



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

“Caenorhabditis elegans como modelo para estudiar el metabolismo de colesterol: autofagia y efecto del aceite de kril”

Bernabé Battista

Tesis para optar al título de Licenciado en Biotecnología

Director: Dr. de Mendoza, Diego

Director Asistente: Lic. Prez, Gastón

~2019~

Índice

Índice.....	II
Agradecimientos	1
Abreviaturas	2
Resumen.....	4
Introducción.....	5
1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio.....	5
1.1.1 Ventajas de <i>C. elegans</i> como organismo modelo de estudio.....	5
1.1.2 Ciclo de vida	7
1.1.3 Regulación del ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	9
1.2 Autofagia.....	11
1.2.1 El proceso autofágico	11
1.2.2 Tipos de autofagia	12
1.2.3 El rol de la autofagia.....	14
1.2.4 Autofagia en <i>C. elegans</i>	14
1.2.5 La autofagia en el desarrollo y envejecimiento de <i>C. elegans</i>	15
1.2.6 El metabolismo del colesterol y su relación con la autofagia	16
1.2.7 Endocannabinoides y autofagia.....	16
1.3 Rol de los endocannabinoides en el metabolismo del colesterol	17
1.4 Suplementación dietaria con aceite de kril y su posible relación con el metabolismo del colesterol y los endocannabinoides	18
Objetivos	20
2.1 Objetivo General	20
2.3 Objetivos particulares	20
Materiales y Métodos.....	21

3.1 Cepas.....	21
3.1.1 Cepas de <i>C. elegans</i>	21
3.1.2 Cepas de <i>E. coli</i>	22
3.2 Medios y condiciones de cultivo	23
3.3 Sincronización de poblaciones mediante obtención de embriones de.....	24
<i>C. elegans</i>	24
3.4 Ensayos de formación de dauers	25
3.5 Ensayo de hambreado de colesterol.....	25
3.6 Tratamiento con cloroquina	25
3.7 Observación bajo la lupa.....	26
3.8 Observación al microscopio	26
3.8.1 Preparación de muestras para microscopía	26
3.8.2 Microscopio confocal	26
3.9 Ensayo de autofagia utilizando microscopia confocal de fluorescencia	27
3.10 Western Blot.....	27
3.10.1 Protocolo	27
3.10.2 Protocolo de Normalización de la cantidad de proteínas de las muestras ...	29
3.10.3 Protocolo de remoción de anticuerpos.....	29
3.11 Protocolo de extracción de lípidos totales por método de FOLCH.....	30
3.12 Protocolo para fraccionamiento de lípidos.....	30
3.13 Protocolo para realizar cromatografía en capa delgada (TLC)	31
3.14 Ensayos estadísticos.....	32
Resultados	33
4.1 CAPITULO 1: “Rol del colesterol sobre la autofagia en <i>C. elegans</i> ”	33
4.1.1 Determinación de actividad autofágica en condiciones de hambreado de colesterol mediante ensayos de Western Blot.....	33
4.1.2 Determinación de actividad autofágica en condiciones de hambreado de colesterol mediante ensayos de microscopia confocal de fluorescencia	44

4.1.3 Efecto de 2AG sobre la relación entre el metabolismo del colesterol y la autofagia	48
4.2 CAPITULO II: “Efecto del aceite de kril sobre la formación de dauers de la cepa mutante de <i>C. elegans daf-7;fat-4</i> ”	51
4.2.1 Extracción y fraccionamiento del aceite de kril	51
4.2.2 Ensayos con las fracciones obtenidas del aceite de kril	53
Discusión	63
5.1 Capítulo I.....	63
5.2 Capítulo II	66
Conclusiones.....	69
Referencias	70

Agradecimientos

Como se menciona en una de las películas del extraordinario Almodóvar “...*Porque uno es más auténtico cuando más se parece a aquello que ha soñado de sí mismo...*”, yo me siento auténticamente feliz de haber podido llegar hasta este punto en mi vida. A lo largo de los años la curiosidad ha sido un componente decisivo que nos permitió progresar como especie primero y como civilización después. Tener la posibilidad de convertir en profesión la búsqueda de la verdad, para develar el “cómo” o “por qué” de las cosas hace que, aquel niño que deseaba ser científico sienta que su sueño se está volviendo realidad.

Sería necio decir que todo esto ocurrió exclusivamente por mi cuenta, durante todo el tiempo que tomó alcanzar este momento, tuve la suerte de tener a mi lado a personas maravillosas que fueron fundamentales para lograrlo. Principalmente tengo que darles un “gracias” gigante a mi mamá y mi papá porque, más allá de las razones obvias, a ellos les debo prácticamente todo lo que soy. Estás dos personas increíbles, a pesar de los miles de inconvenientes que se presentaron en el camino, jamás bajaron los brazos y lo dieron todo para brindarme la posibilidad de hacer lo que me gusta. También tengo que agradecer a mi hermana, de quién no recuerdo momento en el que no haya estado conmigo, apoyándome en cualquier decisión que tomara para mi vida.

Tengo que agradecer al resto de mi familia y, por supuesto, a mi segunda familia, mis amigos, a los de siempre y a los que se fueron sumando en el camino. Gracias Karen, Sofi, Guido, Juli y Mica por su presencia incondicional. A mis amigos más recientes Vale, Viru, Sole, Cami, Vicky, Negro, Rata, Elliot, Pau, Tomi, Juan y Juance gracias por haberme aliviado el peso durante todo este tiempo, por compartir conmigo tantas risas y anécdotas, por enseñarme a ver el mundo con otros ojos y hacerme mejor persona.

A mis compañeros del laboratorio 6, actuales y pasados, muchas gracias por haberme dado una mano cada vez que lo necesité. Especialmente quiero agradecer a Diego y Celina por haberme abierto las puertas al grupo y a Gastón por asumir la responsabilidad de hacerse cargo de mi dirección después.

Abreviaturas

2AG: 2- araquidonil glicerol

2AGE: 2-araquidonil glicerol éter

AA: Ácido araquidónico

AD: Ácido dafacrónico

AEA: Anandamida

AGL: Ácidos grasos libres

AL: Autolisosoma

AP: Autofagosoma

ARNi: ARN de interferencia

BHT: Butil hidroxitolueno

DHT: Ácido 2-docosahexanóico

EC: Endocanabinoide

ECs: Endocanabinoides

ECS: Sistema endocanabinoide

EPA: Ácido eicosapentanóico

FL: Fosfolípidos

GFP: Proteína fluorescente verde

MA: membrana de aislamiento

MEN: Medio mínimo esencial

MPM: Marcador de peso molecular

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero

NGM: Medio de crecimiento para nematodos

OBR: Proteína relacionada a proteína que une oxisterol

ORP: Proteínas relacionadas a OSBP

OSBP: Proteína que une oxisterol

PMN: Microautofagia fragmentaria del núcleo

PUFAS: Ácidos grasos poliinsaturados

RF: Relación de frente

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

STR^r: Resistente a estreptomina

TAG: Triacilgliceroles

TLC: Cromatografía de capa delgada

T-TBS: solución salina Tris HCl/ Tween 20

WB: Western Blot

Resumen

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es una poderosa herramienta para el estudio de diversas patologías. En nuestro laboratorio, se estudia como diferentes lípidos afectan el transporte de colesterol y su rol en el desarrollo reproductivo del gusano. El control del transporte de colesterol es crucial para la homeostasis fisiológica en la mayoría de las células eucariotas. Entre otros factores, el metabolismo del colesterol se encuentra asociado al proceso de reciclaje de componentes celulares conocido como autofagia. Se ha reportado que desregulaciones de la misma se asocian a diferentes enfermedades y desórdenes metabólicos.

En este trabajo se estudio la influencia del metabolismo del colesterol sobre la autofagia en *C. elegans*. Encontrándose que la ausencia del colesterol produce una disminución del flujo autofágico y que el agregado externo del endocanabinoide 2-araquidonoil glicerol (2AG) restituye parcialmente el mismo.

Asimismo se estudió el efecto del aceite de kril suplementado en la dieta, sobre la formación de dauers en cepas mutantes de *C. elegans*. Se descubrió que el aceite de kril contiene compuestos lipídicos que aumentan o inhiben la formación de dauers en *C. elegans*.

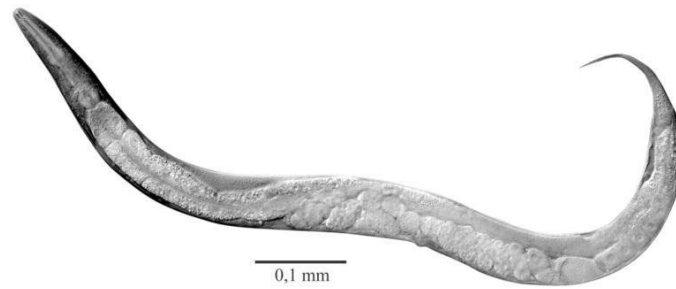
Introducción

1.1 *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio

1.1.1 Ventajas de *C. elegans* como organismo modelo de estudio

C. elegans es un nematodo de vida libre que se encuentra en forma natural alrededor del mundo. Las larvas recién eclosionadas tienen 0,25 milímetros de longitud, mientras que un adulto alcanza una longitud de 1 milímetro [1]. Este gusano se propuso por primera vez como un organismo modelo por Sydney Brenner en 1974. Sus características más sobresalientes son: su cultivo económico, su fácil manipulación y la gran cantidad de herramientas genéticas y moleculares disponibles para ser usadas en este nematodo. Es un animal anatómicamente simple y su cuerpo es transparente, lo que facilita su visualización en la lupa permitiendo observar marcadores fluorescentes in vivo [2]. Además, el genoma de este animal ha sido completamente secuenciado, observándose que posee un 60% de genes homólogos con el genoma humano, lo cual lo convierte en un excelente modelo de estudio de la patogénesis de distintas enfermedades [3]. Debido a la homología a nivel genético que presenta con humanos, es un buen candidato para el estudio del funcionamiento de diversas vías metabólicas, como por ejemplo las relacionadas a la insulina [4]. Sumado a esto, se lo ha presentado como una poderosa plataforma para el diseño de nuevas drogas, ya que cuenta con la ventaja de ser un buen modelo para realizar “screenings” [5]. En el laboratorio, es fácil de cultivar ya que se puede crecer sobre un césped de bacterias (en general la cepa *Escherichia coli* OP50) en un medio de cultivo de tipo microbiológico con agar. El mantenimiento de las poblaciones de *C. elegans* es extremadamente simple y sólo requiere transferirlos mediante el recorte de un pequeño trozo de agar de la placa de origen a la de destino. Los adultos poseen alrededor de 1000 células somáticas, pero aun así presentan diferentes tipos de tejidos, como muscular, nervioso e intestinal [2] (Fig 1.1).

A



B

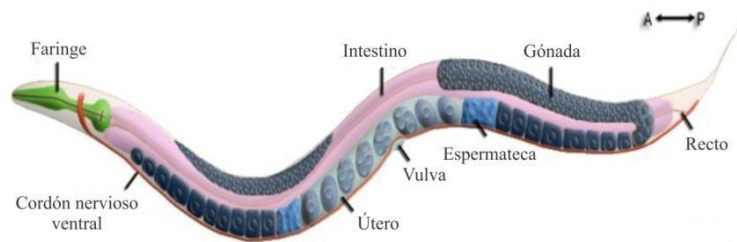


Figura 1.1: Anatomía de *C. elegans* adulto. **A)** Microscopía de un nematodo adulto. Se puede apreciar la transparencia del animal y las estructuras que lo componen. Imagen adaptada de http://web.science.uu.nl/developmentalbiology/boxem/elegans_intro.html. **B)** Representación del nematodo en la que se indican los órganos principales. Se observa la faringe (verde), el intestino (violeta) y el sistema reproductor (en celeste y azul oscuro). El sistema reproductor está formado por la gónada distal y la gónada proximal, la espermateca y el útero donde comienza el desarrollo de los huevos. Imagen adaptada de WormAtlas (www.wormatlas.com).

Debido al dimorfismo sexual que presentan, los nematodos *C. elegans* pueden ser machos o hermafroditas, con 1031 y 959 células somáticas respectivamente. Los hermafroditas son esencialmente hembras que producen y almacenan espermatozoides en una determinada etapa del desarrollo, antes de comenzar a producir ovocitos. Los machos aparecen en la población muy infrecuentemente [(0,1-0,2) %], como resultado de la no disyunción del cromosoma sexual X. Son morfológicamente distinguibles de los hermafroditas ya que son más pequeños y finos y poseen una cola con forma de abanico. Gracias a este dimorfismo sexual, los hermafroditas son útiles para mantener mutaciones homocigotas sin la necesidad de un cruzamiento, mientras que los machos pueden utilizarse para trasladar mutaciones entre cepas. Si un hermafrodita se auto-fertiliza, puede generar una progenie de unos 300 individuos (dada la cantidad limitada de espermatozoides que almacena), mientras que, si se aparea con un macho, el número asciende a ~1000

individuos [2].

1.1.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *C. elegans* consiste de: una etapa embrionaria, cuatro estadios larvales (L1-L4) y la adultez (fig. 1.2). El ciclo de vida completo de *C. elegans* transcurre a lo largo de aproximadamente 3 días en condiciones óptimas. Su extensión es dependiente de la temperatura. Así, un embrión puede alcanzar la adultez en 3 días a 25°C, pero demora 5 días a 15°C. El embrión comienza su desarrollo dentro del hermafrodita, sin importar si el espermatozoide que fertiliza al ovocito provenga de la espermateca del hermafrodita o del apareamiento con un macho. Una vez que el embrión alcanzó aproximadamente las (28-30) células, es depositado en el ambiente exterior. La embriogénesis se completa luego fuera del hermafrodita durante un periodo de 14 horas a 20°C, la cual es la temperatura de crecimiento óptima. Al eclosionar, el gusano se denomina larva L1. En condiciones de alimentación favorables esta larva se desarrolla al estadio L2, mientras que si enfrenta un hambre puede arrestar su desarrollo hasta que las condiciones mejoren. En presencia de alimento, la larva procede a través de cuatro estadios que son delimitados por los cambios de cutícula necesarios para soportar el aumento en el volumen corporal, y en el transcurso de los mismos se desarrollan los caracteres sexuales específicos [2], a esto se le denomina **ciclo de vida reproductivo**. En promedio *C. elegans* puede llegar a vivir unas tres semanas, depositando durante ese periodo entre 200 y 300 huevos [6].

Además del posible arresto en la fase L1, el nematodo presenta una ruta alternativa del desarrollo post-embionario que ocurre justo antes de la fase de larva L2 (Fig 1.2). Esto sucede cuando el gusano se encuentra en condiciones ambientales desfavorables, como, por ejemplo, carencia de comida, altas temperaturas o sobrepoblación. En estos casos, el nematodo ingresa en un estado hipo-metabólico, denominado larva dauer (del alemán “duración”). Esta larva se caracteriza principalmente porque presenta una cutícula más resistente que las larvas del desarrollo regular del nematodo [7]. Gracias a esta característica, la larva dauer es capaz de sobrevivir entre 3 y 4 meses, mientras que cuando se encuentra en ciclo reproductivo, sólo vive entre 2 y 3 semanas. En las larvas dauer, la alimentación se interrumpe definitivamente y la locomoción se torna más lenta. A su vez son altamente resistentes a distintas clases de estrés: nutricional, térmico, hídrico y oxidativo. Cuando las condiciones ambientales mejoran, pueden reingresar al ciclo normal del desarrollo, directamente en el estadio L4. No importa

cuánto tiempo haya estado el nematodo como dauer, al retomar el desarrollo normal, el promedio de vida no se ve afectado respecto de un gusano que nunca cursó por ese estadio [6].

Existen más de 30 genes que controlan la decisión de entrar en el ciclo dauer, ellos se denominan genes *daf* (*dauer formation*). Entre ellos, se encuentran ortólogos de los genes humanos de las vías de señalización por insulina (receptor DAF-2 del nematodo) y del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) de vertebrados (péptido DAF-7 del nematodo) [6].

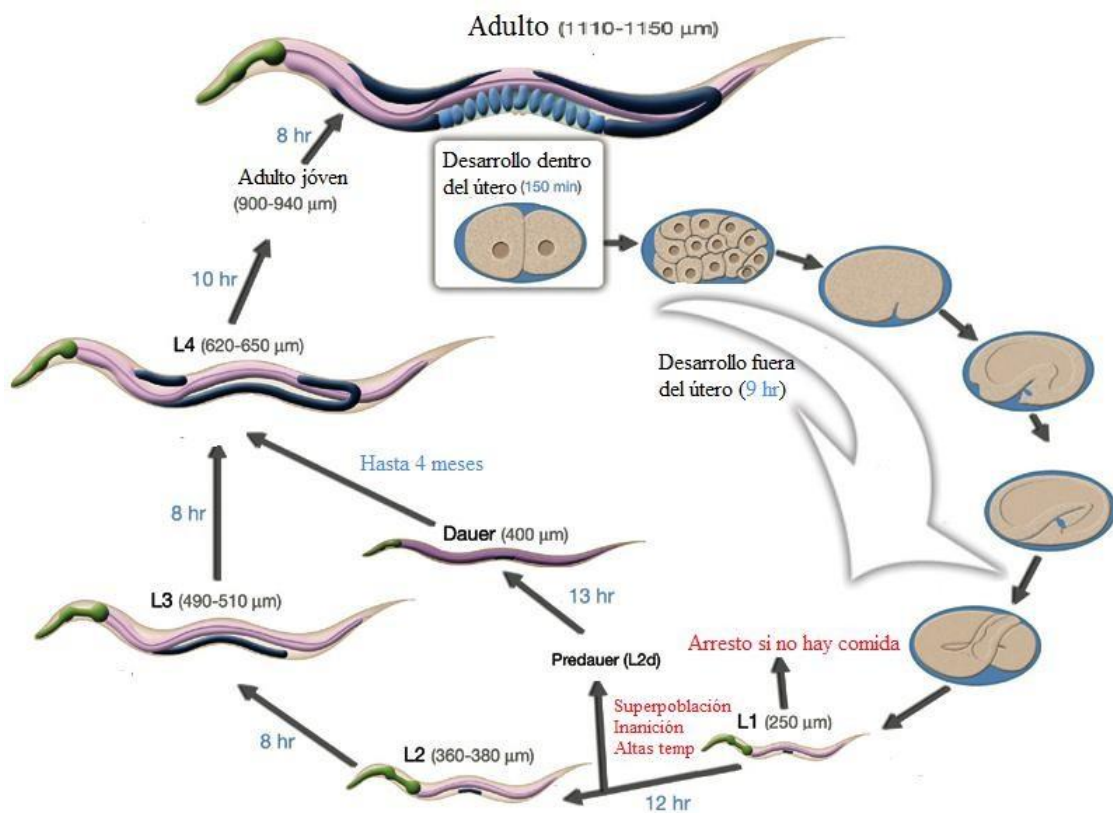


Figura 1.2: Ciclo de vida de un hermafrodita a 22°C. Arriba se muestra un hermafrodita adulto con desarrollo de embriones en su interior. Una vez que estos embriones poseen entre 28 y 30 células, son depositados en el medio y continúan su desarrollo. Cuando la embriogénesis se completa, eclosionan larvas L1 y comienzan a desarrollarse en presencia de fuentes nutricionales adecuadas. El nematodo atraviesa los cuatro estadios larvales hasta que alcanza la adultez. Nótese el aumento de tamaño de la gónada en estas etapas, que se encuentra coloreada en azul oscuro (ciclo de vida reproductivo). Pevio al estadio L2, si las condiciones nutricionales son pobres o si la densidad poblacional es alta o la temperatura elevada, los gusanos ingresarán en el ciclo de vida alternativo *dauer*, permaneciendo en este estadio hasta que las condiciones mejoren. El tamaño de los animales en cada etapa se indica entre

paréntesis, y el tiempo estimado que dura cada una se indica sobre las flechas. Imagen adaptada de WormAtlas (www.wormatlas.org).

1.1.3 Regulación del ciclo de vida de *C. elegans*

Uno de los principales reguladores del ciclo de vida es el receptor nuclear DAF-12. Este receptor regula el avance desde el estadio L2 a L3 y media la opción entre el ciclo alternativo de la larva dauer o el desarrollo reproductivo [8]. Una de las evidencias que apoya la hipótesis de que los ligandos de DAF-12 son derivados del colesterol, es que *C. elegans* es auxótrofo para colesterol, y la falta de este esteroide en su dieta conduce al arresto larval [9]. Se ha propuesto que el colesterol se convierte a través de vías biosintéticas ramificadas, denominadas ramas D-7 y D-4, en los dos ácidos dafacrónicos (ADs). Ambas ramas convergen en la enzima DAF-9 que cataliza el último paso de la conversión del colesterol a AD [10]. Esta enzima se expresa en un par de células neuroendocrinas llamadas XXX, en el sincitio hipodérmico y la espermateca de los gusanos hermafroditas [23] [24].

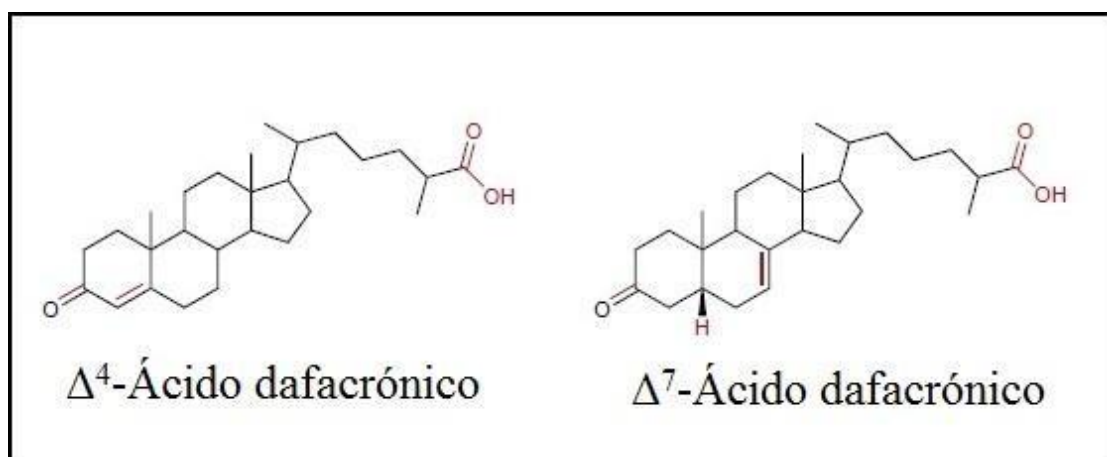


Figura 1.3: Estructura de los Ácidos Dafacrónicos. Adaptado de Antebi (2013) [18].

Un análisis genético y molecular de los genes *daf* reveló que estos genes comprenden una red endócrina convergente en DAF-12, que funciona como un interruptor decidiendo entre el desarrollo reproductivo y el arresto dauer (Fig 1.4) [6]. Las señales ambientales son detectadas por las anfidas, neuronas sensoriales ciliadas, que se encuentran en la parte posterior del nematodo y son traducidas a través de las guanilil ciclasas y otras vías de traducción de señales, como la señalización serotoninérgica. Estas vías a su vez afectan dos vías endocrinas principales, DAF-7 y la vía de señalización de DAF-2, que regulan la señal de transducción esteroide de DAF-12 [6]. En condiciones de crecimiento favorables, hormonas insulinas y DAF-7 son producidas

y secretadas desde las neuronas sensoriales, activando sus respectivas vías de transducción de señales en los tejidos blanco [6].

El receptor DAF-12 se encuentra en el núcleo de todas las células del cuerpo de *C. elegans*, pero los genes biosintéticos de la hormona AD se expresan en tejidos esteroideogénicos específicos. Debido a esto, se supone que el colesterol debe ser movilizado desde las reservas presentes en el gusano, hasta los lugares de síntesis de AD y, por último, esta hormona debe ser distribuida a todas las células del cuerpo del nematodo para interactuar con el receptor DAF-12. Cuando las condiciones de crecimiento son favorables y ocurre la interacción entre el receptor nuclear DAF-12 y AD, el receptor nuclear no puede unirse al factor DIN-1, de esta forma no se activan los genes involucrados en el desarrollo dauer y el nematodo prosigue por el ciclo de vida reproductivo.

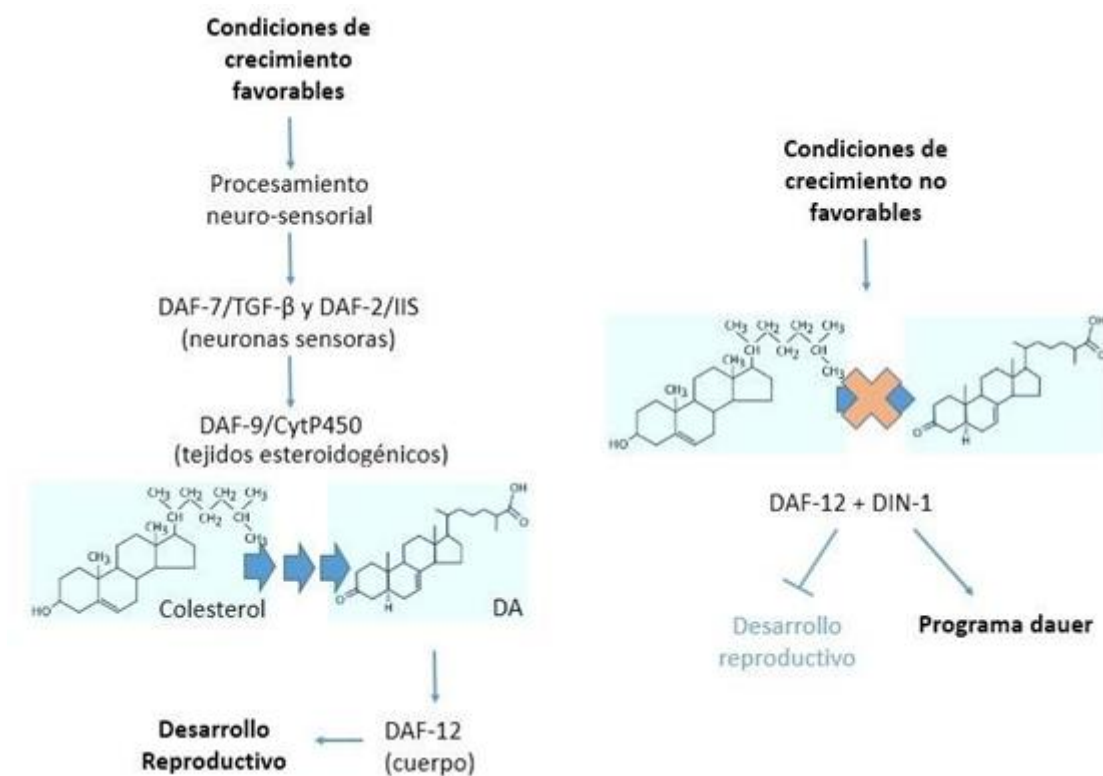


Figura 1.4: Esquema de los principales pasos involucrados en las vías de transducción de señales implicadas en el desarrollo reproductivo (ver texto para mayor detalle).

1.2 Autofagia

1.2.1 El proceso autofágico

Uno de los factores que ayuda a mantener la homeostasis celular es el equilibrio entre la síntesis y la degradación de proteínas. Desde que se descubrió la ubiquitinación, las proteínas de vida corta fueron un objeto de estudio muy relevante. Sin embargo, más del 99% de las proteínas celulares son de vida relativamente larga. La vida media de las proteínas puede consistir en unos pocos minutos a más de diez días. Usualmente, una proteína de vida larga es aquella con una vida media de más de cinco horas [11]. La mayor parte de estas proteínas son degradadas en un compartimento lítico, como son el lisosoma o la vacuola. La macroautofagia, o solamente autofagia, es la ruta principal por la cual el citoplasma celular es secuestrado en un compartimento lítico, por una “membrana de aislamiento” (Fig 1.5). Esto resulta en la formación de una estructura de doble membrana llamada autofagosoma (Fig 1.5), que eventualmente se fusiona con el lisosoma o la vacuola para ser degradado (Fig 1.5). En mamíferos, la autofagia es inducida por la falta de nutrientes como el nitrógeno, el carbono, el sulfato o el fosfato [11].

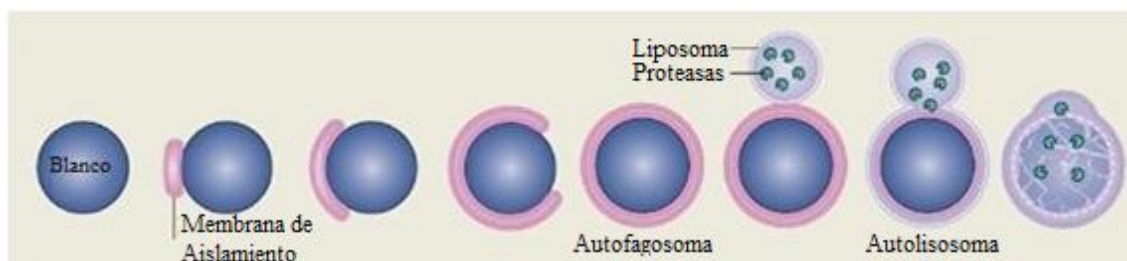


Figura 1.5: La vía autofágica conlleva cuatro etapas: nucleación, expansión, maduración y degradación. La nucleación ocurre en respuesta a una señal transmitida corriente abajo de un estrés celular, causando que la membrana de aislamiento comience a crecer. La expansión de esta membrana le permite secuestrar un contenido citoplasmático específico. La expansión se completa cuando la membrana se cierra para formar una vesícula de doble membrana o autofagosoma. La maduración comienza por la fusión con compartimentos endocíticos, que pueden ser endosomas tempranos, cuerpos multivesiculares, endosomas tardíos y lisosomas. Esta fusión crea un anfisoma, el cual madura y su lumen se acidifica, lo que lleva a la formación de un autolisosoma, en el cual el contenido secuestrado es degradado y reciclado nuevamente al citosol. Adaptado de Lamb y colaboradores [12].

Los primeros estudios de autofagia fueron realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde el compartimento lítico es la vacuola. En la levadura, la depleción de

nutrientes desencadena una reorganización de las membranas indicando que la autofagia es una respuesta general contra estas circunstancias adversas. Las vacuolas de las levaduras tienen un lumen ácido que contiene enzimas hidrolíticas. Mediante la utilización de microscopios ópticos se pudieron determinar las diferentes estructuras involucradas en este mecanismo de degradación, como la estructura pre-autosomal y el autofagosoma (Fig 1.5) [11]. El proceso completo en levaduras es topológicamente el mismo que la macroautofagia en mamíferos, con la salvedad de que, en estos últimos, el autofagosoma se fusiona a un lisosoma, u otros endosomas, para formar una estructura nueva denominada autolisosoma [13].

A partir de estudios genéticos en levaduras, se descubrieron más de treinta proteínas involucradas en la vía autofágica, denominadas ATG (por “autophagy”). ATG8 es la más conservada, entre las diferentes especies de eucariotas, de todas las proteínas ATG. Mientras que en levaduras consiste en un solo gen, en eucariotas avanzados consiste en una familia de multigenes.

1.2.2 Tipos de autofagia

Hay tres vías principales de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. Estas tres vías, representadas en la figura 1.6, son constitutivamente activas, pueden ocurrir a niveles basales y también pueden ser reguladas por estrés celular [14].

La macroautofagia es la más importante de todas ellas y es la comúnmente llamada autofagia. Se inicia cuando el material a ser removido se marca con diferentes proteínas autofágicas, ATG. Esta señal desencadena eventos moleculares complejos que llevan a la formación de una doble membrana alrededor del material a ser removido y reciclado, conduciendo a los eventos representados en la figura 1.5. La macroautofagia puede remover y reciclar proteínas mutadas o con radicales libres, y también agregados proteicos [14]. Cuando por macroautofagia se digieren mitocondrias dañadas, se denomina a este tipo especial de autofagia, mitofagia [14]. Las mitocondrias son los sitios esenciales para la producción de energía aeróbica en células eucariotas. Las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son un sub producto inevitable del metabolismo mitocondrial y pueden causar mutaciones en el ADN mitocondrial y disfunción. El daño mitocondrial también puede llevar a enfermedades, por lo que el mantenimiento de una población sana de mitocondrias es esencial para el

bienestar de las células [14]. Por su parte, la microautofagia consiste esencialmente en la invaginación de la membrana lisosomal y no requiere la formación de una doble membrana autofagosomal [14]. Finalmente, la autofagia mediada por chaperonas es un mecanismo específico de autofagia que se encuentra en los eucariotas superiores y requiere que las proteínas a degradar sean desplegadas por chaperonas y de esta manera puedan entrar al lisosoma. Vale la pena mencionar que debido a que los agregados proteicos no pueden ser desplegados por chaperonas, esta vía es incapaz de eliminarlos, por lo que la macroautofagia pasa a ser la vía más importante para prevenir enfermedades como el Parkinson, Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas asociadas con la acumulación de agregados de proteínas [14].

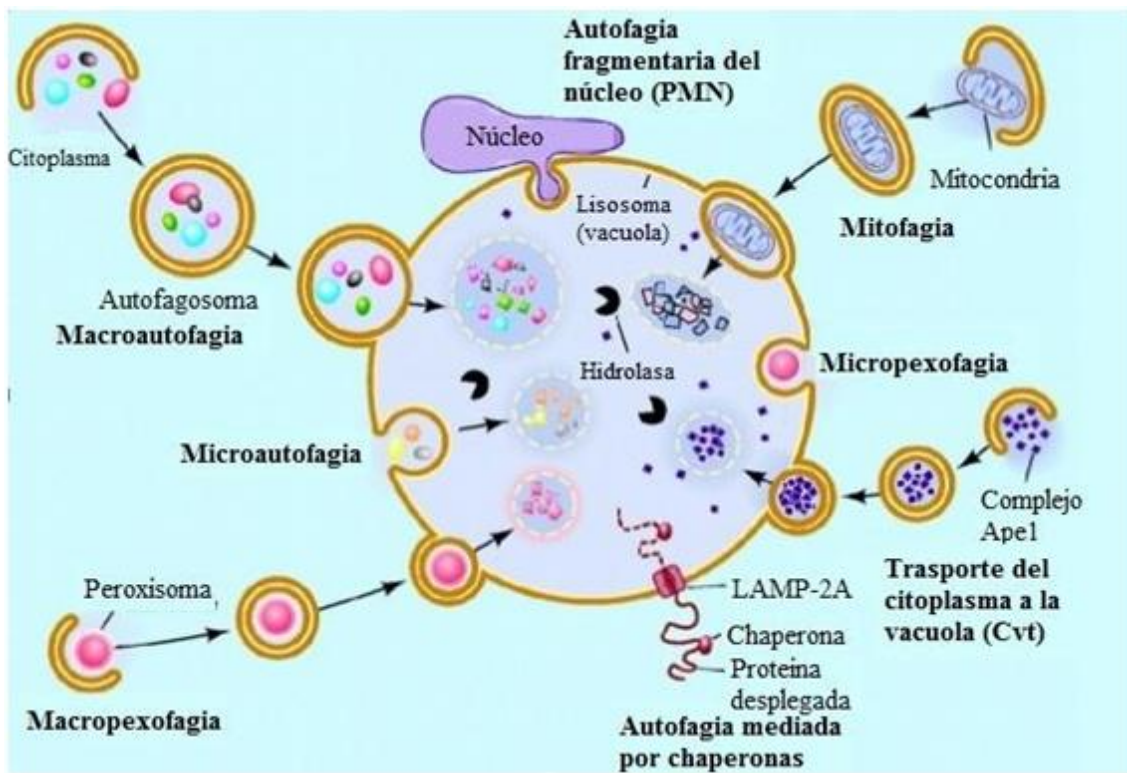


Figura 1.6: Tipos de autofagia. Adaptado de Watson y colaboradores [14] (ver texto para mayor detalle).

Otras organelas celulares también pueden experimentar macroautofagia, como el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi o peroxisomas (micro y macropexofagia). Incluso parte del núcleo celular también puede someterse a la autofagia, lo que se llama microautofagia fragmentaria del núcleo, o PMN por sus siglas en inglés [14].

1.2.3 El rol de la autofagia

La autofagia fue inicialmente reconocida como una respuesta celular al estrés, pero en la actualidad se sabe que el sistema opera continuamente a niveles basales. Juega un rol esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular y, además, participa en una gran variedad de procesos, como la diferenciación celular y la embriogénesis, que requieren de la eliminación de determinadas fracciones citoplasmáticas. La rápida inducción de la autofagia en respuesta a diferentes tipos de estrés es la verdadera razón de su función citoprotectiva y la capacidad de contrarrestar las lesiones celulares y muchas enfermedades asociadas con el envejecimiento [15]. Debido a que la desregulación del flujo autofágico está directa o indirectamente relacionada con un amplio espectro de enfermedades humanas, la autofagia es de particular interés como blanco para la intervención terapéutica. Una importante y pionera idea sobre el rol de la autofagia en las enfermedades viene de la observación de que Beclin-1, el producto del gen BECN1 está mutado en gran porcentaje de mujeres que padecen cáncer de mamas y ovarios. BECN1 es homólogo al ATG6 (ver tabla 1.1) de levaduras que regula la iniciación de la autofagia [16].

La autofagia no solo es importante para el recambio de proteínas, sino también, es central como mecanismo de supervivencia durante la inanición. Además, numerosos estudios posteriores revelan otras funciones de la autofagia, como ser la eliminación de agregados tóxicos de proteínas que se forman por un mal plegamiento de las mismas [17]. Su desregulación se encuentra también asociada a enfermedades neurodegenerativas y de inmunidad comprometida, siendo el rol de la autofagia diferente en cada enfermedad [18].

1.2.4 Autofagia en *C. elegans*

La conservación evolutiva de los genes de autofagia entre la levadura y *C. elegans* permitió la identificación de genes que codifican para los componentes centrales de la maquinaria autofágica en el gusano, a partir de estudios de homología de secuencias entre los genomas [19]. En la siguiente tabla se detallan algunos de los genes más importantes en *C. elegans* y sus homólogos en levaduras y mamíferos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Genes de autofagia en *C. elegans*, y homólogos. Adaptado de Chen y colaboradores [20].

Genes de <i>C. elegans</i>	Homólogos en mamíferos	Genes de levaduras
<i>atg-2</i>	<i>ATG2</i>	<i>ATG2</i>
<i>atg-3</i>	<i>ATG3</i>	<i>ATG3</i>
<i>atg-10</i>	<i>ATG10</i>	<i>ATG10</i>
<i>atg-16.1</i>	<i>ATG16L1</i>	<i>ATG16</i>
<i>atg-16.2</i>	<i>ATG16L2</i>	
<i>bec-1</i>	<i>BECN1</i>	<i>VSP30/ATG6</i>
<i>epg-1</i>	<i>KIA A0652</i>	<i>ATG13</i>
<i>epg-2</i>	?	<i>VSP34</i>
<i>epg-3</i>	<i>VPM1</i>	<i>VSP34</i>
<i>epg-4</i>	<i>EI24</i>	<i>VSP34</i>
<i>epg-5</i>	<i>EPG5</i>	<i>VSP34</i>
<i>let-363</i>	<i>TOR</i>	
<i>lgg-1</i>	<i>GABARAP</i>	<i>ATG8</i>
<i>lgg-2</i>	<i>LC3</i>	<i>ATG8</i>
<i>sqst-1</i>	<i>SQSTM1/p62</i>	
<i>vsp-34</i>	<i>VSP34</i>	<i>VSP34</i>

Las similitudes entre las proteínas autofágicas de *S. cerevisiae*, mamíferos y *C. elegans* sugieren que los mecanismos moleculares de la formación del autofagosoma podrían estar conservados. Los genes identificados en *C. elegans* que no tienen ortólogos en levaduras podrían indicar que la autofagia involucra una dinámica de membrana más compleja en los eucariotas superiores [19].

1.2.5 La autofagia en el desarrollo y envejecimiento de *C. elegans*

Diferentes estudios indican que la autofagia está involucrada en el desarrollo de *C. elegans*. Por un lado, se demostró la importancia de la misma durante los estadios tempranos de desarrollo del gusano, debido a que la inactivación de los genes de autofagia disminuye la supervivencia de las larvas L1 que se encuentran en inanición [19]. Además, como se mencionó anteriormente, *C. elegans* puede entrar en un estadio alternativo de desarrollo cuando las condiciones del ambiente no son favorables para su crecimiento, denominado arresto dauer y se observó que la autofagia también tiene un rol central en la correcta morfogénesis de la larva dauer [21]. Adicionalmente, la autofagia es inducida directamente después de la fecundación para la eliminación de organelas específicas del espermatozoide, incluyendo a las mitocondrias parentales. Por último, la autofagia está involucrada en la muerte celular en el nematodo. Si bien la

autofagia está relacionada al mantenimiento de la homeostasis como un mecanismo de supervivencia, un exceso en la misma puede llevar a la destrucción de las células. La autofagia es también requerida para la necrosis, un tipo de muerte celular caracterizada por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Además, se demostró que la autofagia es necesaria para promover la degradación por apoptosis [19].

1.2.6 El metabolismo del colesterol y su relación con la autofagia

Existen diferentes evidencias que indican que el metabolismo de colesterol ejerce una influencia decisiva sobre el proceso de autofagia. Si bien inicialmente en mamíferos modelos se encontró que la depleción de colesterol induce la autofagia [22], más adelante se postuló que fallas en el transporte intracelular de colesterol provocan un bloqueo en el flujo autofágico, que conduce a la acumulación de autofagosomas, lo cual inicialmente se había interpretado erróneamente como un incremento en el flujo autofágico [23]. Esto se atribuiría a que la falta de colesterol provoca la disrupción de las balsas lipídicas de membrana, por supresión de mTOR, lo que lleva a la inducción de la autofagia [22]. Además, se ha descrito que la proteína ORP1L, de mamíferos, es capaz de censar la cantidad de colesterol en lisosomas/endosomas tardíos. Cuando los niveles del mismo son altos, los autofagosomas son transportados a la región perinuclear donde se promueve su fusión con los lisosomas para generar autolisosomas y llevar a cabo el paso final del proceso de autofagia. Ante la falta de colesterol, el transporte de los autofagosomas no se promueve y los mismos se acumulan, dándose el bloqueo del flujo autofágico en este paso final del mismo [24]. En *C. elegans* en particular, donde está determinado que la autofagia es crucial para la correcta morfogénesis de la larva dauer [21] y donde se ha demostrado que el hambreado de colesterol conduce al arresto dauer de determinadas mutantes [25] aún no existen estudios que exploren el efecto de la depleción de colesterol sobre la actividad autofágica del nematodo.

1.2.7 Endocannabinoides y autofagia

En los seres humanos, el Sistema Endocanabinoide (ECS) tiene un rol vital manteniendo los niveles de lípidos dentro de los parámetros normales. Cuando el ECS se desregula puede llevar a la obesidad y otras enfermedades metabólicas [26]. El ECS actúa sobre distintos tejidos favoreciendo la incorporación de lípidos: en el sistema nervioso autónomo promueve la ingesta de alimentos, en especial los que resulten

sabrosos, mientras que en el sistema nervioso periférico disminuye el uso de lípidos como fuente de energía. También activa el sistema sensorial, en particular el del olfato y el del gusto. En el tracto gastrointestinal induce la preferencia e ingesta de grasas [26]. Todos estos efectos son mediados por la unión de las moléculas de endocannabinoides (ECs) a sus receptores, CB1 y CB2, los cuales se encuentran distribuidos por los diferentes tejidos del cuerpo humano [27]. A su vez, en los últimos años ha habido un aumento en las investigaciones que relacionan al metabolismo lipídico con el fenómeno de autofagia [28], si bien hasta el momento no ha sido estudiado si el ECS influye sobre el flujo autofágico. Además, la autofagia facilita la degradación de lípidos en ciertos tejidos, como el hígado, a través de un mecanismo que involucra lipasas localizadas en el autofagosoma o en el lisosoma. En contraste, la autofagia también es capaz de promover el almacenamiento lipídico afectando la diferenciación celular en tejido adiposo [29].

Naturalmente, una de las condiciones por las que la autofagia se induce en diferentes organismos es por restricción dietaria. Está demostrado que en respuesta a la restricción alimenticia *C. elegans* es capaz de inducir la expresión de LIPL-4, una lipasa que proporciona al nematodo ácidos grasos poliinsaturados en ω -6 (ω -6-PUFAS) [30]. Un ejemplo de ω -6-PUFA es el ácido araquidónico (AA) que es el precursor de los ECs en *C. elegans*, aunque todavía persiste el interrogante sobre si los ECs ejercen alguna influencia sobre el contenido de grasas y/o la autofagia en el nematodo.

1.3 Rol de los endocannabinoides en el metabolismo del colesterol

La primera evidencia de la presencia de ECs en *C. elegans*, vino dada por el trabajo realizado por Lehtonen y colaboradores [31], donde determinaron por espectrometría de masas que el nematodo *C. elegans* posee de manera endógena los ECs 2-araquidonil glicerol (2AG) y anandamida (AEA). Luego, recientes estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio comprobaron que la ausencia de ECs produce un aumento del fenotipo dauer en las dobles mutantes *daf-7; fat-3* y *daf-7;fat-4*, cepas mutantes que fueron construidas en el laboratorio, que se caracterizan por ser incapaces de producir AA del cual derivan los ECs. El fenotipo dauer en esta condición puede ser revertido con el agregado exógeno de los ECs [25].

Como se comentó anteriormente, la movilización del colesterol, desde las reservas intracelulares hasta los tejidos esteroideogénicos donde ocurre la síntesis del AD, es esencial para el desarrollo reproductivo del nematodo. En este sentido, además de los hallazgos mencionados, Galles y colaboradores [25] proponen a los ECs como posibles mediadores en el tráfico de colesterol. Si bien estos estudios postulan a diferentes compuestos lipídicos con capacidad para movilizar el colesterol en *C. elegans*, hasta el presente, el o los mecanismos por los cuales, los ECs, llevan a cabo esta tarea continúan siendo desconocidos.

1.4 Suplementación dietaria con aceite de kril y su posible relación con el metabolismo del colesterol y los endocannabinoides

Como se mencionó anteriormente los ECs se encuentran relacionados con la movilización de las reservas de colesterol en el nematodo *C.elegans*. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que la presencia de determinados ECs, como el 2AG y AEA, son capaces de rescatar el fenotipo dauer que se desarrolla en las dobles mutantes *daf-7; fat-3* y *daf-7;fat-4*. Se sabe que estas cepas presentan deficiencias en el transporte de colesterol, por lo cual exhiben un elevado porcentaje de dauers [25].

Por otra parte, en los mamíferos los ECs forman parte de un sistema de señalización celular llamado sistema endocanabinoide (ECS), y se vio que desregulaciones del mismo pueden llevar a distintos desordenes metabólicos, entre ellos, la obesidad. Estudios recientes sobre el ECS en ratas obesas, alimentadas con una dieta rica en ácidos grasos, llevados a cabo por Piscitelli y col (2011), evidencian que los desórdenes metabólicos que presentan las ratas se deben a un aumento de los niveles de ECs en los tejidos periféricos, lo que produce una sobre-activación de los receptores CB1 en el organismo. Entre los desórdenes mencionados, se encuentra el aumento de la biosíntesis lipídica en el hígado pero en este órgano, a diferencia del resto, los niveles de 2AG y AEA disminuyen con la dieta rica en grasas. Piscitelli y col (2011), utilizaron aceite de kril como suplemento dietario para evaluar su influencia sobre los niveles de ECs en las ratas obesas. Uno de los hallazgos reportados muestra que los niveles de ECs se restablecen con el aceite de kril en los distintos tejidos del roedor. [32]

El aceite de kril se obtiene de pequeños crustáceos que habitan en las aguas del océano antártico, que son el alimento por excelencia de las ballenas. El aceite contiene una mezcla de lípidos rica en ácidos grasos omega-3 como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el 2-docosahexaenoico (DHT). Es relevante el alto contenido del antioxidante astaxantina que presenta el aceite de kril. Esta molécula es un carotenoide que se encuentra también presente en langostas y camarones, siendo el principal responsable de la coloración rosácea que presentan estos organismos. Recientes estudios han demostrado las propiedades beneficiosas de este antioxidante para la salud. Por ejemplo, mantiene la presión sanguínea en niveles saludables, promueve el bienestar celular y contribuye al funcionamiento cerebral normal. Debido a los efectos que posee el aceite de kril sobre las funciones cardíacas y cognitivas, en los últimos años ha vuelto muy popular su utilización como suplemento dietario [33].

En este trabajo de tesina se estudió el efecto del aceite de kril sobre el metabolismo del colesterol y los ECs en *C. elegans*. Para este fin se utilizó la cepa *daf-7;fat-4* encontrándose que el aceite de kril contiene compuestos que disminuyen el porcentaje de dauers, lo que implicaría que estos compuestos restablecen el transporte de colesterol de manera tal que aumentan su biodisponibilidad en los tejidos esteroideogénicos.

Objetivos

2.1 Objetivo General

Uno de los objetivos centrales de este trabajo es dilucidar la relación existente entre la autofagia y el metabolismo del colesterol en *C. elegans*. Otro de los objetivos es la búsqueda de compuestos en el aceite de kril, que influyan sobre el metabolismo del colesterol evaluado como inhibidor de la formación de dauers en *C. elegans*.

2.3 Objetivos particulares

1. Poner a punto una técnica de Western Blot que es indicadora del flujo autofágico.
2. Establecer cómo influye la disponibilidad de colesterol sobre la autofagia en los diferentes tejidos del nematodo empleando dos estrategias metodológicas complementarias.
3. Estudiar la posible conexión entre los endocannabinoides y la autofagia en el nematodo.
4. Buscar compuestos presentes en el aceite de kril, relacionados al metabolismo de colesterol, que produzcan una disminución en la formación de dauers en la doble mutante *daf-7;fat-4*.

Materiales y Métodos

3.1 Cepas

3.1.1 Cepas de *C. elegans*

Las cepas de *C. elegans* utilizadas en este estudio se detallan en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1: Cepas utilizadas en el presente trabajo de Tesina. Todas obtenidas del CGC (*Caenorhabditis Genetics Center*) excepto las cepas MAH215 y *daf-7;fat-4*. La primera fue amablemente cedida por la Dra. Malene Hansen del instituto Sanford Burnham Prebys – Medical Discovery Institute; La Jolla, California, EE. UU. La segunda fue construida en nuestro laboratorio.

**Roller*: Mutante con movilidad afectada que provoca que el cuerpo del gusano rote alrededor de su eje longitudinal mientras se mueve. Este efecto fuerza al animal a avanzar en forma circular [37].

Cepa	Genotipo	Fenotipo relevante
N2 Bristol	Salvaje	Salvaje [34]
MAH215	<i>sqIs11</i> [<i>lgg-1p::mCherry::GFP::lgg-1 + rol-6</i>]	Reportera de autofagia (ubicua) <i>Roller*</i> . [35]
DLM1	<i>ttTi5605 II; unc-119(ed3) III; uwaEx1</i> [<i>eft-3p::CERULEAN-VENUS::lgg-1 + unc-119(+)</i>]	Reportera de autofagia (ubicua). [36]
DLM5	<i>ttTi5605 II; unc-119(ed3) III; uwaEx1</i> [<i>dpy-7p::CERULEAN-VENUS::lgg-1 +unc-119(+)</i>]	Reportera de autofagia (hipodermis). [36]
<i>daf-7;fat-4</i>	<i>daf-7(e1372) III/fat-4(wa14) IV</i>	Forma constitutivamente dauers, sensible a la temperatura. Mutante en la desaturasa $\Delta 5$ de ácidos grasos. [25]

3.1.1.1 Conservación de las cepas de gusanos

Las diferentes cepas de gusanos fueron congeladas y almacenadas a -80°C en tubos crioviales al 20% (p/v) de glicerol estéril (solución de “Freezing”) a partir de una placa con el alimento agotado donde predominan estadios L1 y L2 (más resistentes al congelado y posterior descongelado).

3.1.1.2 Solución de “Freezing”

NaCl 1M 100 ml

Buffer fosfato 1M (pH= 6) 50 ml

Glicerol 300 ml

H₂O csp 1L

Autoclavar y agregar 30 μl de MgSO₄ 1M.

3.1.2 Cepas de *E. coli*

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este estudio se detallan en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2: Cepas utilizadas en el presente trabajo de Tesina. Str^r denota casete de resistencia a estreptomycin.

Cepa	Características relevantes	Referencias
OP50	Auxótrofa para Uracilo, Str ^r Protótrofa	Brenner, 1974 [34]
NA22		Schachat y col., 1978 [38]

3.1.2.1 Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas de interés fueron congeladas y almacenadas a -80°C en tubos crioviales al 20% (p/v) de glicerol estéril a partir de un cultivo crecido durante toda la noche.

3.2 Medios y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas fueron cultivadas a 37°C en medio LB líquido con agitación o bien en medio LB sólido. La cepa NA22 luego se concentró 20 veces, mientras que la cepa OP50 se concentró 10 veces para ser utilizada como alimento para los gusanos.

Los gusanos fueron crecidos en medio NGM, suplementado con colesterol 5 µg ml⁻¹ y crecidos a las temperaturas de 15°C, 20°C o 25°C, según sea el ensayo. Como fuente de alimento se utilizaron las cepas bacterianas mencionadas en la **tabla 3.2**.

A continuación, se describe la composición de los medios utilizados.

Medio LB [39]:

Peptona de caseína	1% (p/v)
NaCl	1% (p/v)
Extracto de Levadura	0,5 % (p/v)

Medio utilizado para el crecimiento de *C. elegans* (NGM) [34]:

NaCl	0,3 % (p/v)
Agar	1,7 % (p/v)
Peptona	0,25 % (p/v)

Luego de autoclavar se agrega:

Colesterol	5 µg ml ⁻¹
MgSO ₄	1 mM
Solución fosfato pH 6 1M	25 mM
Anfotericina B	1mM

Solución fosfato pH 6 1M [39], por litro:

K ₂ HPO ₄	35,6 g
KH ₂ PO ₄	108,3 g

Ajustar el pH a 6 con KOH concentrado.

Sales M9 1X, por litro:

KH ₂ PO ₄	3g
Na ₂ HPO ₄	6g
NaCl	5g
H ₂ O	1000 ml

Después de autoclavar agregar:

MgSO ₄ 1M	1ml
----------------------	-----

Para obtener medios sólidos a partir de estos medios líquidos, agregar agar 1,5% (p/v).

3.3 Sincronización de poblaciones mediante obtención de embriones de

C. elegans

Para aislar los huevos de una determinada población de gusanos, se utilizó una técnica de blanqueamiento que emplea NaOCl, también conocida como “*Bleaching*”. Para ello se lavó una placa de NGM conteniendo una población mixta de gusanos con (10-15) ml de sales M9 1X, y se recolectó el material en un tubo Falcon estéril de 15 ml. Se centrifugó 2 min a 2000 *x g* y luego se descartó el sobrenadante. Se agregó entre 1 y 2,5 ml de solución blanqueadora [lavandina –NaOCl- (10 ml), NaOH 1M (25 ml), H₂O (15 ml)] al *pellet* (10 veces el volumen del mismo) y se incubó de 2 a 5 min con constante agitación para favorecer la lisis de los gusanos. La reacción se detuvo con el agregado de 15 ml de sales M9 1X. Se volvió a centrifugar por 2 min a 2000 *x g*, se descartó el sobrenadante y se lavó nuevamente con sales M9 1X. Estos pasos se repitieron hasta que se logró la eliminación de la solución blanqueadora. El *pellet* final se rediluyó en 50 o 100 µl de sales M9 1X.

3.4 Ensayos de formación de dauers

Para la realización de los distintos ensayos se procedió de la siguiente manera: 24 horas previas al inicio del ensayo, se obtuvieron los embriones de la cepa *daf-7;fat-4* (ver tabla 3.1) y los mismos se incubaron a la temperatura apropiada durante toda la noche en sales M9, sincronizándose los gusanos en estadio L1 por hambreado. Los ensayos se realizaron en placas de 6 pocillos a las cuales se les agregó 3 ml por pocillo de NGM agar debidamente suplementado con las sales correspondientes y colesterol. A modo de alimento para los nematodos, se colocaron 100 µl de la cepa bacteriana a usar para el ensayo junto con los distintos aditivos o compuestos a analizar. En el caso de las fracciones obtenidas del aceite de kril se adicionaron 30 µl de cada una de las respectivas fracciones por placa.

Por último, se agregaron entre 80-100 gusanos sincronizados por pocillo, que se incubaron a la temperatura necesaria para cada ensayo.

3.5 Ensayo de hambreado de colesterol

Para obtener condiciones libres de esteroides, se utilizó agarosa ultra pura en lugar de agar en la formulación del medio NGM. Para ello, la agarosa se lavó tres veces con cloroformo para eliminar posibles trazas de esteroides. Se mantuvo sin alteración la composición salina del medio NGM. Como fuente de alimento, se creció durante toda la noche a la bacteria *E. coli* NA22 en el medio MEM (GIBCO), libre de esteroides. Posteriormente, el cultivo bacteriano se concentró 20 veces. Luego, se dejaron eclosionar los embriones en las sales de M9 1X para garantizar que no estuvieran en contacto con esteroides. Al llegar al estadio L1, los gusanos se sembraron en las placas NGM/NA22, con el agregado de ECs o solvente. Luego de 72 horas se cuantificó el porcentaje de dauers.

3.6 Tratamiento con cloroquina

Se adaptó el procedimiento de Palmissano y col, 2017 [40]. Las placas sin colesterol utilizadas en el ensayo de autofagia sembradas con *E. coli* NA22 fueron expuestas a UV durante 15 min. Se tomó esta precaución para asegurar que la bacteria no alterara la estructura de la droga. Estas placas fueron luego suplementadas con cloroquina 30 mM

(Sigma-Aldrich) o H₂O destilada estéril como control. Una vez que la placa se secó se transfirieron a la misma las larvas L1 ya sincronizadas.

3.7 Observación bajo la lupa

Todas las observaciones se realizaron en una lupa Olympus MVX10 con aumentos variables hasta 63X. Las fotos fueron tomadas con una cámara Olympus DP72.

3.8 Observación al microscopio

3.8.1 Preparación de muestras para microscopía

Se colocaron 500 μ l de agarosa caliente al 2 % (p/v) en M9 1X suplementada con azida de sodio 30 mM en el centro de un portaobjeto y a continuación se presionó perpendicularmente con otro portaobjeto de manera de generar una lámina de agarosa de 0,5 mm de espesor aproximadamente (“*pad*”). La utilización de azida sódica permite la observación de los nematodos ya que los mata sin alterar sus estructuras internas. Una vez solidificada la agarosa se coloca una gota de (10-15) μ l de M9 1X, sobre la superficie de la lámina, a la cual se transfirieron los gusanos correspondientes con ayuda de un “*pick*”, que se asemeja a un ansa en hilo, con el cual se pueden ir tomando los gusanos de a uno.

3.8.2 Microscopio confocal

Las imágenes de los ensayos de autofagia fueron realizadas con el microscopio confocal Carl Zeiss LSM880, con objetivo 63X en aceite de inmersión y con un zoom de 2X y 3X. Se usó una apertura numérica de 1.4 y la longitud de onda utilizada fue $\lambda = (490-570)$ nm, con láser 488 nm al 10% de potencia. La resolución lateral fue de (512x512) píxeles. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el software FIJI.

3.9 Ensayo de autofagia utilizando microscopia confocal de fluorescencia

Los ensayos para observar autofagia se realizan de la misma manera que el ensayo de hambreado de colesterol mencionado anteriormente (3.5), pero en este caso se utilizan cepas reporteras de autofagia, que expresan a la proteína LGG-1 fusionada a GFP y mCherry bajo el control del promotor de *lgg-1* (MAH215, ver tabla 3.1), para su observación al microscopio confocal. En el microscopio se procede a tomar imágenes de células de la hipodermis del gusano denominadas *seam cells*, involucradas en el desarrollo dauer y que se hacen visibles en el estadio elegido. En esas células particulares se observa el patrón de expresión de las proteínas GFP y mCherry en forma de focos de fluorescencia amarillos, señalando la formación de autofagosomas y a la proteína mCherry en forma de focos de fluorescencia rojos indicando la formación de autolisosomas. La cuantificación se llevó a cabo empleando el software FIJI contando la cantidad de los distintos focos presentes por célula.

3.10 Western Blot

3.10.1 Protocolo

A continuación se describe el protocolo final resultante de la puesta a punto del mismo durante este trabajo de tesina.

Se adaptó el protocolo de Chapin y col (2015) [36], se recolectan los gusanos de las cepas DLM1 o DLM5 (tabla 3.1) en M9 1X de la placa de NGM suplementada con *E. coli* NA22 (ver tabla 3.2), se los transfiere a un eppendorf de 1,5 ml para congelarlos en N₂ (l). Luego se le añade un volumen igual al del pellet de gusanos de solución de siembra Laemmli 2X. Se los hierve a 95 °C durante 5 minutos y se los congela en N₂ líquido, se repite el proceso 3 veces. Se clarifica durante 5 minutos a 8000 g. Luego se siembran las muestras en un gel de poliacrilamida (gel de corrida al 12 % “*running*” y gel de concentración al 5 % “*stacking*”), la corrida electroforética se realiza a 130 V utilizándose solución amortiguadora. A continuación se transfiere, durante toda la noche a 25 mA, a una membrana de nitrocelulosa, utilizándose solución de transferencia, en la cámara fría (4°C). Luego de finalizada la transferencia, se retira la membrana de la

celda de transferencia, se la lava 3 veces con T-TBS. Seguidamente se la cubre con una solución de Rojo Ponceaus 1X de manera tal de evidenciar que la transferencia haya sido efectiva. Una vez corroborado lo mencionado anteriormente, se retira la solución de Rojo de Ponceaus y se lava la membrana tres veces con solución de T-TBS. Posteriormente se procede a incubar con la solución de bloqueo (leche 5 % p/v T-TBS), una vez realizado el bloqueo se hacen tres lavados de 10 minutos con T-TBS y agitación. Se incuba con el anticuerpo primario anti GFP (1/1000) durante una hora a temperatura ambiente. Se hacen otros tres lavados de 10 minutos con T-TBS y agitación. Se incuba con el anticuerpo secundario *anti-mouse* conjugado con HRP (1/5000) durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se repiten los tres lavados con T-TBS y se revela la membrana con kit enzimático quimio luminiscente HRP.

Solución de siembra Laemmli

Glicerol	5% (v/v)
SDS	2% (p/v)
β-mercaptoetanol	0,1% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,1 mg/ml

Solución amortiguadora

Tris	0,3 % (p/v)
Glicina	1,44 % (p/v)
SDS	0,1 % (p/v)

Solución de transferencia 1X

Tris glicina (10 X)	100 ml
Metanol	200 ml
H ₂ O	csp 1000 ml

TT- TBS

Tris	10 mM (pH= 7,5)
NaCl	150 mM

Tween 0, 05 % (v/v)

Tritón 0, 2 % (v/ v)

Rojo Ponceaus (10X)

Ácido Tricloroacético 30g

Ácido sulfosalicílico 30g

H₂O csp 100 ml

3.10.2 Protocolo de Normalización de la cantidad de proteínas de las muestras

Este procedimiento se lleva a cabo previo a realizar la siembra de las muestras en el gel de poliacrilamida utilizado para WB. De manera tal de poder sembrar cantidades similares de proteínas que permitan realizar la comparación de los resultados luego, dado que las condiciones de extracción de proteínas empleadas en este trabajo no permiten medir la concentración de las mismas previo a realizar la siembra.

Se realiza la siembra de diferentes volúmenes (5, 10, 15 y 20 μ l) de las muestras a analizar en un gel de poliacrilamida diferente al utilizado para la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa. Se procede a realizar la electroforesis en las mismas condiciones que la electroforesis del gel utilizado para la transferencia de proteínas en WB. Finalizada la corrida electroforética, se retira el gel de la cuba de electroforesis y se lo tiñe con el colorante Azul Brillante de Coomassie R250 1% [etanol: ácido acético: agua (50:10:40)]. Posteriormente se escanea el mismo y la imagen obtenida se analiza con un programa informático para análisis de geles (GelAnalyzer). Este programa informático permite comparar la intensidad de determinadas bandas en un gel de poliacrilamida. Seguidamente, se selecciona una banda presente en todas las calles sembradas y se relativizan sus intensidades a la intensidad de la banda presente en aquella calle donde la intensidad es menor que la del resto. Este procedimiento permite relativizar las cantidades de proteínas entre las diferentes muestras pero no determinar su concentración de proteínas totales.

3.10.3 Protocolo de remoción de anticuerpos

Se calientan 10- 15 ml de la solución para la remoción de anticuerpos a 60 °C, bajo campana y al momento de usar, se añaden 74 μ l β -mercaptoetanol cada 10 ml de

solución para remover anticuerpos. Luego se adiciona la solución a la membrana y se coloca en agitación pareja en todas las calles. Se procede a realizar 10 lavados de 1 minuto con H₂O destilada y dos con T-TBS de 10 minutos. Finalmente se vuelve a bloquear y se repite la incubación con los anticuerpos deseados.

Solución para remover anticuerpos

Tris	62.5 mM
SDS	2% (p/v)

La solución debe tener pH= 6,5

3.11 Protocolo de extracción de lípidos totales por método de FOLCH

A la muestra se le agregan:

MeOH	1,3 ml
Cloroformo	2,6 ml
KCl (0,5 M)	1,3 ml
BHT (1000X)	5 µl

Luego, se sonica en baño con hielo durante 15 minutos, después se lleva al vórtex durante dos minutos. Posteriormente se centrifuga por otros dos minutos, se obtienen dos fases, una inferior con cloroformo y otra superior con metanol. Se toma la fase inferior, que es la que contiene los lípidos y finalmente se la seca en una atmosfera de N₂.

En este trabajo la muestra empleada para la extracción de lípidos fue el aceite de kril de la especie *Euphausia superba*. El aceite de kril de esta especie se obtuvo de cápsulas del mismo comercializadas por la empresa PHYTOMED [41].

3.12 Protocolo para fraccionamiento de lípidos

Se utiliza una columna de sílica empacada con 500 mg de la misma, de la marca BondElut (Agilent Technologies). Se equilibra la columna con 100 ml de una mezcla

cloroformo: metanol (24:1). Luego se coloca 1 ml la muestra y se realizan los siguientes lavados:

Lavado 1: 50 ml cloroformo: metanol (24:1)

Lavado 2: 30 ml cloroformo: metanol: NH₃ 32% (60:35:5)

Lavado 3: 15 ml cloroformo: metanol: NH₃ 32% (60:35:5)

Lavado 4: 40 ml metanol puro.

Se colectan cada una de las fracciones en tubos diferentes y luego se las seca en atmósfera de N₂. Finalmente se las rediluye en 50 µl de hexano.

3.13 Protocolo para realizar cromatografía en capa delgada (TLC)

Se utilizan placas de sílica de 10 cm x 10 cm y sobre ellas se marcan las calles dejando 1 cm por debajo de la línea de siembra. Se calienta la sílica a 90 °C durante 30 - 45 minutos, se procede a sembrar sobre la placa las diferentes muestras. Se siembra un volumen total de 35 µl de cada muestra, sembrándose en alícuotas de 5 µl, se espera a que se evapore el solvente y se vuelve a sembrar. Posteriormente se coloca en la cuba suficiente cantidad de la mezcla de solventes de corrida, de manera tal que el volumen utilizado alcance, aproximadamente, 1 cm de altura desde el fondo de la cuba. Se introduce la placa de sílica dentro de la cuba y se deja correr la siembra hasta que el frente de solvente haya alcanzado casi el final de la placa. Se seca a 160 °C durante 5 minutos para evaporar los solventes y se rocía con el revelador (Cu fosfórico). Se procede a quemar la placa en la estufa a 180°C

Mezcla de solventes de corrida

hexano: dietil éter: ácido acético (75:25:1).

3.14 Ensayos estadísticos

Los datos fueron analizados mediante el programa computacional SigmaPlot 12.0 (www.sigmaplot.co.uk). En el mismo se realizaron ensayos utilizando los métodos Holm-Sidak y Mann-Whitney para observar diferencias estadísticamente significativas, según correspondiera.

Resultados

4.1 CAPITULO 1: “Rol del colesterol sobre la autofagia en *C. elegans*”

La autofagia es un proceso celular catabólico en el cuál varios componentes del citosol son degradados. Por ejemplo, la autofagia puede mediar la lipólisis de lípidos neutros en las gotas de grasa (“lipids droplets”) [29]. En contraste ha sido reportado que la vía autofágica es requerida para la acumulación de lípidos neutros en *C. elegans* [29]. Por lo tanto, los genes involucrados en la autofagia desempeñan un rol complejo en el metabolismo lipídico, ya que ellos contribuyen tanto a la acumulación como degradación de lípidos. Sin embargo, ha sido muy poco explorado como la carencia de lípidos influye en el proceso de autofagia. Como fue comentado en la introducción las hormonas esteroideas tales como el ácido dafacrónico tienen un rol crucial en el ciclo de vida de *C. elegans*. Teniendo en cuenta que el colesterol es el precursor del ácido dafacrónico y que la autofagia es esencial para la correcta morfogénesis en *C. elegans*, en esta tesina decidimos estudiar la influencia de colesterol en el proceso de autofagia.

4.1.1 Determinación de actividad autofágica en condiciones de hambreado de colesterol mediante ensayos de Western Blot

Con el fin de determinar si existe una relación entre el metabolismo del colesterol y la autofagia en el nematodo *C. elegans* se emplearon ensayos de hambreado de colesterol seguidos por análisis de Western Blot. Para tales ensayos se empleó la cepa DLM1, que como se detalla en la sección Materiales y Métodos, es una cepa que expresa ubicuamente una construcción transgénica de la proteína LGG1 de *C. elegans* (homóloga a ATG-8 de levadura/LC3 de humanos) fusionada a dos copias de la proteína fluorescente verde GFP, bajo el promotor de LGG1. La forma lipídica de esta proteína se localiza en la membrana de los autofagosomas y autolisosomas. Inicialmente LGG1 se integra en las membranas nacientes de los autofagosomas, de las cuales es un componente activo. Luego de que esta estructura se fusiona con un lisosoma en el

citoplasma celular, la proteína LGG1 se transforma en un miembro constitutivo de los autolisosomas. La cepa reportera permite el seguimiento del proceso debido a que la proteína de fusión que expresa atraviesa diferentes estados a lo largo del flujo autofágico, que se identifican como bandas que corresponden a distintos pesos moleculares en las membranas de inmunoblot [36]. Al principio, cuando la fusión transcripcional se encuentra en los autofagosomas, ambas copias de la GFP se hayan intactas fusionadas a LGG1. A medida que los autofagosomas se transforman en autolisosomas y se ponen en contacto con las enzimas hidrolíticas que se hallaban en los lisosomas los segmentos conectores, que unen a las GFP entre sí y con LGG1, se clivan. La proteólisis lisososomal no afecta a los monómeros de las proteínas fluorescentes debido a que se encuentran estrechamente plegadas y son resistentes al mencionado proceso. Esta característica de las GFPs permite que se encuentren disponibles en configuraciones distintas que, a su vez, se condicen con bandas de pesos moleculares diferenciales reconocibles en un ensayo de Western Blot cuando se las incuba con anticuerpo monoclonal específico anti- GFP. En estos ensayos, la fusión traduccional LGG1-GFP-GFP exhibe una banda de aproximadamente 70 kDa y el monómero libre de GFP exhibe una banda de aproximadamente 27 kDa. (Fig 4.1)

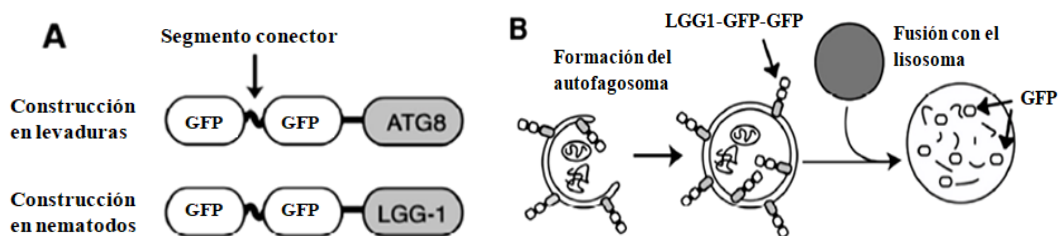


Figura 4.1: A) Se muestran las construcciones de las fusiones traducionales que portan las cepas de nematodos *C. elegans* (DLM1) y la misma fusión en levaduras. En tal construcción se aprecia a la proteína LGG1 fusionada con dos copias en tándem de GFP unidas por el segmento conector flexible sensible a la acción de las proteasas lisosomales. B) Se esquematiza brevemente una porción del flujo autofágico, donde se aprecia la ruptura del conector flexible y la liberación de los monómeros de GFP. Adaptado de Chapin y col (2015) [36].

4.1.1.1 Puesta a punto del protocolo de Western Blot

Considerando lo mencionado anteriormente, se llevaron a cabo ensayos de hambreado de colesterol para los cuales se hicieron crecer gusanos DLM1 en placas de NGM suplementadas con *E. coli* OP50 como alimento. Cuando la placa contaba con un número considerable de gusanos adultos con huevos en su interior, se obtuvieron los

embriones por el tratamiento con NaOCl, con el fin de sincronizar los gusanos para iniciar el experimento en las condiciones deseadas. Los huevos obtenidos se dejaron eclosionar toda la noche en medio mínimo líquido M9, al día siguiente se los transfirió a placas de agarosa libre de colesterol (ver Materiales y Métodos) en dos condiciones, una suplementada con colesterol a una concentración final de 5 mg/ ml y otra suplementada con etanol absoluto, solvente en el cuál se haya disuelto el *stock* de colesterol.

Luego de transcurridas 80 horas, se recolectaron en M9 1000 nematodos pertenecientes a cada condición, en presencia y ausencia de colesterol. Los gusanos fueron procesados según el protocolo de Chapin y col (2015) [36], detallado en la sección Materiales y Métodos. Posteriormente las muestras fueron sembradas en las distintas calles del gel de poliacrilamida. Seguidamente se realizó la transferencia durante toda la noche a 4°C, se bloqueó en solución de leche disuelta en T-TBS y se incubó con el anticuerpo primario anti- GFP en una dilución 1/200, y con el anticuerpo secundario *anti-mouse* conjugado con HRP en una dilución 1/5000 (figura 4.2).

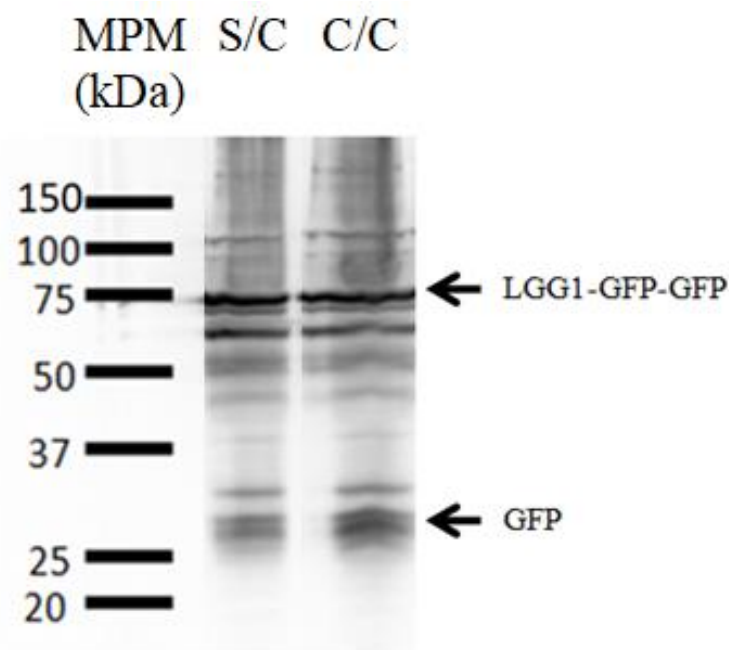


Figura 4.2: Revelado del ensayo de Western Blot donde se representan las bandas correspondientes a LGG1-GFP-GFP y a GFP, en ambas condiciones sin colesterol y con colesterol, indicadas por las siglas “S/C” y “C/C” respectivamente. Se indican con flechas las bandas correspondientes a LGG1-GFP-GFP y al monómero de GFP. El marcador de peso molecular utilizado es “all blue pre-stained” de la marca comercial BioRad y se sembró una cantidad igual a 5µL del mismo.

Como puede observarse en la figura 4.2, en ambas condiciones (en presencia y ausencia de colesterol) se evidencia un sombreado intenso característico de la presencia de proteólisis en el extracto inicial y la aparición de bandas con pesos moleculares diferentes a los esperados (70 kDa y 27 kDa). Una de las razones del marcado excesivo de las proteínas puede deberse a que la concentración del anticuerpo primario no es la adecuada, lo cual podría llevar a inespecificidad en la unión del mismo. Otra de las causas del efecto mencionado podría ser que se sembró demasiada proteína en las distintas calles.

En primera instancia se decidió disminuir la concentración del anticuerpo primario anti-GFP, para hallar la concentración óptima del mismo que permita obtener imágenes más claras. Para lograr lo mencionado anteriormente, se procedió a realizar un proceso de remoción de anticuerpos sobre la membrana de nitrocelulosa. Este proceso permite remover los anticuerpos adheridos sobre las proteínas en la membrana y de esta forma volver a incubar la membrana con nuevos anticuerpos o con los mismos pero en concentraciones diferentes. Como se muestra en la figura 4.3, se incubó la membrana, nuevamente empleando, el protocolo utilizado anteriormente pero empleando una dilución 1/1000 del anticuerpo primario, 4 veces más diluido que al comienzo.

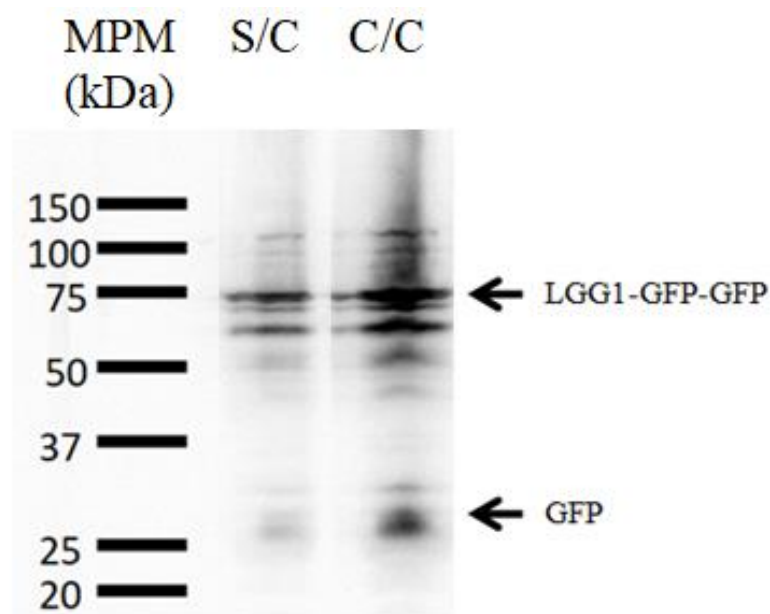


Figura 4.3: Misma membrana que la de la figura 4.2 pero con una dilución 1/1000 del anticuerpo primario anti- GFP. La sigla “S/C” indica condición sin colesterol y “C/C” condición con colesterol. Se indican con flechas las bandas correspondientes a LGG1-GFP-GFP y al monómero de GFP. El marcador

de peso molecular utilizado es “all blue pre-stained” de la marca comercial BioRad y se sembró una cantidad igual a 5µL del mismo.

El experimento ilustrado en la figura 4.3 muestra una disminución del excesivo marcado de proteínas en el revelado, tras volver a incubar con el anticuerpo anti-GFP, evidenciando una imagen más clara. Sin embargo, se siguen observando bandas que poseen pesos moleculares diferentes a los de la construcción LGG1-GFP-GFP (~70 kDa) y el monómero de GFP libre (~27 kDa), figura 4.3.

Es importante remarcar que las condiciones empleadas para la extracción de proteínas, no permiten medir la concentración de proteínas de las muestras, previo a realizar la siembra de las mismas en los geles de poliacrilamida. Esto es debido a que los gusanos se lisan en la solución de siembra Laemmli que posee SDS, azul de bromofenol y agentes reductores, mediante ciclos sucesivos de calentamiento y congelamiento en N₂ líquido. Como los métodos que se disponen para medir proteínas en solución se basan en ensayos colorimétricos, la presencia del colorante azul de bromofenol, SDS y agentes reductores afectarían las mediciones que tienen que ser efectuadas para determinar la concentración de las proteínas totales. Tales condiciones de trabajo implican una baja reproducibilidad de los experimentos dado que no se puede saber con seguridad con qué cantidad de proteínas se llevan a cabo los ensayos.

Debido a que no se puede determinar la concentración de proteínas previo a la siembra en el gel de poliacrilamida, se procedió a determinar la cantidad de extracto óptima que permitiera evidenciar el flujo autofágico en presencia y ausencia de colesterol. Con el objetivo de lograr lo mencionado anteriormente, se sembraron en el gel de poliacrilamida SDS-PAGE diferentes volúmenes de los extractos de gusanos crecidos con y sin colesterol 5, 10, 15 y 20 µl. También se sembró una muestra proveniente de extracto proteico de la cepa salvaje de *C. elegans* (N2), para evidenciar inespecificidad en la unión del anticuerpo a proteínas que no son necesariamente GFP. Luego de la corrida electroforética se realizó la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, se bloqueó en solución de leche en T-TBS y se incubó la membrana con la dilución 1/1000 del anticuerpo primario anti-GFP y 1/5000 del secundario *anti-mouse* conjugado con HRP, sucesivamente. El resultado del análisis se muestra en la figura 4.4, donde solo se representan las calles correspondientes a las condiciones de 15 µl. Se decidió representar la calle correspondiente a 15 µl debido a que presentaba una cantidad de proteínas óptima para revelado enzimático. Las calles que poseían una cantidad de

extracto inferior mostraban una señal muy tenue, mientras que la que correspondía a 20 μ l tenía una alta concentración de proteínas. Esta elevada cantidad de proteínas produce una saturación de la membrana al momento del revelado enzimático, por lo cual tras los primeros segundos de exposición en el transiluminador ya se genera una señal muy intensa que implica saturación de la calle. La saturación es un factor que, en la medida de lo posible, debe ser evitado, porque puede llevar a concluir erróneamente acerca de los resultados.

Posteriormente se removieron los anticuerpos de la membrana, con el fin de efectuar un control de carga del ensayo, y se volvió a incubar a la membrana con un anticuerpo anti-actina en una dilución de 1/10000 y con anticuerpo secundario *anti-rabbit* en una dilución 1/5000, el resultado del revelado se visualiza en la figura 4.4.

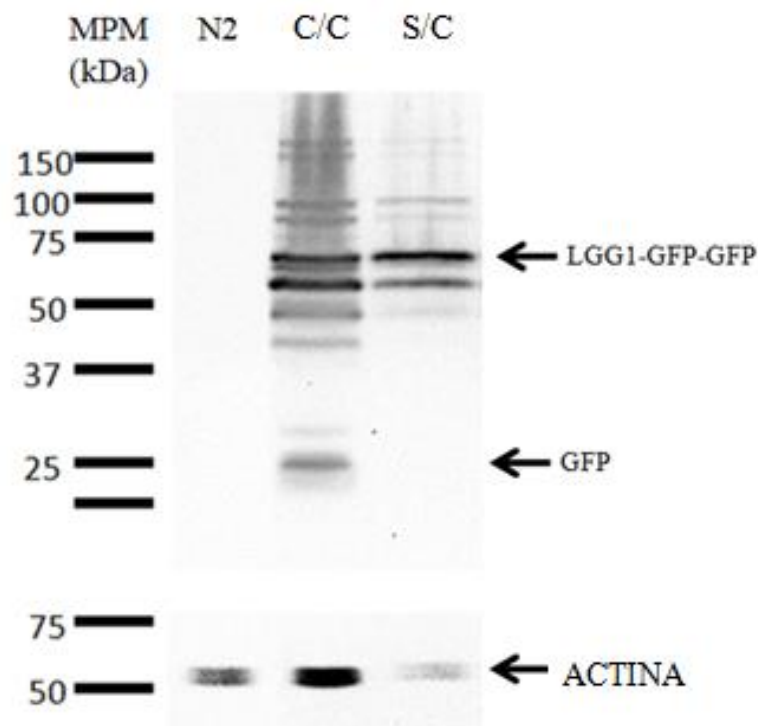


Figura 4.4: Se muestran las calles correspondientes a 15 μ l de las condiciones con y sin colesterol, “C/C” y “S/C”, respectivamente. La sigla N2 denota la calle donde se sembró el extracto de proteínas proveniente de la cepa salvaje N2 que no posee la construcción LGG1-GFP-GFP. Se indican con flechas las bandas correspondientes a LGG1-GFP-GFP, al monómero de GFP y al control de carga con actina. El marcador de peso molecular utilizado es “all blue pre-stained” de la marca comercial BioRad y se sembró una cantidad igual a 5 μ L del mismo.

Como se mencionó anteriormente, una de las causas de la inespecificidad observada en el revelado del ensayo de Western Blot representado en la figura 4.4, podría haber sido

el hecho de que el anticuerpo anti-GFP se una de manera inespecífica a otras proteínas que no necesariamente sean GFP. Este factor fue descartado, dado que la calle correspondiente a la cepa salvaje N2 no presenta ninguna banda de reconocimiento.

El análisis de los resultados de este último experimento muestra que a pesar de sembrar la misma cantidad de extracto en ambas condiciones, claramente eso no se condice con la cantidad de proteínas totales, que se evidencian en el control de carga con actina. Es importante resaltar que a pesar de recolectar 1000 gusanos de cada condición, en presencia y ausencia de colesterol, y procesarlos de la misma forma, la cantidad de proteínas en ambas condiciones es diferente. Esta particularidad podría deberse al hecho de que los gusanos se desarrollan mejor con colesterol presente en el medio donde se encuentran creciendo. Cuando se observan los gusanos en la placa, aquellos que crecen en el medio con presencia de colesterol tienen un tamaño ligeramente mayor a sus pares que crecen en el medio sin el estero. Esta sutil diferencia de tamaño podría llevar a confusiones a la hora de determinar el estadio de crecimiento en el cuál se encuentran los nematodos, sin embargo, el estadio no se define exclusivamente en función del tamaño. Una de las características que permite evidenciar el estado adulto, en el cual se recolectan los gusanos luego de transcurridas 80 horas, es la formación de la vulva. Esta diferencia de tamaño podría explicar las cantidades de proteínas disímiles en presencia y ausencia de colesterol, evidenciadas con el control de carga con actina. Por otro lado, las mencionadas diferencias en las proteínas totales también podrían deberse a que durante el procesamiento se pierden distintas cantidades de nematodos. En este sentido, cuando se los recolecta o se los trasvasa, se produce una disminución del número de gusanos con los cuales se está trabajando, y esa disminución no necesariamente es la misma en ambas condiciones.

Los resultados obtenidos en el experimento visualizado en la figura 4.4, evidencian la presencia de bandas que aparecen a pesos moleculares no esperados, entre las bandas de 70 kDa y la de 27 kDa señaladas en la figura. Estas bandas corresponden a proteínas que poseen un tamaño inferior al de la construcción LGG1-GFP-GFP y su presencia se podría atribuir a la degradación parcial de la construcción traduccional. Además de las bandas mencionadas anteriormente, se observan bandas de pesos moleculares superiores al de LGG1-GFP-GFP, posiblemente, agregados proteicos de la misma LGG1-GFP-GFP.

Considerando lo mencionado anteriormente se refuerza la necesidad de llevar a cabo algún tipo de determinación del contenido proteico en los extractos correspondientes a las distintas condiciones, de manera tal que se pueda normalizar la cantidad de proteína entre los diferentes extractos.

Además de los factores mencionados previamente, otro que podría estar influyendo en los patrones de proteínas obtenidos es el hecho de que la cepa DLM1 expresa el arreglo extracromosomal con GFP de manera ubicua. La expresión del sistema recombinante en todo el organismo podría estar enmascarando la respuesta, dado que no todos los tejidos tienen el mismo flujo autofágico [36]. En este sentido, probablemente, variaciones en el flujo autofágico en determinadas zonas del organismo que son evidenciables se ven enmascaradas por una respuesta diferente del flujo autofágico, frente al mismo estímulo, en otros tejidos. En el trabajo de Chapin y col (2015) [36] se muestra que distintos tejidos exhiben diferentes grados de flujo autofágico. Por ejemplo, uno que presenta mayor flujo autofágico es la hipodermis en el estadio adulto. A raíz de esto, se decidió cambiar la cepa DLM1 con la cual se estaban llevando a cabo los ensayos por una nueva, DLM5. Esta nueva cepa expresa el mismo arreglo extracromosomal que DLM1 pero que se expresa solamente en la hipodermis.

Para los ensayos con DLM5 se sincronizó a los gusanos y luego de que transcurrieran 80 horas se recolectaron en M9 1000 nematodos de cada condición, en presencia y en ausencia de colesterol. Seguidamente se extrajeron las proteínas acorde al procedimiento descrito por Chapin y col (2015). Dado que este procedimiento no es apto para la cuantificación de proteínas, se realizó en paralelo la siembra de diferentes volúmenes de los extractos en un gel de poliacrilamida diferente al cual fue utilizado para la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa. Después de la electroforesis, el mencionado gel se tiñó con Coomassie Blue y se lo analizó con un programa informático para análisis de geles (GelAnalyzer), que permite comparar la intensidad de determinadas bandas en un gel de poliacrilamida. Seguidamente, se seleccionó una banda presente en todas las calles sembradas y se relativizaron sus intensidades a la intensidad de la banda presente en aquella calle donde la intensidad era menor que la del resto. Si bien, esto no permite conocer la concentración exacta de las proteínas, sí permite sembrar cantidades comparables del extracto proteico en las distintas calles. Una vez relativizadas las cantidades de proteína entre las diferentes condiciones se procedió a sembrar el gel de poliacrilamida para realizar la electroforesis

y posterior transferencia de la misma forma que se realizaron los ensayos anteriores, utilizando las mismas diluciones de los anticuerpos primario anti-GFP y secundario *anti-mouse* conjugado con HRP. El resultado del revelado de la membrana de nitrocelulosa con el kit enzimático se muestra en la figura 4.5.

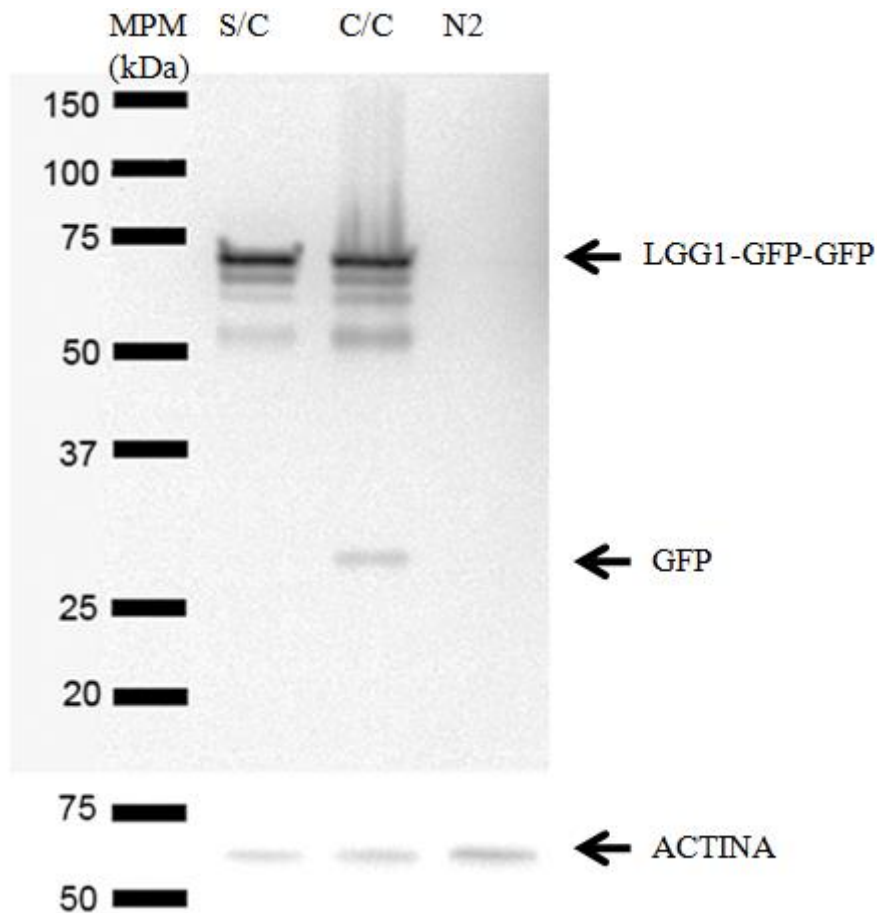


Figura 4.5: Las siglas “S/C”, “C/C” y “N2” indican las condiciones sin colesterol, con colesterol y cepa salvaje, respectivamente. Se indican con flechas las bandas correspondientes a LGG1-GFP-GFP, al monómero de GFP y al control de carga con actina. El control de carga se reveló sobre la misma membrana luego de remover al primer conjunto de anticuerpos. El marcador de peso molecular utilizado es “all blue pre-stained” de la marca comercial BioRad y se sembró una cantidad igual a 5µL del mismo.

Los resultados de este experimento muestran que en los ensayos realizados con la cepa DLM5 no se observa la degradación proteica que se observa con la cepa DLM1, se detectan un menor número de bandas correspondientes a diferentes conformaciones de GFP. Este ensayo, además, indica que la muestra proveniente de gusanos crecidos en presencia de colesterol exhibe las bandas correspondientes a LGG1-GFP-GFP y la del monómero de GFP, a diferencia de la muestra obtenida a partir de gusanos crecidos en

ausencia de colesterol que solo presenta la primera. Esto estaría sugiriendo que el flujo autofágico disminuye en ausencia del estero.

Este ensayo fue útil para determinar las condiciones experimentales empleadas en el resto del trabajo. En los siguientes experimentos de Western Blot se utilizó la cepa DLM5, se extrajeron las proteínas según protocolo de Chapin y col (2015), se realizaron geles de poliacrilamida previos para normalizar la cantidad de proteínas sembradas en las distintas condiciones, transferencia durante toda la noche a 25 mA y diluciones del anticuerpo primario anti-GFP 1/1000 y secundario *anti-mouse* conjugado con HRP 1/5000 para el revelado enzimático.

4.1.1.2 Influencia de la disponibilidad de colesterol sobre el flujo autofágico

La construcción LGG1-GFP-GFP permite evidenciar el flujo autofágico porque se presenta en diferentes conformaciones a lo largo de este. Podría decirse que la visualización de la banda correspondiente al monómero de GFP se debe a dos factores. Por un lado es necesario que se produzca la liberación del monómero de GFP del resto de la fusión traduccional y por otra parte se requiere que dicho monómero se mantenga estable dentro del autolisosoma. Si bien GFP tiene un estrecho plegamiento que le permite resistir a las enzimas hidrolíticas del autolisosoma a tiempos cortos, finalmente la proteína comienza a ser degradada por los procesos hidrolíticos propios del autolisosoma.

Con el fin de diferenciar si el hecho de no observar la banda correspondiente al monómero de GFP (27 kDa) se debe a que ésta no está siendo liberada de la construcción traduccional o a que está siendo liberada y se degrada rápidamente en el interior del autofagosoma, se procedió a realizar un experimento involucrando cloroquina, un agente que neutraliza el pH ácido del lisosoma e inhibe de este modo la actividad lisosomal [42]. Al inhibir la actividad del lisosoma, permite aumentar la ventana de tiempo en la cual se produce la degradación en su interior. Si GFP es liberada de la LGG1-GFP-GFP y se degrada rápidamente, cuando se adiciona cloroquina al medio este proceso es inhibido (por inactivación de la actividad hidrolítica del autolisosoma), por ende, ante el agregado de cloroquina, la desaparición de la banda puede atribuirse a que efectivamente GFP no está siendo liberada.

De acuerdo a lo discutido más arriba, se llevó a cabo un nuevo experimento respetando las mismas condiciones que el último realizado, con la diferencia que en este caso se

hizo un tratamiento con cloroquina. Los nematodos DLM5 fueron sincronizados mediante tratamiento con NaOCl y se los dejó eclosionar durante una noche, al día siguiente las larvas L1 fueron separadas en cuatro grupos:

- 1) Sin colesterol: No se adicionó colesterol a las placas.
- 2) Sin colesterol + Cloroquina: No se adicionó colesterol a las placas y se las suplementó con Cloroquina 30 μ M.
- 3) Con colesterol: Se adicionó colesterol a las placas.
- 4) Con colesterol + Cloroquina: Se adicionó colesterol a las placas y se las suplementó con Cloroquina 30 μ M.

Luego de que transcurrieran 80 horas se recolectaron 1000 gusanos de cada condición en M9 y se les extrajo el contenido proteico según el protocolo de Chapin y col (2015) [36]. Se realizó un gel de poliacrilamida en paralelo, al igual que en el ensayo anterior, para relativizar el contenido de proteínas de las diferentes muestras. Se procedió de igual forma que para el ensayo anterior en lo que respecta a la transferencia. Los resultados del revelado se muestran en la figura 4.6.

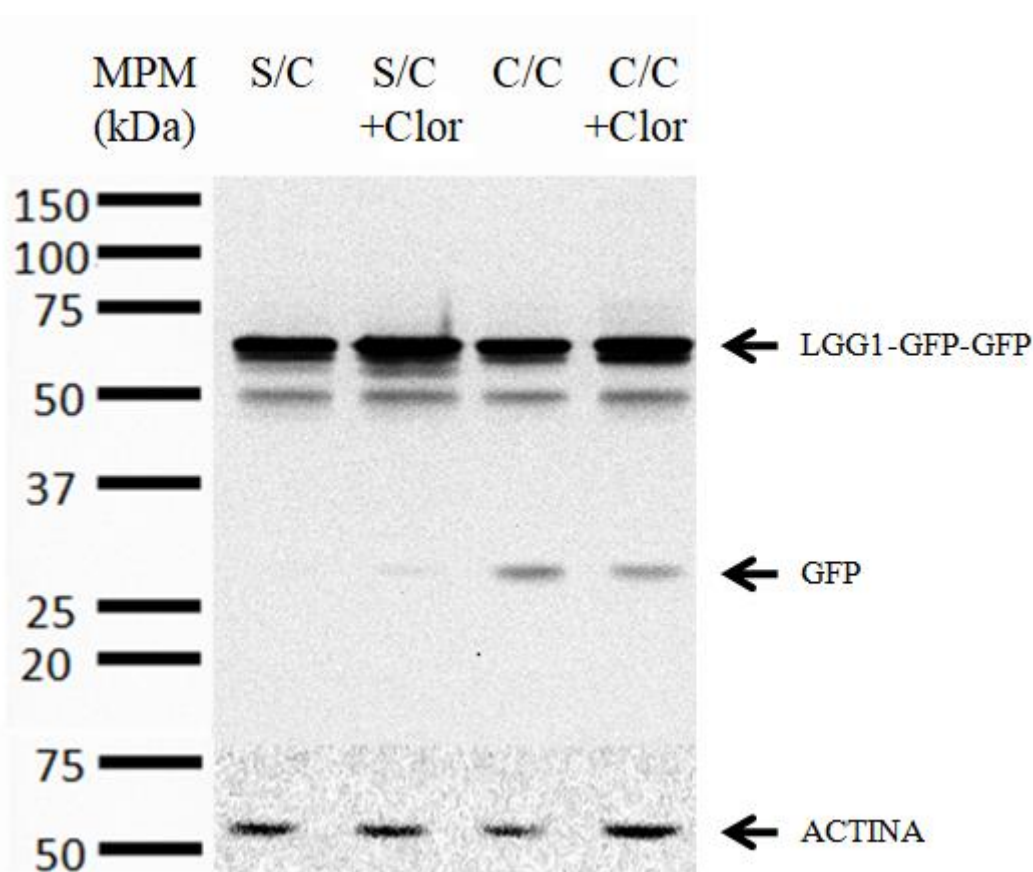


Figura 4.6: Las siglas “S/C” y “C/C” indican las condiciones sin colesterol y con colesterol respectivamente. Las siglas “+Clor” indican que a la condición se le adiciona cloroquina. Se indican con flechas las bandas correspondientes a LGG1-GFP-GFP, al monómero de GFP y al control de carga con

actina. El control de carga se reveló sobre la misma membrana luego de remover al primer conjunto de anticuerpos. El marcador de peso molecular utilizado es “all blue pre-stained” de la marca comercial BioRad y se sembró una cantidad igual a 5µL del mismo.

Los resultados obtenidos, visualizados en la figura 4.6, indican la presencia de bandas más intensas correspondientes al monómero GFP en las condiciones con colesterol y con colesterol más cloroquina. Mientras que la banda que corresponde a LGG1-GFP-GFP se observa con la misma intensidad en todas las condiciones. Estos resultados sugieren que, efectivamente, hay un aumento del flujo autofágico en presencia de colesterol comparado con el flujo autofágico sin colesterol agregado, dado que este aumento se aprecia comparando tanto las condiciones sin cloroquina, como comparando aquellas que sí la poseen.

Con el objetivo de lograr una validación de estos hallazgos se realizaron estudios de la influencia del metabolismo del colesterol sobre el flujo autofágico utilizando otro enfoque, que emplea como método de detección microscopía confocal de fluorescencia.

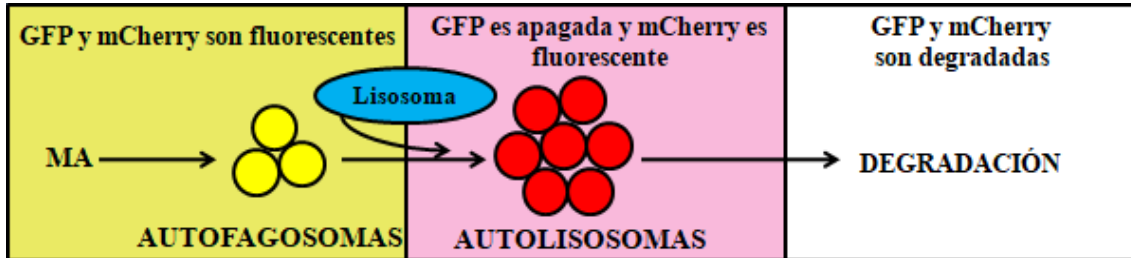
4.1.2 Determinación de actividad autofágica en condiciones de hambreado de colesterol mediante ensayos de microscopía confocal de fluorescencia

4.1.2.1 La cepa fluorescente MAH215

Para tales ensayos se empleó la cepa MAH215, que como se detalla en la sección Materiales y Métodos, es una cepa que expresa ubicuamente una construcción transgénica de la proteína LGG1 de *C. elegans* (homóloga a ATG-8 de levadura/LC3 de humanos) fusionada a una copia de la proteína fluorescente mCherry en tándem con una copia de la proteína fluorescente GFP. Esta cepa reportera permite determinar variaciones en el flujo autofágico dado que cuando los autofagosomas se fusionan con los lisosomas para dar lugar a los autolisosomas, GFP se escinde de la fusión transcripcional y la señal de fluorescencia correspondiente a esta proteína se apaga. Inicialmente cuando ambas proteínas fluorescentes se encuentran fusionadas a LGG1 y forman parte de las membranas de los autofagosomas emiten su señal, de forma que mediante microscopía confocal de fluorescencia y programas informáticos, como el software FIJI se puede apreciar a los autofagosomas como pequeños puntos amarillos en el interior de las células de *C. elegans*. Luego cuando los autofagosomas se fusionan con lisosomas para dar lugar a los autolisosomas, la señal de GFP se pierde y estas

estructuras se visualizan como puntos rojos dentro de las células del nematodo, dado que solo se emite fluorescencia desde mCherry [35]. (Fig 4.7)

A)



B)

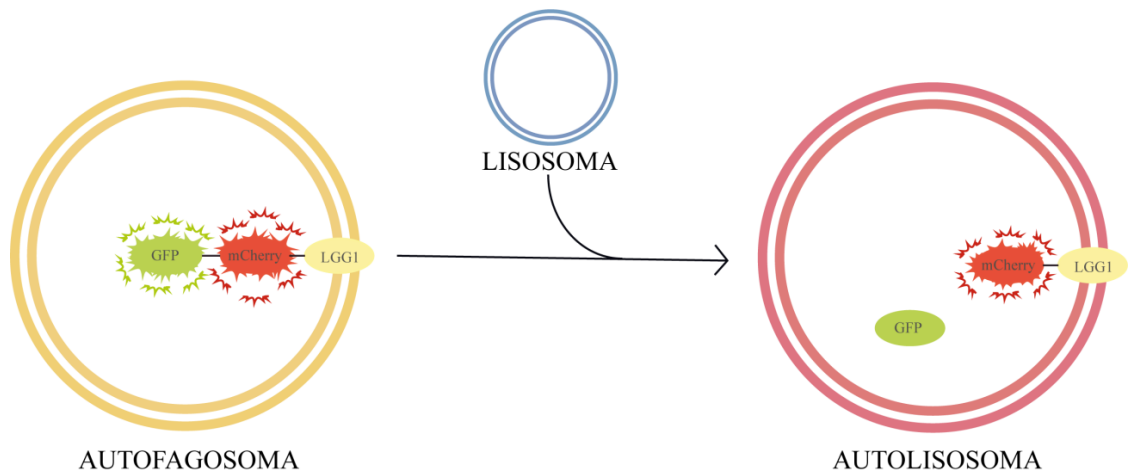


Figura 4.7: A) Esquematación de cómo se visualizan los autofagosomas y los autolisosomas a lo largo del flujo autofágico en la cepa MAH215. A partir de una membrana de aislamiento (MA) se forman los autofagosomas (amarillos), luego éstos se fusionan con los lisosomas para dar lugar a los autolisosomas (rojos). Adaptado de Hansen y col (2017) [35]. B) Se visualiza cual es el estado de la fusión traduccional en las dos estructuras, autofagosomas y autolisosomas. Inicialmente, en los autofagosomas tanto GFP como mCherry son fluorescentes, luego de la fusión con los lisosomas, la fluorescencia de GFP es apagada y solo es fluorescente mCherry, en los autolisosomas.

La observación del proceso se efectúa en las *seem cells* del gusano que son un conjunto de células hipodérmicas especializadas y que se encuentran involucradas en la morfogénesis de la larva dauer (Fig. 4.8). Mediante cuantificación posterior de los diferentes focos de fluorescencia se puede establecer la relación entre autofagosomas y autolisosomas de manera tal de poder determinar variaciones en el flujo autofágico frente a distintas condiciones.

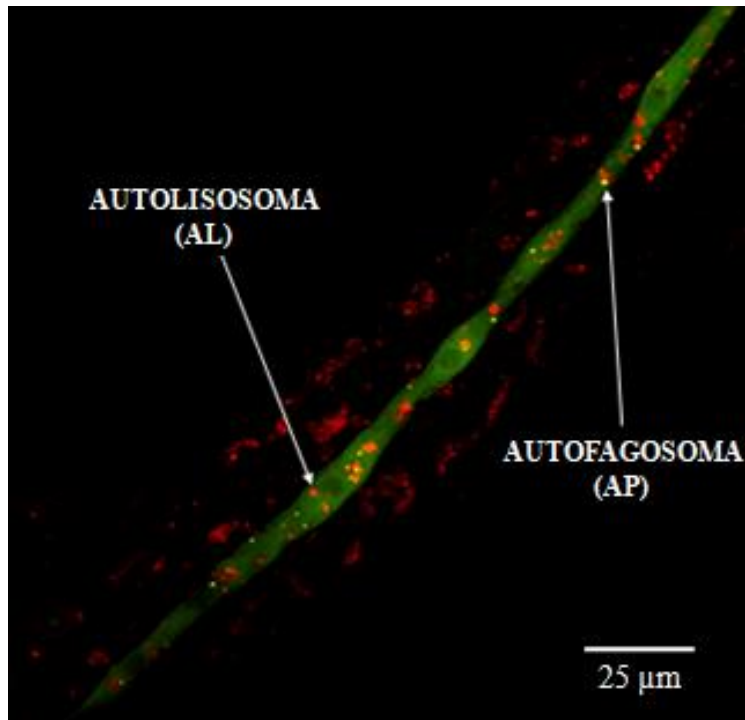


Figura 4.8: Imagen de una fotografía obtenida con el microscopio confocal de fluorescencia de un gusano perteneciente a la cepa MAH215. En la imagen se aprecia de color verde, el cordón característico que forman las *seam cells* a lo largo del organismo. Se indican con flechas blancas los autofagosomas (focos amarillos) y los autolisosomas (focos rojos).

4.1.2.2 Ensayo de hambreado de colesterol con MAH215

Para este experimento se sincronizó a una población de nematodos MAH215 y se los dividió en dos grupos, a uno se lo hizo crecer en una condición sin colesterol y al otro con colesterol. Transcurridas 80 horas, se seleccionaron varios ejemplares de cada condición y se prepararon las muestras para microscopía (ver sección Materiales y Métodos). En el microscopio confocal de fluorescencia es posible obtener capturas a distintos planos de la célula y luego apilar las mismas en una sola imagen 2D para maximizar la visualización de los focos de autofagia. Una vez que se obtienen estas fotos, se las visualiza con el software FIJI y se cuantifican los puntos fluorescentes que hay en cada célula. Se hace el recuento de los focos, donde aquellos que presentan color amarillo son considerados como autofagosomas y los que presentan color rojo se consideran como autolisosomas. Luego de contar los focos fluorescentes por gusano se calculó la relación autofagosomas/autolisosomas (AP/AL) por nematodo. Finalmente se realizó un análisis estadístico de los datos, aplicando a los mismos el método no paramétrico de Mann-Whitney. El resultado del mencionado análisis se visualiza en un diagrama de cajas (*Box Plot*) en la figura 4.9. El análisis muestra que la mediana de las

relaciones AP/AL para los gusanos crecidos en el medio con colesterol fue de 1,847 mientras que para los gusanos desarrollados en ausencia de colesterol fue de 2,778. Lo mencionado anteriormente implica que en la condición sin colesterol hay más autofagosomas por cada autolisosoma de los que hay en la condición con colesterol. Por ende, en la condición sin colesterol el flujo autofágico en las *seam cells* se encuentra disminuido con respecto a cuándo si hay colesterol.

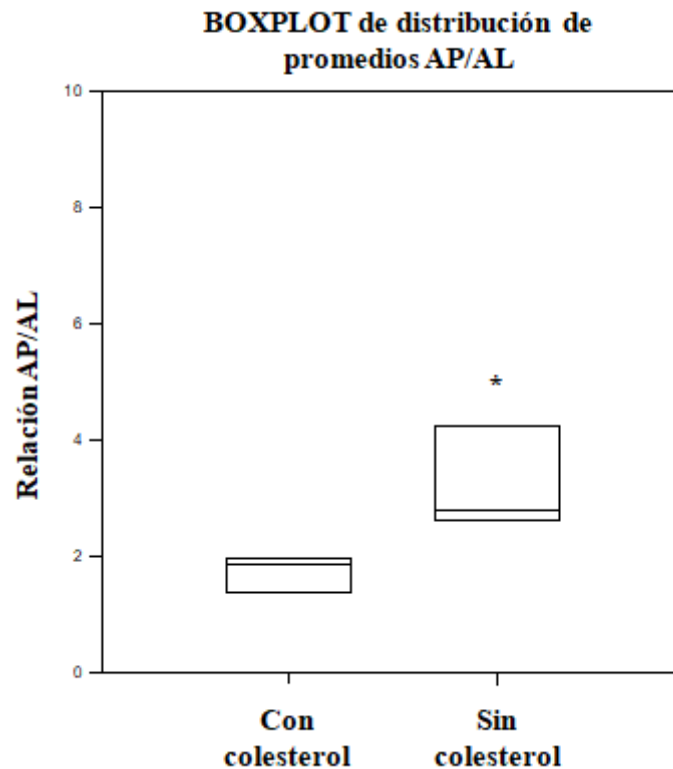


Figura 4.9: Se muestra un diagrama de cajas (*Box Plot*) de las relaciones de autofagosomas/autolisosomas (relación AP/AL) en las dos condiciones, con y sin colesterol. (*) Indica una diferencia estadísticamente significativa entre la condición “Sin colesterol” con respecto a la condición “Con colesterol”, $P = 0,002$, método de Mann-Whitney.

En la figura 4.10 se muestran dos fotografías de dos nematodos diferentes, uno que se desarrolló en el medio con la presencia de colesterol y el otro que creció en un medio donde el esterol se encontraba ausente. Las micrografías fueron obtenidas del microscopio confocal de fluorescencia y analizadas mediante el software FIJI.

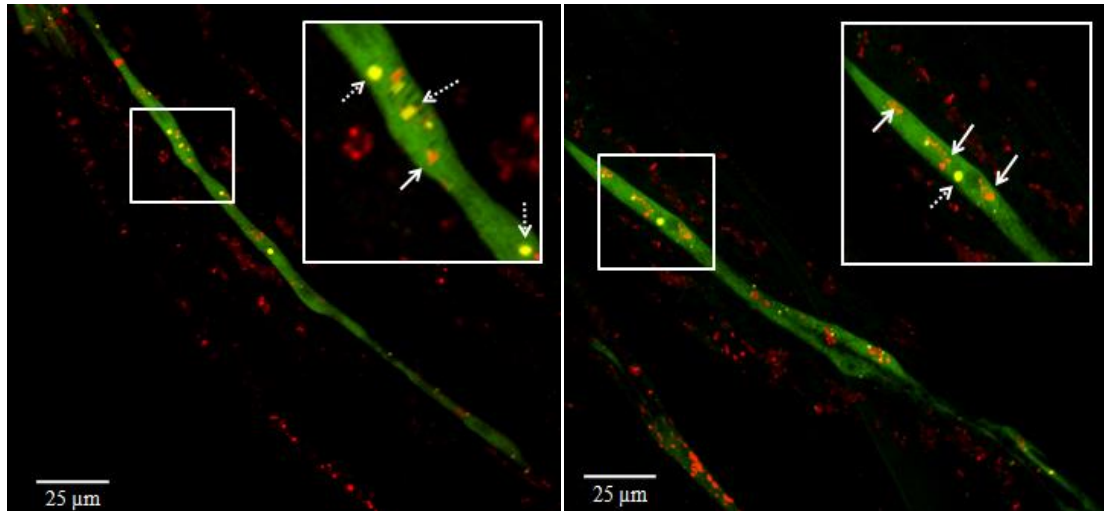


Figura 4.10: A la derecha se observa una fotografía de las *seam cells* de un gusano perteneciente a la condición con colesterol, a la izquierda se observa una fotografía de un gusano perteneciente a la condición sin colesterol. Las flechas punteadas indican los focos fluorescentes amarillos que corresponden a los autofagosomas, mientras que las flechas llenas indican los focos fluorescentes rojos correspondientes a los autolisosomas.

4.1.3 Efecto de 2AG sobre la relación entre el metabolismo del colesterol y la autofagia

Habiendo detectado por ensayos de Western Blot y de microscopía confocal de fluorescencia que la ausencia de colesterol inhibe el flujo autofágico en *C. elegans*, se decidió investigar si el EC 2AG tiene influencia en el flujo autofágico. Para estudiar este aspecto, se llevó a cabo un nuevo ensayo con el agregado de 2AG. Para este experimento los nematodos DLM5 fueron sincronizados mediante tratamiento con NaOCl y se los dejó eclosionar durante una noche, al día siguiente las larvas L1 fueron tratadas de la siguiente manera:

- 1) Sin colesterol: No se adicionó colesterol a las placas.
- 2) Sin colesterol + 2AG: No se adicionó colesterol a las placas y se las suplementó con 2AG 50 μ M.
- 3) Con colesterol: Se adicionó colesterol a las placas.
- 4) Con colesterol + 2AG: Se adicionó colesterol a las placas y se las suplementó con 2AG 50 μ M.

Luego de transcurridas 80 horas, se recolectaron 1000 gusanos de cada condición y fueron procesados según protocolo de Chapin y col (2015) [36]. Posteriormente las muestras fueron sembradas en un gel de poliacrilamida para la corrida electroforética, luego se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y la misma fue

revelada con el kit enzimático pertinente. Los resultados del experimento se visualizan en la figura 4.11.

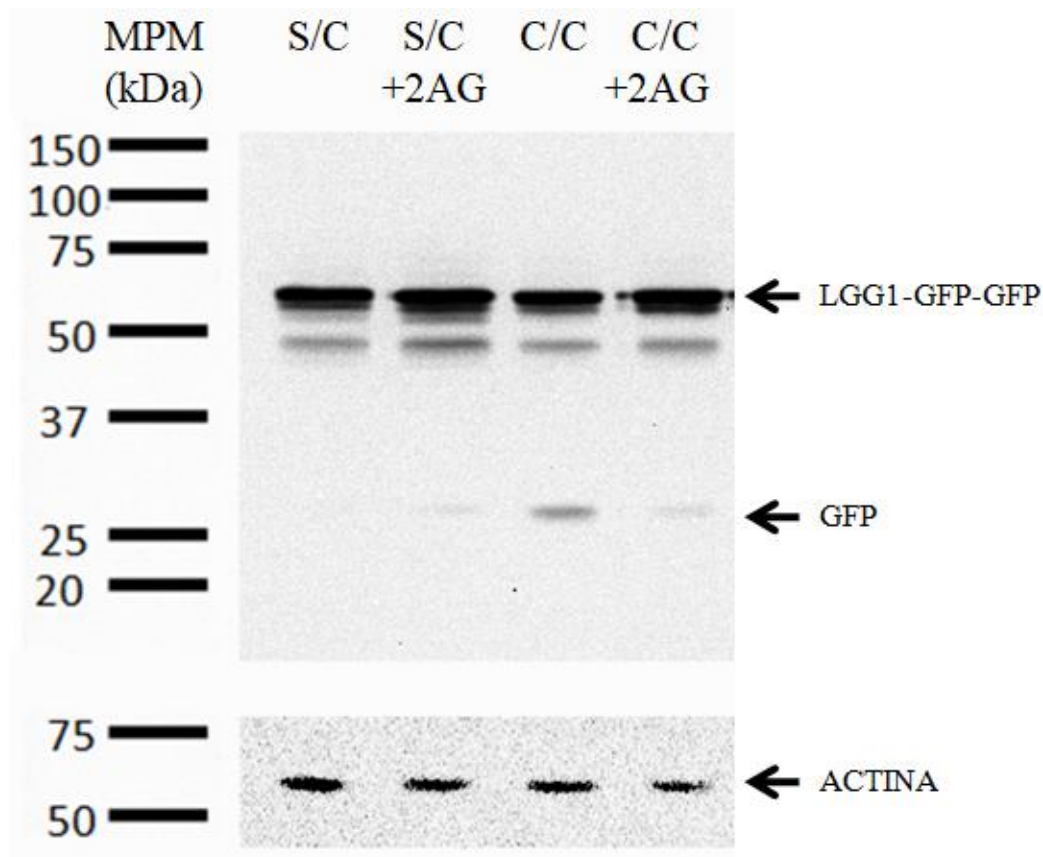


Figura 4.11: Las siglas “S/C” y “C/C” indican las condiciones sin colesterol y con colesterol respectivamente. Las siglas “+2AG” indican que a la condición se le adiciona 2-araquidonil glicerol. Se indican con flechas las bandas correspondientes a LGG1-GFP-GFP, al monómero de GFP y al control de carga con actina. El control de carga se reveló sobre la misma membrana luego de remover al primer conjunto de anticuerpos. El marcador de peso molecular utilizado es “all blue pre-stained” de la marca comercial BioRad y se sembró una cantidad igual a 5µL del mismo.

En el análisis de la figura 4.11 se evidencia que en la condición con colesterol, el agregado de 2AG produce una disminución de la banda correspondiente a GFP libre (27 kDa). El agregado de este mismo EC en ausencia de colesterol genera la aparición de la banda correspondiente al monómero de GFP con respecto al control en la misma condición, aunque de manera muy tenue. Estos resultados sugieren que el 2AG produciría un efecto diferencial en presencia y ausencia de colesterol. Por un lado, en ausencia de colesterol podría ayudar a restituir parcialmente el flujo autofágico, de acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio [25] que demostraron que el 2AG aumenta la movilización de colesterol en el nematodo. Si bien en esta condición no se

adicionó el esteroil al medio, los gusanos fueron analizados en la primera generación, por lo que poseen reservas de colesterol de origen materno. Por otra parte, en presencia de colesterol el 2AG produce un efecto opuesto causando una disminución del flujo autofágico.

4.2 CAPITULO II: “Efecto del aceite de kril sobre la formación de dauers de la cepa mutante de *C. elegans daf-7;fat-4*”

Ha sido demostrado que la suplementación del alimento de roedores con aceite de kril (AK) suprime la síntesis de lípidos debido a que aumenta la expresión de genes involucrados en la oxidación de los lípidos, mientras que disminuye la expresión de genes involucrados en la lipogénesis. También fue observado que los niveles sanguíneos de triglicéridos y colesterol fueron significativamente reducidos luego de la alimentación suplementada con aceite de kril de ratas sanas y en ratas a las cuales se les redujo la hiperlipidemia. Por otra parte, estudios preliminares sugieren que el ECS tiene un rol importante en la acción del aceite de kril en la distribución de lípidos en ratas obesas [43].

Tomando en cuenta toda esta información y recientes hallazgos de nuestro laboratorio que demuestran que los ECs son esenciales para la movilización de colesterol en *C. elegans*, se decidió estudiar si el aceite de kril restablece el tráfico de colesterol causado por la deficiencia de ECs en *C. elegans*.

4.2.1 Extracción y fraccionamiento del aceite de kril

Para llevar a cabo los ensayos con el aceite de kril con la cepa mutante *daf-7;fat-4* se realizó primero una extracción de los lípidos del aceite según el método de Folch, detallado en Materiales y Métodos. Una vez obtenido el extracto lipídico, se procedió a realizar un fraccionamiento de los lípidos que lo componen utilizando una columna de sílica gel con un sistema de solventes de polaridad creciente, como se detalla en Materiales y Métodos. De este fraccionamiento se obtuvieron cuatro fracciones denominadas F1, F2, F3 y F4, donde F1 es la fracción obtenida del primer lavado con cloroformo: metanol (24:1), F2 es la obtenida del segundo lavado con cloroformo: metanol: amoníaco 32% (60:35:5), F3 es la fracción correspondiente al tercer lavado con cloroformo: metanol: amoníaco 32% (60:35:5) y, por último, F4 es la fracción obtenida del cuarto lavado con metanol puro. Posteriormente las fracciones fueron secadas en una atmosfera de N₂ para evitar su oxidación, luego se las rediluyó en hexano. El análisis de la composición de cada una de las fracciones se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC), cuyos resultados se visualizan en la Figura 4.12. El sistema de solventes empleado fue hexano: dietil éter:

ácido acético (75:25:1). Como se reporta en la bibliografía [44] [45], esta mezcla de solventes permite resolver moléculas de lípidos con naturaleza diferente. Independientemente del origen de las muestras utilizadas, los triacilgliceroles (TAG), ácidos grasos libres (AGL), colesterol y fosfolípidos (FL), entre otros, corren siempre de la misma manera en las placas de sílica con la mezcla de solventes empleada en este trabajo. De esta forma se pueden asociar diferentes bandas características que poseen una relación de frente (RF) particular con sus respectivas moléculas de lípidos.

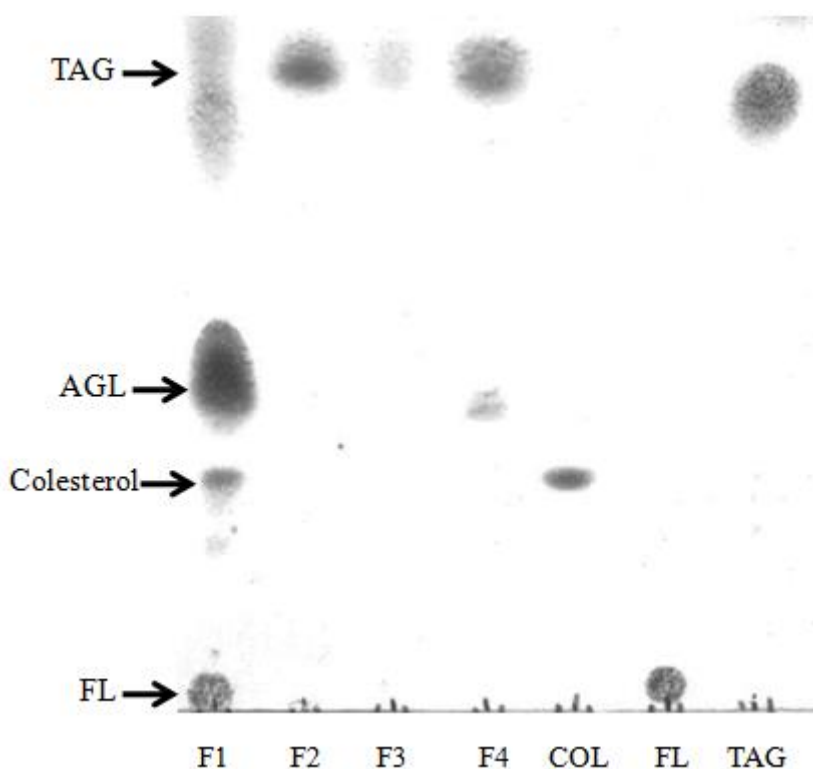


Figura 4.12: TLC de las fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto lipídico total del aceite de kril. Las siglas F1, F2, F3 y F4 indican a las fracciones 1 a 4 respectivamente, mientras que las siglas COL, FL y TAG, corresponden a los estándares de colesterol, fosfolípidos y triacilgliceroles respectivamente. Las relaciones de frente para los estándares fueron las siguientes: colesterol RF= 0,291, fosfolípidos RF= 0,013 y TAG RF= 0,861. Se indican con flechas las bandas correspondientes a TAG, FL, colesterol y ácidos grasos libres (AGL) de las calles donde se sembraron las distintas fracciones. El sistema de solventes empleado fue hexano: dietil éter: ácido acético (75:25:1).

Del análisis de la figura 4.12 se pone en evidencia que la composición lipídica de cada una de las fracciones es diferente. Mostrando que la más compleja de las fracciones es la 1, que posee bandas con RF similares a la de los estándares. Siendo para la banda indicada como TAG el RF= 0,877, para AGL el RF= 0,457, para colesterol el RF= 0,260 y para FL el RF= 0,025. Las fracciones 2 y 3 muestran solo una banda con una

RF= 0,888 y RF= 0,886 respectivamente, similar a la RF de las bandas correspondientes a los TAG, mientras que en la fracción 4 aparecen bandas que tienen RF similares a aquellas correspondientes a los TAG y AGL, siendo éstas RF 0,887 y 0,435 respectivamente. Es importante resaltar, que con un análisis mediante TLC no se puede determinar cuál es la composición exacta de cada fracción, dado que las bandas que corren con RF similares en dos calles diferentes no necesariamente van a pertenecer al mismo compuesto. Como el método empleado se basa en la diferencia de polaridad para producir la separación de los lípidos, dos moléculas que tengan polaridades similares van a correr con la misma RF en la placa de sílica. Sin embargo, el fin de utilizar TLC es obtener información preliminar acerca de que tan diferentes son las distintas fracciones entre sí. En este sentido, tiene particular importancia estudiar la presencia de colesterol en cada una de las fracciones (por motivos explicados más adelante en este trabajo). Debido a que no se disponía de un método adecuado para la determinación del mismo en cada una de las fracciones, se hizo el seguimiento mediante TLC corriendo un estándar del esteroil en una de las calles y comparando con la aparición de la banda con una RF similar en la calle correspondiente a cada fracción. Como se mencionó anteriormente, no se puede asegurar con total veracidad que ver una banda con una RF parecida a la del estándar de colesterol, implique que la fracción contenga al esteroil, pero es probable que se trate de éste. Una de las razones que llevan a pensar que sea probable es el hecho de que el aceite de kril es rico en este compuesto, reportándose que representa entre un 4 a 6 % de su composición lipídica total [46].

4.2.2 Ensayos con las fracciones obtenidas del aceite de kril

Luego de obtener las mencionadas fracciones se procedió a realizar el ensayo de rescate de la formación de dauers con los gusanos de la cepa mutante *daf-7;fat-4*. Para el mismo, se sincronizó a los gusanos mediante tratamiento con NaOCl y se los dividió en 5 grupos:

- 1) Control con hexano
- 2) F1
- 3) F2
- 4) F3
- 5) F4

Se colocó a cada grupo de gusanos en placas suplementadas con 30 μ L de cada uno de los eluidos. Se los dejó crecer a 20°C, que es la temperatura semi-permisiva para la mutante *daf-7;fat-4* dado que a esa temperatura DAF-7 es parcialmente activo, mientras

que a 25°C es totalmente inactivo. El péptido DAF-7 se encuentra involucrado en una vía de la señalización que determina que el gusano prosiga por el ciclo de vida normal o que ingrese en el arresto larval conocido como dauer. Esta mutante genera aproximadamente 50% de larvas dauer a 20°C. Luego de 4 días, se calculó el porcentaje de dauers, observándose los resultados mostrados en la figura 4.13.

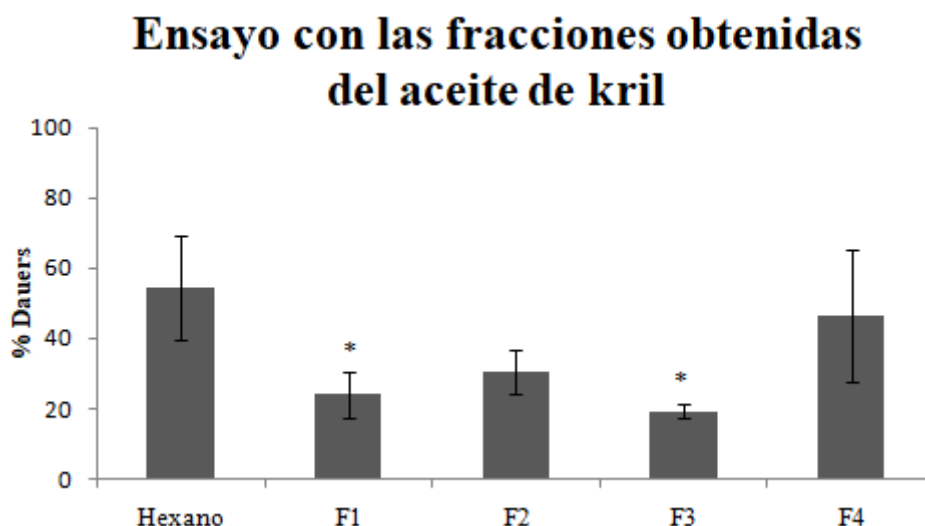


Figura 4.13: Resultado del ensayo con las diferentes fracciones del aceite de kril rediluidas en hexano, en la formación de dauers de *daf-7;fat-4*. El (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre la condición que lo posee y el control con hexano, $P = 0,017$, método de Holm-Sidak, el experimento se realizó por triplicado.

El análisis de los resultados de la figura 4.13 muestra que las fracciones F1 y F3 inhiben significativamente la formación de dauers en la cepa *daf-7;fat-4*.

Como se mencionó anteriormente, el aceite de kril es una mezcla de lípidos rica en colesterol [46], y sabiendo que este esteroide es un compuesto muy apolar, es muy probable que la mayor parte del mismo se encuentre en la fracción 1, evidenciado en el análisis por TLC (Fig. 4.12). Como se detalló en la introducción, el colesterol es el precursor del ácido dafacrónico, cuya presencia inhibe la formación de dauers. Por lo tanto la disponibilidad de colesterol en el medio podría rescatar la formación de dauers en la cepa *daf-7;fat-4*. Por este motivo se consideró relevante el estudio del efecto de la fracción 3, que al ser obtenida con solventes mucho más polares, es menos probable que eluyan al colesterol de la sílica gel. De todas maneras, esto no implica que no haya colesterol en tal fracción.

Se repitió el ensayo de rescate de formación de dauers de *daf-7;fat-4* utilizando solamente la fracción 3. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.14.

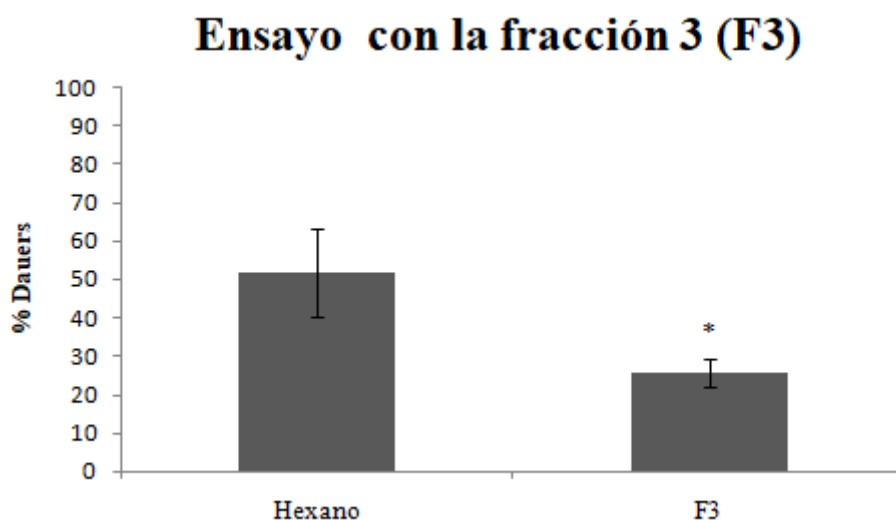


Figura 4.14: Resultados del ensayo con F3 obtenida del fraccionamiento del aceite de kril rediluida en hexano en la formación de dauers de *daf-7;fat-4*. El (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre la condición que lo posee y el control con hexano, $P = 0,020$, método de Holm-Sidak, el experimento se realizó por triplicado.

Los resultados de la figura 4.14 confirman el resultado preliminar obtenido en el ensayo mostrado en la figura 4.13. Una característica particular de la fracción 3 es que cuando se la rediluye en hexano, se forma un precipitado que contiene un pigmento amarillo que es insoluble en el solvente apolar empleado. Se procedió separando ese precipitado amarillo del sobrenadante, el primero fue disuelto en metanol mientras que el sobrenadante continuó disuelto en hexano, obteniéndose dos nuevas fracciones a partir de la fracción 3 original.

4.2.2.1 Experimentos con las porciones metanólicas y hexánicas de la fracción 3 obtenida del aceite de kril.

Debido a que en los ensayos esquematizados en las figuras 4.13 y 4.14 se empleó a la fracción 3 completa (conteniendo tanto la parte soluble en hexano como el pellet amarillo insoluble), se decidió estudiar el efecto por separado de estas dos porciones de la fracción 3 original (F3). Para el mencionado fin se ensayó la capacidad para rescatar dauers en la cepa *daf-7;fat-4* de la misma forma que se llevaron a cabo los ensayos previos con los diferentes eluidos del fraccionamiento del aceite de kril (Fig.4.13). En

este caso los ensayos se realizaron utilizando las porciones metanólica y hexánica de la fracción 3 original. Los resultados del experimento se visualizan en la figura 4.15.

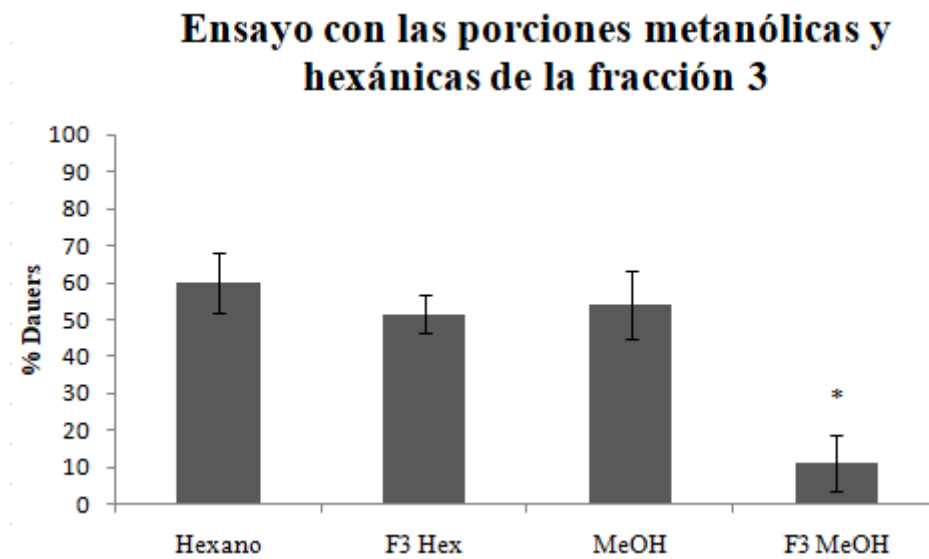


Figura 4.15: Resultado del experimento con las fracciones obtenidas a partir de la fracción 3 original (F3). Se observan la porción metanólica (F3 MeOH) con su respectivo control con metanol y la porción hexánica (F3 Hex) con su respectivo control con hexano. El (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre la condición que lo posee y el control con el respectivo solvente, $P = <0,001$, método de Holm-Sidak, el experimento se realizó por triplicado.

El análisis de los resultados, que se representan en la figura 4.15, demuestran que la porción de la F3 que se rediluye en metanol es efectiva a la hora de rescatar el fenotipo dauer, dado que presenta un porcentaje de dauers que es aproximadamente cinco veces menor que el control con metanol. Por otra parte, la porción de la F3 que se rediluye en hexano no es efectiva para rescatar el fenotipo dauer, ya que presenta un porcentaje de dauer que es muy cercano al control con hexano.

4.2.2.2 Refraccionamiento de las fracciones metanólica y hexánica de la Fracción 3

Con el fin de realizar un análisis más exhaustivo de las porciones disueltas en hexano y metanol, estas fueron refraccionadas, para eliminar posibles trazas de colesterol y aumentar la purificación de dicha fracción. El fraccionamiento realizado fue el mismo que se utilizó para el extracto total de lípidos del aceite de kril, y del mismo se obtuvieron 8 fracciones, 4 de la porción rediluida en metanol y 4 de las que correspondían al hexano. A las 8 fracciones obtenidas se les evaporó la mezcla de solventes utilizada en la elución y posteriormente fueron rediluidas en distintos

solventes. Las primeras cuatro fueron rediluidas en metanol, y las segundas cuatro fueron se rediluyeron en hexano, Fig. 4.16.

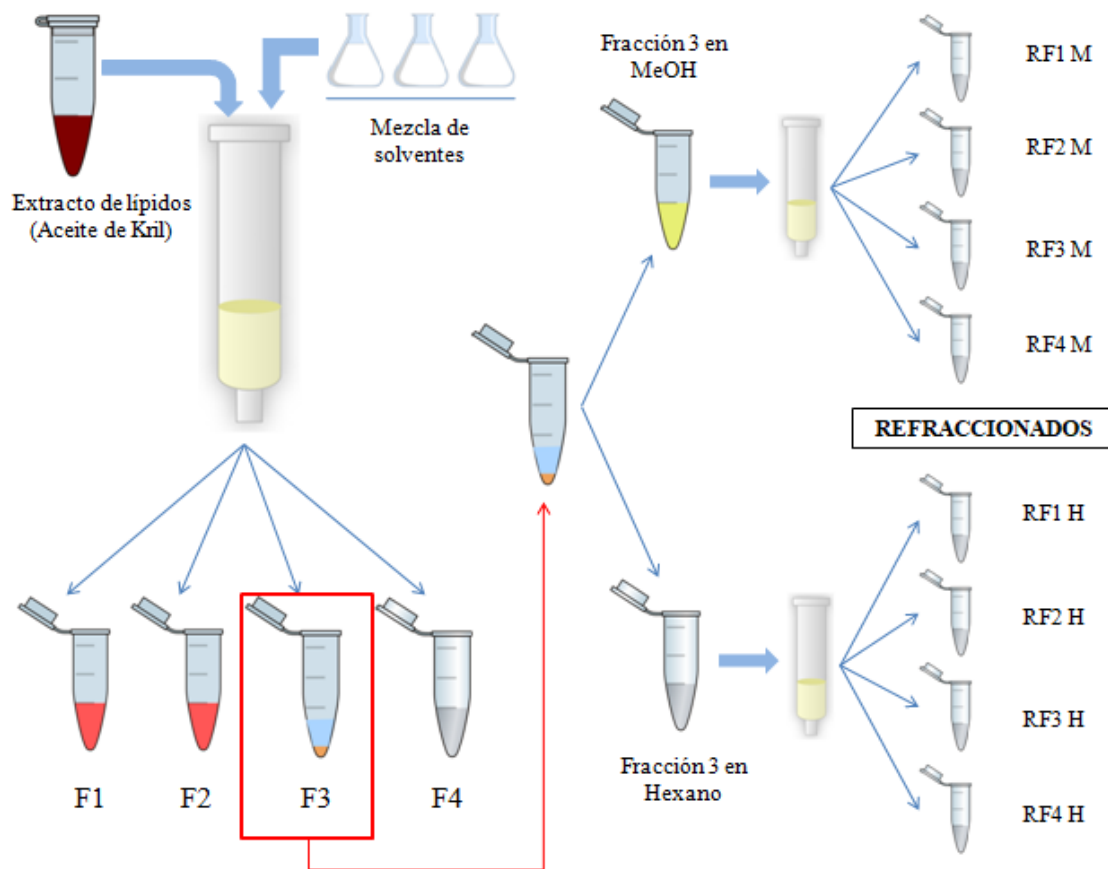


Figura 4.16: Representación esquemática del procedimiento llevado a cabo para refraccionar la fracción 3 obtenida del extracto lipídico total del aceite de kril.

Las siglas utilizadas para designar a cada fracción fueron las siguientes:

Porción con Metanol

- **RF1 M** correspondiente a la fracción 1 del re-fraccionamiento de la porción metanólica de la F3 original.
- **RF2 M** correspondiente a la fracción 2 del re-fraccionamiento de la porción metanólica de la F3 original.
- **RF3 M** correspondiente a la fracción 3 del re-fraccionamiento de la porción metanólica de la F3 original.
- **RF4 M** correspondiente a la fracción 4 del re-fraccionamiento de la porción metanólica de la F3 original.

Porción con Hexano

- **RF1 H** correspondiente a la fracción 1 del re-fraccionamiento de la porción con hexano de la F3 original.
- **RF2 H** correspondiente a la fracción 2 del re-fraccionamiento de la porción con hexano de la F3 original.

- **RF3 H** correspondiente a la fracción 3 del re-fraccionamiento de la porción con hexano de la F3 original.
- **RF4 H** correspondiente a la fracción 4 del re-fraccionamiento de la porción con hexano de la F3 original.

El contenido lipídico de estas fracciones obtenidas de las porciones metanólicas y hexánicas de F3 fue analizado por TLC. En la figura 4.17 se muestra el resultado de la TLC para las fracciones metanólicas y en la figura 4.18 se muestra el resultado de la TLC para las fracciones hexánicas.

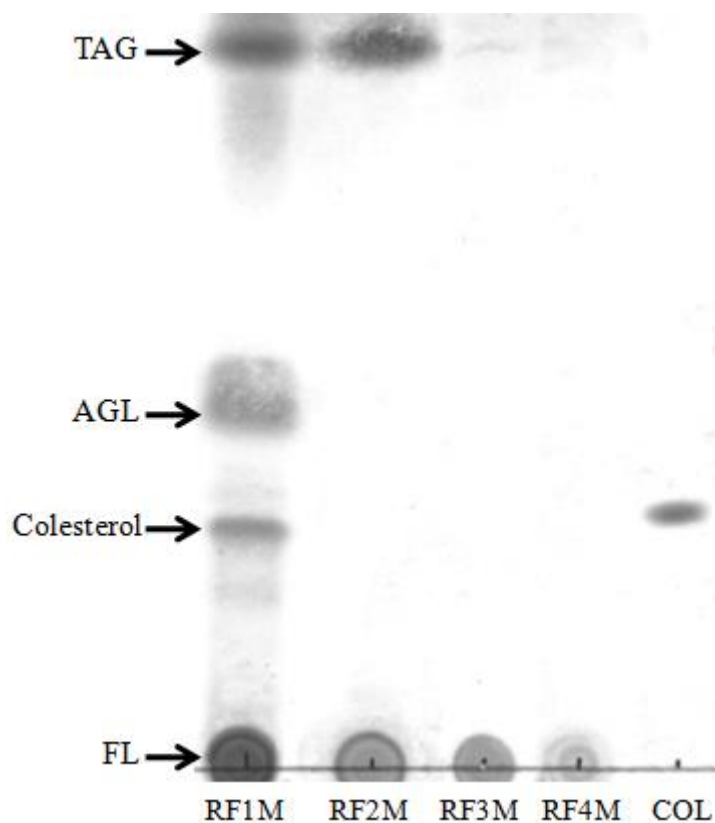


Figura 4.17: TLC de las fracciones obtenidas del fraccionamiento de la porción metanólica de F3. Las siglas RF1M, RF2M, RF3M y RF4M indican a las fracciones 1 a 4 respectivamente, mientras que la sigla COL corresponde al estándar de colesterol (RF= 0,291). Se indican con flechas las bandas correspondientes a triacilgliceroles (TAG), ácidos grasos libres (AGL), colesterol y fosfolípidos (FL) de las calles donde se sembraron las distintas fracciones. El sistema de solventes empleado fue hexano: dietil éter: ácido acético (75:25:1).

Del análisis de la figura 4.17 se evidencian las diferencias en cuanto a composición lipídica de cada una de las fracciones. Mostrando que todas las fracciones (RF1M-RF4M) contienen bandas que poseen RF= 0, similar al RF a la cual suelen aparecer las bandas de FL. Además de éstos, la fracción RF1M posee una banda con una RF = 0,254 similar a la del estándar de colesterol, mientras que las otras tres fracciones restantes no.

El hecho de no ver una banda particular, no implica que el compuesto no se encuentre presente, podría estarlo pero en una concentración que no es detectable por el método. En este caso la fracción RF1M tiene la composición de lípidos más compleja. Esta fracción muestra, además de la bandas de colesterol y FL, bandas que corren con una RF similar a la RF de las bandas de TAG y AGL, siendo estas $RF= 0,907$ y $RF= 0,465$, respectivamente. La fracción RF2M exhibe una banda con una $RF= 0,919$, parecida a la RF con la cuál suelen aparecer las bandas de TAG. Las fracciones 3 y 4 muestran un área sombreada en la zona donde suele aparecer la banda correspondiente a TAG, probablemente se deba a la presencia de estos compuestos pero en una proporción menor que RF1M y RF2M.

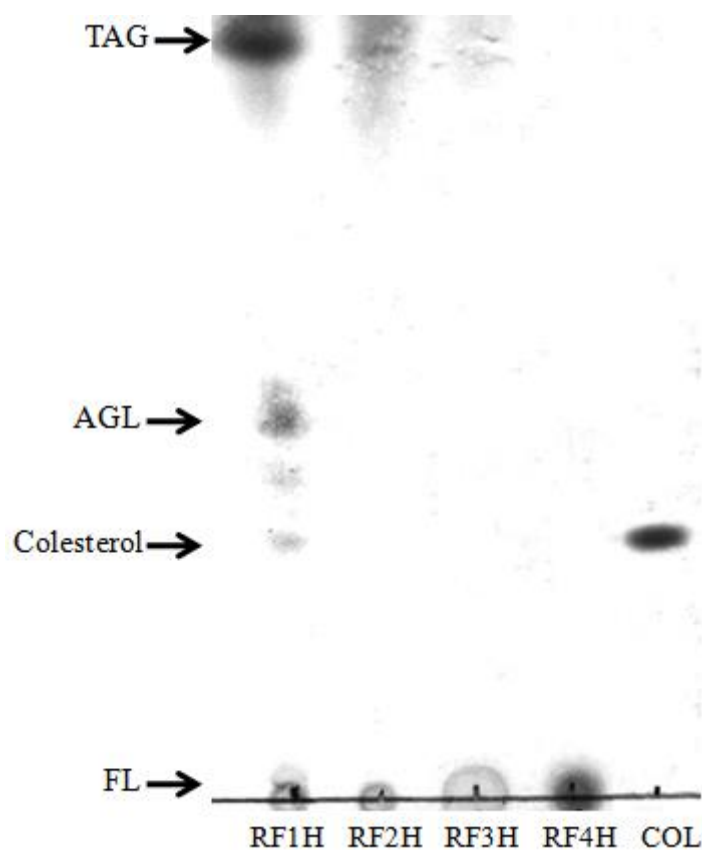


Figura 4.18: TLC de las fracciones obtenidas del fraccionamiento de la porción hexánica de F3. Las siglas RF1H, RF2H, RF3H y RF4H indican a las fracciones 1 a 4 respectivamente, mientras que la sigla COL corresponde al estándar de colesterol ($RF= 0,291$). Se indican con flechas las bandas correspondientes a triacilgliceroles (TAG), ácidos grasos libres (AGL), colesterol y fosfolípidos (FL). El sistema de solventes empleado fue hexano: dietil éter: ácido acético (75:25:1).

En la figura 4.18 se muestran las diferencias en composición lipídica de cada una de las fracciones. Todas las fracciones (RF1H-RF4H) muestran bandas que poseen $RF= 0$,

similar a la RF a la cual suelen aparecer las bandas de FL. Además de ésta, la fracción RF1H exhibe bandas que corren similar a como usualmente lo hacen las bandas de TAG, AGL y colesterol, siendo sus RF= 0,906, RF= 0,471 y RF= 0,328 respectivamente. Las fracciones RF2H y RF3H muestran un área sombreada en la zona donde suele aparecer la banda correspondiente a TAG, en el caso de RF2H más intensa que en RF3H. La fracción RF4H no muestra ninguna otra banda ni área sombreada.

Tanto la porción metanólica como la hexánica contuvieron fracciones que poseían colesterol o algún compuesto que tiene una polaridad similar. Evidenciado en el análisis por TLC como una banda que corre con una RF equivalente a la del control con colesterol empleado. Estas fracciones son las RF1M y RF1H, obtenidas de la elución con la primer mezcla de solventes (más apolar). La presencia de la banda mencionada demuestra la utilidad de llevar a cabo el refraccionamiento de la F3 original.

4.2.2.3 Experimentos con los refraccionados de las porciones metanólicas y hexánicas obtenidos de la fracción 3

Luego de obtener los refraccionados de las porciones metanólicas y hexánicas de la fracción 3 descritas arriba, la actividad de las mismas fue ensayada empleando a la doble mutante *daf-7;fat-4*. Los resultados del experimento utilizando las fracciones metanólicas se muestran en la figura 4.19 y los de la fracción proveniente del hexano se muestran en la figura 4.21.

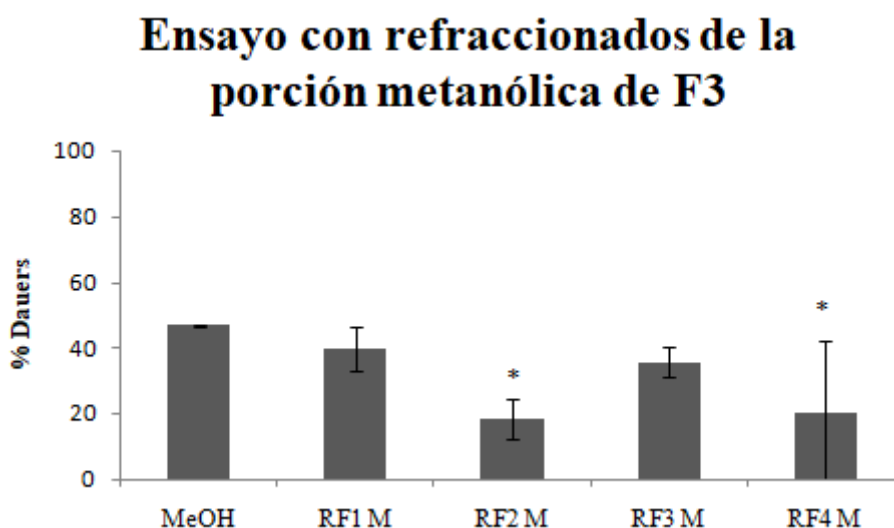


Figura 4.19: Resultado del experimento con las fracciones obtenidas a partir del refraccionamiento de la porción metanólica de fracción 3 original (F3) con su respectivo control con metanol. El (*) indica una

diferencia estadísticamente significativa entre la condición que lo posee y el control con Metanol, $P = 0,035$, método de Holm-Sidak, el experimento se realizó por triplicado.

En la figura 4.20 se muestra una imagen representativa del experimento, donde se visualizan los gusanos tratados con la fracción RF2M y los gusanos en el control con metanol.



Figura 4.20: Imagen representativa del ensayo con la fracción RF2M (derecha) con su respectivo control con metanol (izquierda). Se indican con flechas negras los gusanos arrestados en dauer, evidenciándose una menor proporción de los mismos en el medio suplementado con RF2M.

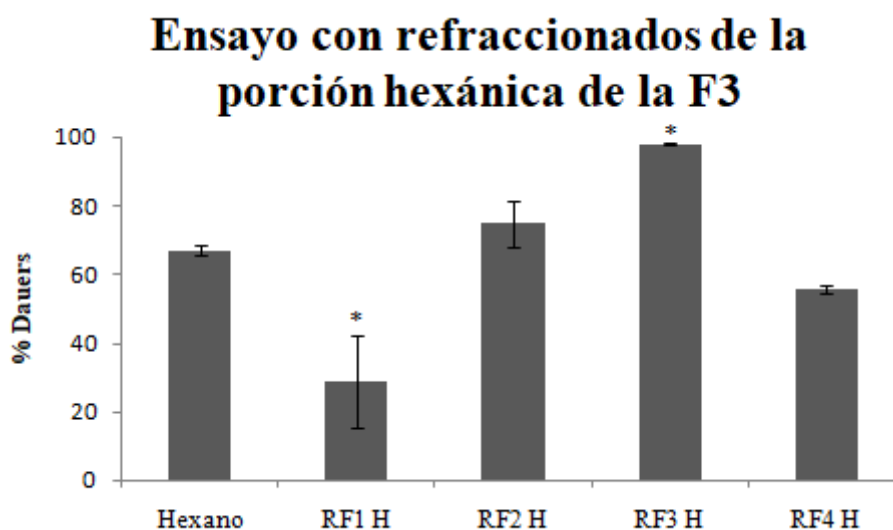


Figura 4.21: Resultado del experimento con las fracciones obtenidas a partir del re-fraccionamiento de la porción hexánica de fracción 3 original (F3) con su respectivo control con hexano. El (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre la condición que lo posee y el control con hexano, $P < 0,001$, método de Holm-Sidak, el experimento se realizó por triplicado.

En la figura 4.22 se muestra una imagen representativa del experimento, donde se visualizan los gusanos tratados con la fracción RF3H y los gusanos en el control con hexano.

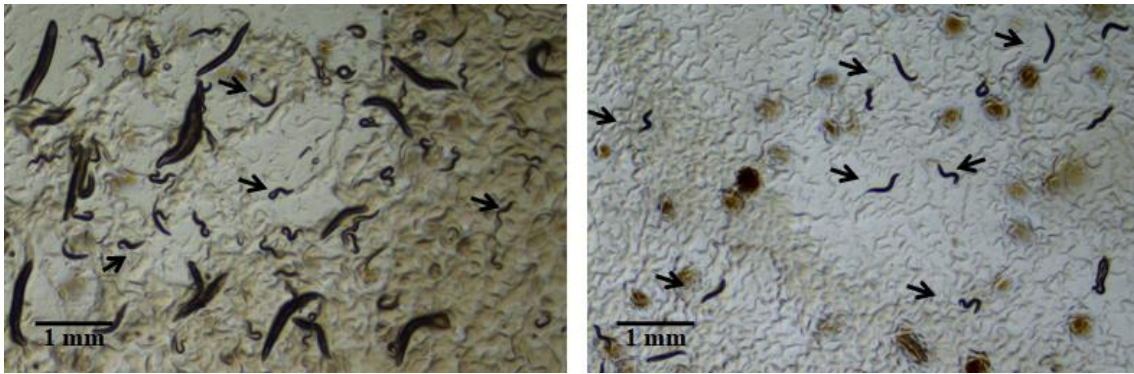


Figura 4.20: Imagen representativa del ensayo con la fracción RF3H (derecha) con su respectivo control con hexano (izquierda). Se indican con flechas negras los gusanos arrestados en dauer, evidenciándose una mayor proporción de los mismos en el medio suplementado con RF3H.

Los resultados del ensayo, representados en las figuras 4.19 y 4.21, demuestran que en general las fracciones metanólicas son más efectivas que sus contrapartes en hexano a la hora de rescatar el fenotipo dauer. Dentro de estas fracciones metanólicas RF2 M y RF4 M son las más potentes para inhibir la formación de dauers de *daf-7;fat-4*. Por otra parte dentro de las que se redisolviéron en hexano, RF1 H fue la más efectiva en inhibir la formación de dauers, mientras que el resultado estadísticamente significativo de RF3 H muestra que esta fracción estimula la formación de dauers.

Discusión

5.1 Capítulo I

Del análisis de los resultados obtenidos de los experimentos de la relación entre el metabolismo del colesterol y la autofagia en *C. elegans*, se pudo evidenciar que la depleción de colesterol en el medio de crecimiento de los nematodos produce una disminución del flujo autofágico. Estos resultados fueron evidenciados empleando dos metodologías diferentes para el estudio, por un lado utilizando análisis por Western Blot y por otra parte con los estudios de microscopía confocal de fluorescencia. El análisis de la bibliografía existente en el tema revela resultados contrapuestos en cuanto a la influencia del colesterol sobre el flujo autofágico. Se encuentran disponibles trabajos que proponen que la depleción de colesterol induce la autofagia [22], mientras que hay otros que demuestran que la presencia del colesterol promueve la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas, de manera tal que se pueda realizar el paso final del proceso autofágico [24]. Es importante remarcar que estos estudios son realizados sobre células aisladas (líneas celulares de fibroblasto, melanoma y HeLa) que no cuentan con el entorno que provee un organismo completo, el cual podría tener determinada influencia en los procesos estudiados. En este sentido, a excepción de este trabajo, no existen publicaciones previas de la relación entre autofagia y el metabolismo del colesterol en un animal entero. Lo mencionado, demuestra en sí una de las grandes ventajas que tiene *C. elegans* como modelo de estudio, ya que se trata de un organismo de fácil manipulación y bajo costo de mantenimiento, ofreciendo una variedad de fenotipos y estrategias genéticas que permite estudiar diversos procesos metabólicos.

El hecho de que se observe una disminución del flujo autofágico en ausencia de colesterol sugiere que este proceso se encuentra bloqueado. Ha sido comunicado que en mamíferos existe una proteína que tiene la capacidad de detectar y unir colesterol denominada ORP1L [24]. Esta proteína es uno de los componentes de una maquinaria proteica que tiene como función mediar la unión entre los autofagosomas y los lisosomas/ endosomas tardíos. De esta manera, cuando hay colesterol en el medio, ORP1L adopta una conformación tal que permite orquestar el proceso de fusión entre ambas estructuras de membrana asegurando que se concluya el paso final del flujo

autofágico. Cuando el colesterol está ausente, lo mencionado anteriormente no ocurre y los autofagosomas no se fusionan con los lisosomas [24].

La proteína ORP1L pertenece a la familia de proteínas ORP, que significa *proteínas relacionadas a OSBP*, por sus siglas en inglés. Esta familia de proteínas junto con la proteína que une oxisterol (OSBP, por su sigla en inglés), median una gran variedad de procesos como la transducción de señales, el metabolismo lipídico, el tráfico vesicular y el transporte de colesterol no vesicular [47]. Según publicaciones recientes, la mayoría de los organismos eucariotas muestran poseer proteínas homólogas a OSBP, incluyendo 12 homólogos en humanos (OSBP y ORP1 a ORP11), siete en *Saccharomyces cerevisiae*, y cuatro en *C. elegans*, OBR-1 a OBR-4, indicando “OBR” proteína relacionada a proteína que une oxisterol, por sus siglas en inglés [47].

Considerando el rol de las proteínas OBR y que la vía autofágica parece estar conservada entre los organismos eucariotas, es lícito postular que en el nematodo esté ocurriendo algo similar a lo que ocurre en las células de mamíferos.

Sería interesante poder estudiar más exhaustivamente este interesante problema generando mutantes o aplicando ARNi para bloquear la expresión de los genes ORB de forma tal que de investigar si estos genes están involucrados en la regulación de la autofagia por colesterol.

Durante el estudio de la influencia de los ECs sobre la relación entre autofagia y colesterol, se encontró que el agregado del EC 2AG tiene efectos diferentes sobre los nematodos crecidos en presencia y ausencia de colesterol. Como se mencionó en la introducción, existen reportes previos que demuestran la influencia de los ECs 2AG y AEA en la movilización del transporte del colesterol [25]. A pesar de que no se incorpora colesterol en el medio en la condición que requiere la ausencia del esterol, los gusanos en la primera generación (F1) cuentan con reservas del colesterol de origen materno. Estas reservas podrían movilizarse con el agregado de ECs. A su vez, existe evidencia que sugiere que las proteínas OBR poseen similaridad de función con sus ortólogos en mamífero, los cuales están implicados en el flujo autofágico. En conjunto, estas hipótesis podrían indicar que el agregado externo de ECs promueve la movilización del colesterol desde las reservas intracelulares en *C. elegans*, permitiendo que una fracción del mismo se encuentre disponible para unirse al homólogo del sensor

de colesterol, ORP1L. De esta forma se podría permitir una restitución parcial del flujo autofágico.

El efecto del agregado del 2AG en los medios de crecimiento que contenían colesterol, es opuesto a lo que ocurre en la condición donde el esteroles se encontraba ausente, produciendo una disminución del flujo autofágico en los nematodos. Si bien estos resultados son preliminares, podrían explicarse considerando las diferencias metabólicas de los nematodos que se desarrollan en un medio con colesterol y aquellos que lo hacen en un medio sin el mismo. Una de las mencionadas diferencias es que, en la presencia de colesterol en la dieta los nematodos cuentan con más sustrato, para sintetizar ácido dafacrónico que es requerido para el correcto desarrollo del organismo, y esto podría estar influyendo en un aumento global de la síntesis de proteínas en comparación con sus pares que se desarrollan en ausencia de colesterol.

Estos estudios fueron realizados sobre nematodos que expresan el arreglo extracromosomal *lgg::gfp::gfp* solo en hipodermis, por lo tanto los resultados obtenidos reflejan solamente el efecto de los agregados del EC únicamente en este tejido. Dado que en nuestro laboratorio se disponen otras cepas que expresan el mismo arreglo extracromosomal en otros tejidos, sería prometedor analizar cuál es la influencia del 2AG sobre el flujo autofágico y su relación con el colesterol en estos tejidos, como intestino, faringe, músculo o en el tejido nervioso. De la misma manera, se podría evaluar el efecto sobre la autofagia frente al tratamiento con ECs diferentes al 2AG, como AEA o 2AGE (un análogo no hidrolizable del 2AG). Otra forma de hacer estudios más específicos del tema consistiría en la construcción de mutantes que sean deficientes en la producción de ácidos grasos poliinsaturados que presenten el arreglo extracromosomal *lgg::gfp::gfp*. Las mutantes mencionadas se podrían obtener de la cruce de las cepas que contienen la fusión traduccional con la doble GFP y cepas mutantes *fat-4* que son deficientes en la producción de ácido araquidónico que es el precursor de los ECs en el nematodo. De la misma forma que se generarían las mutantes que permitirían seguir el estudio por análisis de Western Blot, se podrían construir nuevas mutantes de la cruce de la cepa MAH215 (cepa empleada en los estudios de microscopia confocal de fluorescencia) y mutantes *fat-4*. La construcción de las cepas mencionadas permitiría seguir de forma paralela el estudio de la relación entre autofagia y el metabolismo del colesterol mediante dos modelos diferentes.

5.2 Capítulo II

Del análisis de los resultados de los experimentos con aceite de kril sobre dobles mutantes *daf-7;fat-4*, se deduce que hay ciertos componentes dentro de la mezcla lipídica que tienen la capacidad de disminuir el porcentaje de dauers en la cepa doble mutante *daf-7;fat-4*. Uno de los factores que podría influir sobre el rescate del fenotipo dauer que exhiben las dobles mutantes *daf-7;fat-4* es el hecho de que uno de los componentes del aceite de kril es el colesterol. Estudios previos que se realizaron en nuestro laboratorio muestran que el exceso de colesterol en el medio conlleva al rescate del fenotipo dauer de esta mutante [25], porque de alguna manera el exceso de este esterol permite superar los problemas en su transporte, presentados por las mutantes empleadas para el estudio. Incluso aquellas mutantes que carecen de los transportadores de colesterol, *ncr-1;ncr-2*, tienen la capacidad de disminuir el porcentaje de dauers que naturalmente forman cuando hay un exceso de colesterol en el medio de crecimiento [25].

Este factor eventualmente podría descartarse considerando que uno de los eluidos que se adquieren del fraccionamiento del aceite de kril (fracción 3, sobretudo la fracción RF2 de la porción metanólica) se obtiene luego del empleo de una mezcla de solventes de elevada polaridad, que reduce la probabilidad de que aparezca el colesterol en ella. Si bien los análisis por TLC requieren de estudios analíticos de mayor sensibilidad para corroborar la ausencia o presencia de un compuesto particular, son un buen punto de partida para el estudio de la composición lipídica parcial de las fracciones empleadas. En este trabajo se evidencia mediante TLC, que la calle donde se siembra la fracción RF2M no posee la banda correspondiente al colesterol cuando se la compara con la calle que contiene el estándar del esterol. Sin embargo, aunque no se vea la banda correspondiente al colesterol en la calle perteneciente a la fracción RF2M, podría haber colesterol en trazas indetectables por la técnica empleada, para lo cual se requieren determinaciones de mayor sensibilidad. Considerando lo mencionado anteriormente, es factible razonar que en la fracción 3, de la cual se obtiene RF2M, aparecen uno o varios compuestos que tienen la capacidad de producir un rescate del fenotipo dauer que presentan los nematodos de la cepa *daf-7;fat-4*. Estos compuestos presentan un efecto análogo al de los ECs derivados del ácido araquidónico, para los cuales existen estudios previos que demuestran la disminución del porcentaje de dauers que la cepa forma a 20°C [25]. Debido a que el aceite de kril utilizado en este trabajo se obtiene de la

especie *Euphausia superba*, se puede asegurar que efectivamente estos compuestos no son ECs, dado que el kril perteneciente a esta especie no posee ácido araquidónico según se reporta en la bibliografía [46]. Sin embargo, con los experimentos realizados en este trabajo no es posible determinar cuál es la naturaleza química de esos compuestos o cuál es su mecanismo de acción. Para tal fin se requiere de estudios adicionales que permitan elucidar el interrogante.

Por otra parte, el estudio de los resultados obtenidos con el empleo de la porción hexánica de la fracción 3, se deduce que hay uno o varios componentes que tienen un efecto potenciador en la formación de dauers. Este efecto es particularmente interesante, por lo cual habría que llevar a cabo más experimentos para determinar la identidad y el posible mecanismo de acción del o los compuestos. Podría tratarse de compuestos antagonistas a los cannabinoides o de compuestos que actúen de una forma totalmente diferente. Para diferenciar entre ambos se necesitaría ensayar la fracción con otras mutantes y con la cepa salvaje de *C. elegans*. También habría que realizar experimentos de competencia con 2AG y AEA, ECs ya estudiados en nuestro laboratorio, de manera tal que se pueda determinar si anulan o no su efecto. Es importante considerar la posible existencia de compuestos con acción antihelmíntica dentro de esta fracción del aceite de kril.

Sería interesante realizar un estudio más exhaustivo del efecto que ejerce el aceite de kril sobre la formación de dauers en la doble mutante *daf-7;fat-4* del nematodo *C. elegans*. Para estos estudios se podría realizar un análisis de la composición de las diferentes fracciones con métodos más precisos como una separación cromatografía de alta presión (HPLC) seguida de un análisis por espectrometría de masas. Con estas técnicas se podrían separar los diferentes compuestos, provenientes de las distintas fracciones obtenidas del aceite de kril, con una alta resolución y posterior determinación de su naturaleza molecular. Una vez conocida la identidad de las moléculas que se encuentran presentes en las distintas fracciones, especialmente en la fracción 3, se podrían realizar ensayos con el fin de determinar cuál o cuáles son los responsables del efecto de la mezcla. De la misma forma se podrían utilizar análogos no hidrolizables de dichos compuestos, con el objetivo de esclarecer si son ellos o derivados de los mismos los que ejercen el efecto sobre el porcentaje de dauers que se observa.

Si bien el empleo de la doble mutante *daf-7;fat-4* es útil en la determinación del efecto de los diferentes compuestos sobre el fenotipo dauer, sería enriquecedor realizar estudios donde se utilicen otras mutantes de *C. elegans*, como las mutantes *ncr-1;ncr-2*, que como se mencionó anteriormente, carecen de los transportadores del colesterol. De esta manera, se podría hacer un análisis más preciso de la influencia directa de los distintos compuestos del aceite de kril sobre el transporte del colesterol en *C. elegans*.

Conclusiones

- La presencia de colesterol produce un aumento del flujo autofágico en el tejido hipodérmico de *C. elegans*, mientras que la ausencia del esteroles induce una disminución del flujo autofágico en ese tejido del nematodo.
- El empleo del EC 2AG parece restablecer parcialmente el flujo autofágico en el tejido hipodérmico de *C. elegans* en ausencia de colesterol. Mientras que en presencia de colesterol, el efecto es opuesto e implica una disminución del flujo autofágico.
- En el aceite de kril se halla presente uno o varios compuestos que tienen la capacidad de disminuir el porcentaje de dauers que forma la doble mutante *daf-7;fat-4*.
- En el aceite de kril también se encuentra presente uno o varios compuestos que fomentan el aumento del porcentaje de dauers que exhiben los nematodos de la cepa *daf-7;fat-4*.

Referencias

- [1] A. K. Corsi, B. Wightman, and M. Chalfie, “A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*,” *Genetics*, vol. 200, no. 2, pp. 387–407, 2015.
- [2] A. K. Corsi, “A biochemist’s guide to *Caenorhabditis elegans*,” *Anal. Biochem.*, vol. 359, no. 1, pp. 1–17, 2006.
- [3] S. E. Hulme and G. M. Whitesides, “Chemistry and the Worm: *Caenorhabditis elegans* as a Platform for Integrating Chemical and Biological Research,” *Angew. Chemie*, vol. 50, pp. 4774–4807, 2011.
- [4] C. D. Sifri, J. Begun, and F. M. Ausubel, “The worm has turned - Microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*,” *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 119–127, 2005.
- [5] M. Artal-Sanz, L. de Jong, and N. Tavernarakis, “*Caenorhabditis elegans*: A versatile platform for drug discovery,” *Biotechnol. J.*, vol. 1, no. 12, pp. 1405–1418, 2006.
- [6] N. Fielenbach and A. Antebi, “*C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity,” *Genes Dev.*, vol. 22, no. 16, pp. 2149–2165, 2008.
- [7] P. J. Hu, “Dauer,” *WormBook*, no. 734, pp. 1–19, 2007.
- [8] A. Antebi, W. H. Yeh, D. Tait, E. M. Hedgecock, and D. L. Riddle, “*daf-12* encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*,” *Genes Dev.*, vol. 14, no. 12, pp. 1512–1527, 2000.
- [9] V. Matyash *et al.*, “Sterol-derived hormone(s) controls entry into diapause in *Caenorhabditis elegans* by consecutive activation of DAF-12 and DAF-16,” *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 10, pp. 1561–1571, 2004.
- [10] A. Antebi, “Steroid regulation of *C. elegans* diapause, developmental timing, and longevity,” *Elsevier*, vol. 105, pp. 181–212, 2013.
- [11] Y. Ohsumi, “Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems,” *Macmillan Mag.*, vol. 2, pp. 211–216, 2001.
- [12] C. A. Lamb, T. Yoshimori, and S. A. Tooze, “The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex,” *Nature*, pp. 1–16, 2013.

- [13] A. Simonsen and S. A. Tooze, “Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes,” *J. Cell Biol.*, vol. 186, no. 6, pp. 773–782, 2009.
- [14] J. P. Watson and V. Giuliano, “Autophagy – the housekeeper in every cell that fights aging,” *Agingscience- Anti-agingfirewalls*, 2013.
- [15] N. G. Larsson and M. G. Masucci, “Scientific background discoveries of mechanisms for autophagy,” *Nobel Prize*.
- [16] X. H. Liang *et al.*, “Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1,” *Nature*, vol. 402, no. 6762, pp. 672–676, 1999.
- [17] T. Hara *et al.*, “Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice,” *Nature*, vol. 441, no. 7095, pp. 885–889, 2006.
- [18] D. C. Rubinsztein, C. F. Bento, and V. Deretic, “Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases,” *J. Exp. Med.*, vol. 212, no. 7, pp. 979–990, 2015.
- [19] N. J. Palmisano and A. Meléndez, “Detection of autophagy in *Caenorhabditis elegans*,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2016, no. 2, pp. 107–116, 2016.
- [20] Y. Chen, V. Scarcelli, and R. Legouis, “Approaches for studying autophagy in *Caenorhabditis elegans*,” *Cells*, vol. 6, no. 3, p. 27, 2017.
- [21] A. Melendez, Z. Tallóczy, M. Seaman, E.-L. Eskelinen, D. H. Hall, and B. Levine, “Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*,” *Science.*, vol. 301, no. 5638, pp. 1387–1391, 2003.
- [22] J. Cheng, Y. Ohsaki, K. Tauchi-Sato, A. Fujita, and T. Fujimoto, “Cholesterol depletion induces autophagy,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 351, no. 1, pp. 246–252, 2006.
- [23] S. Sarkar *et al.*, “Impaired autophagy in the lipid-storage disorder niemann-pick type c1 disease,” *Cell Rep.*, vol. 5, no. 5, pp. 1302–1315, 2013.
- [24] R. H. Wijdeven *et al.*, “Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway,” *Nat. Commun.*, vol. 7, no. May, pp. 1–14, 2016.
- [25] C. Galles *et al.*, “Endocannabinoids in *Caenorhabditis elegans* are essential for the mobilization of cholesterol from internal reserves,” *Sci Rep*, 2018.

- [26] W. Mazier, N. Saucisse, B. Gatta-Cherifi, and D. Cota, “The Endocannabinoid System: Pivotal orchestrator of obesity and metabolic disease,” *CellPress*, vol. 26, no. 10, pp. 524–537, 2015.
- [27] F. A. Iannotti, V. Di Marzo, and S. Petrosino, “Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: targets, metabolism and role in neurological disorders,” *Prog. Lipid Res*, vol. 62, pp. 107–128, 2016.
- [28] Y. Ohsumi, “Historical landmarks of autophagy research,” *Cell Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 9–23, 2013.
- [29] L. R. Lapierre *et al.*, “Autophagy genes are required for normal lipid levels in *C. elegans*,” *Landes Biosci.*, vol. 9, no. 3, pp. 1–9, 2013.
- [30] E. J. O. Rourke, P. Kuballa, R. Xavier, and G. Ruvkun, “ ω -6 Polyunsaturated fatty acids extend life span through the activation of autophagy,” *Genes Dev.*, vol. 27, pp. 429–440, 2013.
- [31] M. Lehtonen *et al.*, “Determination of endocannabinoids in nematodes and human brain tissue by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry,” *J. Chromatogr. B*, vol. 879, no. 11–12, pp. 677–694, 2011.
- [32] F. Piscitelli *et al.* “Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice”. *Nutrition & metabolism*, vol. 8, no 1, p. 51, 2011.
- [33] URL: <https://www.onnit.com/krill-oil/#benefits>. Consultado el 03/03/2019, 17:00 hs.
- [34] S. Brenner, “The genetics of *Caenorhabditis elegans*,” *Genetics*, vol. 77, no. 1, pp. 71–94, 1974.
- [35] J.T. Chang *et al.* “Spatiotemporal regulation of autophagy during *Caenorhabditis elegans* aging”. *Elife*, vol. 6, p. e18459, 2017.
- [36] H. C. Chapin *et al.* “Tissue-specific autophagy responses to aging and stress in *C. elegans*”. *Aging (Albany NY)*, vol. 7, no 6, p. 419, 2015.
- [37] L. Timmons and A. Fire, “Specific interference by ingested dsRNA,” *Nature*, vol. 395, no. 6705, p. 854, 1998.
- [38] R. L. Garcea, F. Schachat, and H. F. Epstein, “Synthesis and mutant nematode development of two myosins in wild-type muscle during larval,” *Cell*, vol. 15, pp. 421–428, 1978.
- [39] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, “Molecular cloning: a

- laboratory manual, 2nd edition.” 1989.
- [40] N. J. Palmisano, N. Rosario, M. Wysocki, M. Hong, B. Grant, and A. Meléndez, “The recycling endosome protein RAB-10 promotes autophagic flux and localization of the transmembrane protein ATG-9,” *Autophagy*, vol. 13, no. 10 pp.1742–1753, 2017.
- [41] URL:
<http://phytomed.ch/platform/apps/products/index.asp?MenuID=171&ID=334&Menu=4&Item=4.2>. Consultado 12/03/2019, 16:00 hs.
- [42] S. Ohkuma and B. Poole, “Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 75, no. 7, pp. 3327–3331, 1978.
- [43] K. Berge et al. “Krill oil supplementation lowers serum triglycerides without increasing low-density lipoprotein cholesterol in adults with borderline high or high triglyceride levels”. *Nutrition research*, vol. 34, no 2, p. 126-133, 2014.
- [44] S. Zhang et al. “Morphologically and functionally distinct lipid droplet subpopulations”. *Scientific reports*, vol. 6, p. 29539, 2016.
- [45] K. T. Hwang et al. “Aldehydes in grain sorghum wax”. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 79, no 6, p. 529-533, 2002.
- [46] C. F. Phleger et al.” Interannual and between species comparison of the lipids, fatty acids and sterols of Antarctic krill from the US AMLR Elephant Island survey area”. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 131, no 4, p. 733-747, 2002.
- [47] H. Kobuna et al. “Multivesicular body formation requires OSBP-related proteins and cholesterol”. *PLoS genetics*, vol. 6, no 8, p. e1001055, 2010.