



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ANÁLISIS DE LÍPIDOS Y CARBOHIDRATOS EN UN MODELO
DE DIABETES TIPO II EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA

BIÓL. ALEJANDRO REYES DE LA TORRE

TUTOR PRINCIPAL

DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

CAMPUS JURQUILLA, QUERÉTARO. NOVIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por Alejandro Reyes De la Torre, cuyo título es: “Análisis de lípidos y carbohidratos en un modelo de diabetes tipo II en *Drosophila melanogaster*” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología), y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. _____

Secretario (Tutor)

Dr. _____

Vocal

Dr. _____

Suplente

Dr. _____

Suplente

Dr. _____

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

La diabetes tipo 2 es una enfermedad crónica caracterizada por resistencia a la insulina, hiperglucemia y ácidos grasos elevados en circulación. Se exploró el aspecto crónico de la diabetes tipo 2 en *Drosophila* haciendo mediciones de lípidos y carbohidratos totales en larvas de tercer instar y moscas hembras adultas, mutantes para la vía de la insulina y controles a 1, 7, 14 y 28 días después de la eclosión. También se hicieron estimaciones de volumen de lípidos en adipocitos abdominales de moscas adultas de 1 día mediante tinción con Rojo Nilo. Se encontró que existen diferencias significativas en la cantidad de carbohidratos en larvas mutantes *Dp110*, así como un aumento en el tiempo en adultos mutantes *InR*, *chico* y *PKB* ($P < 0.01$). Además, se observaron niveles superiores de lípidos en larvas mutantes *InR*, *Dp110*, *PKB* y *S6K*, así como en adultos mutantes *InR*, *Dp110* y *PKB*, observándose un incremento sostenido de estos a través del tiempo ($P < 0.01$). Finalmente, en las observaciones de adipocitos individuales se apreció un menor tamaño celular en moscas mutantes *Dp110* y *PKB* ($P < 0.05$). Los resultados de carbohidratos y lípidos concuerdan con los reportados anteriormente, así como la reducción de tamaño en células de moscas mutantes de la vía de la insulina. En el presente trabajo se prueba de manera más extensiva que existen alteraciones metabólicas y de tamaño en las moscas mutantes de la vía de la insulina. Por tanto, *Drosophila melanogaster* sirve como modelo de diabetes tipo 2 para estudiar otros aspectos de la enfermedad, como los crónicos en la regulación metabólica a través del ciclo de vida de este insecto.

SUMMARY

Type 2 diabetes is a chronic disease characterized by peripheral insulin resistance, high glucose, and elevated free fatty acids. We used *Drosophila melanogaster* as a model to study chronic aspects of type 2 diabetes. We measured total lipid and carbohydrate contents from insulin pathway mutant and control third instar larvae and adult female flies at 1, 7, 14 and 28 days after eclosion. We measured total lipid cellular volume with Nile Red staining of isolated abdominal adipocytes of 1-day-old mutant and control adult flies. Results show significant differences on total carbohydrates in *Dp110* mutant larvae, as well as increases on carbohydrates throughout time in *InR*, *chico* and *PKB* mutant adults ($P < 0.01$). Besides, *InR*, *Dp110*, *PKB* and *S6K* mutant larvae show higher lipid levels, as well as lipid increases throughout time in *InR*, *Dp110* and *PKB* mutant adults ($P < 0.01$). Finally, adipocytes are significantly smaller in *Dp110* and *PKB* mutants. Present results on carbohydrates and lipids, as well as cell size reductions, are in agreement with published results. In summary, in this work we thoroughly demonstrate metabolic and size alterations in *Drosophila* insulin pathway mutants, providing more evidence to support *Drosophila melanogaster* as an excellent experimental model for the study of type 2 diabetes, such as the chronic aspects of metabolic regulation.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Becario No: 369737

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

Becario No. 511006980

Unidad de Microscopía

Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos

Biblioteca

Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela

Videoconferencia

Lic. Lourdes Lara Ayala

Unidad de Enseñanza

M. en C. Leonor Casanova Rico

Donativos:

CONACYT 81864 y PAPIIT 203110 y IN200313 a JRRE.

A mi comité tutorial

Dra. Rocío Salceda

Dra. Yazmín Macotela

Dr. Juan Riesgo

DEDICATORIA

A Oli, a mis padres y a mis amigos.

ÍNDICE

	PÁGINA
• RESUMEN EN ESPAÑOL.....	III
• RESUMEN EN INGLÉS.....	IV
• AGRADECIMIENTOS.....	V
• DEDICATORIA.....	VI
• INTRODUCCIÓN.....	1
• ANTECEDENTES.....	3
1. Metabolismo de carbohidratos.....	3
1.1 Vertebrados.....	3
1.2 Invertebrados.....	4
1.2.1 Trehalosa.....	5
2. La vía de señalización de la insulina.....	7
3. Metabolismo de lípidos.....	13
4. Diabetes.....	16
• JUSTIFICACIÓN.....	19
• HIPÓTESIS.....	19
• OBJETIVOS.....	19
• MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
1. Sujetos experimentales.....	20
2. Carbohidratos totales.....	23
3. Lípidos totales.....	23
4. Histología.....	23
5. Análisis estadístico.....	24
• RESULTADOS.....	25
1. Carbohidratos.....	25
1.1 Larvas.....	25
1.2 Adultos.....	27
2. Lípidos.....	31
2.1 Larvas.....	31

2.2 Adultos.....	33
3. Histología.....	37
3.1 Tamaño del adipocito.....	40
3.2 Proporción de lípidos en el adipocito.....	42
• DISCUSIÓN.....	45
• CONCLUSIONES.....	50
• REFERENCIAS.....	51
• LISTA DE FIGURAS.....	56
• LISTA DE TABLAS.....	61
• APÉNDICE.....	62

INTRODUCCIÓN

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, fue utilizada formalmente como organismo experimental a partir de los estudios sobre la teoría cromosómica de la herencia realizados por T. H. Morgan y sus colaboradores a principios del siglo XX; desde entonces el trabajo con este pequeño organismo nos ha provisto de una gran cantidad de conocimientos en biología, genética y desarrollo (St Johnston, 2002; Griffiths, 2008). *Drosophila* es un insecto holometábolo cuyo desarrollo incluye varias etapas: embrión, larva, pupa y adulto. A temperatura ambiente, su desarrollo embrionario dura apenas unas 24 horas y la etapa larvaria alrededor de 5 días. A estas etapas sucede el estadio pupal por 4 días más para finalmente emerger de la metamorfosis como adulto, por lo que su tiempo de generación es de aproximadamente diez días. Esto posibilita el estudio de varias generaciones en poco tiempo. Las hembras son muy prolíficas, además que pueden llegar a vivir de 45 a 60 días. *Drosophila* sólo tiene cuatro cromosomas y no existe recombinación meiótica en los machos. El exoesqueleto de los adultos posee elementos apreciables al estereomicroscopio (ojos compuestos, venas de las alas y quetas) que pueden verse afectados por mutaciones y producen fenotipos característicos. Estos pueden ser utilizados en varias mutaciones muy bien caracterizadas, que se usan como marcadores genéticos en cromosomas balanceadores. Los cromosomas balanceadores son herramientas que sirven al genetista para evitar la recombinación y hacer un seguimiento de otras mutaciones de interés en cromosomas homólogos. Con estas características, *Drosophila* ofrece muchas ventajas como organismo experimental, ya que además es fácil y económico de mantener en condiciones de laboratorio, ideal para el análisis genético (Ashburner, 1989). Probablemente la mosca de la fruta sea hoy el modelo genético mejor caracterizado, ya que su genoma fue secuenciado en su totalidad y publicado por primera vez en el año 2000 (Adams *et al.*, 2000; Kornberg y Krasnow, 2000). También existe una gran colección de cepas mutantes. Por ejemplo, en la actualidad existen más de 50,000 líneas mutantes disponibles en el Bloomington *Drosophila* Stock Center de la Universidad de Indiana (BDSC, 2013).

Además de su versatilidad como organismo experimental, una ventaja adicional es que existe una fuerte conservación evolutiva entre los procesos biológicos de las moscas y los humanos, por lo que hay homología en un gran número de genes requeridos para funciones diversas, desde factores de transcripción, proteínas estructurales, canales iónicos y moléculas de señalización, hasta moléculas implicadas en conducta y sueño (Kornberg y Krasnow, 2000). La investigación con *Drosophila* ha contribuido también al avance en el entendimiento de procesos metabólicos; por ejemplo en la vía de señalización de la insulina/Insulin-like Growth Factor (IGF)/Target of Rapamycin (TOR) (Oldham y Hafen, 2003), la cual se encuentra conservada desde nematodos hasta vertebrados. Esta vía tiene un papel central en el crecimiento, metabolismo, reproducción y longevidad del organismo. En mamíferos esta vía regula el metabolismo anabólico incrementando la captura de glucosa, promoviendo su almacenamiento en tejido adiposo, hepático y muscular (Saltiel y Kahn, 2001; Giannakou y Partridge, 2007).

Esfuerzos recientes se han enfocado al estudio de la regulación del metabolismo de carbohidratos, especialmente por el creciente interés en el entendimiento de enfermedades metabólicas, tales como la obesidad y la diabetes tipo 2 (Baker y Thummel, 2007). La desregulación en la liberación de la insulina y la resistencia a la insulina, que son características de la diabetes en humanos, han sido estudiadas también en moscas mutantes hipomorfas de la vía de la insulina, así como en moscas obesas (Bohni *et al.*, 1999; Broughton *et al.*, 2008; Murillo-Maldonado *et al.*, 2011; Musselman *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se indagó en el aspecto crónico de la diabetes tipo 2 en un modelo experimental de *Drosophila* mutantes de la vía de la insulina. Se hicieron mediciones de lípidos y carbohidratos totales en larvas de tercer instar y moscas hembras adultas de 1, 7, 14 y 28 días de edad, además de larvas de tercer instar tardío. También se hicieron estimaciones del tamaño y el volumen de lípidos en adipocitos abdominales de moscas adultas de 1 día por medio de una tinción con Rojo Nilo.

ANTECEDENTES

1. Metabolismo de carbohidratos

1.1 Vertebrados

La glucosa es un monosacárido utilizado como fuente primaria de energía por la célula, desde bacterias hasta mamíferos. En periodos de ayuno y alimentación en vertebrados, su concentración en plasma se mantiene entre 4 y 7 mM, equivalente a cerca del 0.1%. Este estricto control es gobernado por el balance entre la absorción de glucosa desde el intestino, su producción en el hígado (gluconeogénesis), y su recaptura y utilización en tejidos periféricos (Saltiel y Kahn, 2001). Esta homeostasis de la glucosa es mantenida por un mecanismo de retroalimentación dependiente de dos hormonas pancreáticas: insulina y glucagón, la primera con acción anabólica y la última con acción catabólica. La insulina promueve la internalización de glucosa en músculo y tejido adiposo y consecuentemente la síntesis de glucógeno en hígado, el glucagón induce su hidrólisis. En peces, reptiles y mamíferos las acciones metabólicas de la insulina han sido bien documentadas, por lo que se sabe que el metabolismo de carbohidratos se encuentra muy conservado evolutivamente (Ebberink *et al.*, 1989; Jin Chan y Steiner, 2000).

El mecanismo de internalización celular de glucosa dependiente de insulina se describió en adipocitos en cultivo en la década de 1990 por medio de la estimulación con insulina. La insulina provoca la activación de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K), a través de una vía de transducción, que incluye entre otros Akt, Rab8 y Rab13, y que tiene como objetivo el reclutamiento de una mayor cantidad de transportadores GLUT4 (de la familia de facilitadores de carbohidratos GLUT) a la membrana plasmática a partir de un pool de GLUT4 en un compartimiento membranal intracelular ((Cheatham *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 2010). Esta traslocación dependiente de insulina de GLUT4 a la membrana se ha identificado como el paso limitante en la captura de glucosa en el músculo cardíaco y esquelético, así como en el tejido adiposo (Huang y Czech, 2007). Además,

la insulina también estimula la síntesis de glucógeno en tejidos blancos (Saltiel y Kahn, 2001).

1.2 Invertebrados

Tal como ocurre en vertebrados con la insulina y el glucagón, los invertebrados poseen hormonas con funciones homólogas: los péptidos insulinoides (Insulin-like Peptides, ILPs, con acción anabólica) y las hormonas adipocinéticas (Adipokinetic Hormones, AKH, con acción catabólica). *Drosophila melanogaster* regula también sus niveles de carbohidratos circulantes y almacena los excesos de energía en forma de glucógeno y lípidos (Teleman, 2010).

También en la década de 1990 se describió un sistema de transporte de glucosa en *Drosophila* con una cinética semejante a la de los transportadores GLUT (Wang y Wang, 1993); y posteriormente se clonó y secuenció un cDNA con homología del 68% al transportador de glucosa GLUT1 de humanos (Escher y Rasmuson-Lestander, 1999).

A diferencia de los vertebrados, en donde, como se mencionó anteriormente, ocurre una muy fina regulación de la concentración de glucosa en circulación (0.1% independientemente de la presencia o falta de alimento, temperatura ambiental, estado de estrés oxidativo, o escasez de agua) y no existen otros carbohidratos que circulen como moneda de intercambio energético, la concentración de carbohidratos, particularmente trehalosa, un disacárido de glucosa (Figura 1) en la hemolinfa, varía de manera importante (fluctuando hasta llegar a concentraciones del 2%) en función del estado nutricional y fisiológico, la etapa de desarrollo y las condiciones ambientales (Thompson, 2003; Reyes-DelaTorre *et al.*, 2012). Sin embargo, esto no quiere decir que los carbohidratos en la hemolinfa de insectos no estén también sujetos a una regulación.

1.2.1 Trehalosa

Es importante considerar que existen diferencias en los carbohidratos circulantes de vertebrados e invertebrados. En la hemolinfa de invertebrados además de glucosa, la trehalosa es un componente muy abundante (Wyatt y Kale, 1957). La concentración de trehalosa en la hemolinfa de insectos, así como la glucosa en la sangre de mamíferos, está regulada por hormonas. Además de los ILPs y las AKH, se han descrito otros péptidos de la familia de las AKH, los cuales promueven la síntesis de trehalosa en el cuerpo graso de insectos, y por consiguiente un incremento en la concentración de trehalosa en hemolinfa. Estos péptidos son conocidos como hormonas hipertrehalósémicas (Hypertrehalosemic Hormones, HTH; Lee y Park, 2004). Las HTH son producidas por células neurosecretoras del *corpora cardiaca*, parte de la glándula en forma de anillo (ring gland) de insectos, que se localiza rodeando el proventrículo anterior en el tórax de *Drosophila* (Demerec, 1994). Las HTH son secretadas en respuesta a una variedad de estímulos dependientes de requerimientos energéticos o estrés, tales como la ausencia de alimento, deshidratación, cambios de temperatura o durante el vuelo. Por medio de la ablación de las células neurosecretoras de HTH se puede observar un decaimiento en los niveles de trehalosa en hemolinfa en larvas de *Drosophila*; por el contrario, la sobreexpresión de las HTH provoca concentraciones altas de trehalosa (Lee y Park, 2004).

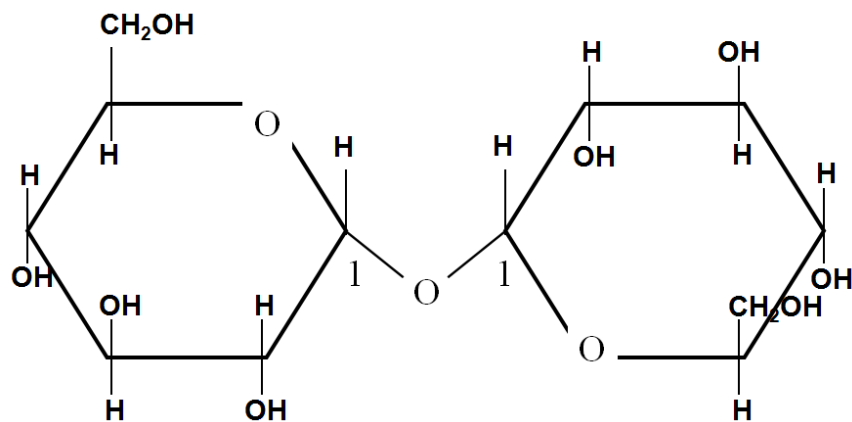


Fig. 1. Estructura de la trehalosa (α 1-D-glucopiranosil1- α 1-D-glucopiranosido, tomada de Reyes-DelaTorre *et al.*, 2012).

Los receptores a HTH son receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Staubli *et al.*, 2002). Mutaciones en el receptor a HTH de *Drosophila* generan fenotipos de acumulación de glucógeno y lípidos en el cuerpo graso, independientemente del estado nutricional (Bharucha *et al.*, 2008); sin embargo se conoce poco sobre las vías de señalización involucradas en su activación. En cucarachas se ha observado la acumulación de inositol trifosfato (IP3) y la consecuente activación de la proteína cinasa C (PKC), lo cual produce un incremento en la actividad de la glucógeno fosforilasa, una enzima en la vía biosintética de la trehalosa en el cuerpo graso (Sun *et al.*, 2002).

El anabolismo de la trehalosa es dependiente de las HTH y de la enzima glucógeno fosforilasa. Su catabolismo es dependiente de la enzima trehalasa, que provoca el rompimiento de la trehalosa, produciendo glucosa. La trehalasa se encuentra tanto de manera soluble, como unida a la membrana plasmática, y se expresa en una gran variedad de tejidos en *Drosophila* y en células de la hemolinfa (hemocitos) de este y otros insectos (Thompson, 2003; McQuilton *et al.*, 2011).

La trehalosa en insectos es entonces una importante fuente de energía y carbono al ser utilizada como un combustible de “alto octanaje”. Se ha demostrado que es el carbohidrato preferentemente utilizado durante el vuelo por insectos como la langosta y la cucaracha (Chino *et al.*, 1992; Kono *et al.*, 1994). Por otro lado, posee propiedades físicas particulares que la distinguen de otros disacáridos como la sacarosa, ya que siendo un azúcar no reductor, no es tóxica en altas concentraciones; además es altamente higroscópica, tiene mayor viscosidad y forma puentes de hidrógeno más fácilmente con proteínas u otras moléculas orgánicas (Thompson, 2003; Ohtake y Wang, 2011). Estas características hacen de la trehalosa un excelente agente estabilizador de biomoléculas, y en los organismos donde está presente se ha observado que cumple un importante papel en la resistencia a la deshidratación (Watanabe *et al.*, 2002; Thorat *et al.*, 2012), cambios de temperatura (Khani *et al.*, 2007; Mahmud *et al.*, 2012), hipoxia (Chen *et al.*, 2002) y estrés oxidativo (Benaroudj *et al.*, 2001).

2. La vía de señalización de la insulina

La insulina en vertebrados es una proteína compuesta por dos cadenas polipeptídicas (A y B) unidas por puentes disulfuro. El producto primario de la traducción del mRNA de la insulina es un polipéptido único, preproinsulina, el cual contiene un péptido señal de secreción que es eliminado durante el proceso de traslocación del precursor al retículo endoplásmico. En la molécula resultante, la proinsulina, las cadenas B y A aún se encuentran conectadas por el péptido intermedio C. El orden de amino (NH₂-) a carboxilo terminal (-COOH) de los péptidos es B-C-A. El péptido C muestra una variación importante entre especies. Además de estos péptidos, los factores de crecimiento insulinoideos (insulin-like growth factors, IGFs) contienen partes D y E. Sin embargo, los factores insulinoideos no se limitan a vertebrados; en otros organismos se denominan péptidos relacionados a la insulina (insulin-related peptides, IRFs) o ILPs (Claeys *et al.*, 2002).

Si se considera entonces que existen diferencias en la regulación metabólica de carbohidratos en moscas y humanos se podría pensar que estos organismos tienen poco en común; sin embargo existe una cantidad considerable de evidencia que indica lo contrario. Por ejemplo, en ratones, la mutación de los genes de insulina *Ins1* e *Ins2* produce retardo en el crecimiento, un peso corporal menor (22% más chicos), desarrollo temprano de diabetes tipo 2, cetoacidosis y niveles altos de triglicéridos (Duvillié *et al.*, 1997). La mutación de *IGF1*, *IGF2* o de su receptor *IGFR* tiene como resultado una reducción dramática en el peso y tamaño corporal (Efstratiadis, 1998). En *Drosophila*, la ablación de las células neurosecretoras de insulina (Neurosecretory Cells, NSC) que producen los ILPs 2, 3 y 5 en el cerebro durante la etapa larvaria resulta en adultos con retraso en el desarrollo, tamaño corporal reducido y niveles de carbohidratos y lípidos corporales totales elevados, medidos éstos últimos en los dos primeros días después de la eclosión de la pupa. La ablación de estas mismas células en adultos conduce a una trehalosemia incrementada sin los fenotipos de crecimiento. El bloqueo de la expresión de ILP2 en las NSC por RNAi provoca niveles de trehalosa corporal total elevados (Rulifson *et al.*, 2002; Broughton *et al.*, 2008). Estos efectos

fisiológicos de la ablación de las NSC, o reduciendo los niveles de ILPs causa azúcares circulantes elevados y acumulación de lípidos, y son análogas a los efectos observados en pacientes diabéticos o en modelos de diabetes tipo 1 en ratones, cuando hay falta de insulina (Teleman, 2010). Además, el receptor a insulina de *Drosophila* tiene una estructura semejante al receptor a insulina de humanos y es capaz de fosforilarse en respuesta a insulina humana (Fernandez-Almonacid y Rosen, 1987), y los DILPs tienen bioactividad de insulina al ser inyectados en ratones (Meneses y de los Angeles Ortíz, 1975). Por lo tanto, tanto en vertebrados como en invertebrados, la activación de la vía influencia el tamaño de la célula y del organismo, así como el metabolismo (Bohni *et al.*, 1999; Brogiolo *et al.*, 2001).

Como ha sido mencionado, la vía de señalización de la insulina se encuentra fuertemente conservada desde nematodos hasta vertebrados. En mamíferos, la vía de Insulina/IGF controla el crecimiento, la proliferación, el metabolismo y la supervivencia. Tanto el receptor a insulina (Insulin Receptor, IR) como el receptor a factores de crecimiento insulinoides (Insulin-like Growth Factor Receptor, IGFR) son proteínas tetraméricas que consisten de dos subunidades α y dos subunidades β , que funcionan como enzimas alostéricas, donde la subunidad α inhibe la actividad tirosina cinasa de la subunidad β . La unión de la insulina al receptor conduce a la desinhibición de la subunidad α , lo cual incrementa su actividad de cinasa. Esta activación recluta a los sustratos del receptor a insulina (Insulin Receptor Substrate, IRS1 – IRS4) y a otros sustratos con dominios con homología a Src 2 (Src-homology-2). La existencia de varios IRS y la unión de otros sustratos al IR se explica debido a las diferentes funciones de la vía a nivel celular, diferencias en distribución tisular, localización subcelular y actividad intrínseca en distintas especies celulares. Entre los eventos celulares que ocurren después de la activación del complejo IR-IRS se encuentran la activación de la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), la activación de la proteína cinasa B (Akt/PKB), la activación de la cinasa anabólica mTOR (mammalian Target of Rapamycin), y la fosforilación de los factores de transcripción forkhead (FOXO) (Saltiel y Kahn, 2001; Oldham y Hafen, 2003). Además, se ha observado que se requiere de la activación de las proteínas cinasas C atípicas (PKC- ζ y PKC- λ), el complejo de la

proteína CAP (c-Cbl-associated protein, CAP) y el protooncogen Cbl (CAP/Cbl), así como de la proteína G pequeña TC10 para el transporte de glucosa estimulado por insulina (Thong *et al.*, 2005).

La vía de señalización de la insulina/IGF en *Drosophila*, a diferencia de vertebrados, en donde existen distintos receptores (IR e IGFR) y al menos 4 IRSs (IRS1 – IRS4), se encuentra unificada en *Drosophila* (Figura 2). Se han identificado siete DILPs (*Drosophila* Insulin-like Peptides 1-7, DILPs), y más recientemente DILP 8 (Colombani *et al.*, 2012; Garelli *et al.*, 2012) que actúan como ligandos para el receptor a insulina (InR, Insulin-like Receptor). Los DILPs 1, 2, 3, 5 y 7 se expresan en las NSC del cerebro y los DILPs 4 y 6 se expresan en el intestino medio y tejido graso. DILP 8 se expresa diferencialmente en los discos imagales y como respuesta a un crecimiento anómalo y tumoraciones. Todos los DILP se unen de manera específica al receptor de insulina, InR (Garelli *et al.*, 2012).

De manera homóloga a vertebrados, la señalización a través de la vía de la insulina/IGF en *Drosophila* comienza luego de la unión del ligando al receptor de insulina (InR), evento que provoca que el InR, un receptor con actividad de tirosina cinasa, se autofosforile y reclute a los IRS Chico y Lnk. El complejo InR-IRS se une a la PI3K. Se ha observado que el InR de *Drosophila* puede unirse directamente a PI3K en ausencia de IRSs debido a que el InR tiene una extensión citoplásmica con sitios de autofosforilación que unen a PI3K una vez fosforilados. Luego de la fosforilación de InR, Lnk y Chico, la PI3K (que tiene dos subunidades, Dp110 y Dp60) es reclutada a la membrana celular y activada, lo que conduce a la generación y acumulación de fosfatidil-inositol (3, 4, 5)-trifosfato (PIP3). Un gen supresor de tumores (PTEN) se opone a la actividad de cinasa de PI3K, regulando su actividad. La acumulación de PIP3 recluta las dos cinasas PDK1 y Akt/PKB a la membrana plasmática y provoca su fosforilación y activación. Akt fosforila varias proteínas involucradas en el control metabólico, incluyendo la glucógeno sintetasa cinasa 3 β (GSK-3 β , o Shaggy [Sgg]), los factores de transcripción FOXO, Tsc2 y la cinasa SIK2. La actividad de Akt es regulada de manera inhibitoria por una fosfatasa de tipo PP2A (Protein phosphatase 2A), que

defosforila e inactiva a Akt. Por otro lado, Akt también es fosforilado y activado por TOR-C2. La fosforilación de SIK2 (salt-inducible kinase 2) por Akt provoca la fosforilación y degradación del coactivador transcripcional TORC (en mamíferos CRTC2), evento que tiene como consecuencia que TORC no pueda funcionar más como un coactivador de CREB. La fosforilación de FOXO por Akt lleva a su retención en el citoplasma, inhibiendo su actividad de transcripción nuclear. Parte de los efectos anabólicos de la insulina resultan del bloqueo de la actividad de FOXO, el cual, de otra manera, promueve la conservación de energía. La fosforilación de Tsc2 por Akt promueve la actividad del complejo TOR-C1 a través de la GTPasa Rheb. TOR (Target or Rapamycin) es una cinasa anabólica, reguladora central del metabolismo celular, regulando el metabolismo de carbohidratos, lípidos y la autofagia. TOR existe en uno de dos complejos, llamados TOR-C1 y TOR-C2. TOR-C1 es un regulador del tamaño y crecimiento celular; controla la decisión de la célula sobre la utilización o conservación de la energía y nutrientes. Entre sus blancos de fosforilación se encuentran el factor de transcripción SREBP (Sterol Regulatory-Element Binding Protein) y la cinasa S6K. SREBP regula la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de esteroides. La cinasa S6K fosforila varias proteínas; entre las principales se encuentran la proteína ribosomal S6 y los reguladores de la iniciación de la traducción y elongación eIF4B y eEF2K. La retroalimentación de la vía se da por S6K que fosforila a IRS1 en vertebrados; InR es un objetivo transcripcional de FOXO, además de la actividad de TOR-C2, que es antagónica de TOR-C1. La regulación de la activación de estas cinasas en la cascada de la insulina tiene un impacto en el metabolismo celular al regular enzimas que actúan como efectores, controlando la biosíntesis y rompimiento de lípidos y carbohidratos (Teleman, 2010).

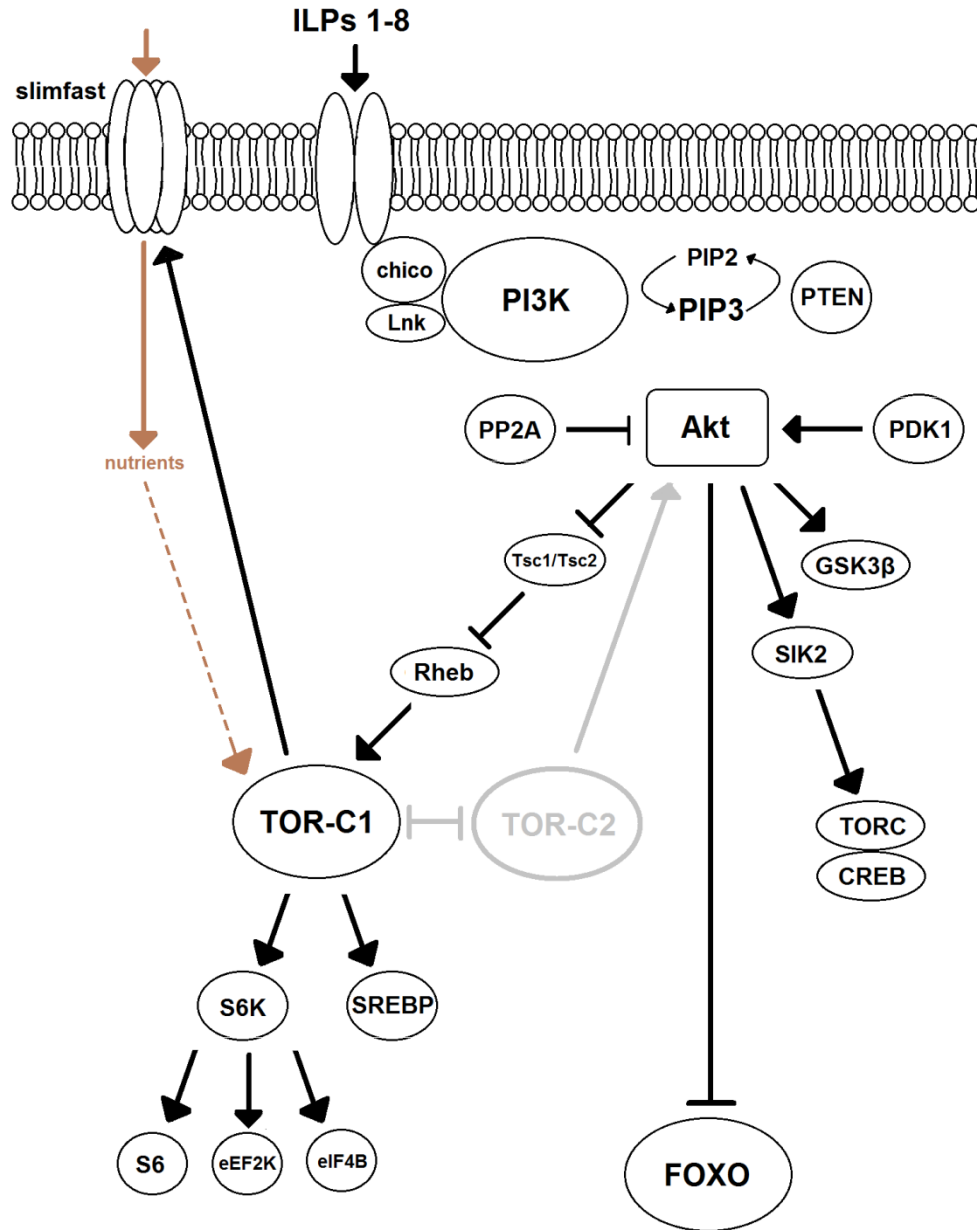


Fig. 2. Señalización a través del receptor a la insulina (InR) en *Drosophila melanogaster*. Los eventos principales luego de la unión del ligando (DILP1-7) al InR comienzan con la autofosforilación del receptor de manera cruzada, evento que favorece el reclutamiento de los IRS Chico y Lnk. El complejo InR-IRS se une a la PI3K y la activa, provocando la acumulación de PIP3, evento que recluta a las cinasas PDK1 y Akt a la membrana plasmática. Akt fosforila proteínas involucradas en el control metabólico, incluyendo la GSK-3 β , los factores de transcripción FOXO, Tsc2 y la cinasa SIK2. La actividad de FOXO promueve la conservación de energía. Su fosforilación

provoca su retención en el citoplasma, y por lo tanto, la inhibición de su actividad. La fosforilación de Tsc2 por Akt activa la actividad del complejo TOR-C1 a través de la GTPasa Rheb. TOR es una cinasa anabólica reguladora central del metabolismo de carbohidratos, lípidos y de la autofagia (modificado de Teleman, 2010).

Respecto a la relación directa entre la activación de la vía y el transporte de carbohidratos, no se ha observado un aumento en la captura de 2-desoxiglucosa etiquetada con ^3H en células Kc de *Drosophila* después de la activación de la vía (Ceddia *et al.*, 2003), y tampoco la manipulación de la actividad de la PI3K o de la proteína cinasa B (PKB o Akt) en células S2 promueven la internalización de glucosa (Hall *et al.*, 2007). Por lo anterior, la relación entre la señalización de insulina y la internalización de glucosa en invertebrados todavía no es muy clara.

3. Metabolismo de lípidos

Drosophila melanogaster almacena sus excesos de energía en forma de glucógeno y lípidos. El sitio principal de almacenamiento de estos sustratos, así como de la síntesis de proteínas y metabolitos circulantes de la hemolinfa incluida la trehalosa, es el cuerpo graso, que es un órgano distribuido a través de todo el cuerpo del insecto, análogo al hígado y tejido graso de vertebrados y considerado el órgano más importante en el metabolismo. El principal tipo celular del cuerpo graso es el adipocito, una célula dinámica y con un metabolismo muy activo, que regula los lípidos y carbohidratos del organismo, y funge también como célula endócrina. El almacenamiento de lípidos en el cuerpo graso puede ocurrir por la síntesis *de novo* de lípidos en el cuerpo graso a partir de carbohidratos, así como por la transferencia de los lípidos de la dieta desde el intestino medio hacia el cuerpo graso durante el periodo de alimentación. Más del 90% de los lípidos almacenados en el cuerpo graso se encuentran como TAG (Canavoso *et al.*, 2001; Arrese y Soulages, 2010).

Los TAGs son almacenados en forma de gotitas de lípidos dentro de los adipocitos. Cada gotita de lípidos está compuesta por una monocapa exterior de fosfolípidos rodeando a los TAG, y de un núcleo de moléculas de colesterol. En la monocapa de fosfolípidos se pueden encontrar algunas proteínas, especialmente proteínas relacionadas a la diferenciación de adipocitos y perilipinas (PATs). Las dos PATs de insectos Lsd1 y Lsd2 controlan la síntesis y la lipólisis de las reservas de lípidos (Gronke *et al.*, 2003).

Los insectos digieren y absorben los lípidos de una manera similar a los vertebrados, pero con algunas diferencias importantes. En insectos el lípido transportado más abundante es el diacilglicerol (DAG), y a diferencia de los vertebrados, donde existen varios tipos de lipoproteínas, estos lípidos son transportados por una única lipoproteína de alta densidad llamada lipoforina, cuya proteína precursora es sintetizada en el cuerpo graso. La lipoforina transporta los lípidos desde el intestino medio, donde lipasas hidrolizan los TAGs de la dieta, produciendo monoacilgliceroles y ácidos grasos libres

hasta los tejidos de almacenamiento. La mayoría de los lípidos en la hemolinfa se encuentran asociados a una partícula de lipoforina. Pequeñas cantidades de esteroides, ácidos grasos libres, carotenoides y monoacilglicéridos también son transportados por la lipoforina (Canavoso *et al.*, 2001).

Los lípidos son movilizados desde el cuerpo graso como DAG, no ácidos grasos libres como en vertebrados. Esta movilización es inducida por dos tipos de hormonas: AKH y octopamina. El mecanismo más probable para la producción de DAG es la hidrólisis estereoespecífica de TAG por una lipasa de TAG. En *Drosophila*, Brummer (*Bmm*) se ha descrito como la única lipasa de triglicéridos, localizada en las gotitas de lípidos de los adipocitos y que antagoniza a Lsd2. Mutantes de *Bmm* presentan un fenotipo de obesidad (Canavoso *et al.*, 2001; Grönke *et al.*, 2005). Además DHR96, el único ortólogo en *Drosophila* de los receptores nucleares a esteroides de mamíferos PXR (Pregnane X Receptor) y CAR (Constitutive Androstane Receptor), influye en la homeostasis de lípidos al regular genes expresados en el intestino medio involucrados en el metabolismo, como la lipasa de esteroides Magro (*Mag*); y mutantes de DHR96 tienen un fenotipo delgado y mueren antes que sus controles (Sieber y Thummel, 2009).

Como en el caso del metabolismo de carbohidratos, la insulina promueve el anabolismo, por lo tanto provoca la síntesis de lípidos e inhibe su degradación. Estos cambios requieren un incremento en el factor SREBP-1c, ya que se ha observado que una mayor expresión de este contribuye a la estimulación de la síntesis de lípidos, además de estar relacionada a la resistencia a la insulina, por lo que se ha considerado su inhibición como un posible tratamiento para algunos de los síntomas de la diabetes tipo 2 (Shimomura *et al.*, 1999; Saltiel y Kahn, 2001; Xiao y Song, 2013). Además, la sobreactivación de la vía de la insulina en *Drosophila* promueve el anabolismo al observarse un mayor número de adipocitos, un mayor número de gotitas de lípidos, así como un volumen incrementado de lípidos en el cuerpo graso de moscas adultas de entre 5 y 10 días de edad (DiAngelo y Birnbaum, 2009).

También se ha propuesto que la dieta y el sexo del individuo influyen de una manera muy importante en la cantidad y el tipo de lípidos presentes en el organismo. En dos estudios recientes sobre el lipidoma de *Drosophila* se observó que la regulación del metabolismo de lípidos, incluyendo su incorporación, movilización y acumulación depende en gran medida de la etapa de desarrollo y de la dieta, existiendo una mayor acumulación de TAG en moscas alimentadas con una dieta rica en cereales donde hay mayor disponibilidad de lípidos neutros (es decir TAG y lípidos insaturados), que en moscas alimentadas con una dieta tradicional de levaduras, con una mayor disponibilidad de fosfoinosítoles (lípidos saturados). En general los TAG aumentan su disponibilidad en tejidos de reserva conforme la mosca pasa de un estadio al siguiente, sin disminuir en el paso de pupa a adulto, aunque el animal no se alimenta en esta etapa, aunque se presume que la metamorfosis es una etapa energéticamente demandante (Carvalho *et al.*, 2012). Además, otros lípidos de reserva, los ésteres de esteroles (Sterol Esters, SE) son muy abundantes en la etapa embrionaria y larvaria, y de una manera mayor en hembras que en machos a partir de la emergencia del adulto después de la metamorfosis. Esto sugiere un papel importante de estos, y no necesariamente solo de los TAG en el desarrollo embrionario de la mosca, en el paso de embrión a larva, y en la producción de huevos por las hembras (Guan *et al.*, 2013).

Aún se desconoce si las moscas mutantes de la vía de la insulina presentan alteraciones en la cantidad de lípidos totales, o el tamaño de adipocitos y el volumen de lípidos en las gotitas de lípidos en los adipocitos individuales en las distintas etapas de vida de *Drosophila*.

4. Diabetes

Existen dos tipos de la enfermedad, la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. La diabetes tipo 1 es consecuencia de la baja en los niveles de insulina en el cuerpo debido a una síntesis y secreción defectuosa de insulina. La diabetes tipo 2 se caracteriza por la resistencia periférica a la insulina, así como la disfunción de las células pancreáticas beta, proceso atribuido en parte a los niveles elevados de glucosa (hiperglucemia) y de ácidos grasos libres en sangre, lo que provoca un fuerte impacto en la homeostasis metabólica. La diabetes tipo 2 es la más prevalente, cerca del 90 al 95% de los casos, y es una enfermedad crónica que afecta la salud y el bienestar general de la persona que la padece (Bailey, 2000); además, se ha convertido en el mayor problema de salud en México al ser la causa primaria del retiro prematuro, ceguera y falla renal, así como la causa principal de muerte en mujeres y hombres desde el año 2008 (Rull *et al.*, 2005; SINAIS, 2008).

La diabetes tipo 2 se diagnostica en individuos que tienen resistencia a la insulina y usualmente tienen cierta deficiencia en su producción. Sin embargo, estos individuos en general no requieren de tratamiento de insulina para sobrevivir. Diversos procesos patogénicos se han asociado con el desarrollo de la diabetes, pero en su mayoría, los pacientes con esta forma de diabetes son obesos, y la obesidad en sí misma causa cierto grado de resistencia a la insulina. Este tipo de diabetes puede no ser diagnosticada por varios años, debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente. A pesar de lo anterior, las personas con diabetes tipo 2 tienen un riesgo elevado de desarrollar complicaciones macro y microvasculares. Mientras estos pacientes parecen tener niveles normales o ligeramente elevados de insulina, tienen también altos niveles de glucosa en sangre, por lo que la secreción de insulina es defectuosa en estos pacientes, e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina (ADA, 2004).

La diabetes tipo 2 es una enfermedad crónica. Se ha observado que pacientes diabéticos de edad avanzada tienen una menor calidad de vida comparados con

pacientes más jóvenes, ya que en pacientes de edad avanzada se suelen presentar complicaciones como retinopatía, neuropatía y cardiopatía, además de que la diabetes tipo 2 cursa con envejecimiento acelerado (Redekop *et al.*, 2002; Eldor *et al.*, 2005; Morley, 2008).

Los defectos metabólicos asociados a la diabetes tipo 2, en particular la desregulación en la liberación de la insulina y la resistencia a la insulina, han sido estudiados en una variedad de modelos transgénicos en roedores. Si bien no todos los modelos transgénicos replican en su totalidad los síntomas de la enfermedad humana, ofrecen nociones importantes de su patofisiología (LeRoith y Gavrilova, 2006). Sin embargo, no sólo existen modelos vertebrados.

Se ha observado que moscas mutantes hipomorfas de la vía de la insulina (larvas y adultos de uno y dos días después de la eclosión) para DILP1-7, InR, Chico, Lnk, Dp110, PKB (Akt), Rheb y S6K tienen niveles elevados de lípidos. También estas mutantes muestran niveles elevados de carbohidratos. Además muestran un fenotipo de defecto en el crecimiento al ser significativamente más pequeñas que sus controles heterocigotas. En contraste, mutantes para la fosfatasa PTEN tienen niveles circulantes reducidos de glucógeno y lípidos (Bohni *et al.*, 1999; Baker y Thummel, 2007; Broughton *et al.*, 2008; Teleman, 2010; Murillo-Maldonado *et al.*, 2011).

En un estudio reciente se observó que larvas alimentadas con una dieta alta en carbohidratos desarrollan obesidad y resistencia a la insulina, además de presentar un fenotipo de crecimiento semejante al observado en las mutantes de la vía de la insulina (Musselman *et al.*, 2011). Por todo lo anterior se ha propuesto a *Drosophila* como un modelo de estudio para la patofisiología de la diabetes tipo 2.

Datos preliminares de nuestro laboratorio muestran una menor cantidad de lípidos medidos en moscas mutantes de la vía de la insulina de diez días de nacidas (Murillo-Maldonado, comunicación personal). Esto parece indicar, como se ha observado en pacientes con diabetes tipo 2 de diferentes edades y tiempo de diagnóstico, que la

cantidad de lípidos corporales presentes varía con el tiempo. Sin embargo, el aspecto crónico de la diabetes permanece poco estudiado en general, y en *D. melanogaster* en particular.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe un particular interés en el estudio de los procesos fisiológicos relacionados a enfermedades metabólicas, mismas que están alcanzando proporciones epidémicas. Se ha demostrado que existe una fuerte conservación evolutiva entre los procesos biológicos de las moscas y los humanos, y estudios recientes con *Drosophila melanogaster* han contribuido al avance del conocimiento de estos procesos metabólicos. Las moscas mutantes hipomorfas de la vía de la insulina se han propuesto como un modelo viable para la diabetes tipo 2. Sin embargo, hasta el momento no se ha indagado en el aspecto crónico de dicha enfermedad en este modelo.

HIPÓTESIS

- Los niveles de lípidos y carbohidratos no varían durante el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*
- Moscas mutantes para la vía de la insulina muestran diferencias respecto a moscas control en los niveles de lípidos y carbohidratos durante el ciclo de vida

OBJETIVOS

- Determinar en moscas control y mutantes de la vía de la insulina de diferentes edades (larvas de tercer instar y adultos de 1, 7, 14 y 28 días después de la eclosión):
 - Carbohidratos totales
 - Contenido lipídico total
 - Tamaño de adipocitos y proporción de lípidos en el adipocito en disecciones de cuerpo graso

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos experimentales

Las cepas de moscas mutantes que se utilizaron en los experimentos fueron donadas por el Prof. Ernst Hafen del Instituto de Zoología de la Universidad de Zürich, Suiza. Los alelos mutantes usados fueron: InR^{E19} , InR^{3T5} , $Dp110^A$, $Dp110^{5W3}$, PKB^1 , PKB^3 , $S6K^{L-1}$ y $S6K^{P1713}$. Además se utilizaron la cepa *chico*¹ y las cepas Oregon R (*ORR*) y *yellow white* (*yw*) como controles silvestres. Las cepas de *Drosophila* fueron mantenidas en heterocigosis con cromosomas balanceadores. Los cromosomas balanceadores son cromosomas con múltiples rearrreglos que impiden la recombinación meiótica, y que además de portar mutaciones visibles dominantes, son letales en homocigosis.

Para los experimentos de determinación de lípidos y carbohidratos en adultos, así como para la histología, se utilizaron los siguientes cromosomas balanceadores: para el gen *chico* que se encuentra en el cromosoma 2 se utilizó el balanceador *CyO*, mientras que para el resto de los genes, que se encuentran en el cromosoma 3, se utilizó *TM3* o *TM6* (Tabla 1). Además, para los experimentos de determinación de lípidos y carbohidratos en larvas de tercer instar se utilizaron cromosomas balanceadores que portan una copia de la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP), que se expresa en los estadios larvarios y es visible en larvas y moscas adultas bajo luz fluorescente en el estereomicroscopio. Para el gen *chico* se utilizó un balanceador *CyO-GFP*, mientras que para el resto de los genes se utilizó un balanceador *TM3-GFP*. Con ayuda de estos cromosomas balanceadores se puede hacer el seguimiento de las mutaciones. Para obtener las mutantes homocigotas o heteroalélicas, se realizaron cruza *inter-se* para *chico*¹ y cruza heteroalélicas con las combinaciones InR^{E19}/InR^{3T5} , $Dp110^A/Dp110^{5W3}$, PKB^1/PKB^3 y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$. Todas estas moscas mutantes son viables.

En cada cruce se utilizaron de 10 a 15 hembras vírgenes por cada 15 a 20 machos. Se seleccionó de la progenie (F1) aquellas que no tuvieran fenotipo del balanceador, las

cuales eran homocigotas o heteroalélicas mutantes para el gen en estudio. Todas las moscas seleccionadas fueron hembras y se utilizó a sus respectivas hermanas heterocigotas como controles.

Se seleccionaron larvas de tercer instar tardío (wandering thirds) homocigotas o heteroalélicas mutantes y controles heterocigotos, lavadas en PBS y secadas en papel absorbente para las determinaciones. Las moscas adultas de la F1 mutante o control fueron seleccionadas 1 día después de la eclosión, y aquellas que se utilizarían posteriormente se mantuvieron separadas en tubos con alimento hasta los 7, 14 o 28 días. Todas las larvas y moscas fueron sacrificadas por congelación y conservadas a -70 °C hasta el experimento. Antes de las determinaciones de lípidos o de carbohidratos, tanto larvas como moscas fueron pesadas individualmente en una microbalanza (Cahn C-31) con una sensibilidad de 0.1 µg a 26 µg.

Para las tinciones histológicas se utilizaron moscas adultas mutantes o controles de 1 día después de la eclosión.

Tabla 1. Alelos mutantes de la vía de la insulina, cromosomas balanceadores y fenotipo mutante dominante del balanceador, utilizados en los experimentos.

Gen	Alelo	Balanceador	Fenotipo del balanceador	Proteína
<i>InR</i>	E19	<i>TM3</i>	Alas de borde aserrado.	Receptor a DILPs
<i>InR</i>	E19	<i>TM3-GFP</i>	Alas de borde aserrado, fluorescente.	
<i>InR</i>	3T5	<i>TM6</i>	Abdomen ancho	
<i>InR</i>	3T5	<i>TM3-GFP</i>	Alas de borde aserrado, fluorescente.	
<i>chico</i>	1	<i>CyO</i>	Alas curvas.	Sustrato del receptor a insulina
<i>chico</i>	1	<i>CyO-GFP</i>	Alas curvas, fluorescente.	
<i>Dp110</i>	A	<i>TM6</i>	Abdomen ancho	Subunidad catalítica de la PI3K
<i>Dp110</i>	A	<i>TM3-GFP</i>	Alas de borde aserrado, fluorescente.	
<i>Dp110</i>	5W3	<i>TM6</i>	Abdomen ancho.	
<i>Dp110</i>	5W3	<i>TM3-GFP</i>	Alas de borde aserrado, fluorescente.	
<i>PKB</i>	1	<i>TM3</i>	Alas de borde aserrado.	Proteína Cinasa B
<i>PKB</i>	1	<i>TM3-GFP</i>	Alas de borde aserrado, fluorescente.	
<i>PKB</i>	3	<i>TM3</i>	Alas de borde aserrado.	
<i>PKB</i>	3	<i>TM3-GFP</i>	Alas de borde aserrado, fluorescente.	
<i>S6K</i>	L-1	<i>TM3</i>	Alas de borde aserrado.	Cinasa de la proteína ribosomal S6
<i>S6K</i>	L-1	<i>TM3-GFP</i>	Alas de borde aserrado, fluorescente.	
<i>S6K</i>	P1713	<i>TM3</i>	Alas de borde aserrado.	
<i>S6K</i>	P1713	<i>TM3-GFP</i>	Alas de borde aserrado, fluorescente.	

2. Carbohidratos totales

Para la determinación de carbohidratos totales se utilizó la metodología descrita por (Van Handel, 1985a). Moscas individuales sacrificadas por frío se homogenizaron en 200 μ l de etanol y se añadió 4.8 ml del reactivo de antrona-ácido sulfúrico (1.4 mg/ml de antrona en ácido sulfúrico al 72%); se mezcló y se calentaron las muestras a 92°C por 17 minutos. Luego de enfriarse, se leyó la densidad óptica a 625 nm contra un blanco de reactivos. El contenido de carbohidratos se estimó interpolando a partir de una curva de calibración de diluciones de glucosa de una solución de 1 mg/ml como estándar de carbohidratos. Se utilizaron al menos 8 individuos para cada grupo experimental o control.

3. Lípidos totales

Para la determinación de lípidos totales se utilizó la metodología descrita por (Van Handel, 1985b). Moscas individuales sacrificadas por frío se calentaron a 90°C por una hora en tubos de ensaye; después fueron homogenizadas en 500 μ l de cloroformo-metanol 1:1. El sobrenadante se evaporó y se añadieron 0.2 ml de ácido sulfúrico, para posteriormente calentar por 10 minutos a 100°C. Luego de enfriarse, se añadieron 2.3 ml de reactivo de vainillina-ácido fosfórico (1.2 mg/ml de vainillina en ácido fosfórico al 68%), se mezcló y la lectura se realizó por lo menos 5 minutos después a 490 y a 525 nm contra un blanco de reactivos. Los lípidos totales se estimaron interpolando a partir de una curva de calibración de diluciones de aceite vegetal a partir de una concentración de 1 mg/ml como estándar de lípidos. Se utilizaron al menos 8 individuos para cada grupo experimental o control.

4. Histología

Para la histología de tejido graso con rojo Nilo se utilizó la metodología descrita por Sieber y Thummel (2009). La tinción de rojo Nilo se realizó al colocar tejido adiposo en medio de montaje de rojo Nilo (20% de glicerol en PBS con una dilución 1:10,000 de

rojo Nilo al 10% en dimetil sulfóxido, DMSO) y se observó por medio de un microscopio confocal (Zeiss LSM780) con excitación a una longitud de onda de 543 nm y con un espectro de emisión de 600 a 650 nm. Para el análisis del tejido graso se hicieron un mínimo de 22 y un máximo de 59 cortes ópticos por muestra, con un tamaño de voxel de 0.33x0.33x1.39 μm . El análisis de imágenes se hizo con el software ImageJ (Rasband, 2011). Se seleccionó a cada adipocito individualmente trazando una elipse (denominada región de interés o Region of Interest, ROI) sobre el perímetro mayor del adipocito. Se utilizó el perímetro mayor del adipocito (en μm) en los cortes ópticos como indicador de tamaño. Se estimó la proporción (en porcentaje) de lípidos en el adipocito al dividir el volumen teñido de la ROI sobre el volumen total de la ROI x 100. Se analizó un mínimo de 11 adipocitos para cada grupo experimental o control.

5. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos en este trabajo fueron analizados utilizando pruebas estadísticas t de student y ANOVA de dos vías con pruebas *post-hoc* de Tukey.

RESULTADOS

1. Carbohidratos

1.1 Larvas

Se determinó la cantidad de carbohidratos totales en larvas de tercer instar (Figura 3), silvestres ORR y *yw*, y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} , $chico^1/chico^1$, $Dp110^A/Dp110^{5W3}$, PKB^1/PKB^3 y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ con sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$. Por medio de pruebas t de student se evaluaron las diferencias en carbohidratos totales entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y control. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de carbohidratos entre las larvas de moscas silvestres ORR y *yw*, y mutantes InR^{E19}/InR^{3T5} , $chico^1/chico^1$, PKB^1/PKB^3 , y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ con sus respectivos controles. Las larvas mutantes $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ mostraron un aumento significativo en la cantidad de carbohidratos respecto a su control (Figura 3D). Sin embargo, hay una tendencia a mayor acumulación de carbohidratos en varias de las mutantes analizadas (*chico*, *PKB* y *S6K*).

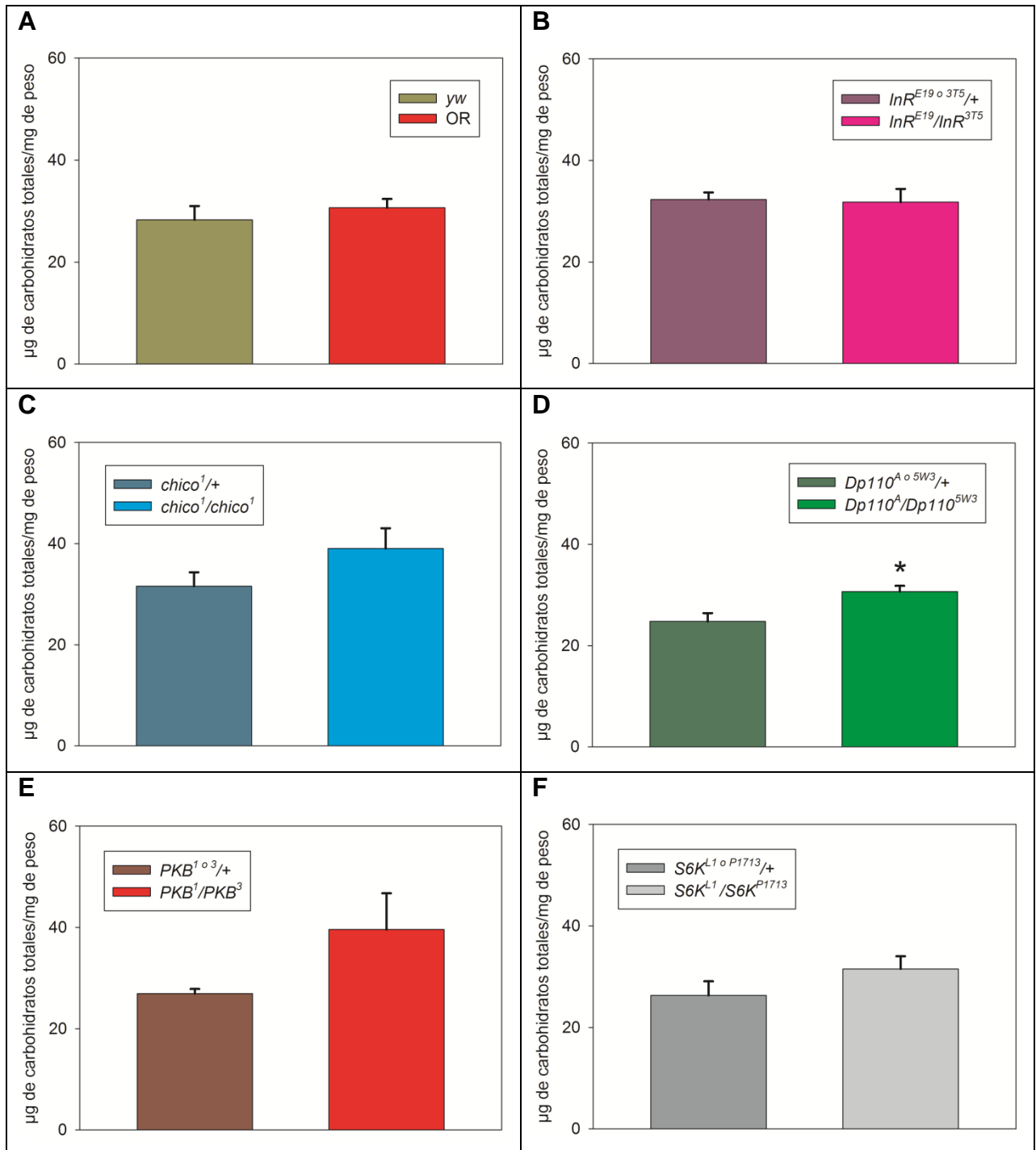


Fig. 3. Carbohidratos totales en larvas de tercer instar, silvestres ORR y *yw* (A), y mutantes de la vía de la insulina *InR*^{E19}/*InR*^{3T5} (B), *chico*¹/*chico*¹ (C), *Dp110*^A/*Dp110*^{5W3} (D), *PKB*¹/*PKB*³ (E) y *S6K*^{L-1}/*S6K*^{P1713} (F) con sus respectivos controles heterocigotos

$InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$. Se realizaron pruebas t de student para evaluar diferencias entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles. La diferencia significativa para $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ se representa con un asterisco (* $P < 0.05$). La escala en el eje de las ordenadas representa μg de carbohidratos totales/mg de peso. El número de individuos $n = 9$ en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).

1.2 Adultos

Además, en moscas adultas silvestres ORR y *yw*, y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} , $chico^1/chico^1$, $Dp110^A/Dp110^{5W3}$, PKB^1/PKB^3 y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ con sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$ a 1, 7, 14 y 28 días después de la eclosión, se determinó la cantidad de carbohidratos totales (Figura 4). Por medio de una prueba ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de Tukey se evaluó el cambio en los niveles de carbohidratos totales respecto al día 1 en los días 7, 14 y 28 después de la eclosión en cada genotipo individual. También se evaluaron las diferencias en los niveles de carbohidratos totales entre ambos genotipos (cepas silvestres, y mutantes y controles).

En moscas silvestres no se encontraron diferencias respecto al tiempo en ORR o *yw*. Tampoco hubo diferencias en los carbohidratos totales entre ambas cepas (Figura 4A). En moscas mutantes se encontraron diferencias en carbohidratos totales respecto al tiempo a los día 7 y 28 en InR^{E19}/InR^{3T5} y a los días 14 y 28 con respecto al control $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$. Además, se encontraron diferencias en la cantidad de carbohidratos totales entre InR^{E19}/InR^{3T5} y su control (Figura 4B). También se encontraron diferencias en carbohidratos totales respecto al tiempo al día 7 en $chico^1/chico^1$, pero no existieron diferencias respecto al tiempo con $chico^1/+$. Se encontraron diferencias en la cantidad de carbohidratos totales entre $chico^1/chico^1$ y su control (Figura 4C). Hubo diferencias en carbohidratos totales respecto al tiempo al día 7 en $Dp110^A/Dp110^{5W3}$, pero no existieron diferencias respecto al tiempo con $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$. Tampoco hubo diferencias en la cantidad de carbohidratos totales entre $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ y el control (Figura 4D).

Se encontraron diferencias en carbohidratos totales respecto al tiempo a los días 7, 14 y 28 en PKB^1/PKB^3 y al día 28 con respecto al control $PKB^1 \text{ o } 3/+$. Además, se encontraron diferencias en la cantidad de carbohidratos totales entre PKB^1/PKB^3 y su control (Figura 4E). Finalmente, se encontraron diferencias en carbohidratos totales a los días 14 y 28 en $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ y a los días 7 y 14 con respecto al control pero no existieron diferencias en el tiempo en el control $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$. En este caso nótese que no existieron diferencias en la cantidad de carbohidratos totales entre mutantes y control (Figura 4F). Sin embargo, en general, los resultados muestran mayor acumulación en mutantes que en controles.

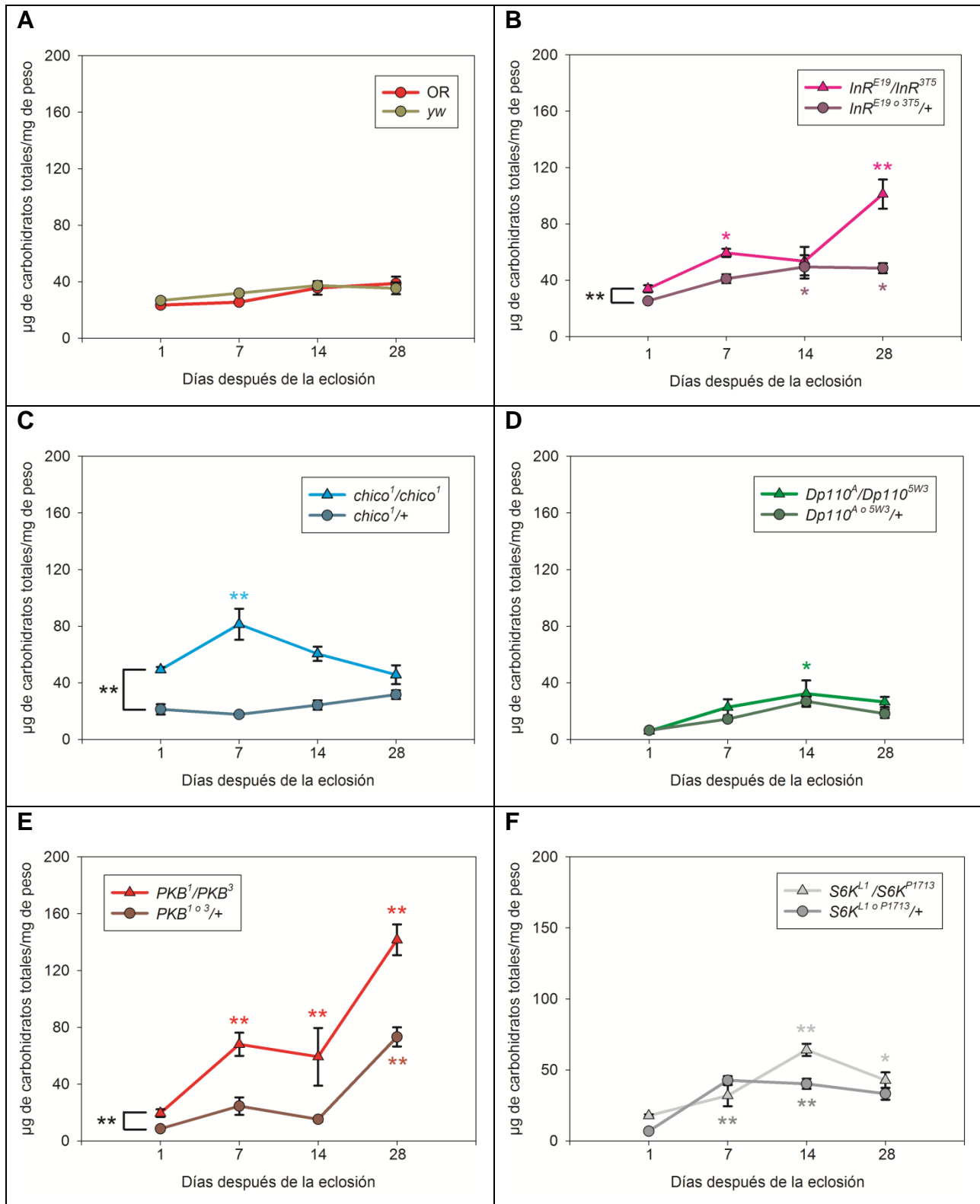


Fig. 4. Carbohidratos totales en moscas adultas silvestres ORR y yw (A), y mutantes de la vía de la insulina *InR^{E19}/InR^{3T5}* (B), *chico¹/chico¹* (C), *Dp110^A/Dp110^{5W3}* (D),

PKB^1/PKB^3 (E) y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ (F) con sus respectivos controles heterocigotos InR^{E19} o $3T5/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A$ o $5W3/+$, PKB^1 o $3/+$ y $S6K^{L-1}$ o $P1713/+$, de 1, 7, 14 y 28 días después de la eclosión. Se utilizó una prueba ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de Tukey para evaluar el cambio en los carbohidratos totales respecto al día 1 en cada genotipo. Además, se evaluaron las diferencias en los niveles de carbohidratos totales entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y controles. Las diferencias significativas respecto al tiempo dentro de los genotipos ORR, así como en los mutantes se representan con los asteriscos superiores del mismo color del genotipo respectivo (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); las diferencias significativas respecto al tiempo dentro de las moscas silvestres *yw*, así como dentro de los controles se representan con los asteriscos inferiores del mismo color del genotipo respectivo (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Las diferencias significativas entre cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles se representan con los asteriscos de color negro a la izquierda de la gráfica (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). La escala en el eje de las ordenadas representa μg de carbohidratos totales/mg de peso. El número de individuos $n = 9$ en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).

2. Lípidos

2.1 Larvas

Se determinó la cantidad de lípidos totales en larvas de tercer instar (Figura 5), silvestres ORR y *yw*, y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} , $chico^1/chico^1$, $Dp110^A/Dp110^{5W3}$, PKB^1/PKB^3 y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ con sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$. Por medio de pruebas t de student se evaluaron las diferencias en lípidos totales entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y control. No hubo diferencias significativas en la cantidad de lípidos entre las larvas de moscas silvestres ORR y *yw*, ni de las mutantes $chico^1/chico^1$ y su control (Figura 5A y 5C). Sin embargo, se observó un aumento significativo en la cantidad de lípidos entre las mutantes InR^{E19}/InR^{3T5} (Figura 5B), $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ (Figura 5D), PKB^1/PKB^3 (Figura 5E) y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ (Figura 5F) respecto a sus controles. En general, las larvas acumulan más lípidos que sus controles.

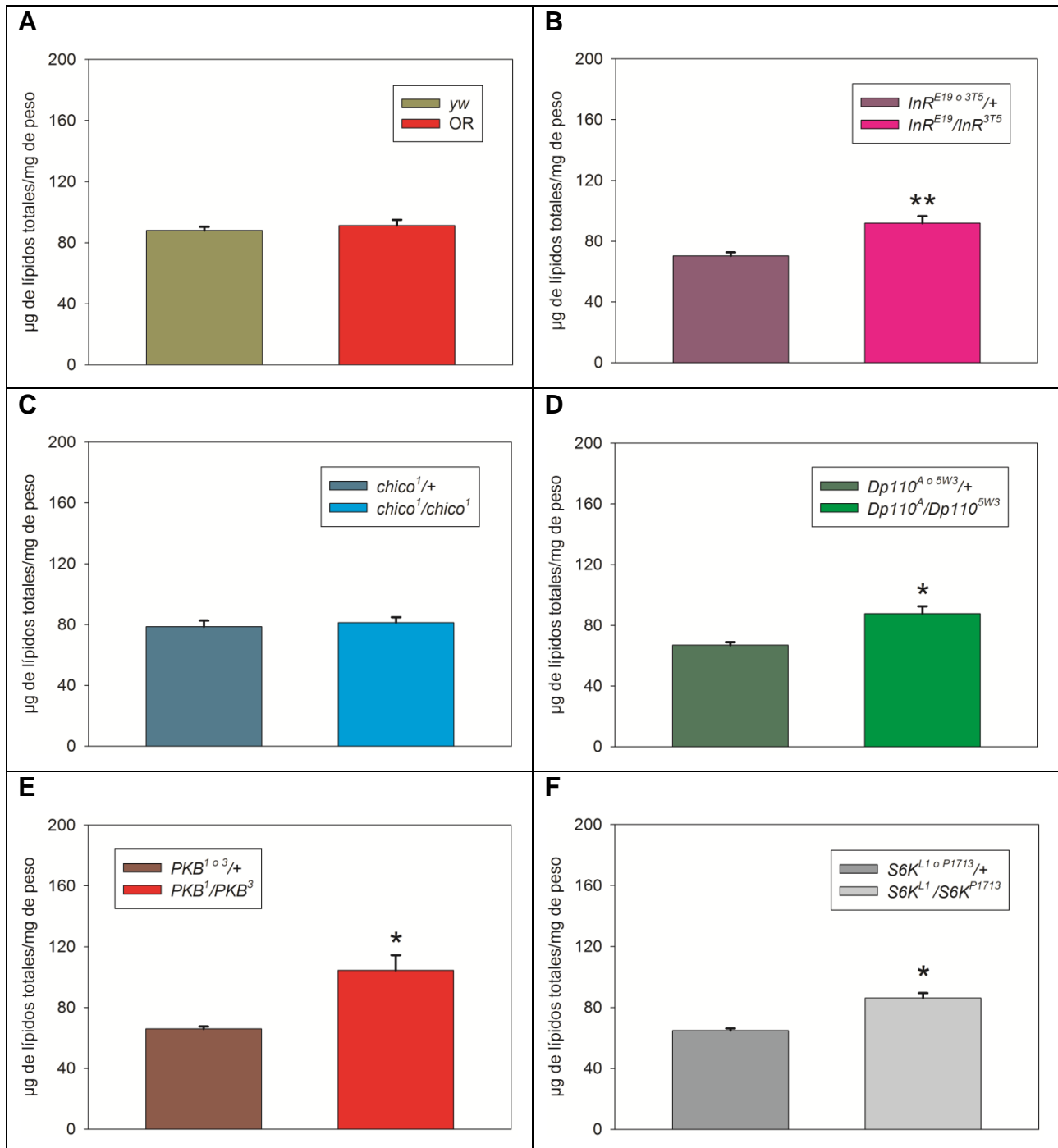


Fig. 5. Lípidos totales en larvas de tercer instar, silvestres ORR y *yw* (A), y mutantes de la vía de la insulina *InR^{E19}/InR^{3T5}* (B), *chico¹/chico¹* (C), *Dp110^A/Dp110^{5W3}* (D), *PKB¹/PKB³* (E) y *S6K^{L1}/S6K^{P1713}* (F) con sus respectivos controles heterocigotos *InR^{E19} / InR^{3T5} / +*, *chico¹ / +*, *Dp110^A / Dp110^{5W3} / +*, *PKB¹ / PKB³ / +* y *S6K^{L1} / S6K^{P1713} / +*. Se realizaron pruebas t de

student para evaluar diferencias entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles. Las diferencias significativas se representan con asteriscos (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). La escala en el eje de las ordenadas representa μg de lípidos totales/mg de peso. El número de individuos $n = 9$ en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).

2.2 Adultos

En moscas adultas silvestres ORR y *yw*, y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} , $chico^1/chico^1$, $Dp110^A/Dp110^{5W3}$, PKB^1/PKB^3 y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ con sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$ a 1, 7, 14 y 28 días después de la eclosión se determinó la cantidad de lípidos totales (Figura 6). Por medio de una prueba ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de Tukey se evaluó el cambio en los niveles de lípidos totales respecto al día 1, en los días 7, 14 y 28 después de la eclosión en cada genotipo individual. También se evaluaron las diferencias en los niveles de lípidos totales entre ambos genotipos (mutantes y controles).

Se observó un aumento significativo en los lípidos totales al día 7 y 14 en ORR. Esto no se observó en *yw*, donde por el contrario, hubo un descenso significativo en los lípidos totales en los días 7 y 14. Los lípidos totales entre ambas cepas mostraron diferencias significativas (Figura 6A). No existieron diferencias en los lípidos totales respecto al tiempo en InR^{E19}/InR^{3T5} , $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ y PKB^1/PKB^3 , ni en sus respectivos controles $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$; siendo $PKB^1 \text{ o } 3/+$ la única excepción, con un incremento al día 28 (Figura 6E). En todos los anteriores hubo diferencias en la cantidad de lípidos totales entre mutantes y sus controles (Figuras 6B, 6D y 6E). Por el contrario, en $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ y su control $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$ no se observaron diferencias en lípidos totales respecto al tiempo, ni entre ambos genotipos (Figura 6F). En contraste, en moscas mutantes $chico^1$ se observó un descenso significativo en los lípidos totales respecto al tiempo al día 1 en los días 7, 14 y 28 en $chico^1/chico^1$. De manera contraria, hubo un aumento significativo en lípidos totales al día 14 en el control

*chico*¹/+. Sí existieron diferencias significativas en la cantidad de lípidos totales entre *chico*¹/*chico*¹ y el control (Figura 6C). A diferencia de *chico*, en *InR*, *Dp110* y *PKB* se observan aumentos significativos de lípidos.

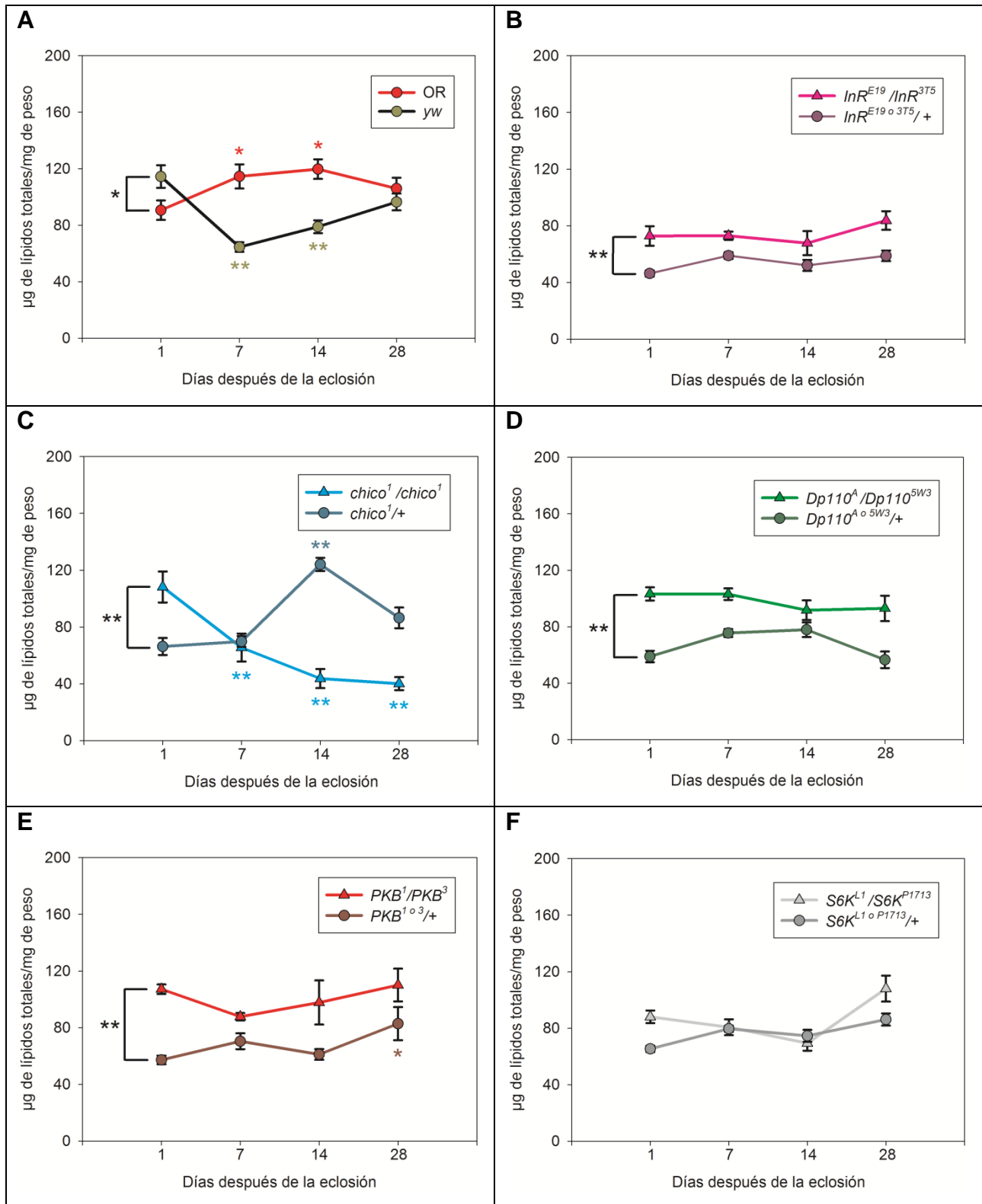
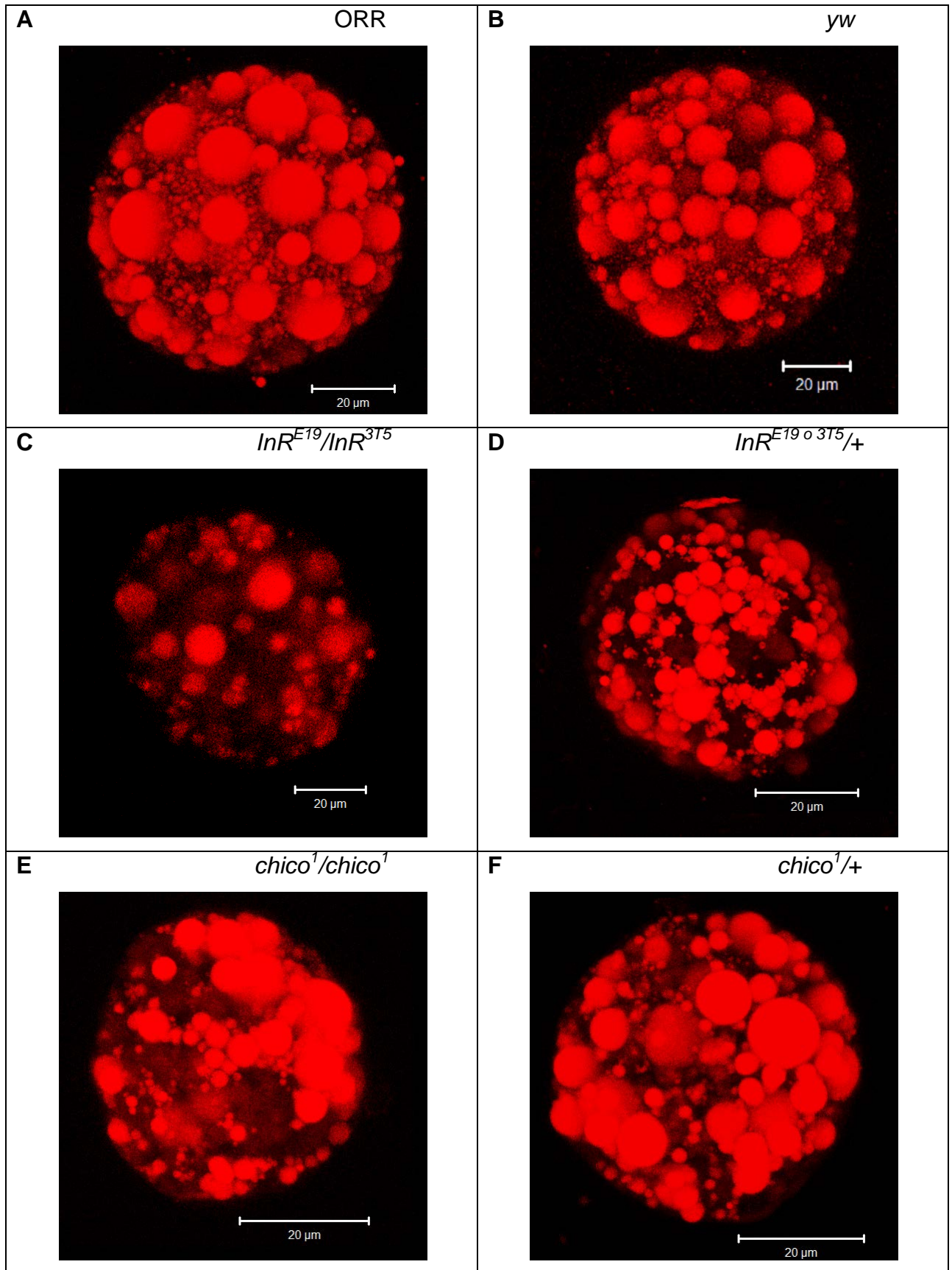


Fig. 6. Lípidos totales en moscas adultas silvestres ORR y yw (A), y mutantes de la vía de la insulina *InR^{E19}/InR^{3T5}* (B), *chico¹/chico¹* (C), *Dp110^A/Dp110^{5W3}* (D), *PKB¹/PKB³* (E)

y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ (F) con sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $chico^1/+$, $Dp110^{A \text{ o } 5W3}/+$, $PKB^{1 \text{ o } 3}/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$, a 1, 7, 14 y 28 días después de la eclosión. Se utilizó una prueba ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de Tukey para evaluar el cambio en los lípidos totales respecto al día 1 en cada genotipo. Además, se evaluaron las diferencias en los niveles de lípidos totales entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y controles. Las diferencias significativas respecto al tiempo dentro de los genotipos ORR, así como en los mutantes se representan con los asteriscos superiores del mismo color del genotipo respectivo (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); las diferencias significativas respecto al tiempo dentro de las moscas silvestres *yw*, así como dentro de los controles se representan con los asteriscos inferiores del mismo color del genotipo respectivo (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Las diferencias significativas entre cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles se representan con los asteriscos de color negro a la izquierda de la gráfica (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). La escala en el eje de las ordenadas representa μg de lípidos totales/mg de peso. El número de individuos $n = 9$ en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).

3. Histología

Se observaron al microscopio confocal con un objetivo de 25X, preparaciones histológicas de apidocitos aislados teñidos con rojo Nilo de cuerpo graso de moscas adultas de 1 día después de la eclosión, silvestres ORR (Figura 7A) y *yw* (Figura 7B), y mutantes de la vía de la insulina *InR^{E19}/InR^{3T5}* (Figura 7C) y su control *InR^{E19 o 3T5}/+* (Figura 7D), *chico¹/chico¹* (Figura 7E) y su control *chico¹/+* (Figura 7F), *Dp110^A/Dp110^{5W3}* (Figura 7G) y su control *Dp110^{A o 5W3}/+* (Figura 7H), *PKB¹/PKB³* (Figura 7I) y su control *PKB^{1 o 3}/+* (Figura 7J), y *S6K^{L-1}/S6K^{P1713}* (Figura 7K) y su control *S6K^{L-1 o P1713}/+* (Figura 7L).



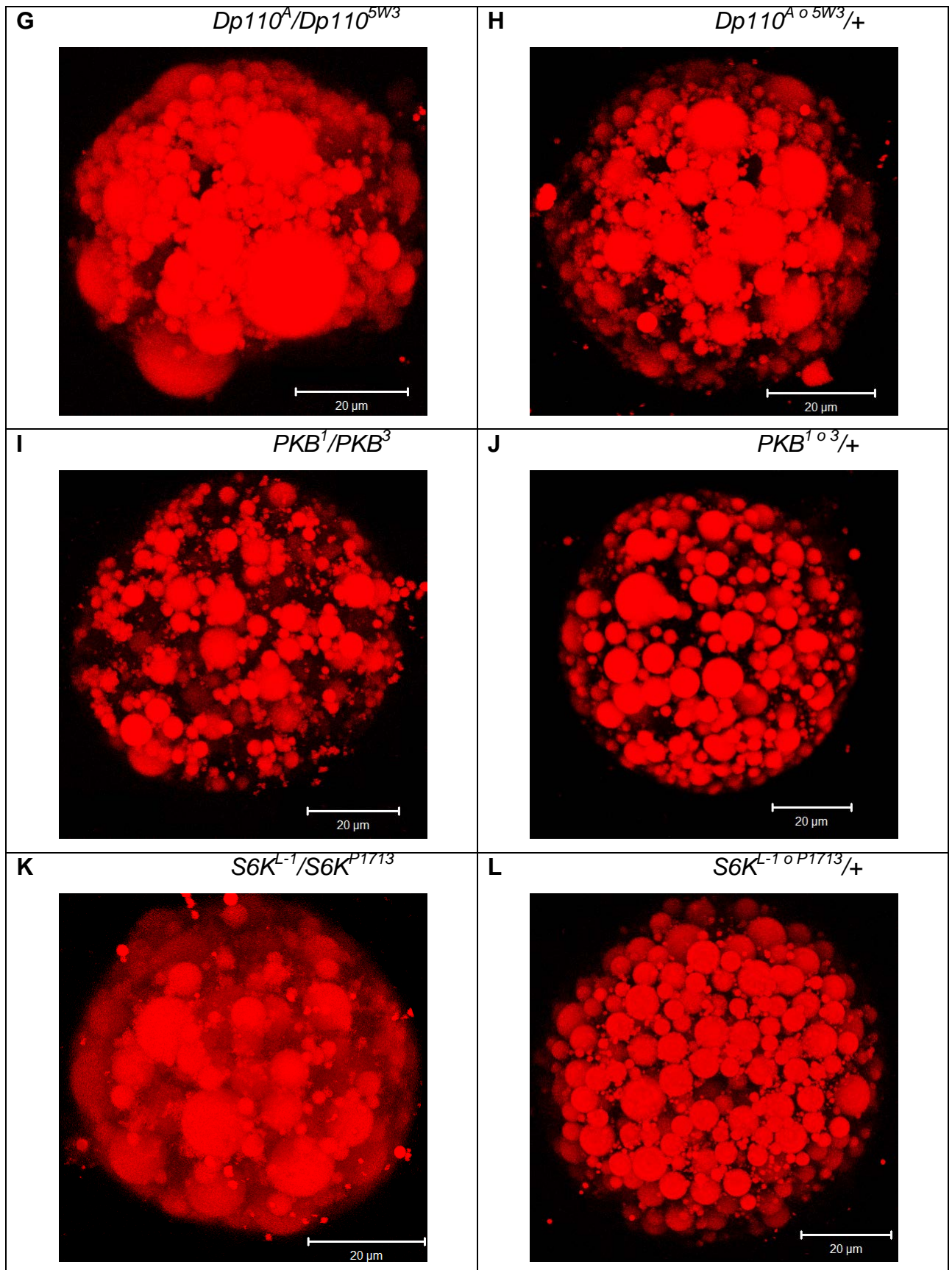


Fig. 7. Adipocitos individuales en las preparaciones histológicas de cuerpo graso teñidas con rojo Nilo de moscas adultas de 1 día después de la eclosión, silvestres ORR (A) y *yw* (B), y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} (C) y su control $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$ (D), $chico^1/chico^1$ (E) y su control $chico^1/+$ (F), $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ (G) y su control $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$ (H), PKB^1/PKB^3 (I) y su control $PKB^1 \text{ o } 3/+$ (J), y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ (K) y su control $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$ (L). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal (Zeiss LSM780, objetivo 25X) con excitación a una longitud de onda de 543 nm y con un espectro de emisión de 600 a 650 nm. Se muestran reconstrucciones hechas a partir de varios cortes ópticos en Z (un mínimo de 22 y un máximo de 59, 1.39 μm de espesor/ corte). La escala representa 20 μm .

3.1 Tamaño del adipocito

Se determinó el tamaño de adipocitos individuales en moscas adultas de 1 día después de la eclosión, silvestres ORR y *yw*, y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} , $chico^1/chico^1$, $Dp110^A/Dp110^{5W3}$, PKB^1/PKB^3 y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ así como de sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$ (Figura 8). Por medio de pruebas t de student se evaluaron las diferencias en el tamaño de los adipocitos entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y control. No se observaron diferencias significativas en el tamaño de los adipocitos entre moscas silvestres ORR y *yw*, ni de las mutantes InR^{E19}/InR^{3T5} , $chico^1/chico^1$ y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ con sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $chico^1/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$. Sin embargo, los adipocitos de las mutantes $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ y PKB^1/PKB^3 sí mostraron una reducción significativa de tamaño al compararse con los adipocitos de sus respectivos controles heterocigotos $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$ y $PKB^1 \text{ o } 3/+$ (Figuras 8D y 8E). Sin embargo, es de notarse que los controles para *InR*, *chico*, *DP110* y *S6K* son menores respecto a cepas silvestres ORR y *yw*.

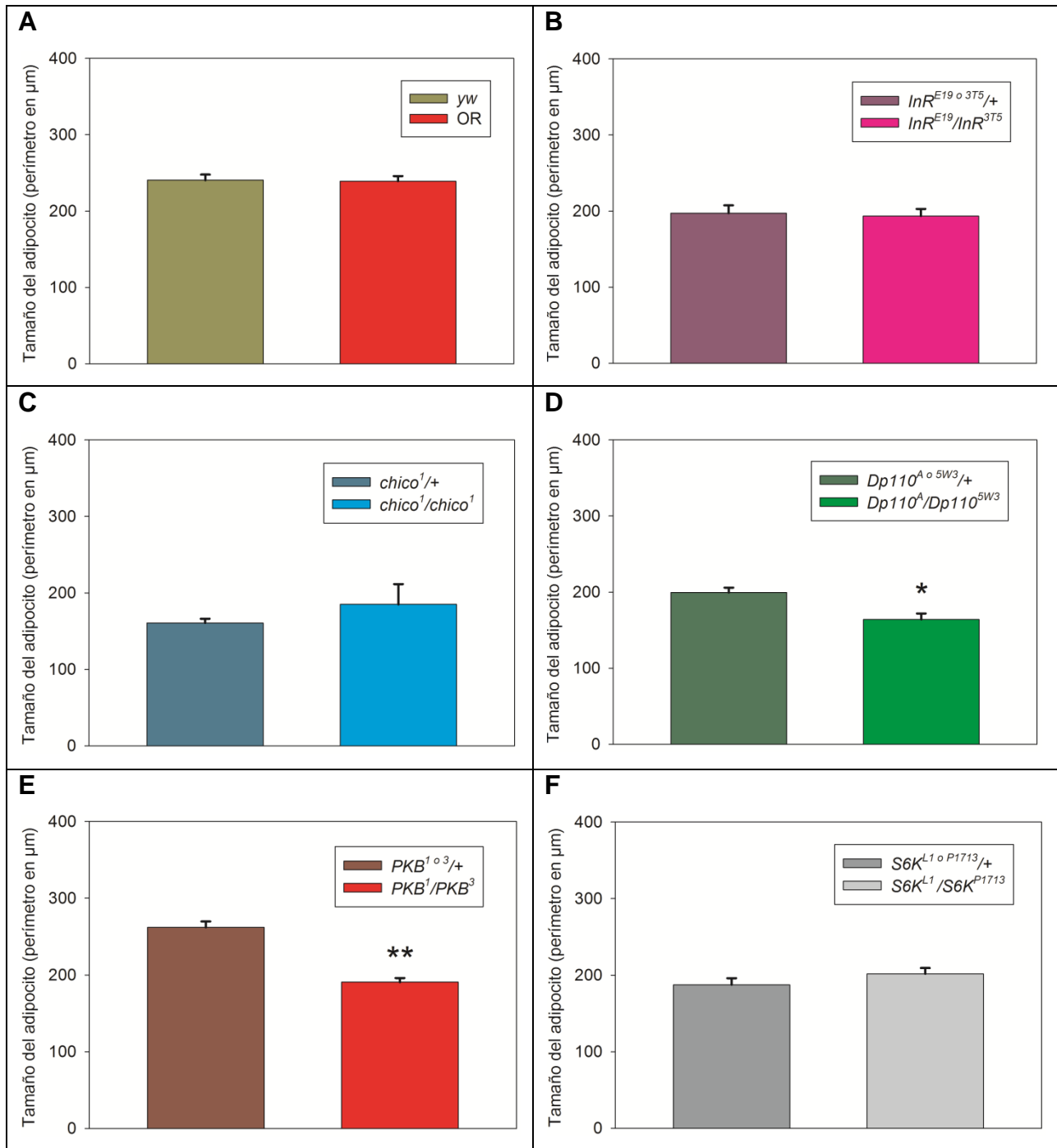


Fig. 8. Tamaño del adipocito de moscas adultas de 1 día después de la eclosión, silvestres ORR y *yw* (A), y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} (B), $chico^1/chico^1$ (C), $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ (D), PKB^1/PKB^3 (E) y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ (F) con sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19 o 3T5}/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A o 5W3/+$, $PKB^1 o 3/+$ y $S6K^{L-1 o P1713}/+$. Se realizaron pruebas t de student para evaluar diferencias en el

tamaño del adipocito entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles. Las diferencias significativas se representan con asteriscos (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). La escala en el eje de las ordenadas representa el perímetro en μm del adipocito. El número de adipocitos $n = 12$ en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).

3.2 Proporción de lípidos en el adipocito

Finalmente, se determinó la proporción de lípidos por adipocito (en porcentaje) en moscas adultas de 1 día después de la eclosión, silvestres ORR y *yw*, y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} , $chico^1/chico^1$, $Dp110^A/Dp110^{5W3}$, PKB^1/PKB^3 y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ así como de sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$ (Figura 9). Por medio de pruebas t de student se evaluaron las diferencias en la proporción de lípidos en el adipocito entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y control. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de lípidos por adipocito entre moscas silvestres ni mutantes con sus respectivos controles heterocigotos (Figura 9).

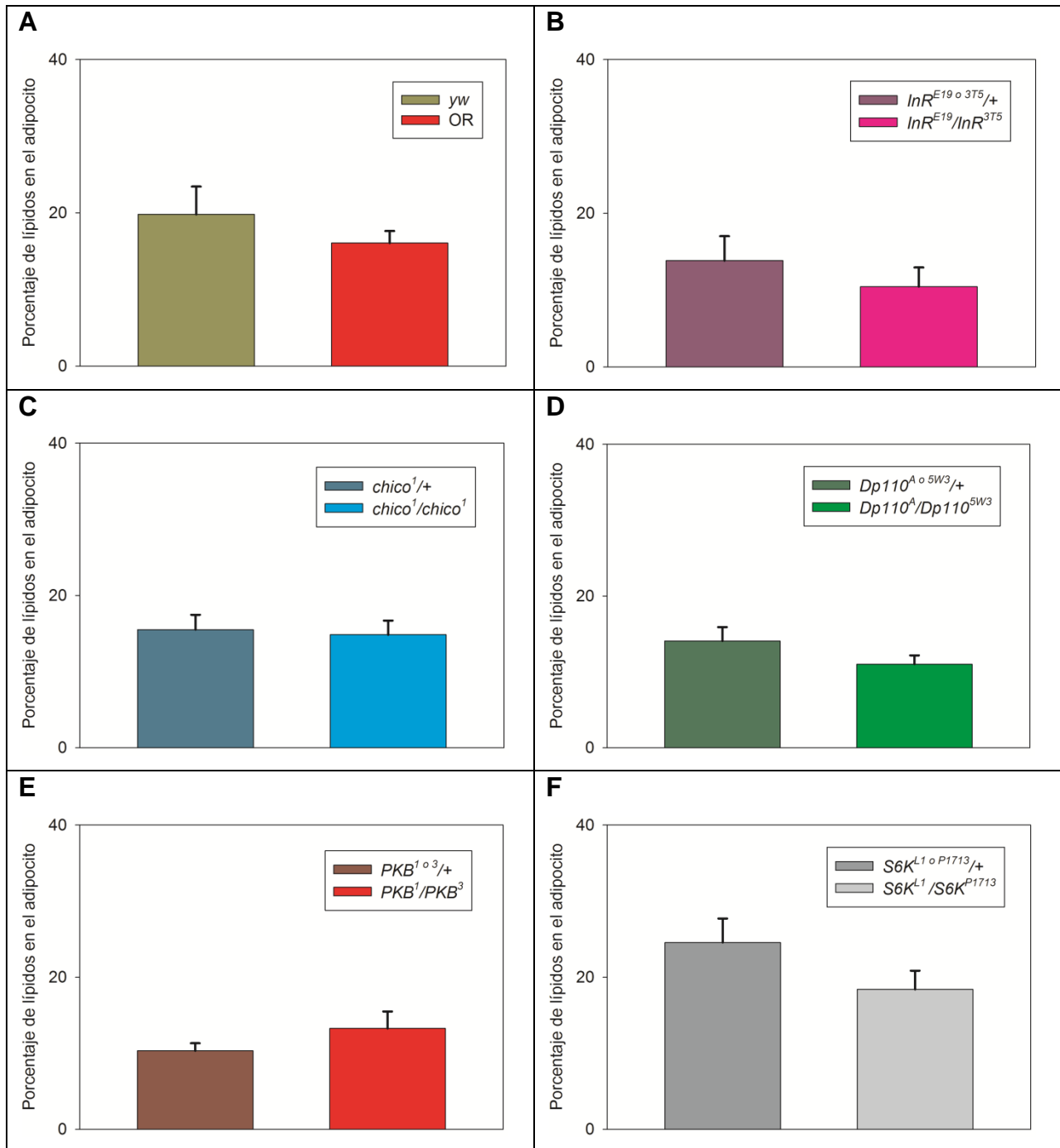


Fig. 9. Porcentaje de lípidos en el adipocito de moscas adultas de 1 día después de la eclosión, silvestres ORR y *yw* (A), y mutantes de la vía de la insulina *InR^{E19}/InR^{3T5}* (B), *chico¹/chico¹* (C), *Dp110^A/Dp110^{5W3}* (D), *PKB¹/PKB³* (E) y *S6K^{L-1}/S6K^{P1713}* (F) con sus respectivos controles heterocigotos *InR^{E19 o 3T5}/+*, *chico¹/+*, *Dp110^{A o 5W3}/+*, *PKB^{1 o 3}/+* y *S6K^{L-1 o P1713}/+*. Se realizaron pruebas t de student para evaluar diferencias en la

proporción de lípidos en el adipocito entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de lípidos por adipocito entre las cepas silvestres, ni entre mutantes y sus controles. La escala en el eje de las ordenadas representa el porcentaje de lípidos por adipocito. El número de adipocitos $n = 12$ en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran diferencias significativas en los carbohidratos de larvas sólo entre $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ y su control (Figura 3). Sin embargo, en adultos ésta diferencia ya no se observa. Independientemente de no existir diferencias en las otras cepas mutantes y control en larvas, en adultos se observan diferencias significativas entre InR^{E19}/InR^{3T5} , $chico^1/chico^1$ y PKB^1/PKB^3 con sus respectivos controles. De manera interesante en los tres casos anteriores, existe un aumento significativo en los carbohidratos respecto al tiempo en InR^{E19}/InR^{3T5} , $chico^1/chico^1$ y PKB^1/PKB^3 desde el día 7, y posterior en el caso de $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$; así como un aumento respecto al tiempo en los controles $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$. No se observó ningún aumento de carbohidratos respecto al tiempo en moscas adultas de las cepas silvestres, y tampoco existieron diferencias en los niveles de carbohidratos totales entre las cepas silvestres ORR y *yw* (Figura 4).

Dado que las larvas de *Drosophila* invierten gran parte de su tiempo en comer y metabolizar el alimento (se calcula que crecen más de 100 veces el tamaño del embrión antes de pupar (Church y Robertson, 1966; Tennessen y Thummel, 2011)) y que estos animales son mutantes, se esperaría ver exacerbados defectos del metabolismo en esta etapa de gran crecimiento, particularmente al final del periodo larvario. Sin embargo, las diferencias mayores se observan en adultos, y no en larvas. Los carbohidratos totales en larvas sin diferencias nos indican que existe una regulación distinta de estos durante los estadios larvarios en este organismo, incluso en mutantes, y que esta regulación no requiere de la vía de la insulina mayormente. Esta necesidad puede deberse a que la larva dedica todos sus esfuerzos a la búsqueda e ingestión de alimento para que esta energía pueda ser utilizada posteriormente para la histolización de tejidos de la larva y el desarrollo de los tejidos del adulto durante la metamorfosis, y que las reservas terminan siendo mayormente lípidos. Dado que esta acumulación mayúscula ocurre también en controles, diferencias debidas a mutaciones en la vía de la insulina no se vuelven significativas. Esto apunta a que la regulación metabólica larvaria de carbohidratos, debido a este crecimiento y generación de reservas, no se ve

perturbado por alteraciones en la vía de la insulina, o bien que dado que las consecuencias de mutaciones en la vía de la insulina en estos organismos tienden a la acumulación, y que eso es precisamente lo que ocurre en los silvestres, no se observan diferencias. Sería deseable estudiar si la vía de la insulina está muy activa en larvas silvestres, así como los niveles en faratos.

Una vez llegados a adultos, las cepas silvestres exhiben un control estricto en los niveles de carbohidratos totales desde el día 1 hasta el día 28, sin cambios significativos. En cambio, en las moscas mutantes de la vía de la insulina, estos niveles de carbohidratos se elevan progresivamente y de manera más dramática en *InR^{E19}/InR^{3T5}*, *chico¹/chico¹* y *PKB¹/PKB³*. Es también importante notar que además del fenotipo metabólico, los fenotipos de tamaño más reducido los presentan también las combinaciones mutantes de *InR^{E19}/InR^{3T5}*, *chico¹/chico¹* y *PKB¹/PKB³* (Murillo-Maldonado *et al.*, 2011). Es posible entonces que representen condiciones más hipomorfas para la vía de la insulina.

En este trabajo particular se midieron carbohidratos totales, por lo que una técnica alternativa de medición de glucosa o la proporción glucosa/trehalosa en hemolinfa podría mostrar cambios de estos carbohidratos entre mutantes y control, así como durante el tiempo, que podrían no observarse al medir carbohidratos totales. Es importante notar, como fue mencionado anteriormente, que los niveles de carbohidratos en hemolinfa de invertebrados son regulados no necesariamente de manera semejante a los de vertebrados; en particular los niveles de trehalosa, el principal carbohidrato circulante en insectos, pueden variar en función del estado nutricional y fisiológico, la etapa de desarrollo y las condiciones ambientales (Thompson, 2003; Teleman, 2010).

De manera distinta a los carbohidratos, se observaron niveles superiores de lípidos en larvas mutantes de las cepas *InR^{E19}/InR^{3T5}*, *Dp110^A/Dp110^{5W3}*, *PKB¹/PKB³* y *S6K^{L-1}/S6K^{P1713}* respecto a sus controles (Figura 5). Además de lo anterior, en moscas adultas existieron diferencias significativas entre *InR^{E19}/InR^{3T5}*, *chico¹/chico¹*, *Dp110^A/Dp110^{5W3}* y *PKB¹/PKB³* y sus controles heterocigotos, con niveles más

elevados de lípidos en todos los casos salvo en el de *chico¹/chico¹*, siendo ésta la única cepa mutante donde se observó un descenso significativo y sostenido desde el día 7 hasta el 28. La cepa silvestre ORR tuvo niveles más elevados respecto a *yw*, El caso de la cepa silvestre *yw* resulta interesante, ya que se observa un fuerte descenso en el nivel de lípidos a partir del día 7, y un ligero aumento a partir del día 14 (Figura 6). En general, estos resultados apoyan la idea de que la acumulación de lípidos es el resultado final de la ingesta en la etapa larvaria, y que estas reservas no se utilizan de la misma manera en los mutantes durante la metamorfosis y la vida adulta. Al contrario, aumentan. En este sentido, es consistente que se observen diferencias en etapas larvarias en la cantidad de lípidos totales, mismas que continúan en la edad adulta. Sugiere que los excesos no metabolizados de otro modo en mutantes de carbohidratos se convierten a lípidos de reserva, y que esta acumulación continúa durante todo el ciclo de vida. Más que la medición de un tipo particular de lípido, la medición de lípidos totales permite monitorear el fenómeno.

En el caso particular de los lípidos en las cepas silvestres, no se observan diferencias en larvas, pero hay variaciones importantes a los distintos tiempos medidos en los adultos. Con estos resultados se puede inferir que la acumulación de lípidos de reserva en la vida adulta de la mosca puede depender de otros factores, ya sea competencia, disponibilidad de alimento o incluso el envejecimiento del organismo. En las moscas mutantes de la vía de la insulina en general se observó un nivel más alto de lípidos en mutantes respecto a sus controles. Además, resulta interesante que estos niveles altos se mantienen razonablemente estables a lo largo de toda la vida del adulto, caso contrario a lo observado en moscas silvestres, por lo que esto se puede interpretar como una evidencia más a favor de un desequilibrio metabólico producto de las alteraciones en la vía de la insulina. Si las moscas mutantes no pueden regular de manera normal sus niveles de lípidos, particularmente lípidos de reserva, dependiendo de las condiciones cambiantes del medio, esto podría provocar consecuencias respecto a la supervivencia y la energéticamente demandante producción de huevos.

Se estaría en el caso de contar con reservas altas en mutantes, pero debido a las mutaciones en la vía, no poder aprovecharlas. Posible evidencia de lo anterior sería la

casi total esterilidad de moscas hembras mutantes de la vía de la insulina, y la talla reducida (Bohni *et al.*, 1999; Tatar *et al.*, 2001), además de que esta cantidad de lípidos podría tener un papel en la longevidad observada en estas moscas bajo condiciones de falta de alimento (Bohni *et al.*, 1999; Tatar *et al.*, 2001; Giannakou y Partridge, 2007; Broughton *et al.*, 2008). Es importante notar de nueva cuenta que en este trabajo se midieron lípidos totales, sin embargo, estos resultados concuerdan con los de Carvalho *et al.*, 2012 y Guan *et al.*, 2013, ya que los lípidos de reserva (TAG y SE), así como los DAG, que contribuyen de manera muy importante a los lípidos totales del organismo, no se acumulan significativamente a lo largo de la vida de la mosca adulta silvestre en condiciones de laboratorio. Sería interesante conocer la proporción de las distintas clases de lípidos en las moscas mutantes de la vía de la insulina.

También es importante mencionar que las moscas en condiciones de laboratorio tienen poca actividad con respecto a moscas en estado silvestre y alimento *ad libitum*, y estas condiciones de laboratorio podrían provocar una acumulación de lípidos con el tiempo. Sería interesante realizar experimentos para explorar estas posibilidades.

Los resultados de carbohidratos y lípidos en moscas adultas mutantes de la vía de la insulina concuerdan parcialmente con lo reportado anteriormente (Bohni *et al.*, 1999; Baker y Thummel, 2007; Broughton *et al.*, 2008; Teleman, 2010; Murillo-Maldonado *et al.*, 2011). El análisis realizado en este trabajo considera la media de los niveles de carbohidratos y lípidos totales en todas las edades medidas (1, 7, 14 y 28 días) para determinar si existen o no diferencias entre las cepas mutantes y sus controles, por lo que se puede considerar que, dado que el metabolismo es dinámico y en muchos casos se observaron cambios respecto al tiempo, el presente trabajo prueba de una manera más extensiva, como cabría esperar, que hay alteraciones metabólicas en las moscas mutantes de la vía de la insulina.

Finalmente, las observaciones de preparaciones histológicas de adipocitos individuales mostraron un menor tamaño celular en moscas mutantes $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ y PKB^1/PKB^3 respecto a sus controles heterocigotos (Figura 8). Estos resultados

concuerdan con trabajos anteriores, donde se reporta un menor tamaño celular en moscas mutantes de la vía de la insulina (Bohni *et al.*, 1999; Murillo-Maldonado *et al.*, 2011), además de ser *PKB¹/PKB³* la cepa donde se observa el fenotipo de mayor reducción. La comparación del volumen de lípidos en adipocitos de las distintas cepas mutantes no arrojó diferencias significativas (Figura 9). Estos resultados deben contrastarse con las observaciones hechas por DiAngelo y Bimbaum (2009), quienes al sobreactivar la vía de la insulina en *Drosophila* observaron un mayor número de adipocitos, un mayor número de gotitas de lípidos, así como un volumen incrementado de lípidos en el cuerpo graso de moscas adultas de entre 5 y 10 días de edad, varios días posteriores a lo observado en este trabajo. Estos resultados sugieren entonces, que las diferencias observadas en los lípidos totales entre las moscas mutantes y sus controles heterocigotos podrían estar dadas por el número total de adipocitos, teniendo en cuenta que una cantidad semejante de lípidos por adipocito, pero adipocitos de menor talla implica una densidad mayor de lípidos por adipocito. Por otro lado, sería interesante hacer histología abdominal o de cuerpo completo, tiñendo los lípidos de todos los adipocitos y buscando una diferencia en la extensión del tejido graso entre moscas mutantes y sus controles.

Cabe mencionar que la mayoría de los alelos utilizados en éste trabajo son hipomorfos, y letales en homocigosis (a excepción de *chico*, que es nulo y viable en homocigosis), por lo que fue necesario realizar cruza heteroalélicas. Las diferencias en los niveles de lípidos y carbohidratos entre mutantes y sus respectivos controles heterocigotos, así como las posibles diferencias entre las mutantes de distintos genes de la vía de la insulina, pueden radicar en el grado de afectación de la proteína producto de cada alelo mutante. Además, otro factor que puede influenciar en éstas diferencias es la falta de total uniformidad en el fondo genético de cada una de las cepas. Esto último podría controlarse parcialmente en experimentos posteriores volviendo más uniforme el fondo genético de todas las cepas utilizadas. Otro factor a tomarse en cuenta es que la cepa mutante de *S6K* es la menos hipomórfica de todas, ya que la reducción en talla, peso, carbohidratos y lípidos es la más discreta de las examinadas (Murillo-Maldonado *et al.*, 2011).

Por último, es importante notar que una dieta rica en ácidos grasos saturados y colesterol se asocia con el síndrome metabólico y enfermedad del corazón en humanos. Los mecanismos que subyacen a esta relación no son totalmente claros, pero un metabolismo cardíaco de fosfolípidos alterado y un almacenamiento incrementado de triglicéridos se han implicado en la cardiomiopatía, pero no se entiende aún por qué el consumo de ácidos grasos saturados conduce a estos problemas (Carvalho *et al.*, 2012). Por lo tanto, sería interesante probar algunos de estos aspectos en moscas que inherentemente acumulan más lípidos, como las estudiadas en este trabajo, en otras sintomatologías en la mosca.

CONCLUSIONES

En su conjunto, estos datos, muestran que la homeostasis de lípidos y carbohidratos está alterada en las moscas mutantes con respecto a sus controles y a moscas silvestres. Estas variaciones en lípidos y carbohidratos en las mutantes de la vía de la insulina son una manifestación de su desajuste metabólico. Este modelo puede servir para estudiar otros aspectos de la diabetes, así como de la regulación metabólica a través del ciclo de vida de este insecto modelo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADA. 2004. "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." *Diabetes Care* 27(suppl 1): s5-s10.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, *et al.* 2000. "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science* 287(5461): 2185-2195.
- Arrese EL y Soulages JL. 2010. "Insect fat body: energy, metabolism, and regulation." *Annu Rev Entomol* 55: 207-225.
- Ashburner M. 1989. *Drosophila*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Bailey CJ. 2000. "Potential new treatments for type 2 diabetes." *Trends Pharmacol Sci* 21(7): 259-265.
- Baker KD y Thummel CS. 2007. "Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*." *Cell Metab* 6(4): 257-266.
- BDSC. 2013. Bloomington *Drosophila* Stock Center at Indiana University.
- Benaroudj N, Lee DH y Goldberg AL. 2001. "Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals." *J Biol Chem* 276(26): 24261-24267.
- Bharucha KN, Tarr P y Zipursky SL. 2008. "A glucagon-like endocrine pathway in *Drosophila* modulates both lipid and carbohydrate homeostasis." *J Exp Biol* 211(Pt 19): 3103-3110.
- Bohni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss BF, *et al.* 1999. "Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4." *Cell* 97(7): 865-875.
- Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R y Hafen E. 2001. "An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control." *Curr Biol* 11(4): 213-221.
- Broughton S, Alic N, Slack C, Bass T, Ikeya T, Vinti G, *et al.* 2008. "Reduction of DILP2 in *Drosophila* triages a metabolic phenotype from lifespan revealing redundancy and compensation among DILPs." *PLoS One* 3(11): e3721.
- Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE y Wells MA. 2001. "Fat Metabolism in Insects." *Annual Review of Nutrition* 21(1): 23-46.
- Carvalho M, Sampaio JL, Palm W, Brankatschk M, Eaton S y Shevchenko A. 2012. "Effects of diet and development on the *Drosophila* lipidome." *Mol Syst Biol* 8.
- Ceddia RB, Bikopoulos GJ, Hilliker AJ y Sweeney G. 2003. "Insulin stimulates glucose metabolism via the pentose phosphate pathway in *Drosophila* Kc cells." *FEBS Lett* 555(2): 307-310.
- Claeys I, Simonet G, Poels J, Van Loy T, Vercammen L, De Loof A, *et al.* 2002. "Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway." *Peptides* 23(4): 807-816.
- Colombani J, Andersen DS y Léopold P. 2012. "Secreted Peptide Dilp8 Coordinates *Drosophila* Tissue Growth with Developmental Timing." *Science* 336(6081): 582-585.
- Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J y Kahn CR. 1994. "Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70

- S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation." *Mol Cell Biol* 14(7): 4902-4911.
- Chen Q, Ma E, Behar KL, Xu T y Haddad GG. 2002. "Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*." *J Biol Chem* 277(5): 3274-3279.
- Chino H, Lum PY, Nagao E y Hiraoka T. 1992. "The molecular and metabolic essentials for long-distance flight in insects." *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 162(2): 101-106.
- Church RB y Robertson FW. 1966. "A biochemical study of the growth of *Drosophila melanogaster*." *Journal of Experimental Zoology* 162(3): 337-351.
- Demerec M. 1994. *The biology of Drosophila*. Plainview, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- DiAngelo JR y Birnbaum MJ. 2009. "Regulation of Fat Cell Mass by Insulin in *Drosophila melanogaster*." *Molecular and Cellular Biology* 29(24): 6341-6352.
- Duvillié B, Cordonnier N, Deltour L, Dandoy-Dron F, Itier J-M, Monthieux E, *et al.* 1997. "Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(10): 5137-5140.
- Ebberink RHM, Smit AB y Van Minnen J. 1989. "The Insulin Family: Evolution of Structure and Function in Vertebrates and Invertebrates." *The Biological Bulletin* 177(2): 176-182.
- Efstratiadis A. 1998. "Genetics of mouse growth." *Int J Dev Biol* 42: 955-976.
- Eldor R, Stern E, Milicevic Z y Raz I. 2005. "Early use of insulin in type 2 diabetes." *Diabetes Res Clin Pract* 68 Suppl1: S30-35.
- Escher SA y Rasmuson-Lestander A. 1999. "The *Drosophila* glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic comparisons, analysis of functional sites and secondary structures." *Hereditas* 130(2): 95-103.
- Fernandez-Almonacid R y Rosen OM. 1987. "Structure and Ligand Specificity of the *Drosophila melanogaster* Insulin Receptor." *Molecular and Cellular Biology* 7(8): 2718-2727.
- Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E y Dominguez M. 2012. "Imaginal Discs Secrete Insulin-Like Peptide 8 to Mediate Plasticity of Growth and Maturation." *Science* 336(6081): 579-582.
- Giannakou ME y Partridge L. 2007. "Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan." *Trends Biochem Sci* 32(4): 180-188.
- Griffiths AJF. 2008. *Introduction to genetic analysis*. New York, W.H. Freeman and Co.
- Gronke S, Beller M, Fellert S, Ramakrishnan H, Jackle H y Kuhnlein RP. 2003. "Control of fat storage by a *Drosophila* PAT domain protein." *Curr Biol* 13(7): 603-606.
- Grönke S, Mildner A, Fellert S, Tennagels N, Petry S, Müller G, *et al.* 2005. "Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*." *Cell Metabolism* 1(5): 323-330.
- Guan Xue L, Cestra G, Shui G, Kuhrs A, Schittenhelm Ralf B, Hafen E, *et al.* 2013. "Biochemical Membrane Lipidomics during *Drosophila* Development." *Developmental Cell* 24(1): 98-111.
- Hall DJ, Grewal SS, de la Cruz AF y Edgar BA. 2007. "Rheb-TOR signaling promotes protein synthesis, but not glucose or amino acid import, in *Drosophila*." *BMC Biol* 5: 10.

- Huang S y Czech MP. 2007. "The GLUT4 glucose transporter." *Cell Metab* 5(4): 237-252.
- Jin Chan S y Steiner DF. 2000. "Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone." *American Zoologist* 40(2): 213-222.
- Khani A, Moharramipour S y Barzegar M. 2007. "Cold tolerance and trehalose accumulation in overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae)." *Eur J Entomol* 104(3): 385-392.
- Kono Y, Takahashi M, Matsushita K, Nishina M, Kameda Y y Hori E. 1994. "Inhibition of flight in *Periplaneta americana* (Linn.) by a trehalase inhibitor, validoxylamine A." *Journal of Insect Physiology* 40(6): 455-461.
- Kornberg TB y Krasnow MA. 2000. "The *Drosophila* genome sequence: implications for biology and medicine." *Science* 287(5461): 2218-2220.
- Lee G y Park JH. 2004. "Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* 167(1): 311-323.
- LeRoith D y Gavrilova O. 2006. "Mouse models created to study the pathophysiology of Type 2 diabetes." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38(5-6): 904-912.
- Mahmud SA, Hirasawa T, Furusawa C, Yoshikawa K y Shimizu H. 2012. "Understanding the mechanism of heat stress tolerance caused by high trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray." *J Biosci Bioeng* 113(4): 526-528.
- McQuilton P, St. Pierre SE, Thurmond J y Consortium tF. 2011. "FlyBase 101 – the basics of navigating FlyBase." *Nucleic Acids Research*.
- Meneses P y de los Angeles Ortíz M. 1975. "A protein extract from *Drosophila melanogaster* with insulin-like activity." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 51(2): 483-485.
- Morley JE. 2008. "Diabetes and aging: epidemiologic overview." *Clin Geriatr Med* 24(3): 395-405, v.
- Murillo-Maldonado JM, Sanchez-Chavez G, Salgado LM, Salceda R y Riesgo-Escovar JR. 2011. "*Drosophila* insulin pathway mutants affect visual physiology and brain function besides growth, lipid, and carbohydrate metabolism." *Diabetes* 60(5): 1632-1636.
- Musselman LP, Fink JL, Narzinski K, Ramachandran PV, Hathiramani SS, Cagan RL, *et al.* 2011. "A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*." *Dis Model Mech* 4(6): 842-849.
- Ohtake S y Wang YJ. 2011. "Trehalose: current use and future applications." *J Pharm Sci* 100(6): 2020-2053.
- Oldham S y Hafen E. 2003. "Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control." *Trends Cell Biol* 13(2): 79-85.
- Rasband WS. 2011. ImageJ, U. S. National Institutes of Health.
- Redekop WK, Koopmanschap MA, Stolk RP, Rutten GE, Wolffenbuttel BH y Niessen LW. 2002. "Health-related quality of life and treatment satisfaction in Dutch patients with type 2 diabetes." *Diabetes Care* 25(3): 458-463.
- Reyes-DelaTorre A, Peña-Rangel MT y Riesgo-Escovar J. 2012. Carbohydrate Metabolism in *Drosophila*: Reliance on the Disaccharide Trehalose.

- Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. Chang, C. Rijeka, InTech: 317-338.
- Rulifson EJ, Kim SK y Nusse R. 2002. "Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes." *Science* 296(5570): 1118-1120.
- Rull JA, Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Rios-Torres JM, Gomez-Perez FJ y Olaiz G. 2005. "Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico." *Arch Med Res* 36(3): 188-196.
- Saltiel AR y Kahn CR. 2001. "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* 414(6865): 799-806.
- Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS y Goldstein JL. 1999. "Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(24): 13656-13661.
- Sieber MH y Thummel CS. 2009. "The DHR96 nuclear receptor controls triacylglycerol homeostasis in *Drosophila*." *Cell Metab* 10(6): 481-490.
- SINAIS. 2008. Base de datos del Sistema Nacional de Información en Salud.
- St Johnston D. 2002. "The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*." *Nat Rev Genet* 3(3): 176-188.
- Staubli F, Jorgensen TJ, Cazzamali G, Williamson M, Lenz C, Sondergaard L, *et al.* 2002. "Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3446-3451.
- Sun D, Garcha K y Steele JE. 2002. "Stimulation of trehalose efflux from cockroach (*Periplaneta americana*) fat body by hypertrehalosemic hormone is dependent on protein kinase C and calmodulin." *Arch Insect Biochem Physiol* 50(1): 41-51.
- Sun Y, Bilan PJ, Liu Z y Klip A. 2010. "Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(46): 19909-19914.
- Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu M-P, Yin C-M y Garofalo RS. 2001. "A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function." *Science* 292(107): 107-110.
- Teleman AA. 2010. "Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*." *Biochem J* 425(1): 13-26.
- Tennessen Jason M y Thummel Carl S. 2011. "Coordinating Growth and Maturation Insights from *Drosophila*." *Current biology* : CB 21(18): R750-R757.
- Thompson SN. 2003. Trehalose – The Insect ‘Blood’ Sugar. *Advances in Insect Physiology*, Academic Press. Volume 31: 205-285.
- Thong FSL, Dugani CB y Klip A. 2005. "Turning Signals On and Off: GLUT4 Traffic in the Insulin-Signaling Highway." *Physiology* 20(4): 271-284.
- Thorat LJ, Gaikwad SM y Nath BB. 2012. "Trehalose as an indicator of desiccation stress in *Drosophila melanogaster* larvae: A potential marker of anhydrobiosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419(4): 638-642.
- Van Handel E. 1985a. "Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes." *J Am Mosq Control Assoc* 1(3): 299-301.
- Van Handel E. 1985b. "Rapid determination of total lipids in mosquitoes." *J Am Mosq Control Assoc* 1(3): 302-304.
- Wang M y Wang C. 1993. "Characterization of glucose transport system in *Drosophila* Kc cells." *FEBS Lett* 317(3): 241-244.

- Watanabe M, Kikawada T, Minagawa N, Yukuhiro F y Okuda T. 2002. "Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures." *J Exp Biol* 205(Pt 18): 2799-2802.
- Wyatt GR y Kale GF. 1957. "The chemistry of insect hemolymph. II. Trehalose and other carbohydrates." *J Gen Physiol* 40(6): 833-847.
- Xiao X y Song B-L. 2013. "SREBP: a novel therapeutic target." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 45(1): 2-10.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
Fig. 1	Estructura de la trehalosa (α 1-D-glucopiranosil1- α 1-D-glucopiranosido, tomada de Reyes-DelaTorre <i>et al.</i> , 2012).	5
Fig. 2	Señalización a través del receptor a la insulina (InR) en <i>Drosophila melanogaster</i> . Los eventos principales luego de la unión del ligando (DILP1-7) al InR comienzan con la autofosforilación del receptor de manera cruzada, evento que favorece el reclutamiento de los IRS Chico y Lnk. El complejo InR-IRS se une a la PI3K y la activa, provocando la acumulación de PIP3, evento que recluta a las cinasas PDK1 y Akt a la membrana plasmática. Akt fosforila proteínas involucradas en el control metabólico, incluyendo la GSK-3 β , los factores de transcripción FOXO, Tsc2 y la cinasa SIK2. La actividad de FOXO promueve la conservación de energía. Su fosforilación provoca su retención en el citoplasma, y por lo tanto, la inhibición de su actividad. La fosforilación de Tsc2 por Akt activa la actividad del complejo TOR-C1 a través de la GTPasa Rheb. TOR es una cinasa anabólica reguladora central del metabolismo de carbohidratos, lípidos y de la autofagia (modificado de Teleman, 2010).	11
Fig. 3	Carbohidratos totales en larvas de tercer instar, silvestres ORR y <i>yw</i> (A), y mutantes de la vía de la insulina <i>InR^{E19}/InR^{3T5}</i> (B), <i>chico¹/chico¹</i> (C), <i>Dp110^A/Dp110^{5W3}</i> (D), <i>PKB¹/PKB³</i> (E) y <i>S6K^{L-1}/S6K^{P1713}</i> (F) con sus respectivos controles heterocigotos <i>InR^{E19} o 3T5/+</i> , <i>chico¹/+</i> , <i>Dp110^A o 5W3/+</i> , <i>PKB¹ o 3/+</i> y <i>S6K^{L-1} o P1713/+</i> . Se realizaron pruebas t de student para evaluar diferencias entre las cepas silvestres, así como entre mutantes	26

	<p>y sus controles. La diferencia significativa para $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ se representa con un asterisco (*$P < 0.05$). La escala en el eje de las ordenadas representa μg de carbohidratos totales/mg de peso. El número de individuos $n = 9$ en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).</p>	
<p>Fig. 4</p>	<p>Carbohidratos totales en moscas adultas silvestres ORR y <i>yw</i> (A), y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} (B), $chico^1/chico^1$ (C), $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ (D), PKB^1/PKB^3 (E) y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ (F) con sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19 \text{ o } 3T5}/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1 \text{ o } P1713}/+$, de 1, 7, 14 y 28 días después de la eclosión. Se utilizó una prueba ANOVA de dos vías y una prueba <i>post-hoc</i> de Tukey para evaluar el cambio en los carbohidratos totales respecto al día 1 en cada genotipo. Además, se evaluaron las diferencias en los niveles de carbohidratos totales entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y controles. Las diferencias significativas respecto al tiempo dentro de los genotipos ORR, así como en los mutantes se representan con los asteriscos superiores del mismo color del genotipo respectivo (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$); las diferencias significativas respecto al tiempo dentro de las moscas silvestres <i>yw</i>, así como dentro de los controles se representan con los asteriscos inferiores del mismo color del genotipo respectivo (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$). Las diferencias significativas entre cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles se representan con los asteriscos de color negro a la izquierda de la gráfica (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$). La escala en el eje de las ordenadas representa μg de carbohidratos totales/mg de peso. El número de individuos $n = 9$ en cada grupo, las barras de error representan el error</p>	<p>29</p>

	estándar de la media (EEM).	
Fig. 5	<p>Lípidos totales en larvas de tercer instar, silvestres ORR y <i>yw</i> (A), y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} (B), $chico^1/chico^1$ (C), $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ (D), PKB^1/PKB^3 (E) y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ (F) con sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19} \text{ o } 3T5/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1} \text{ o } P1713/+$. Se realizaron pruebas t de student para evaluar diferencias entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles. Las diferencias significativas se representan con asteriscos (*P<0.05, **P<0.01). La escala en el eje de las ordenadas representa μg de lípidos totales/mg de peso. El número de individuos $n = 9$ en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).</p>	32
Fig. 6	<p>Lípidos totales en moscas adultas silvestres ORR y <i>yw</i> (A), y mutantes de la vía de la insulina InR^{E19}/InR^{3T5} (B), $chico^1/chico^1$ (C), $Dp110^A/Dp110^{5W3}$ (D), PKB^1/PKB^3 (E) y $S6K^{L-1}/S6K^{P1713}$ (F) con sus respectivos controles heterocigotos $InR^{E19} \text{ o } 3T5/+$, $chico^1/+$, $Dp110^A \text{ o } 5W3/+$, $PKB^1 \text{ o } 3/+$ y $S6K^{L-1} \text{ o } P1713/+$, a 1, 7, 14 y 28 días después de la eclosión. Se utilizó una prueba ANOVA de dos vías y una prueba <i>post-hoc</i> de Tukey para evaluar el cambio en los lípidos totales respecto al día 1 en cada genotipo. Además, se evaluaron las diferencias en los niveles de lípidos totales entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y controles. Las diferencias significativas respecto al tiempo dentro de los genotipos ORR, así como en los mutantes se representan con los asteriscos superiores del mismo color del genotipo respectivo (*P<0.05, **P<0.01); las diferencias significativas respecto al tiempo dentro de las moscas silvestres <i>yw</i>, así como dentro de los controles se representan con los asteriscos inferiores del mismo color del genotipo respectivo</p>	35

	<p>(*P<0.05, **P<0.01). Las diferencias significativas entre cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles se representan con los asteriscos de color negro a la izquierda de la gráfica (*P<0.05, **P<0.01). La escala en el eje de las ordenadas representa µg de lípidos totales/mg de peso. El número de individuos n = 9 en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).</p>	
Fig. 7	<p>Adipocitos individuales en las preparaciones histológicas de cuerpo graso teñidas con rojo Nilo de moscas adultas de 1 día después de la eclosión, silvestres ORR (A) y <i>yw</i> (B), y mutantes de la vía de la insulina <i>InR^{E19}/InR^{3T5}</i> (C) y su control <i>InR^{E19} o ^{3T5}/+</i> (D), <i>chico¹/chico¹</i> (E) y su control <i>chico¹/+</i> (F), <i>Dp110^A/Dp110^{5W3}</i> (G) y su control <i>Dp110^A o ^{5W3}/+</i> (H), <i>PKB¹/PKB³</i> (I) y su control <i>PKB¹ o ³/+</i> (J), y <i>S6K^{L-1}/S6K^{P1713}</i> (K) y su control <i>S6K^{L-1} o ^{P1713}/+</i> (L). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal (Zeiss LSM780, objetivo 25X) con excitación a una longitud de onda de 543 nm y con un espectro de emisión de 600 a 650 nm. Se muestran reconstrucciones hechas a partir de varios cortes ópticos en Z (un mínimo de 22 y un máximo de 59, 1.39 µm de espesor/ corte). La escala representa 20 µm.</p>	38
Fig. 8	<p>Tamaño del adipocito de moscas adultas de 1 día después de la eclosión, silvestres ORR y <i>yw</i> (A), y mutantes de la vía de la insulina <i>InR^{E19}/InR^{3T5}</i> (B), <i>chico¹/chico¹</i> (C), <i>Dp110^A/Dp110^{5W3}</i> (D), <i>PKB¹/PKB³</i> (E) y <i>S6K^{L-1}/S6K^{P1713}</i> (F) con sus respectivos controles heterocigotos <i>InR^{E19} o ^{3T5}/+</i>, <i>chico¹/+</i>, <i>Dp110^A o ^{5W3}/+</i>, <i>PKB¹ o ³/+</i> y <i>S6K^{L-1} o ^{P1713}/+</i>. Se realizaron pruebas t de student para evaluar diferencias en el tamaño del adipocito entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles. Las</p>	41

	<p>diferencias significativas se representan con asteriscos (*P<0.05, **P<0.01). La escala en el eje de las ordenadas representa el perímetro en μm del adipocito. El número de adipocitos $n = 12$ en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).</p>	
Fig. 9	<p>Porcentaje de lípidos en el adipocito de moscas adultas de 1 día después de la eclosión, silvestres ORR y <i>yw</i> (A), y mutantes de la vía de la insulina <i>InR^{E19}/InR^{3T5}</i> (B), <i>chico¹/chico¹</i> (C), <i>Dp110^A/Dp110^{5W3}</i> (D), <i>PKB¹/PKB³</i> (E) y <i>S6K^{L-1}/S6K^{P1713}</i> (F) con sus respectivos controles heterocigotos <i>InR^{E19} o 3T5/+</i>, <i>chico¹/+</i>, <i>Dp110^A o 5W3/+</i>, <i>PKB¹ o 3/+</i> y <i>S6K^{L-1} o P1713/+</i>. Se realizaron pruebas t de student para evaluar diferencias en la proporción de lípidos en el adipocito entre las cepas silvestres, así como entre mutantes y sus controles. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de lípidos por adipocito entre las cepas silvestres, ni entre mutantes y sus controles. La escala en el eje de las ordenadas representa el porcentaje de lípidos por adipocito. El número de adipocitos $n = 12$ en cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).</p>	43

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
Tabla 1	Alelos mutantes de la vía de la insulina, cromosomas balanceadores y fenotipo mutante dominante del balanceador, utilizados en los experimentos.	22