas que los niveles endógenos de glucosa en *C. elegans* fueron los mismos (Schlotterer et al., 2009).

9.1 Los gusanos alimentados con glucosa y ácido palmítico aumentan su tiempo de vida

El primer efecto que observamos fue el incremento en la sobrevivencia de los gusanos alimentados con ácido palmítico y glucosa.

En algunos estudios donde se ha analizado el tiempo de vida de los gusanos se ha utilizado 5-fluoro-2-desoxiuridina (FUdR) para así esterilizar a los gusanos y facilitar el conteo y manipulación de estos a lo largo del ensayo, sin embargo, se ha reportado que este tratamiento altera diferentes procesos biológicos como la respuesta estrés, el metabolismo y la longevidad. De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo no se utilizó dicho agente para evitar algún sesgo metodológico. (Tauffenberger et al., 2012; Van Raamsdonk et al., 2011; Schlotterer et al., 2009; Lee et al., 2009).

Contrario a lo esperado, se observó que la longevidad de los gusanos alimentados con ácido palmítico y glucosa aumentó. Sin embargo, se ha reportado que gusanos sometidos a una concentración de 0.05 mM de ácido palmítico disminuyen su longevidad, del mismo modo Alcantar-Fernández y colaboradores reportaron que las dietas altas en glucosa disminuyen la longevidad de los gusanos, esto pudiendo resultar así por diferencias experimentales, como es el caso del uso de una cepa nueva debido a que se detectó que la cepa anteriormente utilizada en el laboratorio llevaba gran número de generaciones, adicional a lo anterior, este efecto sobre la longevidad promovido por estas dietas altas se podría definir como un efecto benéfico el cual a niveles superiores podría volverse

perjudicial, la producción de ROS podría estar mediando la señalización celular y la supervivencia pero a niveles elevados crónicos puede llegar a producir daño celular (Smookler et al, 2011; Alcantar-Fernández et al., 2018; López-Otín et al., 2013).

En concordancia con nuestro trabajo, Wang y colaboradores (2020), reportaron que gusanos alimentados con ácido esteárico (0.18 mM) y sacarosa (0 a 250 mM) prolongan la vida del gusano significativamente, observando un efecto sinérgico al igual que en el presente trabajo. Adicionalmente a esto ellos observaron que al aumentar la concentración de sacarosa se presentó un efecto deletéreo (Wang et al., 2020).

Se ha reportado también en nematodos de larga vida, la importancia del alto índice de la relación MUFA:PUFA (por sus siglas en inglés, ácido graso monoinsaturado (MUFA), ácido graso poliinsaturado (PUFA)), debido a esto, la generación de MUFAs por la $\Delta 9$ desaturasa a partir del ácido palmítico suplementado, podría estar favoreciendo esta relación y la activación de factores transcripcionales pro-longevidad, aumentando la longevidad de nuestros gusanos (Schroeder & Brunet, 2015; Smookler et al, 2011).

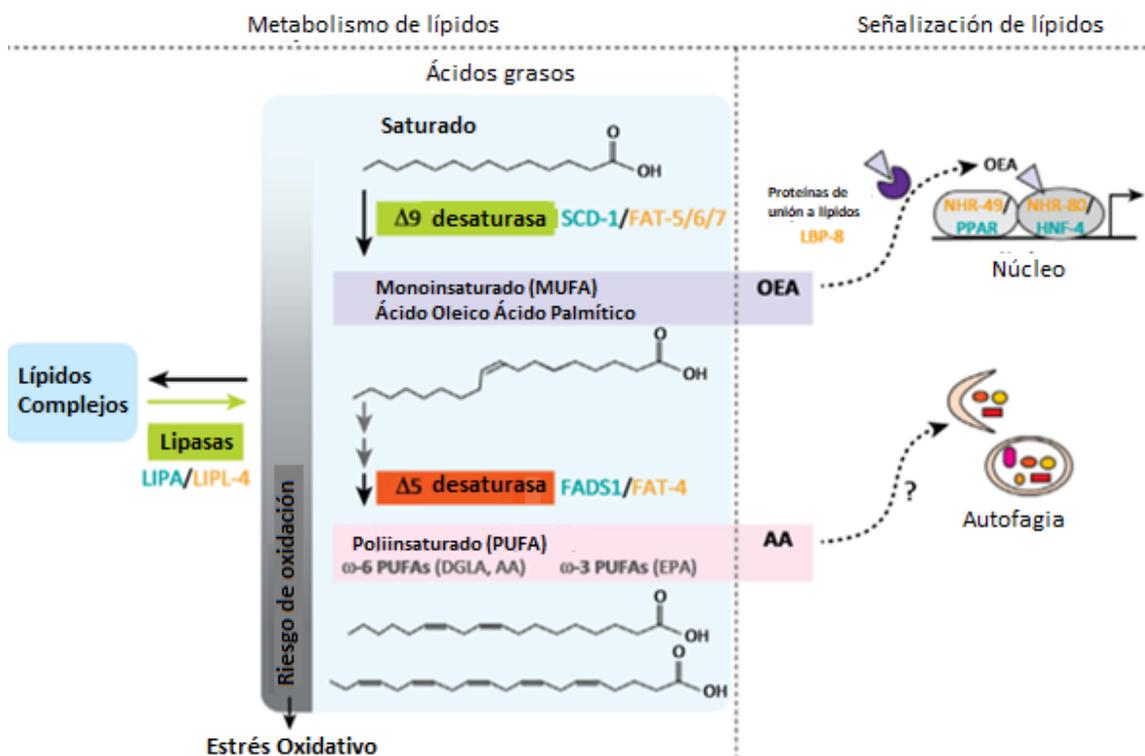


Figura 22. Vías metabólicas lipídicas (Imagen tomada de Schroeder & Brunet, 2015).

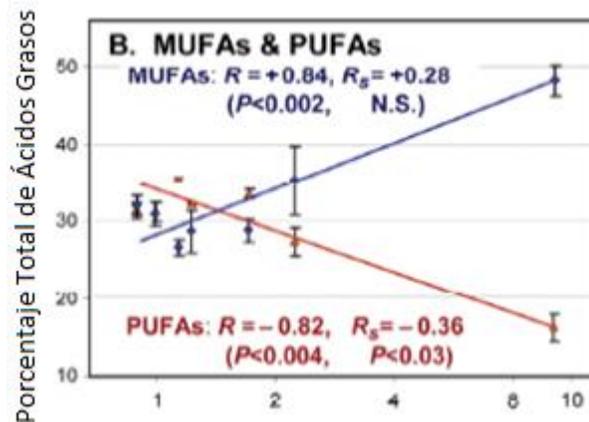


Figura 23. Porcentaje de ácidos grasos totales, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (MUFAs y PUFAs por sus siglas en inglés) (Imagen tomada de Shmookler et al, 2011).

Adicionalmente, recientemente se ha descrito la importancia de los ácidos grasos como reguladores de la expresión genética. La palmitoilación es una modificación postranscripcional que está estrechamente relacionada con el metabolismo de la glucosa y la insulina. También se ha encontrado que la desregulación en la palmitoilación puede desencadenar resistencia a la insulina, así como enfermedades inmunológicas, neurodegenerativas y cáncer (Spinelli et al, 2018).

9.2 Los tratamientos de ácido palmítico y glucosa disminuyen la pérdida movimiento corporal respecto a la edad

La movilidad corporal del *C. elegans* ha sido descrito como un marcador de envejecimiento por lo que fue de nuestro interés estudiarlo en el presente trabajo. En el día 1 de adulto de nuestros nematodos no se observaron diferencias entre los tratamientos, sin embargo, para el día 5, todos los tratamientos mostraron una mayor movilidad corporal contra el control, sugiriendo que estos tratamientos confieren protección frente a la pérdida de movilidad relacionada con el envejecimiento. Por último, en el día 10 de adultos, el tratamiento con glucosa 40 mM fue el único que siguió presentando una menor pérdida de movilidad, así como una diferencia estadísticamente significativa contra el control.

Seo y colaboradores reportaron que los gusanos alimentados con glucosa al 2% (111 mM) presentan una disminución aumentada en la tasa de movimientos corporales en medio líquido, mayor a los gusanos control, contrario a nuestros resultados. Nuestros controles concuerdan con lo reportado por Seo, debido a que, a mayor envejecimiento del gusano, mayor es la pérdida del movimiento corporal (Seo et al., 2018).

9.3 Alteraciones en la talla de gusanos alimentados con ácido palmítico y glucosa

Otros de los efectos observados en los gusanos alimentados con dietas altas en ácido palmítico y glucosa fue el incremento en su talla.

El número de células, su tamaño y el espacio extracelular determinan el tamaño final de un organismo, además de los factores nutricionales y genéticos influyen en esto (Conlon & Raff, 1999).

Un factor clave en el crecimiento es la nutrición. Se ha reportado que incrementos de glucosa en la dieta en los gusanos incrementa su tamaño, por otro lado, también se ha reportado que las condiciones de ayuno conllevan a una disminución en su tamaño, es por esto por lo que se cree que los procesos que regulan el crecimiento están acoplados a los procesos que regulan el metabolismo (Alcantar-Fernández et al., 2018; García-Segura et al., 2015; So et al., 2011; Stern, 2003).

Se ha reportado que las vías de señalización de TGF- β y DAF-2/IGF regulan el tamaño del cuerpo en *C. elegans*. Los cambios observados en la morfología de los gusanos alimentados con dietas altas en glucosa se han atribuido a la actividad de las vías de señalización de TGF- β y DAF-2/IGF-1, (Taghibiglou et al., 2009; Zhu et al., 2016; Mejia-Martinez et al., 2017), lo que podría ser consistente con los resultados mostrados en este estudio.

Se observó un aumento en el tamaño de los gusanos que fueron alimentados con dietas altas en glucosa y ácido palmítico. Al comparar estas condiciones contra el control con un valor p de 0.01 todos los incrementos en la talla fueron estadísticamente significativos. En promedio los gusanos control presentan una longitud de 0.6 mm, y los gusanos sometidos a las diferentes dietas mostraron promedios por encima de este, siendo la dieta combinada de glucosa y ácido palmítico la que mostró un mayor aumento en la talla, sugiriendo una sinergia entre ambos tratamientos.

Se ha reportado que se induce un aumento de talla en gusanos alimentados con glucosa a 20-100 mM (Alcántar-Fernández et al., 2018) y que es consistente con los resultados mostrados en este estudio con el tratamiento con glucosa 40 mM. Además, se han reportado que las dietas altas en colesterol incrementan la longitud de este organismo, por otro lado, se han estudiado con anterioridad las dietas basadas en mezclas de carbohidratos y lípidos, como en este caso ácido esteárico (0.18 mM) y sacarosa (250 mM), mostrando un aumento sobre la longitud del nematodo. También se han estudiado concentraciones más elevadas, sin embargo, estas acortan la longitud, así como la vida útil del gusano (Wang et al., 2020).

9.4 Aumento en el almacenamiento de lípidos en gusanos alimentados con ácido palmítico y glucosa

La regulación del metabolismo de los lípidos en *C. elegans* está influenciada por el medio ambiente, como las deficiencias de temperatura y nutrientes, así como su propio estado fisiológico, incluido el crecimiento, la reproducción, el desarrollo y el envejecimiento (Watts & Ristow, 2017).

Además, el cuerpo del nematodo sufre cambios rápidos para producir una respuesta adaptativa a este estímulo. Además de la digestión y la absorción para cumplir con las actividades básicas de la vida, los nematodos almacenan el exceso de energía en forma de gotas de lípidos. En los embriones tempranos, las gotas de lípidos son abundantes, proporcionando precursores para la síntesis de membrana durante la división celular rápida, así como energía para los procesos celulares hasta la eclosión. Los TAG son el componente principal de las gotas de lípidos, como moléculas eficaces de almacenamiento de energía debido a su reducido estado. Durante la síntesis de grasas, la diacilglicerol aciltransferasa cataliza la formación de TAG a partir de acil-CoA graso y diacilglicerol (Xu et al, 2012).

Los ácidos grasos se sintetizan de novo formando parte del crecimiento, desarrollo, desove y como moléculas de señalización. La característica del metabolismo de los lípidos en *C. elegans* es la síntesis de ácidos grasos de novo a partir de acetil-CoA. (Kniazeva et al, 2004) La glucosa estimula la esterificación de ácidos grasos a triglicéridos al generar piruvato y acetil-CoA, lo que podría explicar un aumento en la acumulación de lípidos en nuestros gusanos sometidos a las diferentes dietas (Brooks et al., 2009; Foretz et al., 1999). Se ha reportado que dietas altas en carbohidratos y lípidos regula al alza los genes involucrados con la síntesis de TAG (Wang et al., 2020).

Nuestros gusanos mostraron un aumento en la acumulación de lípidos de acuerdo con el aumento en la tinción de lípidos, todos nuestros tratamientos mostraron resultados estadísticamente significativos con una $p > 0.001$, siendo el grupo con glucosa 40 mM el que alcanzó la mayor acumulación de lípidos en el nematodo.

En concordancia con nuestros resultados, Lu y Qiu (2017) reportaron que gusanos alimentados con glucosa 100 mM mostraban un aumento en los niveles de almacenamiento de lípidos, debido a que, al teñir los gusanos con la misma técnica en el presente trabajo, sus gusanos suplementados se observaban con tonalidades mayores de rojo en comparación con el grupo control (Lu & Qiu, 2017). Podemos concluir que los niveles de lípidos en los nemátodos incrementan cuando se somete a los gusanos a dietas altas en glucosa y ácido palmítico.

9.5 Las dietas altas en ácido palmítico y glucosa modulan la expresión de factores de transcripción relacionados con la longevidad

Se han llevado a cabo análisis del transcriptoma en gusanos alimentados con dietas altas en carbohidratos y lípidos, arrojando resultados que sugieren que las vías relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y lípidos se encuentran expresadas a la alza, sugiriendo una activación en estos procesos metabólicos derivados por estas dietas (Wang et al, 2020).

En el estudio anteriormente realizado por Alcantar-Fernández y colaboradores, la expresión del factor de transcripción relacionado con la respuesta a estrés *daf-16* disminuyó con el tratamiento de glucosa 40 mM, contrario a esto, en nuestro presente estudio no se encontró cambio en dicho gen con el mismo tratamiento. Por otro lado, en dicho estudio, de igual modo reportaron que el gen *skn-1* mostró una expresión disminuida con el tratamiento de glucosa 40 mM, dicho efecto se puede observar en el presente estudio ya que el gen muestra una tendencia a la baja en todos los tratamientos (Alcántar-Fernández et al., 2018).

Dicha disminución en la expresión de ambos genes podría estar estrechamente relacionado con un aumento en la señalización de la vía de insulina, esto debido al aumento de la captación de glucosa por parte del organismo. Adicionalmente los complejos TORC1 y TORC2 ejercen inhibición sobre el factor de transcripción SKN-1 al encontrarse activos, es decir, al encontrarse promoviendo el metabolismo de glucosa, lípidos, síntesis de proteínas y el crecimiento celular acelerando a la vez el proceso de envejecimiento (Lapierre & Hansen, 2012; Smith-Vikos et al., 2014).

Poco se sabe del impacto de las dietas altas en ácido palmítico sobre la expresión de genes relacionados con la longevidad, sin embargo se ha reportado que estas dietas disminuyen el tiempo de vida en gusanos y mamíferos, contrario a lo esperado, en los gusanos alimentados con ácido palmítico 0.5 mM el gen *daf-16* mostró una tendencia al aumento en su expresión, se ha descrito la participación de este gen de manera activa en el aumento de la longevidad así como en el incremento del almacenamiento de la grasa, esto concordando con el resultado reportado en el presente trabajo en la tinción con rojo oleoso en dicho tratamiento (Kimura et al., 1997).

Anteriormente se ha reportado que el gen *alg-1* disminuye su expresión de manera precipitada durante la edad adulta, sin embargo, la expresión de este gen se ha relacionado muy estrechamente con la promoción de la longevidad, en concordancia con lo anterior, el gen *alg-1* mostró una tendencia al aumento en su expresión (Aalto et al., 2018).

PHA-4 es necesario para regular la longevidad mediante la inhibición de mTOR, la eliminación de la línea germinal y la restricción de calorías, activando el proceso de la autofagia, sin embargo, al mostrarse con una tendencia en su expresión hacia la baja en

tratamientos con ácido palmítico 0.5 mM podemos sugerir que el proceso de autofagia se encuentra inhibido, contrario a esto el complejo TOR se mantiene de manera activa (Nakamura & Yoshimori, 2018).

9.6 Las dietas altas en ácido esteárico y sacarosa modulan la expresión de factores de transcripción relacionados con la longevidad

En gusanos alimentados con ácido esteárico 500 ug/mL (1.75 mM) se observó un aumento en la expresión de todos los FTs relacionados con la supervivencia, contrario a lo obtenido en el presente estudio con el uso de dietas altas en ácido palmítico. El aumento observado en el factor de transcripción *alg-1* podría estar promoviendo la regulación a la alza del FT *daf-16* debido a que anteriormente se ha sugerido una regulación por parte de este (Aalto et al., 2018).

Totalmente contrario a lo anterior, entre *daf-16* y el FT relacionado con la autofagia *pha-4*, se ha reportado que la regulación de la longevidad por parte de *pha-4* es independiente a *daf-16*, sugiriendo que ambos podrían presentar actividad redundante debido a sus genes blancos en común. Adicionalmente se sabe que *daf-16* interactúa con *skn-1* en el núcleo como respuesta al estrés oxidativo, promoviendo la longevidad (Panowski et al., 2007; Murphy & Hu, 2013)

En el tratamiento con 400 mM de sacarosa el factor de transcripción *alg-1* se mostró a la alza, permitiendo una robusta regulación por medio de microRNAs promoviendo la viabilidad del gusano (Kato et al., 2011).

Por otro lado, *skn-1* disminuyó su expresión significativamente, sugiriendo una reducción en su capacidad antiestrés, desencadenando un aceleramiento en el proceso de envejecimiento (Tullet et al., 2017). De acuerdo con los resultados obtenidos por Wang y colaboradores, los procesos principalmente activos en animales con este tratamiento son los relacionados con el metabolismo y procesos celulares, sugiriendo que las principales vías de señalización y detección de nutrientes se encuentran altamente activas ejerciendo una inhibición sobre este factor de transcripción (Wang et al., 2020).

Estudios recientes principalmente en *C. elegans* sugieren que la autofagia es uno de los mecanismos relacionados con la longevidad. La actividad de la autofagia se encuentra elevada en animales de larga vida y es necesaria para su longevidad, en el tratamiento en combinación (ácido esteárico+sacarosa) *pha-4* se mostró con aumento en su expresión (Nakamura & Yoshimori, 2018; Murphy & Hu, 2013).

Por otro lado, la expresión de *skn-1* disminuyó con este tratamiento (ácido esteárico+sacarosa), pudiendo ser este FT secuestrado por la actividad AKT-1/-2 por medio de la activación de la vía de señalización de la insulina del gusano, sugiriendo un decaimiento del proceso de envejecimiento. (Nakamura & Yoshimori, 2018; Murphy & Hu, 2013; Blackwell et al., 2015).

10. Conclusiones

- Las dietas altas en glucosa (40 mM) y ácido palmítico (0.5 mM) promueven la longevidad en el gusano *C. elegans*.
- La suplementación dietaria con ácido palmítico y glucosa en gusanos adultos disminuye la pérdida de movilidad respecto a la edad.
- Las dietas altas en ácido palmítico y glucosa generan larvas más grandes en comparación a las larvas control.
- Los gusanos suplementados con ácido palmítico y glucosa presentan un aumento en el almacenamiento de lípidos.
- Los gusanos crecidos en dietas altas en ácido palmítico y glucosa, contrario a lo esperado, muestran una tendencia al aumento en la expresión de los genes que codifican para los FTs *daf-16* y *alg-1* pudiendo estar promoviendo la longevidad.
- En gusanos crecidos en dietas altas en ácido palmítico y glucosa se observa una tendencia a la disminución de los transcritos de *pha-4* y *skn-1*, sugiriendo la disminución de procesos pro-longevidad como es el caso de la autofagia y respuesta a estrés.
- Contrario a lo esperado, las dietas altas en ácido esteárico promueven la expresión de genes pro-longevidad, por otro lado, las dietas altas en sacarosa y combinación (ácido esteárico y sacarosa) disminuyen la expresión de dichos genes promoviendo el metabolismo y las funciones celulares. En ambos ensayos las dietas modularon algunos genes al alza, sugiriendo una respuesta pro-longevidad.

11.Perspectivas

- Estudiar la acumulación de mRNA de los diferentes FTs durante las diferentes etapas de vida del gusano en dietas altas en glucosa y ácido palmítico para conocer los cambios en la transcripción de estos genes respecto con la edad.
- Estudiar los niveles de acumulación proteica de los FTs de interés del presente trabajo (*daf-16*, *skn-1*, *pha-4* y *alg-1*) para realizar una comparación contra los transcritos y poder sugerir alguna regulación postraduccional.
- Identificar miRNAs relacionados con la regulación de estos factores de transcripción y estudiar sus niveles de expresión en diferentes etapas de vida del gusano.

12. Bibliografía

Aalto, A. P., Nicastro, I. A., Broughton, J. P., Chipman, L. B., Schreiner, W. P., Chen, J. S., & Pasquinelli, A. E. (2018). Opposing roles of microRNA Argonautes during *Caenorhabditis elegans* aging. *PLoS Genetics*, 14(6).

Alcántar-Fernández, J., Navarro, R. E., Salazar-Martínez, A. M., Pérez-Andrade, M. E., & Miranda-Ríos, J. (2018). *Caenorhabditis elegans* respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors. *PLOS ONE*, 13(7), e0199888.

Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Molecular and Cellular Biology*, 32(1), 2–11.

Ashrafi, K. (2007). Obesity and the regulation of fat metabolism. *WormBook*.

Barbieri, M., Bonafè, M., Franceschi, C., & Paolisso, G. (2003). Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans: Fig. 1. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 285(5), E1064–E1071.

Birkenkamp, K. U., & Coffey, P. J. (2003). Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 31, pp. 292–297). Portland Press Ltd.

Blackwell, T. K., Steinbaugh, M. J., Hourihan, J. M., Ewald, C. Y., & Isik, M. (2015). SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.

Blackwell K, T., Sewell, A. K., Wu, Z., & Han, M. (2019). TOR signaling in *Caenorhabditis elegans* development, metabolism, and aging. *Genetics*, 213(2), 329–360.

Blüher, M., Kahn, B. B., & Kahn, C. R. (2003). Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*, 299(5606), 572–574

Brooks, K. K., Liang, B., & Watts, J. L. (2009). The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*. *PloS one*, 4(10), e7545.

Brown, K. C., Svendsen, J. M., Tucci, R. M., Montgomery, B. E., & Montgomery, T. A. (2017). ALG-5 is a miRNA-associated Argonaute required for proper developmental timing in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Nucleic Acids Research*, 45(15), 9093–9107.

Choi, S. S. (2011). High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. *Nutrition Research and Practice*, 5(3), 214–218.

Conlon, I., & Raff, M. (1999). Size Control in Animal Development Review. *Cell*, 96, 235–244.

Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407.

Finch, C. E., & Ruvkun, G. (2001). The genetics of aging. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2(1), 435–462.

Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010, April 16). Extending healthy life span-from yeast to humans. *Science*.

Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Lièvre, X., Berthelot-Lubrano, C., et al. (1999). ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Molecular and cellular biology*, 19(5), 3760–8.

Garcia-Segura, L., Abreu-Goodger, C., Hernandez-Mendoza, A., Dinkova, T. D. D., Padilla-Noriega, L., Perez-Andrade, M. E., & Miranda-Rios, J. (2015). High-Throughput profiling of *Caenorhabditis elegans* starvation-responsive microRNAs. *PLoS ONE*, 10(11).

Hashmi, S., Wang, Y., Parhar, R. S., Collison, K. S., Conca, W., Al-Mohanna, F., & Gaugler, R. (2013). A *C. elegans* model to study human metabolic regulation. *Nutrition and Metabolism*.

Huang, C. W., Li, S. W., & Hsiu-Chuan Liao, V. (2017). Chronic ZnO-NPs exposure at environmentally relevant concentrations results in metabolic and locomotive toxicities in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 220, 1456–1464.

Jones, K. T., & Ashrafi, K. (2009). *Caenorhabditis elegans* as an emerging model for studying the basic biology of obesity. *Disease Models & Mechanisms*, 2(5–6), 224–22.

Johnson, S. C., Rabinovitch, P. S., & Kaeberlein, M. (2013, January 17). mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*.

Kato, M., Chen, X., Inukai, S., Zhao, H., & Slack, F. J. (2011). Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in *C. elegans*. *RNA*, 17(10), 1804–1820.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454), 461–464.

Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., & Ruvkun, G. (1997). Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277(5328), 942–946.

- Kniazeva, M., Crawford, Q. T., Seiber, M., Wang, C. Y., & Han, M. (2004). Monomethyl branched-chain fatty acids play an essential role in *Caenorhabditis elegans* development. *PLoS Biology*, 2(9).
- Lapierre, L. R., & Hansen, M. (2012). Lessons from *C. elegans*: Signaling pathways for longevity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*.
- Lee, S. S., Kennedy, S., Tolonen, A. C., & Ruvkun, G. (2003). DAF-16 target genes that control *C. elegans* Life-span and metabolism. *Science*, 300(5619), 644–647.
- Lee, S. J., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2009). Glucose Shortens the Life Span of *C. elegans* by Downregulating DAF-16/FOXO Activity and Aquaporin Gene Expression. *Cell Metabolism*, 10(5), 379–391.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013, June 6). The hallmarks of aging. *Cell*. Elsevier B.V.
- Lynn, F. C. (2009). Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 20(9), 452–459.
- Lu, Z., & Qiu, Z. (2017). High glucose concentration restricts fat consumption in *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(7), 10554–10559.
- Mak, H. H. Y. (2012). Lipid droplets as fat storage organelles in *Caenorhabditis elegans*: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *Journal of Lipid Research*, 53(1), 28–33.
- Mejia-Martinez, F., Franco-Juarez, B., Moreno-Arriola, E., Hernández-Vázquez, A., Martinez-Avila, M., Gómez-Manzo, S., ... Ortega-Cuellar, D. (2017). The MXL-3/SBP-1 axis is responsible for glucose-dependent fat accumulation in *C. elegans*. *Genes*, 8(11).
- Mondoux, M. A., Love, D. C., Ghosh, S. K., Fukushige, T., Bond, M., Weerasinghe, G. R., ... Krause, M. W. (2011). O-linked-N-acetylglucosamine cycling and insulin signaling are required for the glucose stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 188(2), 369–382.
- Murphy, C. T., & Hu, P. J. (2013). Insulin/insulin-like signaling in *C. elegans*. *WormBook*, 1–30.
- Nakamura, S., & Yoshimori, T. (2018). Autophagy and longevity. *Molecules and Cells*. Korean Society for Molecular and Cellular Biology.

Nawa, M., Kage-Nakadai, E., Aiso, S., Okamoto, K., Mitani, S., & Matsuoka, M. (2012). Reduced expression of BTBD10, an Akt activator, leads to motor neuron death. *Cell Death and Differentiation*, 19(8), 1398–1407.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2011). *Principios de bioquímica de Lehninger*. Principios de Bioquímica de Lehninger.

Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E., & Vázquez-Carrera, M. (2018, March 1). Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Inc.

Pandit, A., Jain, V., Kumar, N., & Mukhopadhyay, A. (2014). PHA-4/FOXA-regulated microRNA feed forward loops during *Caenorhabditis elegans* dietary restriction. *Aging*, 6(10), 835–855.

Panowski, S. H., Wolff, S., Aguilaniu, H., Durieux, J., & Dillin, A. (2007). PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature*, 447(7144), 550–555.

Papadopoli, D., Boulay, K., Kazak, L., Pollak, M., Mallette, F., Topisirovic, I., & Hulea, L. (2019). mTOR as a central regulator of lifespan and aging. *F1000Research*, 8, 998.

Renner, O., & Carnero, A. (2009). Mouse Models to Decipher the PI3K Signaling Network in Human Cancer. *Current Molecular Medicine*, 9(5), 612–625.

Samuelson, A. V., Carr, C. E., & Ruvkun, G. (2007). Gene activities that mediate increased life span of *C. elegans* insulin-like signaling mutants. *Genes and Development*, 21(22), 2976–2994.

Schlotterer, A., Kukudov, G., Bozorgmehr, F., Hutter, H., Du, X., Oikonomou, D., ... Morcos, M. (2009). *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction. *Diabetes*, 58(11), 2450–2456.

Schroeder, E. A., & Brunet, A. (2015, November 1). Lipid Profiles and Signals for Long Life. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Inc.

Seo, Y., Kingsley, S., Walker, G., Mondoux, M. A., & Tissenbaum, H. A. (2018). Metabolic shift from glycogen to trehalose promotes lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(12), E2791–E2800.

Shmookler Reis, R. J., Xu, L., Lee, H., Chae, M., Thaden, J. J., Bharill, P., ... Ayyadevara, S. (2011). Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of *C. elegans* mutants. *Aging*, 3(2), 125–147.

Slack, C., Giannakou, M. E., Foley, A., Goss, M., & Partridge, L. (2011). dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in *Drosophila*. *Aging Cell*, 10(5), 735–748.

Smith-Vikos, T., De Lencastre, A., Inukai, S., Shlomchik, M., Holtrup, B., & Slack, F. J. (2014). MicroRNAs mediate dietary-restriction-induced longevity through PHA-4/FOXA and SKN-1/Nrf transcription factors. *Current Biology*, 24(19), 2238–2246.

So, S., Miyahara, K., & Ohshima, Y. (2011). Control of body size in *C. elegans* dependent on food and insulin/IGF-1 signal. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 16(6), 639–51.

Spinelli, M., Fusco, S., & Grassi, C. (2018, December 1). Nutrient-dependent changes of protein palmitoylation: Impact on nuclear enzymes and regulation of gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG.

Stern, D. (2003). Body-Size Control: How an Insect Knows It Has Grown Enough. *Current Biology*, 13(7), R267–R269. doi:10.1016/S0960-9822(03)00197-0

Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2017, August 23). DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity. *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.

Taghibiglou, C., Martin, H. G. S., Rose, J. K., Ivanova, N., Lin, C. H. C., Lau, H. L., ... Rankin, C. H. (2009). Essential role of SBP-1 activation in oxygen deprivation induced lipid accumulation and increase in body width/length ratio in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Letters*, 583(4), 831–834.

Tang, L., & Choe, K. P. (2015). Characterization of *skn-1/wdr-23* phenotypes in *Caenorhabditis elegans*; pleiotrophy, aging, glutathione, and interactions with other longevity pathways. *Mechanisms of Ageing and Development*, 149, 88–98.

Tauffenberger, A., Vaccaro, A., Aulas, A., Velde, C. V., & Parker, J. A. (2012). Glucose delays age-dependent proteotoxicity. *Aging Cell*, 11(5), 856–866.

Templeman, N. M., & Murphy, C. T. (2018, January 1). Regulation of reproduction and longevity by nutrient-sensing pathways. *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press.

Tissenbaum, H. A. (2018). DAF-16: FOXO in the Context of *C. elegans*. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 127, pp. 1–21). Academic Press Inc.

Tullet, J. M. A., Green, J. W., Au, C., Benedetto, A., Thompson, M. A., Clark, E., ... Gems, D. (2017). The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. *Aging Cell*, 16(5), 1191–1194.

- Van Raamsdonk, J. M., & Hekimi, S. (2011). FUDR causes a twofold increase in the lifespan of the mitochondrial mutant *gas-1*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(10), 519–521.
- Weaver, B. P., Sewell, A. K., & Han, M. (2016). Time to move the fat. *Genes and Development*, 30(13), 1481–1482.
- Wang, X., Zhang, L., Zhang, L., Wang, W., Wei, S., Wang, J., ... Zhang, Y. (2020). Effects of excess sugars and lipids on the growth and development of *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Nutrition*, 15(1).
- Watts, J. L., & Ristow, M. (2017). Lipid and carbohydrate metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 207(2), 413–446.
- Wolkow, C. A., Kimura, K. D., Lee, M. S., & Ruvkun, G. (2000). Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system. *Science*, 290(5489), 147–150.
- Xu, N., Zhang, S. O., Cole, R. A., McKinney, S. A., Guo, F., Haas, J. T., ... Mak, H. Y. (2012). The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface. *Journal of Cell Biology*, 198(5), 895–911.
- Yen, K., Le, T. T., Bansal, A., Narasimhan, S. D., Cheng, J. X., & Tissenbaum, H. A. (2010). A comparative study of fat storage quantitation in nematode *Caenorhabditis elegans* using label and label-free methods. *PLoS ONE*, 5(9), 1–10.
- Zečić, A., Dhondt, I., & Braeckman, B. P. (2019, May 6). The nutritional requirements of *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Nutrition*. BioMed Central Ltd.
- Zhu, G., Yin, F., Wang, L., Wei, W., Jiang, L., & Qin, J. (2016). Modeling type 2 diabetes-like hyperglycemia in *C. elegans* on a microdevice. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 8(1), 30–38.
- Zinovyeva, A. Y., Bouasker, S., Simard, M. J., Hammell, C. M., & Ambros, V. (2014). Mutations in Conserved Residues of the *C. elegans* microRNA Argonaute ALG-1 Identify Separable Functions in ALG-1 miRISC Loading and Target Repression. *PLoS Genetics*, 10(4).
- Zisoulis, D. G., Lovci, M. T., Wilbert, M. L., Hutt, K. R., Liang, T. Y., Pasquinelli, A. E., & Yeo, G. W. (2010). Comprehensive discovery of endogenous Argonaute binding sites in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(2), 173–179.

13.Anexos

Medio de crecimiento de Nematodos (NGM):

3 g NaCl Hycl de México.

24 g Bacto Agar BD 214010- 454g.

2.5 g Bacto Peptona BD 211677-500g.

0.005 g Colesterol disuelto en alcohol etílico absoluto Sigma C 8667 25 g, Congelación - 20°C.

975 ml Agua desionizada.

1 ml CaCl₂ (1 M) Sigma C-4901-500g.

1 ml MgSO₄ (1 M) J:T Baker 2506-01.

10 ml Buffer de fosfatos pH 6.0 (Fosfato de potasio dibásico, K₂HPO₄ J.T.Baker 3252-01, Fosfato de potasio Monobásico KH₂PO₄. J.T.Baker 324601).

Buffer fosfatos pH 6.0:

17.42 g Fosfato de potasio dibasico (K₂HPO₄ J.T.Baker 3252-01).

13.6 g Fosfato de potasio Monobásico (KH₂PO₄. J.T.Baker 324601).

NaOH 1 N:

400 mg NaOH (MACRON 1310-76-2).

10 ml Agua desionizada.

Mezcla de lisis:

2 ml de cloro a concentración comercial (5%).

8 ml de NaOH 1 N.

Buffer M9 isotónico:

6 g de Na₂HPO₄ (J.T. BAKER CAT. 3828-01).

3 g de KH₂PO₄ (J.T. BAKER CAT. 3246-01).

5 g de NaCl (J.T. BAKER CAT. 3624-01).

0.105 g de MgSO₄ (Anhidro J.T. BAKER CAT. 2506-01).

1 L de agua desionizada.

Agua DPC:

1.5 ml Dietil pirocarbonato 97% Sigma Aldrich 15922-0.

13.5 ml alcohol etílico absoluto.

1.5 L de agua desionizada.

Stock oil-red-O (0.5% Oil-red-O):

0.5 g de oil-red-O en 100 ml de isopropanol anhidro.

Solución de trabajo oil-red-O:

60 ml de oil-red-O stock.

40 ml de agua desionizada.

Buffer MRWB 2X:

160 mM KCl.

40 mM NaCl.

14 mM Na₂EGTA.

0.2% β-mercaptoetanol.

PBS 10X:

137 mM NaCl.

2.7 mM KCl.

4.3 mM Na₂HPO₄*7H₂O.

1.4 mM KH₂PO₄.

PBStX 1X:

PBS 1X con 0.01% v/v Triton X-100.

Paraformaldehido 10%:

1 g Paraformaldehido.

10 ml de agua caliente.

NaOH 2 M:

0.0800 g NaOH.

10 ml de agua.

Tabla 3. Secuencias de Primers.

Gen	Primer	Secuencia del primer	Tamaño de amplicon	Tm
<i>pha-4</i>	Forward primer	tcaattgccactccctctc	170	63
	Reverse primer	ggctcacgttccttgaccttg		
<i>daf-16</i>	Forward primer	aaagagctcgtgggggta	109	60
	Reverse primer	ttcgagttgagcctttgtagtcg		
<i>skn-1</i>	Forward primer	aagggcacacgacaagtgg	102	60
	Reverse primer	agcattctcttcggcagtgag		
<i>alg-1</i>	Forward primer	cgatgttctcaaagacaagcc	232	60
	Reverse primer	tctcactgcaaagtggttgg		
5s	Forward primer	cgaccatatcacgttgaatgcacgc	100	60
	Reverse primer	aggattcccaggccgtctccg		

Tabla 4. Análisis estadístico ensayo de supervivencia.

Tratamiento	Cepa (n)	Media de vida (días)	Cambios de vida media (%)	Vida Máxima (días)	Cambios de vida máxima (%)	χ^2	Valor P
Control	N2 Bristol (110)	9	-	22	-	-	-
		13	-	21	-	-	-
		17	-	21	-	-	-
Glucosa 40 mM	N2 Bristol (110)	11	22.222	26	18.18	6.1	0.0135
		13	0	25	19.04	0.94	0.3323 (ns)
		12	-29.411	27	28.57	3.158	0.0756 (ns)
Ácido Palmítico 0.5 mM	N2 Bristol (110)	11	22.222	24	9.09	2.662	0.1028 (ns)
		13	0	23	9.52	1.89	0.1692 (ns)
		14	-17.647	23	9.52	0.111	0.7386 (ns)
Glucosa + Ácido Palmítico	N2 Bristol (110)	15	66.667	30	36.36	12.57	0.0004
		13	0	29	38.09	0.33	0.5655 (ns)
		14	-17.647	29	38.09	4.272	0.0387