

Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA CRÓNICA SOBRE LA
PROTEOSTASIS Y LA INFLAMACIÓN EN EL HÍGADO DE RATA

Marta Rodríguez García



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

TRABAJO FIN DE GRADO

TFG experimental

**EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA CRÓNICA SOBRE LA PROTEOSTASIS Y LA
INFLAMACIÓN EN EL HÍGADO DE RATA**

Marta Rodríguez García

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Tutor: Diego Ruano Caballero

Sevilla, 19 de julio de 2021

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. UPR (Unfolded Protein Response)	5
2.1.1. IRE1α	6
2.1.2. PERK	7
2.1.3. ATF6	8
2.2. Autofagia	9
2.3. Factores tróficos	12
2.4. Inflamación	13
2.5. Restricción calórica	14
3. OBJETIVOS	15
4. METODOLOGÍA	15
A. Modelo de experimentación	15
B. PCR	16
C. Análisis estadístico	16
5. RESULTADOS	17
5.1. Efecto de la RC sobre los factores tróficos IGF-1 y BDNF	17
5.2. Efecto de la RC sobre la proteostasis celular	18
5.2.1. Efecto de la RC sobre la chaperona HSP70	18
5.2.2. Efecto de la RC sobre la UPR	19
5.2.3. Efecto de la RC sobre la autofagia	22
5.3. Efecto de la RC sobre la inflamación	24
6. DISCUSIÓN	25
7. CONCLUSIONES	30
8. BIBLIOGRAFÍA	31

1. RESUMEN

La restricción calórica es una de las medidas más eficaces contra el envejecimiento y las patologías asociadas al mismo (cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, etc.). Esta intervención alarga la esperanza de vida de numerosos organismos mediante la optimización del metabolismo y del estrés oxidativo. En este trabajo, para ver el efecto de la RC crónica, las ratas se someten a ella durante un periodo de tres meses y mediante la técnica de la PCR se estudia la expresión transcripcional de diferentes marcadores en los hepatocitos. Nos centramos en el estudio de la proteostasis (UPR y autofagia), los factores tróficos IGF-1 y BDNF, y de la inflamación, por medio de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α y IL-1 β . Los valores obtenidos de expresión transcripcional de los marcadores de las ratas sometidas a RC son comparados con un grupo control de ratas alimentadas *ad libitum*. Nuestros resultados muestran una mejoría celular en cuanto a reprogramación metabólica para la optimización de recursos, así como una menor inflamación celular y una reducción de los factores tróficos de las ratas sometidas a RC con respecto a las ratas alimentadas *ad libitum*. Teniendo en cuenta la limitación del estudio en cuanto a número de animales y técnicas utilizadas, nuestros resultados apoyan la idea de que la RC es un método eficaz para prevenir determinadas patologías asociadas a la edad y para mejorar el estado celular general de los hepatocitos.

Palabras clave: restricción calórica, proteostasis, factores tróficos, inflamación, hepatocitos.

2. INTRODUCCIÓN

La restricción calórica (RC) es una medida eficaz para aumentar la esperanza de vida y proteger a las células frente a algunas enfermedades. Consiste en una limitación de la ingesta calórica de la dieta sin llegar a la malnutrición. Esta restricción va a minimizar o retrasar las alteraciones en la expresión genética relacionadas con el envejecimiento que afectan a la inflamación, fibrosis y estrés celular.

En este trabajo se han estudiado diferentes marcadores de UPR, autofagia, factores tróficos y de la inflamación en hígado de rata para conocer a nivel molecular el efecto que tiene la RC sobre estos marcadores.

2.1. UPR (Unfolded Protein Response)

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo situado en el citoplasma de las células eucariotas que se encarga de varias funciones como son el almacenamiento de calcio, la síntesis de proteínas o el metabolismo lipídico (Chino y Mizushima, 2020). Cuando se produce un estrés del RE se pone en marcha un mecanismo de defensa llamado UPR. La UPR es un proceso que juega un papel muy importante en la restauración de la homeostasis de este orgánulo. Los errores en el plegamiento de las proteínas conducen a la acumulación de proteínas sin plegar o mal plegadas. Esto es lo que se conoce como estrés del RE (Oakes y Papa, 2015).

En este proceso las llamadas chaperonas juegan un papel importante. Se trata de proteínas encargadas de ayudar y controlar el correcto plegamiento de las proteínas durante el proceso de síntesis, o de proteínas desnaturalizadas, así como su ensamblaje y transporte celular, y lo hacen uniéndose a ellas (Yoshida, 2007).

La UPR se activa en respuesta al estrés de RE a través de tres proteínas transmembrana del RE, denominadas: **IRE1 α** (*Inositol-Requiring Enzyme 1 α*), **PERK** (*Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase*), y **ATF6** (*Activating Transcription Factor 6*). Estos tres sensores contienen un dominio en el lumen del RE capaz de detectar directa o indirectamente grandes cantidades de proteínas mal plegadas o dañadas. Cuando lo detectan se realizan cambios en el estado de oligomerización conduciendo así a la activación (Senft y Ronai, 2015).

La proteína Grp78 o Proteína de unión (BiP) es una proteína de choque térmico de la familia de proteínas HSP70. Su expresión está relacionada con la actividad del RE, por lo que aumenta en caso de estrés reticular. En condiciones normales, la proteína Grp78 se encuentra unida a las 3 proteínas sensores IRE1 α , ATF6 y PERK manteniéndolas inhibidas. Cuando aumenta la concentración de proteínas mal plegadas en el RE, Grp78 se desplaza desde los sensores hacia estas proteínas mal plegadas gracias a su afinidad, produciendo la activación de las 3 vías de señalización (Hendershot et al., 2019). Inicialmente, la activación de estos tres sensores va a permitir la adaptación a la nueva situación de estrés celular, aumentando la capacidad de plegamiento de proteínas, así como la transcripción de chaperonas. Al mismo tiempo, aumenta la transcripción de enzimas que intervienen en la degradación de las proteínas mal plegadas en un proceso conocido como degradación de proteínas asociada al RE (ERAD).

La activación de cada proteína sensora va a dar lugar a la activación de tres vías diferentes de señalización que se resumen a continuación.

2.1.1. IRE1 α

La activación de IRE1 α se inicia con la separación de la chaperona Grp78 de esta proteína. Esto permite que dos moléculas de IRE1 α dimericen y se fosforilen de manera recíproca, activando así sus actividades quinasa y endonucleasa. El dominio endonucleasa va a catalizar el procesamiento de un ARNm mediante un proceso de splicing no canónico, citosólico, dando lugar a un ARNm que codifica para un factor de transcripción llamado Xbp1s. Este se transloca al núcleo y estimula la transcripción de genes implicados tanto en la ERAD como de chaperonas. La activación de esta rama de la vía IRE1 α se asocia con una respuesta anti-apoptótica (Liu et al., 2019).

Por otro lado, IRE1 α también media la activación de JNK (Quinasas c-Jun N-terminal) y NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) por medio del factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2) y la quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (MAP3K5/ASK1). También regula la expresión génica mediante la desintegración de ARNm a través de RIDD. La activación de esta rama se asocia con una respuesta pro-apoptótica (Liu et al., 2019).

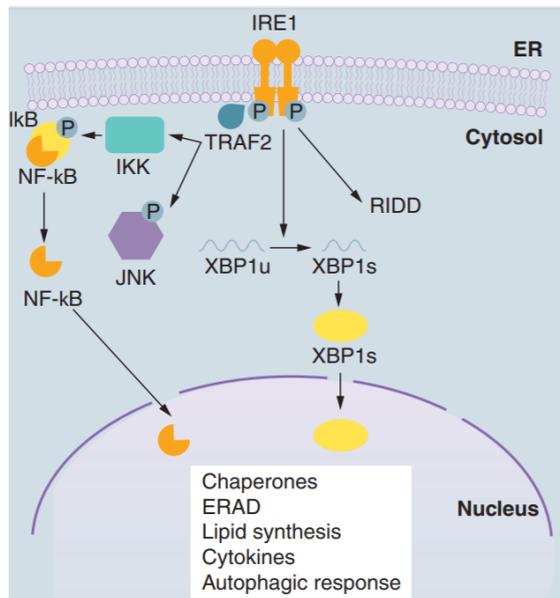


Figura 1. Vía de señalización IRE1α (Galluzzi et al., 2017).

2.1.2. PERK

Al igual que pasa con IRE1α, la disociación de la chaperona Grp78 permite la dimerización y fosforilación recíproca de ambas moléculas de PERK, activándose el dominio quinasa. PERK activo fosforila al factor de elongación eucariótico de la síntesis de proteínas 2 alfa (eIF2α) que se encarga de detener la traducción para evitar la formación de nuevas proteínas, reduciendo así la carga de proteínas. Esta fosforilación está regulada por las fosfatasas GADD34 (proteína inducible por daño al ADN) y CReP (represor constitutivo de la fosforilación de eIF2α). Ambos interaccionan con la proteína fosfatasa 1 (PP1) que desfosforila a eIF2α (Verfaillie et al., 2012).

Curiosamente, en estas circunstancias se estimula la transcripción y traducción de ciertas proteínas que median la respuesta de PERK. Entre ellas cabe destacar al factor de transcripción ATF4 que promueve la adaptación del RE al estrés mediante la activación de genes implicados en respuestas antioxidantes y síntesis de aminoácidos. Además, ATF4 activa la transcripción de otro factor transcripcional denominado CHOP, que tiene un claro perfil pro-apoptótico en respuesta al estrés de RE. Por lo tanto, la activación de esta vía se asocia mayoritariamente con una respuesta pro-apoptótica (Liu et al., 2019).

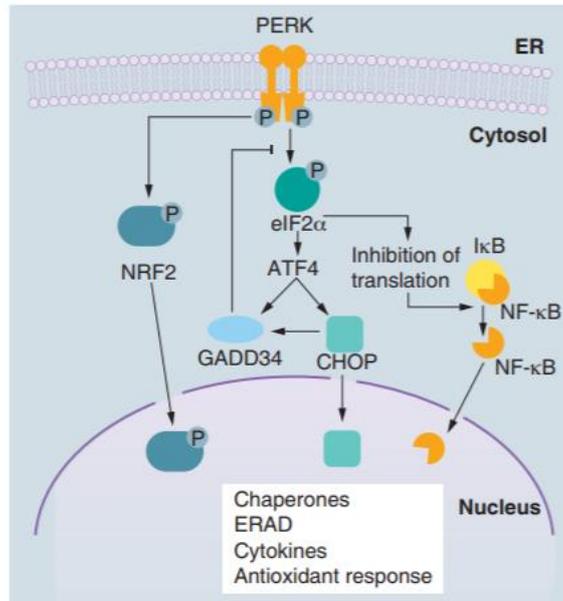


Figura 2. Vía de señalización PERK (Galluzzi et al., 2017).

2.1.3. ATF6

La activación de este sensor es diferente a la de IRE1 α y PERK. En este caso la disociación de la chaperona Grp78 permite la translocación de ATF6 al aparato de Golgi donde es procesado por dos proteasas. La serina proteasa S1P y la metaloproteasa S2P dando lugar a un factor de transcripción denominado ATF6N (fragmento citosólico N terminal). Este factor se transloca al núcleo para regular la expresión de genes que intervienen en la respuesta al estrés del RE como sXBP1, CHOP y Grp78. Además, ATF6N forma un heterodímero con sXBP1 para activar genes implicados en la ERAD. En general, la activación de esta vía se asocia con una respuesta anti-apoptótica (Schwarz y Blower, 2016).

En definitiva, la activación adecuada de las tres vías, en intensidad y temporalidad, permitirá dar una respuesta global adaptada a la intensidad del estrés de RE. Como se ha comentado, las tres vías se asocian con un mayor o menor perfil anti- o pro-apoptótico. Mientras que las ramas de IRE1 α y ATF6 tienen un carácter predominantemente anti-apoptótico, la vía de PERK se asocia a un perfil más pro-apoptótico.

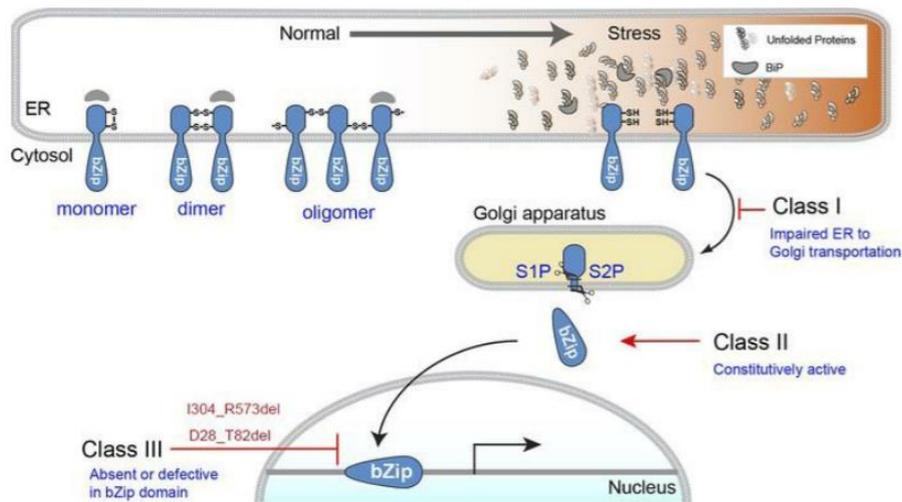


Figura 3. Vía de señalización ATF6 (Lee et al., 2020).

2.2. Autofagia

La autofagia es una respuesta catabólica de las células activada en respuesta al estrés. Está activa a nivel basal en las células, y se puede incrementar su actividad en respuesta a varios tipos de estrés que perturban la homeostasis celular, tales como bajos niveles de ATP, escasez de nutrientes, acumulación de proteínas, daños de orgánulos celulares, etc. (Glick et al., 2010).

Además, el estrés del RE aumenta la actividad autofágica de la célula a través de la UPR, y el RE es una fuente de membranas para la formación de vesículas fagocíticas, llamados **autofagosomas**. Cuando se fusionen con los lisosomas se producirán los **autofagolisosomas** en cuyo interior se produce la degradación del contenido. Este tipo de autofagia se conoce como **macroautofagia o autofagia**.

Existen también otros tipos de autofagia como son la **microautofagia** y la **autofagia mediada por chaperonas**. En la primera el contenido se introduce en el lisosoma a través de invaginaciones de la membrana mientras que en la segunda el contenido se introduce a gracias a un transportador localizado en la membrana y es específica para proteínas que contienen la secuencia de degradación *KFERQ* (Galluzzi et al., 2017).

Aunque la autofagia puede activarse por diferentes vías de señalización, la más relevante de todas es la vía de **mTOR**, que se induce principalmente por falta de nutrientes en el medio (Costas y Rubio, 2017). La vía de señalización mTOR consta de dos ramas principales, **mTORC1** y **mTORC2**, donde mTORC1 es una de las más importantes en el control de la autofagia. El complejo mTORC1 se regula por fosforilación en múltiples sitios, de manera que si está fosforilado es activo, y puede fosforilar a diferentes dianas como a la quinasa ULK1, impidiendo que se active la autofagia. Por el contrario, si mTOR no se fosforila, se inhibe y por lo tanto se activa la autofagia. La activación del complejo **ULK/ Atg1**, permite el inicio de la autofagia mediante la formación de la membrana y su nucleación para dar lugar al autofagosoma. La membrana puede tener diferentes procedencias como por ejemplo el RE, mitocondria, aparato de Golgi o endosomas (Yang et al., 2020).

Gran parte de este proceso está regulado por una serie de genes denominados de manera genérica Atg, que codifican proteínas denominadas ATG (proteínas iniciadoras de la autofagia). Estas proteínas se unen a las proteínas u orgánulos dañados para así marcarlos para la formación de fagóforos. La quinasa ULK1 activa por fosforilación a la proteína Beclin1 o ATG6 que forma parte del complejo iniciador de la nucleación del fagóforo, y posteriormente, para la integración de lípidos de membrana en el autofagosoma se requiere de la síntesis de fosfoinositol-3-fosfato por la fosfoinositol-3 quinasa. Esta proteína es reconocida por las proteínas de unión permitiendo actuar como lanzadera y transfiriendo lípidos de membrana. La proteína similar a la ubiquitina ATG12 es conjugada covalentemente con ATG5 por las enzimas ATG7 y ATG10. La interacción de este conjugado ATG12-ATG5 junto con el complejo fagóforo permite la expansión de la membrana lipídica. Además, la unión de ATG6 con el complejo ATG5/ATG12 permite la inserción de LC3II o también llamado ATG8 en la membrana del complejo. Esta proteína es requerida para el cierre de la vesícula y formación del autofagosoma. Además, solo se localiza en los fagosomas, por lo que constituye un marcador bioquímico de gran relevancia para el estudio de la autofagia. Una vez formado, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma por la acción de las proteínas Rab7, Lamp1 y Lamp2 dando lugar al autofagolisosoma. Dentro de este orgánulo resultante es donde se produce la degradación del contenido o cargo, por las enzimas lisosomales. Los productos resultantes de estas reacciones son liberados al citoplasma para ser reutilizados por la célula (Han et al., 2014).

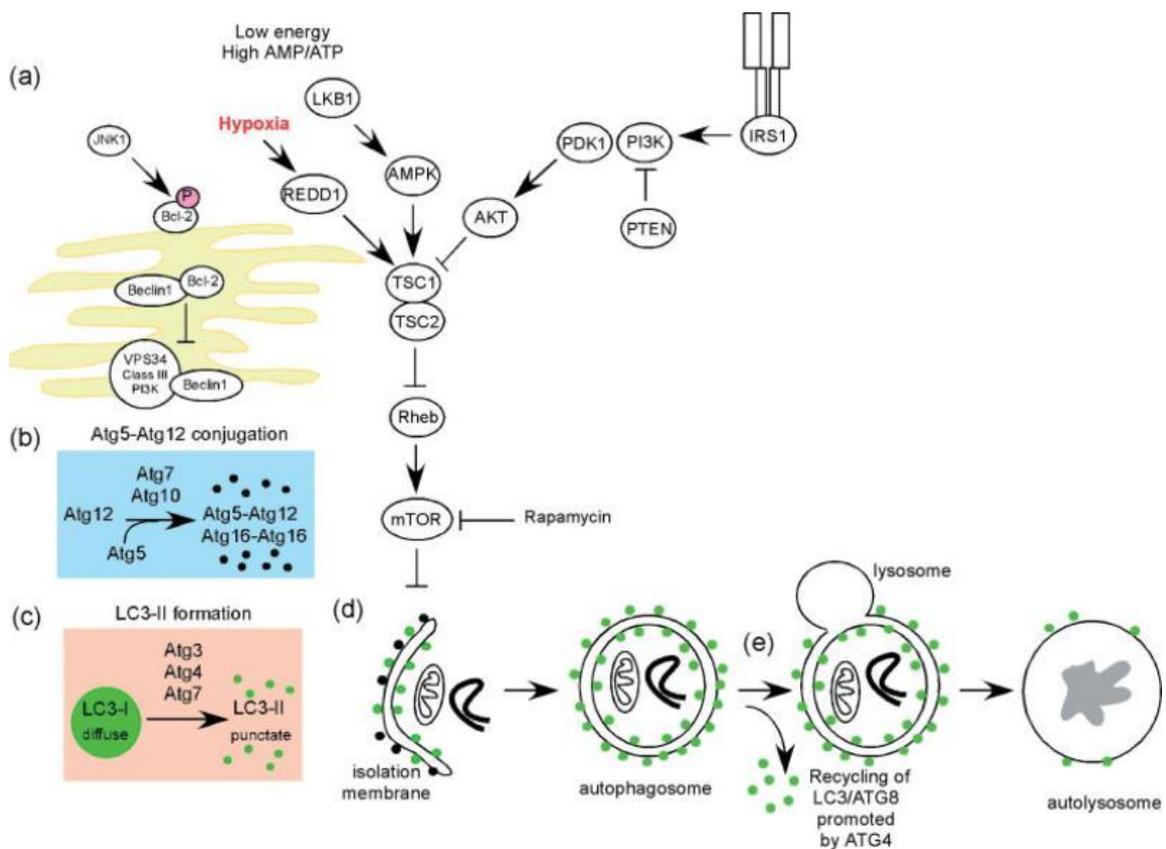


Figura 4. Vía de regulación de la autofagia clásica (Glick et al., 2010).

Cuando se produce un estrés celular se incrementa la transcripción de otro gen relacionado con la autofagia llamado **sequestosoma/p62**. Esta proteína está implicada en el proceso de carga de los agregados de proteínas poliubiquitinadas, actuando como puente entre los agregados y los autofagosomas. p62 cede proteínas ubiquitinadas para la degradación autofágica a través del dominio UBA C-terminal o el dominio LIR. Asimismo, la autofagia regula los niveles de p62 ya que actúa como un sustrato durante la degradación (Liu et al., 2016).

El regulador 3 de la chaperona molecular de la familia **BAG** (Bag3) interacciona con su dominio BAG con la actividad ATPasa de HSP70 inhibiendo su acción. Bag 3 realiza múltiples funciones donde destaca la participación en la homeostasis de las proteínas mediante la regulación de la autofagia en condiciones de estrés. Se ha demostrado que Bag3 aumenta la actividad autofágica al promover la glutaminólisis. La glutamina es el aminoácido más

abundante del plasma, que se transforma en glutamato y este en alfa-cetoglutarato que se utiliza para la obtención de energía a través del Ciclo de Krebs. Para esta conversión la glutamina se transforma enzimáticamente en glutamato por la acción de la glutaminasa (GLS) cuyo proceso recibe el nombre de glutaminólisis, siendo una importante fuente de energía en células tumorales. Además, interviene en el mantenimiento del equilibrio redox con la señalización de mTOR. Por otro lado, el amonio desprendido en esta ruta contribuye a la regulación de la autofagia en células tumorales (Zhao et al., 2019; Dokladny et al., 2015).

2.3. Factores tróficos

Los factores de crecimiento o también llamados factores tróficos son proteínas que intervienen en procesos celulares vitales como pueden ser la proliferación, la diferenciación y la regeneración, manteniendo así la homeostasis celular. El aumento de la proliferación celular lo llevan a cabo actuando sobre el ciclo celular, iniciando la mitosis.

Existen diferentes tipos de factores tróficos, como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (**IGF-1**), que es una hormona polipeptídica con efectos anabolizantes. Su síntesis es favorecida por la hormona del crecimiento (GH) y es secretado por diferentes tejidos celulares, pero principalmente por el hígado. Los niveles óptimos de IGF-1 y GH se alcanzan sólo cuando existe una ingesta dietética adecuada. Actúa sobre dos receptores de membrana: el receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1R) y, con bastante menor afinidad, al receptor de la insulina. El IGF1R es un receptor de tipo tirosina quinasa que señala mediante una transducción intracelular por medio de la proteína quinasa B o AKT, produciendo finalmente los efectos estimuladores del crecimiento y proliferación celular de IGF-1, además de su potente efecto inhibitor de la apoptosis. Diversos estudios muestran la relación entre IGF-1 y la fisiopatología de diversos cánceres por la reducción de sus niveles y un aumento de los niveles de corticoesteroides. Esto podría explicar el efecto preventivo de la restricción calórica frente a estas patologías (Fontana et al., 2016).

Por otro lado, el factor neurotrófico derivado de cerebro (**BDNF**) es una proteína codificada por el gen *bdnf* y que se expresa abundantemente en el SNC y en los tejidos periféricos donde actúa a través del receptor trkB. El BDNF juega un papel destacado en procesos cognitivos como el aprendizaje, la memoria y la consolidación del comportamiento. Además, alteraciones en BDNF pueden conllevar a desórdenes mentales como la depresión. Su

aumento se relaciona en algunos estudios con la restricción calórica (Manchishi et al., 2018). BDNF actúa a través de su receptor TrkB, tanto en neuronas como en el músculo y en el hígado, ejerciendo un papel diferente según el tipo de célula. Mientras que en las neuronas produce una inhibición de AMPK y la activación de mTOR, en los hepatocitos provoca una activación de AMPK y la consiguiente estimulación de las vías catabólicas. En este sentido, aumenta la oxidación de los ácidos grasos, al aumentar los niveles de la proteína fosfatasa 2, mientras bajan los niveles de la proteína ácido graso sintasa (FAS), lo que disminuye la síntesis de los mismos. La activación de AMPK también tiene efecto sobre la regulación de la glucosa. Por un lado, inhibe la gluconeogénesis (Hardie, 2007), ya que disminuye la expresión del ARNm de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, enzima limitante de la velocidad de la gluconeogénesis. Por otro lado, favorece el almacenamiento de glucógeno (Genzer et al., 2017). Es decir, el efecto que produce el BDNF sobre el metabolismo glucídico hepático es similar al que encontramos tras la ingesta de alimentos (Liang et al., 2000).

2.4. Inflamación

La restricción calórica también promueve mecanismos que terminan con una reducción de la inflamación. En el proceso de inflamación se liberan una serie de citoquinas y factores de crecimiento por las células inflamatorias para la regeneración del tejido afectado. Las citoquinas proinflamatorias más destacadas son TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa) e IL-1 β (Interleucina 1 beta), entre otras, cuya fuente principal son los macrófagos hepáticos (Mohammadi et al., 2014). Con la producción de estas citoquinas se inicia un proceso de inflamación aguda y van a participar en diferentes procesos como apoptosis de los hepatocitos, esteatosis, o inflamación. Además, pueden activar células endoteliales de la sinusoide hepática que finalmente se ven involucrados en el reclutamiento de neutrófilos, monocitos y células NKT (del Campo et al., 2018). TNF- α es un mediador inflamatorio inducido por LPS que interviene en algunas patologías hepáticas como la isquemia o el daño hepático producido por el alcohol. TNF- α activa la vía de señalización del factor nuclear NF- κ B tal y como lo hace LPS a través de la señalización de TLR4 o C3a y C5a. C3 y C5 (componente 3 y 5 del complemento) son parte de la respuesta inmune innata que trabaja en el daño hepático para combatir múltiples patógenos. Esto lo realizan a través de la estimulación de la proliferación de los hepatocitos mediante activación de los péptidos bioactivos C3a y C5a con la estimulación de LPS. Si se produce una deficiencia de C3 o C5 provocaría un retraso en la

regeneración (Tao et al., 2017).

TNF- α señala a través de su unión a los receptores TNFR1 y TNFR2. Aunque cada uno inicia vías de señalización diferentes, dependen uno del otro en cierto modo (la activación de uno puede generar la inactivación del otro). Por un lado, TNFR1 interacciona con el dominio de la muerte de la proteína TRADD, que va a permitir la unión con TRAF2 (Factor 2 asociado a al receptor de TNF- α), RIP (Proteína inactivadora de ribosomas) y FADD (Proteína asociada a FAS con dominio de muerte) o también llamada MORT1. TRAF2 y RIP van a participar en la activación de NF κ B, JNK y p38, mientras que FADD va a activar caspasas y a promover la apoptosis, ya que induce a la caspasa 8 que a su vez activa a miembros pro-apoptóticos de Bcl-2. Por otro lado, TNFR2 no contiene el dominio de muerte que interactúa con TRAF2 y solo va a promover mecanismos pro-inflamatorios (no apoptosis) (Schwarz et al., 2016).

2.5. Restricción calórica

Como se ha comentado anteriormente la restricción calórica consiste en una disminución de la ingesta calórica de la dieta (10-40%) sin llegar a la malnutrición. Se trata de una de las intervenciones más efectivas para alargar la esperanza de vida de diversos organismos desde unicelulares, como las levaduras, hasta invertebrados y vertebrados, así como de reducir el riesgo de enfermedad crónica, gracias a que optimiza el metabolismo y reduce el estrés oxidativo (Mattison et al., 2012). Es por ello que frecuentemente la RC se usa como herramienta para entender los mecanismos del envejecimiento y las enfermedades asociadas al mismo.

Un elevado estrés oxidativo se ha relacionado con alteraciones que aparecen con la edad como patologías neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, etc.) y también en enfermedades como el cáncer y la diabetes o eventos cardiovasculares (Furman et al., 2019). Por otro lado, tanto una sobreingesta calórica como una malnutrición actúan de forma negativa sobre la esperanza de vida, por lo que existe una relación lineal inversa que manifiesta que el metabolismo adaptativo es un componente clave en la respuesta de la RC.

Algunos procesos relacionados con la edad como son el rejuvenecimiento de los tejidos y la supresión de tumores han sido relacionados con la función mitocondrial, ya que se reduce la expresión nuclear de genes involucrados en la fosforilación oxidativa mitocondrial

(Balasubramanian et al., 2017; Xu et al., 2013). También implica un cambio en el metabolismo energético mitocondrial al regular vías relacionadas con el metabolismo redox mitocondrial como el metabolismo de los ácidos grasos y la cetogénesis (Barger et al., 2015).

Por tanto, la RC modula el daño oxidativo y regula la actividad mitocondrial (López-Lluch y Navas, 2015).

3. OBJETIVOS

En este trabajo hemos estudiado el efecto que produce la restricción calórica sobre la expresión transcripcional hepática de marcadores relacionados con los sistemas de control de calidad de las proteínas (proteostasis celular), factores tróficos, e inflamación. En concreto, hemos analizado la expresión de la chaperona celular más abundante (HSP70), la expresión de marcadores de la UPR y de la autofagia, así como la de los factores tróficos IGF-1 y BDNF y las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β . Mediante el estudio de la expresión de estos marcadores se pretende conocer, de manera preliminar y muy general, cómo una intervención nutricional afecta a nivel molecular a diferentes vías relacionadas con el envejecimiento.

4. METODOLOGÍA

A. Modelo de experimentación

Para el trabajo se trató con ratas albinas de la raza Wistar en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Estas ratas, de 6-7 semanas de edad, fueron sometidas durante 3 meses a la restricción calórica. Durante las dos primeras semanas se le redujeron un 30% las calorías frente al grupo alimentado *al libitum*, y durante el resto del periodo del tratamiento a una reducción del 35%.

Durante todo el tratamiento se les realizó un control de peso semanal. Una vez finalizado el tratamiento, el promedio de peso ganado de las ratas alimentadas AL (50,7%) fue casi el doble que las ratas sometidas a RC (25,5%), es decir, casi el doble de ganancia de peso (Torrillas, 2016).

B. PCR

La técnica de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real (qPCR) permite amplificar fragmentos de ADN con una gran sensibilidad y cuantificar el producto amplificado.

La PCR cuantitativa se realizó mediante el uso de fluorocromos inespecíficos, y sondas específicas.

- ✚ **Fluorocromos inespecíficos**, SYBR Green. Este compuesto se acopla a los ácidos nucleicos de la doble hélice del ADN lo que produce una emisión fluorescente que nos permite la cuantificación de ADN de doble hélice. Cuanto mayor cantidad de producto amplificado mayor fluorescencia (Prole et al., 2020).
- ✚ **Sondas específicas** que permiten detectar un producto de PCR específico. Es una sonda de oligonucleótidos con un fluorescente en el extremo 5' y un supresor en el extremo 3'. Cuando la sonda está intacta la emisión de fluorescencia está notablemente reducida, pero conforme la ADN polimerasa amplifica, se van a separar los extremos proporcionando un aumento de la señal. En cada ciclo los colorantes se van a separar de sus sondas produciendo una intensidad de señal proporcional a la cantidad de amplicones (Parida et al., 2008).

C. Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar. El análisis estadístico de los datos se realizó comparando los valores de los datos del grupo control (animales alimentados *ad libitum*, n=4) versus los animales sometidos a RC (n=4). La significación estadística se realizó aplicando el test de la t-de Student. Un valor de $p < 0.05$, se considera significativamente diferente.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto de la RC sobre los factores tróficos IGF-1 y BDNF

En primer lugar, analizamos el efecto de la RC sobre la expresión de IGF-1, puesto que está descrito que la RC disminuye la expresión de este factor trófico (Anisimov y Bartke, 2013; Redman et al., 2010). Por lo tanto, esta medida nos sirvió para comprobar si nuestro modelo de RC estaba funcionando. Como se ve en la Figura 5, la expresión de IGF-1 disminuyó en el hígado de los animales sometidos a RC en comparación con los alimentados *ad libitum*, lo que indica que el efecto de la RC se manifiesta a nivel hepático en nuestro modelo. Igualmente, analizamos la expresión del factor BDNF, el cual ha sido muy caracterizado en cerebro, como factor trófico, pero que recientemente ha sido descrito un papel relevante sobre el metabolismo hepático (Genzer et al., 2017). Como se muestra en la Figura 6 la RC también disminuyó la expresión hepática de BDNF.

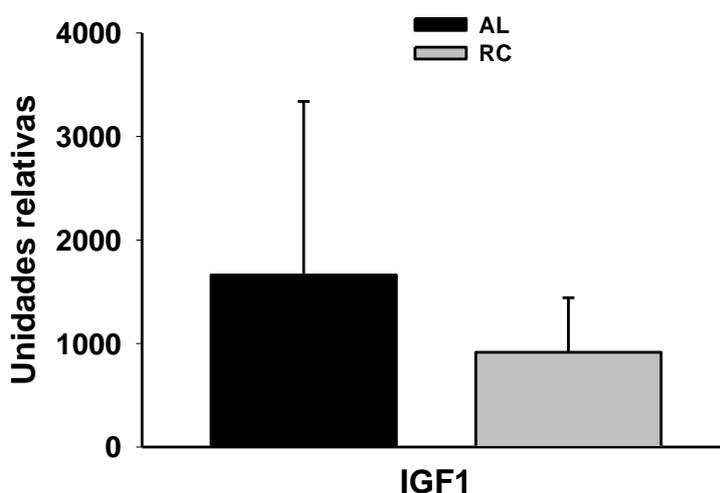


Figura 5. Efecto de la RC sobre la expresión transcripcional de IGF1. La RC disminuyó la expresión hepática de IGF-1 en comparación con los animales alimentados *ad libitum*. $p=0.336$.

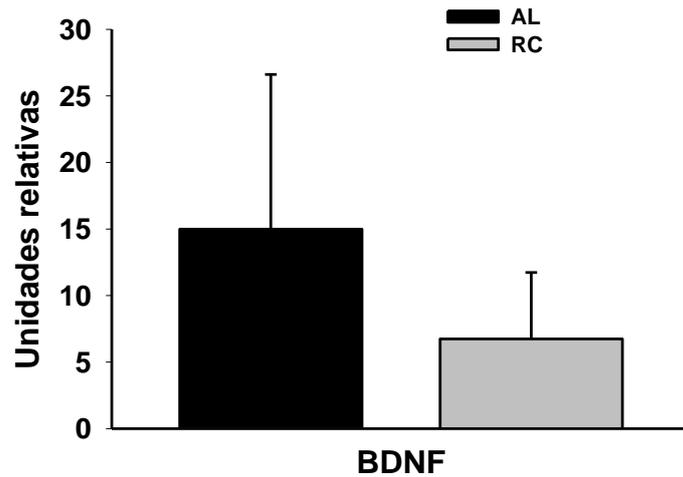


Figura 6. Efecto de la RC sobre BDNF. La RC disminuyó la expresión hepática de BDNF en comparación con los animales alimentados *ad libitum*. $p=0.240$.

5.2. Efecto de la RC sobre la proteostasis celular

5.2.1. Efecto de la RC sobre la chaperona HSP70

La proteostasis celular (homeostasis proteica) es el resultado de la acción conjunta de los sistemas implicados en la síntesis y degradación de proteínas. En este proceso juegan un papel relevante las chaperonas, proteínas implicadas en la biología de las proteínas desde su síntesis y plegamiento, hasta la degradación de las mismas. Es por ello que en primer lugar analizamos el efecto de la RC sobre la expresión transcripcional de la chaperona HSP70, la chaperona celular más abundante (Fernández-Fernández y Valpuesta, 2018). Como se muestra en la Figura 7, la RC disminuyó de manera significativa la expresión de esta proteína. Puesto que un aumento transcripcional de la expresión de chaperonas en general, y de HSP70 en particular, se produce en respuesta al aumento del estrés proteico, este resultado podría sugerir que la RC reduce el estrés proteico basal.

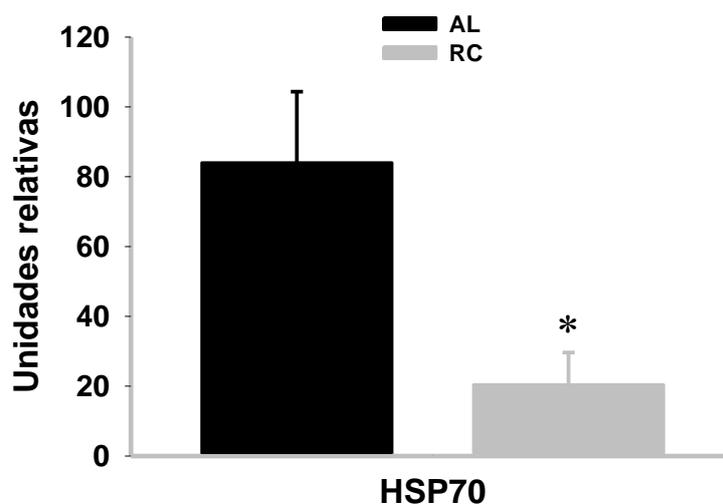


Figura 7. Efecto de la RC sobre la expresión de la chaperona HSP70. La RC redujo de manera significativa la expresión de esta proteína en el hígado de ratas sometidas a RC en comparación con las ratas alimentadas *ad libitum*. $p=0.038$.

5.2.2. Efecto de la RC sobre la UPR

Como se ha comentado anteriormente, el RE es un orgánulo con numerosas funciones imprescindible para la supervivencia celular y un estrés de este, producido por errores en el plegamiento de las proteínas, o la acumulación de proteínas mal plegadas, va a poner en marcha a la UPR para restaurar la proteostasis. El resultado mostrado anteriormente parece sugerir una disminución del estrés proteico basal, es por ello que analizamos la expresión de marcadores de la UPR para profundizar más en este aspecto.

En primer lugar, analizamos la expresión de la proteína GRP78/Bip como marcador de la vía de ATF6. Como se muestra en la Figura 8, la RC no modificó la expresión de GRP78/Bip. Esta proteína juega un papel principal en la activación de la UPR puesto que su activación y separación de IRE1 α , PERK y ATF6 conlleva la activación de las tres vías de señalización. Por lo tanto, este resultado sugiere que la RC no produce estrés del retículo.

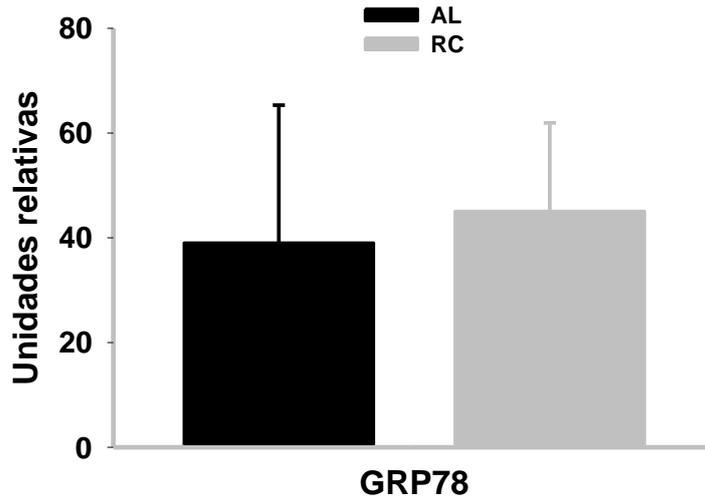


Figura 8. Efecto de la RC sobre la expresión de la chaperona Grp78/Bip. La RC no modificó la expresión de esta proteína en el hígado de ratas sometidas a RC en comparación con las ratas alimentadas *ad libitum*. $p=0.711$.

Otro marcador importante en la vía de IRE1 α es el factor de transcripción sXBP1. Este factor transcripcional va a estimular la ERAD y a la transcripción de chaperonas (Liu et al., 2019). En este caso, los resultados demuestran que la RC aumentó de manera significativa la cantidad de sXBP1 con respecto a las ratas alimentadas *ad libitum* (Figura 9), sugiriendo que la RC activa a la vía de IRE1 α .

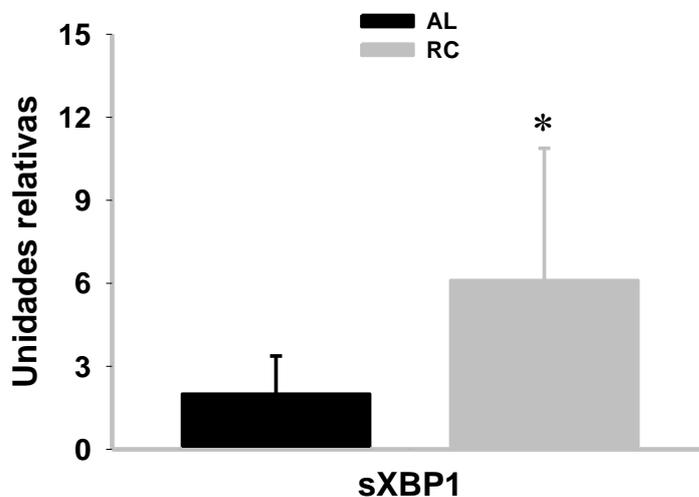


Figura 9. Efecto de la RC sobre la expresión del factor de transcripción sXBP1. La RC aumentó al doble la cantidad de sXBP1 en el hígado de ratas sometidas a RC en comparación con las ratas alimentadas *ad libitum*. $p=0.044$.

Por último, analizamos la expresión transcripcional del factor de transcripción CHOP, como marcador de la vía de PERK. Como se observa en la Figura 10, la RC no modificó el nivel de expresión de CHOP, sugiriendo la no activación de la vía de PERK.

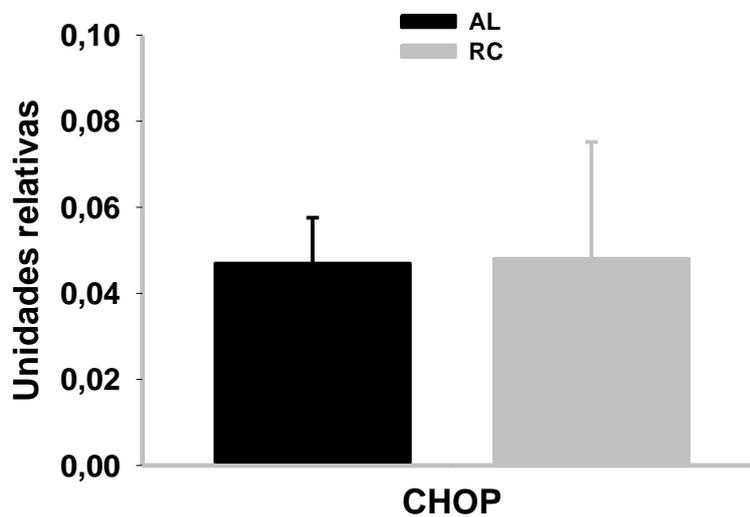


Figura 10. Efecto de la RC sobre la expresión del factor de transcripción CHOP. La RC no modificó la expresión del factor transcripcional CHOP en el hígado de ratas sometidas a RC en comparación con las ratas alimentadas *ad libitum*. $p=0.94$.

En resumen, estos resultados sugieren que la RC produce una estimulación no canónica de la UPR con una activación específica de la vía de IRE1 α , y en concreto de la rama IRE1 α -sXBP1.

Como se comentó anteriormente, la vía de IRE1 α tiene un componente anti-apoptótico en contraposición con la vía de PERK, que presenta un carácter más pro-apoptótico. En este sentido, como se muestra en la Figura 11, la RC aumentó de manera significativa la razón

hepática de sXBP1/CHOP con respecto a las ratas alimentadas *ad libitum*, sugiriendo un predominio de la rama anti-apoptótica sobre la rama pro-apoptótica, lo que podría indicar una mejora en la resistencia al estrés celular basal en general, lo que apoyaría la idea de un menor estrés proteico basal.

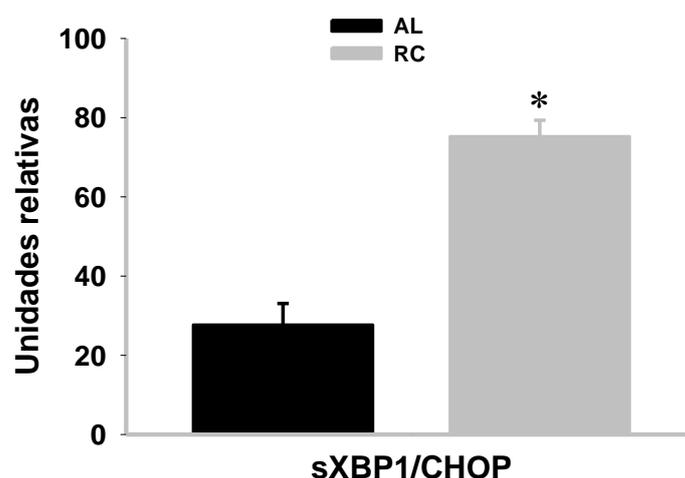


Figura 11. Efecto de la restricción calórica sobre la razón del factor de supervivencia sXBP1 y el factor pro-apoptótico CHOP. La RC aumentó más del doble la razón hepática sXBP1/CHOP en hígado de ratas sometidas a RC en comparación con las ratas alimentadas *ad libitum*. $p=0.00025$.

5.2.3. Efecto de la RC sobre la autofagia

Otro parámetro que evaluamos fue el estado general de la autofagia hepática en respuesta a la RC. Para ello analizamos la expresión de 3 marcadores específicos de la autofagia como son p62, BAG3 y ATG7. Como se puede ver en las Figuras 12, 13 y 14, la RC disminuyó de manera significativa la expresión de p62, pero no la de BAG3 y ATG7, respectivamente. Estos resultados sugerirían que la RC atenúa la actividad autofágica hepática.

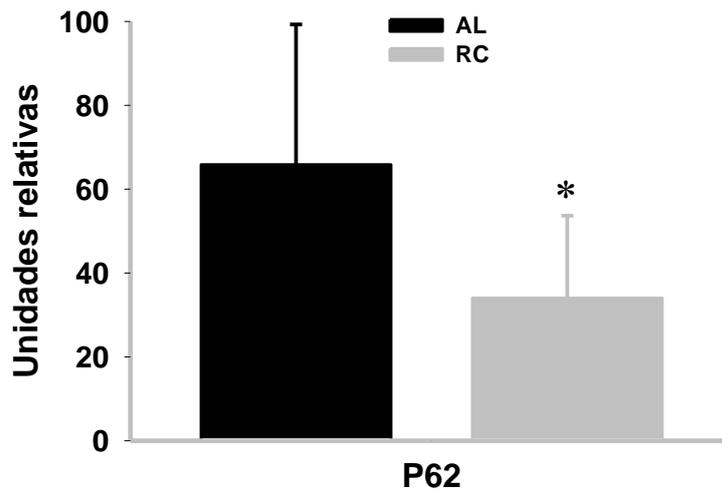


Figura 12. Efecto de la restricción calórica sobre la expresión transcripcional de p62. La RC disminuyó la expresión transcripcional de p62 en el hígado de ratas sometidas a RC en comparación con las ratas alimentadas *ad libitum*. $p=0.035$.

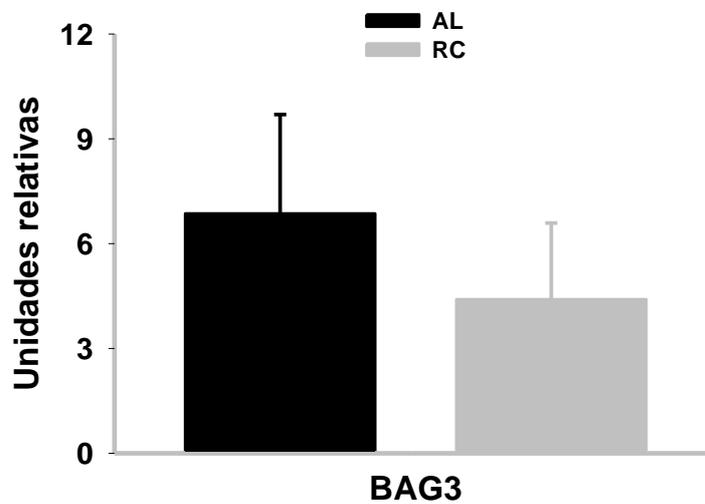


Figura 13. Efecto de la restricción calórica sobre la expresión transcripcional de BAG3. La RC disminuyó la expresión transcripcional de BAG3 en el hígado de ratas sometidas a RC en comparación con las ratas alimentadas *ad libitum*. $p=0.219$.

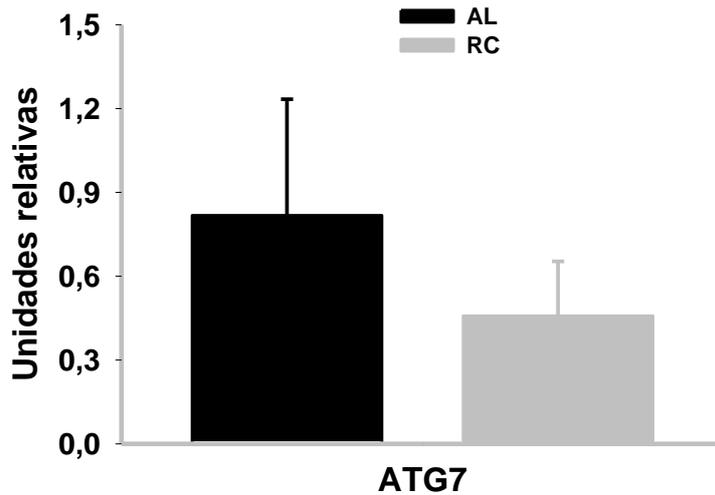


Figura 14. Efecto de la restricción calórica sobre la expresión transcripcional de ATG7. La RC disminuyó la expresión transcripcional de ATG7 en el hígado de ratas sometidas a RC en comparación con las ratas alimentadas *ad libitum*. $p=0.168$.

5.3. Efecto de la RC sobre la inflamación

Por último, también evaluamos el efecto que produce la RC sobre el estado de inflamación hepática basal. Para ello analizamos la expresión transcripcional de dos citocinas pro-inflamatorias como son TNF- α e IL-1 β . Como se muestra en las Figuras 15 y 16, nuestro modelo de RC disminuyó la expresión de ambos mediadores inflamatorios, siendo significativa para IL-1 β , con respecto a los animales alimentados *ad libitum*, lo que sugiere que la RC produce una atenuación de la inflamación hepática basal.

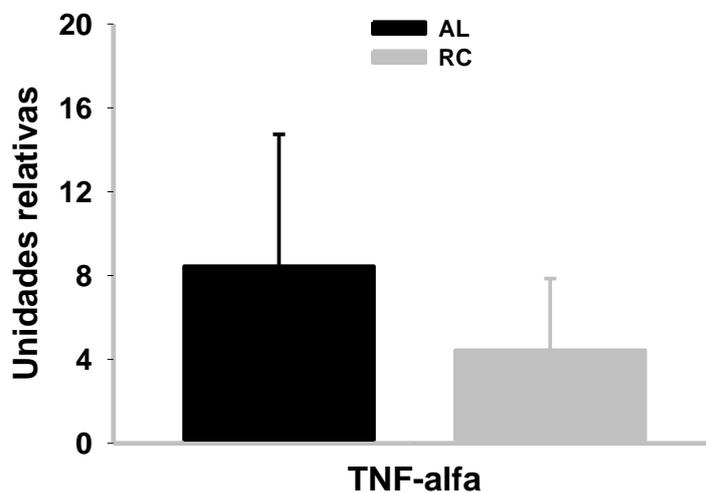


Figura 15. Efecto de la RC sobre la expresión transcripcional de TNF- α . La RC disminuyó la expresión transcripcional de TNF- α en el hígado de ratas sometidas a RC en comparación con las ratas alimentadas *ad libitum*. $p=0.306$.

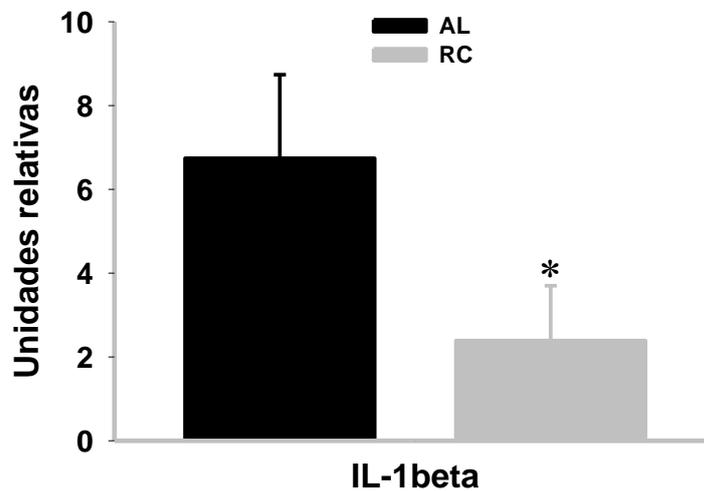


Figura 16. Efecto de la RC sobre la expresión transcripcional de IL-1 β . La RC disminuyó la expresión transcripcional de IL-1 β en el hígado de ratas sometidas a RC en comparación con las ratas alimentadas *ad libitum*. $p=0.017$.

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo nos demuestran que nuestro modelo de RC produce una atenuación general de la expresión transcripcional de los marcadores analizados, lo que sugiere que la RC puede alterar el perfil epigenético de los hepatocitos (ver Tabla 1). En este sentido, diferentes modelos de RC han puesto de manifiesto la existencia de reprogramación epigenética a largo plazo, en diferentes genes relacionados con la inflamación y el control metabólico, en diferentes tejidos y modelos animales (Hernández-Saavedra et al., 2019). Por lo tanto, un primer punto muy importante a tener en cuenta es que la ingesta calórica deja una huella a nivel molecular en nuestras células.

Factores tróficos	↓ IGF-1 ↓ BDNF
UPR	≈ GRP78 ↑ sXBP1 ≈ CHOP ↑ sXBP1/CHOP
Autofagia	↓ p62 ↓ Bag3 ↓ ATG7
Inflamación	↓ TNFalfa ↓ IL-1beta

Tabla 1. Resumen del efecto de la RC sobre la expresión transcripcional de los diferentes marcadores estudiados. Tanto la expresión transcripcional de los marcadores de la inflamación (TNF- α , IL-1 β) como los marcadores de la autofagia (p62, BAG3 y ATG7) y los factores tróficos IGF-1 y BDNF disminuyen en el hígado de ratas al ser sometidas a RC frente a las ratas alimentadas *ad libitum*. En la UPR, la expresión transcripcional de sXBP1 y la razón sXBP1/CHOP aumentan mientras que GRP78 y CHOP permanecen inalterados. En rojo se indican los marcadores que presentan una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Nuestros resultados demuestran que la RC disminuye la expresión de la chaperona HSP70, lo que podría sugerir una disminución del estrés basal proteico. El efecto de la RC sobre la expresión de chaperonas es complejo. Por ejemplo, en ratas sometidas a un ayuno de 48 horas, la expresión de HSP70 aumentó de manera significativa (Ehrenfried et al., 1996). Por otro lado, estudios en músculo en humanos la RC de larga duración aumentó la expresión de HSP70 (Yang et al., 2016). Sin embargo, la RC en ratas produjo una disminución de la expresión de HSP70, así como de GRP78 y otras chaperonas (Spindler et al., 1990; Dhahbi et al., 2001). En

este sentido, nuestros resultados coinciden con estos datos y sugieren que la RC puede tener un efecto órgano-dependiente.

La reducción de los niveles de HSP70 en nuestro modelo de larga duración podría indicar una adaptación a una situación caracterizada por una mejoría general en la proteostasis celular. Por otro lado, se ha observado que la inducción de la chaperona HSP70 disminuye con la edad, lo que indicaría una menor capacidad de protección frente a diferentes tipos de estrés, con respecto a las ratas jóvenes. No obstante, al someter a las ratas a una RC se revierte la disminución de la expresión de HSP70 relacionada con la edad (Heydari et al., 1993), resaltando el efecto beneficioso anti-envejecimiento de la RC.

Por otro lado, nuestros resultados demuestran que la RC no produce una activación completa de la UPR, lo que podría sugerir que la RC reduce de alguna forma la cantidad de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (Spindler et al., 1990). Sin embargo, sí observamos la activación específica de la vía de IRE1 α -sXBP1. Esta activación selectiva sería compatible con una mejor adaptación al estrés celular y al estrés metabólico en particular. La vía de IRE1 α -sXBP1 ejerce un papel regulador en el metabolismo hepático de glúcidos y lípidos, regulando la síntesis de lípidos, y la formación y secreción de VLDL (Wang et al., 2012). Por lo tanto, dado que la RC supone un estrés metabólico, la activación selectiva de la vía IRE1 α -sXBP1, podría tener una función más de reprogramación metabólica, que de establecimiento de la proteostasis. Esta posibilidad se ve apoyada por el hecho de que ha sido demostrado que la sobreexpresión de GRP78/Bip atenúa la UPR significando una regulación negativa de IRE1 α (Kimata et al., 2004). Por lo tanto, la no inducción de GRP78/Bip, tendría un significado doble: por un lado, sugiere la ausencia de estrés proteico, puesto que no se activa la UPR; y por otro lado no inhibiría a la vía de IRE1 α , facilitando la adaptación metabólica.

Con respecto a la UPR, el factor pro-apoptótico CHOP está directamente relacionado con el envejecimiento y la susceptibilidad de las células a los daños oxidativos, por eso sus niveles aumentan conforme aumenta la edad y el daño oxidativo. Sin embargo, ha sido demostrado que la RC atenúa los niveles de CHOP (Ikeyama et al., 2003). En nuestro modelo, la RC a largo plazo no afecta a la expresión de dicho factor, bien por la ausencia de estrés de retículo, o por una adaptación celular al estrés. Esta adaptación pondría de manifiesto a nivel molecular el efecto beneficioso de la RC en hepatocitos, lo que podría desembocar en una mejoría de la supervivencia de los hepatocitos frente a hepatocitos de ratas alimentadas *ad libitum*.

Por último, el efecto de la RC sobre la activación de la UPR también ha mostrado un efecto órgano-dependiente. Así, en el músculo esquelético humano la RC produce una estimulación más general de la UPR (Yang et al., 2016), mientras que nuestros resultados parecen indicar una activación selectiva y posiblemente no relacionada con la alteración de la proteostasis en el hígado de ratas.

Con respecto a la autofagia, los datos disponibles en la literatura ponen de manifiesto que la RC a corto plazo provoca un aumento de la misma en diferentes tejidos incluyendo el hígado (Bagherniya et al., 2018). Dicha activación puede entenderse como una respuesta celular encaminada a facilitar la producción de nutrientes a partir de fuentes endógenas (Liu et al., 2017). Sin embargo, existen pocos trabajos que evalúen el estado de la autofagia en respuesta a situaciones de RC prolongadas. No obstante, la RC a largo plazo también demuestra la activación de la autofagia en el corazón de ratones, un efecto que es dependiente de la proteína Akt2 (Zhang et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados transcripcionales, sin llegar a ser un estudio exhaustivo de la autofagia, ponen de manifiesto la ausencia de inducción o incluso su atenuación en el hígado de rata. Nuestros resultados podrían reflejar una adaptación metabólica de los hepatocitos, en el sentido de que han conseguido una optimización en la obtención de los nutrientes. Esta atenuación o reducción concuerda con otros estudios donde la RC produce la activación inicial seguida de atenuación en el hígado de ratones, y pone de manifiesto que tanto el grado de activación como de atenuación de la autofagia en respuesta a la RC es órgano-dependiente (Mizushima et al., 2004).

En resumen, los datos referentes a la UPR y a la autofagia ponen de manifiesto la ausencia de estrés proteico en nuestro modelo hepático de RC, y sugieren la posibilidad de un ajuste metabólico que podría estar motivado, al menos en parte, por la activación de la vía IRE1 α -sXBP1.

Con la RC, además de un metabolismo más eficiente, se produce al mismo tiempo un bloqueo de las vías de crecimiento, como se ha observado en el tejido muscular (Sharples et al., 2015). En este sentido, la disminución de la expresión de IGF-1 sería compatible con esta idea. La reducción de los niveles de IGF-1 se ha observado tanto en modelos de RC aguda como crónica (Henning et al., 2013). Por otro lado, BDNF juega un papel importante en la regulación metabólica. No solo actúa sobre los niveles de glucosa en sangre, sino que también interviene en el balance energético global (Jo y Chua, 2013). En los hepatocitos y en el músculo, BDNF

activa AMPK que a su vez pone en marcha diferentes vías catabólicas como la oxidación de los ácidos grasos. Sin embargo, en las neuronas BDNF provoca una inhibición de AMPK (Genzer et al., 2017). Este factor aumenta la supervivencia y diferenciación de las neuronas contribuyendo al desarrollo del sistema nervioso central. Asimismo, reduce los niveles de glucosa hepática, hecho que concuerda con nuestro resultado (Figura 6) ya que al existir RC los niveles de BDNF se reducen.

La inflamación crónica está estrechamente relacionada con el envejecimiento y constituye un factor de riesgo de enfermedades relacionadas con la edad (cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, etc.) (Schett y Neurath, 2018). La RC a largo plazo, al igual que la RC a corto plazo (Wright et al., 2020), va a disminuir la inflamación y promueve variaciones en el plegamiento proteico, por lo que es clave para el control de calidad de proteínas y preservar la funcionalidad celular frente al efecto negativo de la edad (Ben-Zvi et al., 2009). Nuestros resultados indican que la RC produce una reducción en la expresión de dos citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β . Resultados similares han sido descritos para la interleucina 6 y para la proteína C reactiva por otros autores (Ugochukwu y Figgers, 2006; González et al., 2012). Por tanto, el estado inflamatorio hepático se mejora de manera eficaz con la RC. La RC es uno de los métodos más eficaces para la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias hepáticas (Park et al., 2017), aunque también muestra sus beneficios en otros tejidos: reduce la inflamación y mejora la función endotelial (Mohammandi et al., 2014).

En resumen, la RC a largo plazo promueve una adaptación celular y una mejora del estrés celular que va a ayudar a prevenir el envejecimiento y las enfermedades asociadas al mismo. Esta mejora se basa en una optimización de la proteostasis celular, un reajuste metabólico y la reducción de la inflamación. No obstante, hay que tener en cuenta la duración de la RC y el órgano bajo estudio.

7. CONCLUSIONES

Atendiendo a los resultados obtenidos y a los descritos por otros estudios podemos concluir que la RC:

- I. A largo plazo no induce estrés proteico, pues no se activa ni la UPR ni la autofagia, sino que impulsa una reprogramación metabólica a través de la activación de la vía IRE1 α -sXBP1. Este reajuste permite a la célula hepática una optimización de la proteostasis celular.
- II. A corto plazo induce una respuesta autofágica en los hepatocitos para facilitar la obtención de nutrientes. Sin embargo, con la RC prolongada se atenúa esta respuesta apoyando la idea de haber alcanzado una mejoría en el estado celular, donde se optimiza la obtención de energía.
- III. Bloquea las vías de crecimiento reduciendo los niveles de expresión de los factores tróficos IGF-1 y BDNF.
- IV. Tanto aguda como crónica reduce la inflamación de los hepatocitos de manera eficaz, por lo que es un método a tener en cuenta para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias hepáticas.
- V. Es órgano-dependiente: el efecto que produce no es el mismo en todos los tejidos u órganos. HSP70 y otras chaperonas disminuyen en hígado de rata mientras que aumentan en músculo humano. Lo mismo ocurre con la UPR.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Anisimov VN, Bartke A. The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;87(3):201-223.
2. Bagherniya M, Butler AE, Barreto GE, Sahebkar A. The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. *Ageing Res Rev*. 2018; 47:183-197.
3. Balasubramanian P, Howell PR, Anderson RM. Aging and caloric restriction research: A biological perspective with translational potential. *EBioMedicine*. 2017; 21:37-44.
4. Barger JL, Anderson RM, Newton MA, et al. A conserved transcriptional signature of delayed aging and reduced disease vulnerability is partially mediated by SIRT3. *PLoS One*. 2015;10(4):e0120738.
5. ben-Zvi A, Miller EA, Morimoto RI. Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(35):14914-9.
6. Chino H, Mizushima N. ER-Phagy: Quality control and turnover of endoplasmic reticulum. *Trends Cell Biol*. 2020;30(5):384-398.
7. Costas MA, Rubio MF. Autofagia, una estrategia de supervivencia celular [Autophagy. A strategy for cell survival]. *Medicina (B Aires)*. 2017;77(4):314-320.
8. Del Campo JA, Gallego P, Grande L. Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies. *World J Hepatol*. 2018;10(1):1-7.
9. Dhahbi JM, Cao SX, Tillman JB, Mote PL, Madore M, Walford RL, et al. Chaperone-mediated regulation of hepatic protein secretion by caloric restriction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284(2):335-9.
10. Dokladny K, Myers OB, Moseley PL. Heat shock response and autophagy--cooperation and control. *Autophagy*. 2015;11(2):200-13. doi: 10.1080/15548627.2015.1009776.
11. Ehrenfried JA, Evers BM, Chu KU, Townsend CM Jr, Thompson JC. Caloric restriction increases the expression of heat shock protein in the gut. *Ann Surg*. 1996;223(5):592-7; discussion 597-9.
12. Fernández-Fernández MR, Valpuesta JM. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. 2018;7:F1000 Faculty Rev-1497.
13. Fontana L, Villareal DT, Das SK, Steven RS, Simin NM, anastassios GP, et al. Effects of 2-year calorie restriction on circulating levels of IGF-1, IGF-binding proteins and cortisol in nonobese men and women: a randomized clinical trial. *Aging Cell*. 2016;15(1):22-27.

14. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med*. 2019;25(12):1822-1832.
15. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*. 2017;36(13):1811-1836.
16. Genzer Y, Chapnik N, Froy O. Effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on hepatocyte metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;88:69-74.
17. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221(1):3-12.
18. González O, Tobia C, Ebersole J, Novak MJ. Caloric restriction and chronic inflammatory diseases. *Oral Dis*. 2012;18(1):16-31.
19. Han J, Hou W, Goldstein LA, Stolz DB, Watkins SC, Rabinowich H. A Complex between Atg7 and Caspase-9: A NOVEL MECHANISM OF CROSS-REGULATION BETWEEN AUTOPHAGY AND APOPTOSIS. *J Biol Chem*. 2014;289(10):6485-6497.
20. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):774-785.
21. Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med*. 2004;71(5):289-297.
22. Henning PC, Scofield DE, Rarick KR, Pierce JR, Staab JS, Lieberman HR, et al. Effects of acute caloric restriction compared to caloric balance on the temporal response of the IGF-I system. *Metabolism*. 2013;62(2):179-87.
23. Hernández-Saavedra D, Moody L, Xu GB, Chen H, Pan YX. Epigenetic regulation of metabolism and inflammation by calorie restriction. *Adv Nutr*. 2019;10(3):520-536.
24. Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, Richardson A. Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol Cell Biol*. 1993; 13(5):2909-2918.
25. Ikeyama S, Wang XT, Li J, Podlutzky A, Martindale JL, Kokkonen G, et al. Expression of the pro-apoptotic gene gadd153/chop is elevated in liver with aging and sensitizes cells to oxidant injury. *J Biol Chem*. 2003; 278(19):16726-16731.
26. Jo YH, Chua SC Jr. The brain-liver connection between BDNF and glucose control. *Diabetes*. 2013; 62(5):1367-1368.

27. Kimata Y, Oikawa D, Shimizu Y, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K. A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol.* 2004;167(3):445-456.
28. Lee EJ, Chiang WJ, Kroeger H, Bi CX, Chao DL, Skowronska-Krawczyk D, et al. Multiexon deletion alleles of ATF6 linked to achromatopsia. *JCI Insight.* 2020; 5(7): e136041.
29. Liang FQ, Allen G, Earnest D. Role of brain-derived neurotrophic factor in the circadian regulation of the suprachiasmatic pacemaker by light. *J Neurosci.* 2000; 20(8):2978-2987.
30. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett.* 2016; 21:29.
31. Liu X, Green RM. Endoplasmic reticulum stress and liver diseases. *Liver Res.* 2019;3(1):55-64.
32. Liu Y, Wang R, Zhao Z, Dong W, Chang X, Chen X, et al. Short-term caloric restriction exerts neuroprotective effects following mild traumatic brain injury by promoting autophagy and inhibiting astrocyte activation. *Behav Brain Res.* 2017; 331:135-142.
33. López-Lluch G, Navas P. Calorie restriction as an intervention in ageing. *J Physiol.* 2016;594(8):2043-2060.
34. Manchishi SM, Cui RJ, Zou XH, Cheng ZQ, Li BJ. Effect of caloric restriction on depression. *J Cell Mol Med.* 2018 ;22(5):2528-2535.
35. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature.* 2012;489(7415):318-321.
36. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell.* 2004;15(3):1101-1111.
37. Mohammadi M, Ghaznavi R, Keyhanmanesh R, Sadeghipour HR, Naderi R, Mohammadi H. Caloric restriction prevents lead-induced oxidative stress and inflammation in rat liver. *ScientificWorldJournal.* 2014:821524.
38. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol.* 2015; 10:173-194.
39. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2008;18(6):407-421.

40. Park CY, Park S, Kim MS, Kim HK, Han SN. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;490(3):636-642.
41. Prole DL, Chinnery PF, Jones NS. Visualizing, quantifying, and manipulating mitochondrial DNA in vivo. *J Biol Chem.* 2020;295(51):17588-17601.
42. Redman LM, Veldhuis JD, Rood J, Smith SR, Williamson D, Ravussin E, et al. The effect of caloric restriction interventions on growth hormone secretion in nonobese men and women. *Aging Cell.* 2010;9(1):32-39.
43. Schett G, Neurath MF. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nat Commun.* 2018;9(1):3261.
44. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):79-94.
45. Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(3):141-148.
46. Sharples AP, Hughes DC, Deane CS, Saini A, Selman C, Stewart CE. Longevity and skeletal muscle mass: the role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake. *Aging Cell.* 2015;14(4):511-523.
47. Spindler SR, Crew MD, Mote PL, Grizzle JM, Walford RL. Dietary energy restriction in mice reduces hepatic expression of glucose-regulated protein 78 (BiP) and 94 mRNA. *J Nutr.* 1990;120(11):1412-7.
48. Tao Y, Wang M, Chen E, Tang H. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. *Mediators Inflamm.* 2017:4256352.
49. Torrillas, R. Efecto de la restricción calórica sobre la proteostasis celular en el hipocampo de rata. 2016; (41).
50. Ugochukwu NH, Figgers CL. Dietary caloric restriction modifies inflammatory responses in the livers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition research.* 2006; 26(5), 221-226.
51. Verfaillie T, Rubio N, Garg AD, Bultynck G, Rizzuto R, Decuypere JP, et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 2012;19(11):1880-1891.
52. Wang S, Chen Z, Lam V, Han J, Hassler J, Finck BN, et al. IRE1 α -XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis. *Cell Metab.* 2012;16(4):473-486.

53. Wright H, Handu M, Jankeel A, Messaoudi I, Varlamov O. Short-term caloric restriction attenuates obesity-induced pro-inflammatory response in male rhesus macaques. *Nutrients*. 2020;12(2):511.
54. Xu X, Duan S, Yi F, Ocampo A, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab*. 2013 Sep 3;18(3):325-32.
55. Yang L, Licastro D, Cava E, Veronese N, Spelta F, Rizza W, et al. Long-term calorie restriction enhances cellular quality-control processes in human skeletal muscle. *Cell Rep*. 2016;14(3):422-428.
56. Yang Y, Klionsky DJ. Autophagy and disease: unanswered questions. *Cell Death Differ*. 2020;27(3):858-871.
57. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J*. 2007;274(3):630-658.
58. Zhang Y, Han X, Hu N, Huff AF, Gao F, Ren J. Akt2 knockout alleviates prolonged caloric restriction-induced change in cardiac contractile function through regulation of autophagy. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;71:81-91.
59. Zhao S, Wang JM, Yan J, Zhang DL, Liu BQ, Jiang JY, et al. BAG3 promotes autophagy and glutaminolysis via stabilizing glutaminase. *Cell Death Dis*. 2019;10(4):284.