



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**Caracterización de defectos metabólicos en *Drosophila melanogaster* por deficiencias en la señalización de la insulina**

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

PRESENTA

Jessica Paloma Alvarez Rendón

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA  
AVANZADA, IPN

Juriquilla, Querétaro

Febrero de 2019



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.

**DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR**  
**DR. LUIS MIGUEL SALGADO RODRÍGUEZ**  
**DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA LORENZO**  
**Presente**

Estimados Miembros del Comité Tutor:

Por este conducto les informo que el Comité Académico del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología), en su pasada reunión del 13 de noviembre de 2018 aprobó su solicitud para realizar los trámites del Examen de Grado de Maestra en Ciencias de la alumna **JESSICA PALOMA ALVAREZ RENDÓN**, con número de cuenta 517005950, con el proyecto de tesis: "**Caracterización de defectos metabólicos en *Drosophila melanogaster* por deficiencias en la señalización de insulina**". Asimismo, se acordó que este jurado queda constituido por los siguientes académicos:

**Jurado de Examen**

|   |            |
|---|------------|
| Dra. Rocio Salceda Sacanelles               | Presidente |
| Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar              | Secretario |
| Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña       | Vocal      |
| Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo | Suplente   |
| Dr. Luis Alberto Téllez Lima                | Suplente   |

**De acuerdo al Artículo 25 del Reglamento de Estudios de Posgrado de la UNAM**

...En el caso de la graduación de maestría con tesis, el jurado será designado por el comité académico según el procedimiento establecido en las normas operativas del programa, y se integrará con cinco sinodales. En un plazo máximo de treinta días hábiles\*, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Será requisito para presentar el examen de grado que al menos cuatro de los cinco votos emitidos sean favorables.

En el examen de grado deberán participar al menos tres sinodales... (de forma presencial o por videoconferencia).

\*La primera revisión se entregará los primeros 15 días hábiles.

**Atentamente**

**"Por mi raza hablará el espíritu"**

**UNAM campus Juriquilla, Querétaro, Qro. a 14 de noviembre de 2018**

**LA COORDINADORA**

**DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ**

\*gau



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Instituto de Fisiología Celular  
División de Neurociencias  
Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología  
Dra. Rocío Salceda Sacanelles



**C.P. AGUSTÍN MERCADO**  
**DIRECTOR DE CERTIFICACIÓN Y CONTROL DOCUMENTAL**  
**ESCOLAR, UNAM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto, me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: "Caracterización de defectos metabólicos en *Drosophila melanogaster* por deficiencias en la señalización de la insulina", que presentó como requisito para la obtención de grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología) la alumna Jessica Paloma Alvarez Rendón con número de cuenta **517005950**.

Por lo anterior, en mi carácter de miembro del jurado revisor de la tesis emito mi voto aprobatorio para que el alumno pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente  
Ciudad de México, México, a 22 de enero de 2018

**Dra. Rocío Salceda Sacanelles**

Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, Instituto de Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México

**Dirección:**

Departamento de  
Neurodesarrollo y Fisiología  
Instituto de Fisiología Celular,  
UNAM  
Apdo. Postal 70-600  
04510 Ciudad de México

**Tel:**  
+52 (55) 5622-5669

**Fax:**  
+52 (55) 5622-5747

**E-mail:**  
rsalceda@ifc.unam.mx



**C.P. AGUSTÍN MERCADO**  
**DIRECTOR DE CERTIFICACIÓN Y CONTROL DOCUMENTAL**  
**ESCOLAR, UNAM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto, me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: "Caracterización de defectos metabólicos en *Drosophila melanogaster* por deficiencias en la señalización de la insulina", que presentó como requisito para la obtención de grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología) la alumna Jessica Paloma Alvarez Rendón con número de cuenta **517005950**.

Por lo anterior, en mi carácter de miembro del jurado revisor de la tesis emito mi **voto aprobatorio** para que el alumno pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente  
Juriquilla, Querétaro, a 22 de enero de 2019

**Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar**  
Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de  
Neurobiología  
Universidad Nacional Autónoma de México



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

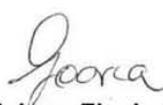
**C.P. AGUSTÍN MERCADO**  
**DIRECTOR DE CERTIFICACIÓN Y CONTROL DOCUMENTAL**  
**ESCOLAR, UNAM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto, me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: "Caracterización de defectos metabólicos en *Drosophila melanogaster* por deficiencias en la señalización de la insulina", que presentó como requisito para la obtención de grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología) la alumna **Jessica Paloma Álvarez Rendón** con número de cuenta **517005950**.

Por lo anterior, en mi carácter de miembro del jurado revisor de la tesis emito mi voto aprobatorio para que la alumna pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

**A t e n t a m e n t e**  
**Querétaro, Qro., a 29 de Enero de 2019**

  
**Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña**  
**Directora**





C.P. AGUSTÍN MERCADO  
Director de Certificación y Control Documental  
Escolar, UNAM  
PRESENTE

Por este conducto, me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: "Caracterización de defectos metabólicos en *Drosophila melanogaster* por deficiencias en la señalización de la insulina", que presentó como requisito para la obtención de grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología) la alumna Jessica Paloma Alvarez Rendón con número de cuenta **517005950**.

Por lo anterior, en mi carácter de miembro del jurado revisor de la tesis emito mi **voto aprobatorio** para que el alumno pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Campus UNAM Juriquilla, Querétaro, a 23 de enero de 2019

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo



**C.P. AGUSTÍN MERCADO**  
**DIRECTOR DE CERTIFICACIÓN Y CONTROL DOCUMENTAL**  
**ESCOLAR, UNAM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto, me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: "Caracterización de defectos metabólicos en *Drosophila melanogaster* por deficiencias en la señalización de la insulina", que presentó como requisito para la obtención de grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología) la alumna Jessica Paloma Alvarez Rendón con número de cuenta **517005950**.

Por lo anterior, en mi carácter de miembro del jurado revisor de la tesis emito mi **voto aprobatorio** para que el alumno pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

*"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"*

Campus UNAM Juriquilla, Querétaro a 29 de enero de 2019

---

Dr. Luis A. Tellez

A11. Neurobiología de la Conducta Motivada  
Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva  
Instituto de Neurobiología, UNAM  
Boulevard Juriquilla 3001  
Juriquilla, Queretaro, C.P. 76230. Mexico

## RESUMEN

La diabetes es una enfermedad crónica degenerativa no transmisible que se desarrolla como consecuencia de la falta de producción de insulina por el páncreas o por la ineficiencia en el uso de la misma en vertebrados. Las causas que dan origen a la diabetes son variadas, y representan una interacción entre factores genéticos y ambientales. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la evolución del padecimiento en un modelo genético, utilizando *Drosophila melanogaster*, por ser un organismo relativamente sencillo de manipular y la vía de la insulina está conservada evolutivamente. Usando cepas mutantes de la vía de la insulina se midieron: la cantidad de lípidos y carbohidratos normalizados por peso en diferentes etapas adultas, el nivel de actividad y la alimentación. Las mutantes de *InR* (el receptor de insulina) mostraron defectos más severos, particularmente en la cantidad de carbohidratos: mientras que las mutantes de *Pi3K92E* (la cinasa PI3K) mostraron defectos particularmente en los primeros días post-eclosión. Las mutantes de *S6k* (la cinasa S6) mostraron los niveles más altos de lípidos. Se observó además que las mutantes de *InR* tienen mayor actividad, y las mutantes de *S6k* menor actividad. Además, las hembras mutantes de *InR* mostraron resistencia a la hambruna. Las cepas mutantes estudiadas presentan la hiperlipidemia y la hiperglicemia comunes del estado diabético, y el estudio de estos parámetros a diferentes edades mostró que el fenotipo se exagera con la edad y afecta más a las hembras; los defectos en el metabolismo específicos que cada mutante presentó las hacen valiosos modelos para estudiar a fondo diferentes aspectos del estado diabético. El estado diabético también provocó contrastantes diferencias conductuales, particularmente en los niveles de actividad, señalando el efecto que la desregulación metabólica puede tener en el comportamiento del organismo.

## ABSTRACT

Diabetes is a chronic disease caused either by the lack of insulin production by the pancreas or the inefficient use of insulin in vertebrates. The causes that give rise to the disease are varied, and represent an interaction between genetic and environmental factors. This work characterizes the diabetic state and its progression in insulin signaling compromised flies. We used *Drosophila melanogaster* as a model system, as it has many advantages as an experimental organism, not least of which is an evolutionarily conserved insulin signaling pathway. We measured metabolic parameters in insulin pathway mutants and controls (lipids and sugars), plus activity levels, and amount of food ingested. Insulin receptor mutants, *InR*, show more severe defects, particularly in carbohydrate levels, whereas the phosphatidylinositol 3 kinase mutants, *Pi3K92E*, show defects particularly in the first post-eclosion days, and finally we measured the highest total lipids levels in S6 kinase mutants, *S6K*. The activity patterns are variously deregulated in the insulin pathway mutants: *InR* mutants have higher activity levels, whereas *S6k* mutants are less active. Lastly, *InR* mutant females show starvation resistance. The mutant strains studied present the hyperlipidemia and hyperglycemia common in the diabetic state, and the study of these parameters at different ages revealed the phenotype worsens with age and affects females more strongly; the specific defects observed in each mutant makes them valuable models for more in-depth studies about different aspects of the diabetic state. The diabetic flies also presented contrasting activity levels, highlighting the incidence of metabolic dysregulation in the behavior of flies.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por el apoyo económico recibido para la realización de este proyecto.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM y a los miembros del posgrado por su instrucción y guía constante.

A mi tutor principal, el Doctor Juan Rafael Riesgo Escovar por aceptarme como miembro de su laboratorio; el apoyo e impulso recibido ha sido inconmensurable, y el aprendizaje y experiencia bajo su tutela invaluable.

A los Doctores Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo y Luis Miguel Salgado Rodríguez, miembros del Comité Tutorial, por sus valiosas sugerencias y observaciones que me permitieron avanzar cada semestre con un enfoque ampliado y apelando a la reflexión.

A los Doctores Rocío Salceda Sacanelles, Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña y Luis Alberto Téllez Lima, miembros del Jurado del Examen de Grado, por sus valiosas comentarios y cuestionamientos que retroalimentaron la redacción y discusión de este trabajo.

Al técnico del laboratorio de Genética de Transducción de Señales, el Doctor Juan Manuel Murillo Maldonado, por su ayuda y sugerencias constructivas durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a todos los miembros del laboratorio por la solidaridad diaria, y los oídos atentos y sugerencias durante los encuentros de evaluación.

Agradezco a mi familia, por el respaldo incondicional y profuso que me dan.

| <b>ÍNDICE</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>1.INTRODUCCIÓN</b>   |               |
| 1.1.Vía de la insulina en <i>Drosophila</i>                                 | 1             |
| 1.1.1.El receptor de Insulina   | 3             |
| 1.1.2.La subunidad catalítica de PI3K: Pi3K92E                              | 3             |
| 1.1.3.La cinasa S6k   | 4             |
| 1.2.Diabetes y el estrés oxidativo  | 5             |
| 1.3.La vía antioxidante del Nrf2  | 6             |
| <b>2.ANTECEDENTES</b>   | 7             |
| <b>3.JUSTIFICACIÓN</b>  | 12            |
| <b>4.HIPÓTESIS</b>  | 12            |
| <b>5.OBJETIVOS</b>  | 12            |
| 5.1.Objetivos específicos   | 12            |
| <b>6.METODOLOGÍA</b>  |               |
| 6.1.Sujetos   | 13            |
| 6.2. Medición de parámetros metabólicos                                     | 14            |
| 6.2.1.Medición de la actividad y ritmo circadiano                           | 14            |
| 6.2.2.Medición de parámetros metabólicos                                    | 15            |
| 6.2.2.1.Medición de tasa metabólica   | 15            |
| 6.2.2.2.Determinación de lípidos  | 16            |
| 6.2.2.3.Determinación de carbohidratos                                      | 16            |
| 6.2.2.4.Medición de consumo de alimentos                                    | 17            |
| 6.2.2.5.Estadística   | 17            |
| <b>7.RESULTADOS</b>   |               |
| 7.1. Cepas mutantes de <i>InR</i> , <i>Pi3K92E</i> y <i>S6k</i>             | 18            |
| 7.1.1. Ritmo circadiano y actividad de mutantes de la<br>vía de la insulina | 18            |
| 7.1.2. Medición de la tasa metabólica                                       | 23            |
| 7.1.3. Medición del peso corporal   | 24            |
| 7.1.4. Lípidos normalizados por miligramo de peso                           | 26            |
| 7.1.5. Carbohidratos normalizados por miligramo de peso                     | 29            |
| 7.1.6. Consumo de alimento  | 31            |
| <b>8.DISCUSIÓN</b>  | 37            |
| <b>9.CONCLUSIONES</b>   | 44            |
| <b>10.LITERATURA CITADA</b>   | 45            |
| <b>APÉNDICE A</b>   | 53            |
| <b>APÉNDICE B</b>   | 64            |
| <b>APÉNDICE C</b>   | 73            |

| <b>FIGURAS</b>   | Página    |
|--|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Esquema general de la vía de la insulina.   | <b>2</b>  |
| <b>Figura 2.</b> Efecto del aumento de las ROS en el metabolismo energético.                               | <b>5</b>  |
| <b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de la vía de Nrf2.  | <b>7</b>  |
| <b>Figura 4:</b> Sistema DAM2.   | <b>15</b> |
| <b>figura 5.</b> Respirómetro.   | <b>15</b> |
| <b>Figura 6.</b> FlyPAD.   | <b>17</b> |
| <b>Figura 7.</b> Actogramas representativos de los diferentes genotipos estudiados.                        | <b>18</b> |
| <b>Figura 8.</b> Ciclo de actividad de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de <i>Pi3K92E</i> .  | <b>19</b> |
| <b>Figura 9.</b> Ciclo de actividad de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de <i>InR</i> .      | <b>19</b> |
| <b>Figura 10.</b> Ciclo de actividad de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de <i>InR</i> .     | <b>20</b> |
| <b>Figura 11.</b> Tiempo de descanso de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de <i>InR</i> .     | <b>20</b> |
| <b>Figura 12.</b> Tiempo de descanso de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de <i>Pi3K92E</i> . | <b>21</b> |
| <b>Figura 13.</b> Tiempo de descanso de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de <i>S6k</i> .     | <b>21</b> |
| <b>Figura 14.</b> Actividad por día de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de <i>InR</i> .      | <b>22</b> |
| <b>Figura 15.</b> Actividad por día de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de <i>Pi3K92E</i> .  | <b>22</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 16.</b> Actividad por día de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de <i>S6k</i> .                                   | <b>22</b> |
| <b>Figura 17.</b> Tasa metabólica de machos y hembras vírgenes de 7 días de edad.   | <b>23</b> |
| <b>Figura 18.</b> Tasa metabólica de machos y hembras vírgenes de 7 días de edad.   | <b>23</b> |
| <b>Figura 19.</b> Tasa metabólica de machos y hembras vírgenes de 7 días de edad.   | <b>24</b> |
| <b>Figura 20.</b> Peso de machos y hembras de 1,10,20 y 30 días post-eclosión de <i>InR</i> .   | <b>25</b> |
| <b>Figura 21.</b> Peso de machos y hembras de 1,10,20 y 30 días post-eclosión de <i>Pi3K92E</i> .                                       | <b>25</b> |
| <b>Figura 22.</b> Peso de machos y hembras de 1,10,20 y 30 días post-eclosión de <i>S6k</i> .   | <b>26</b> |
| <b>Figura 23.</b> Cantidad de lípidos por mg de peso en machos y hembras de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión de <i>InR</i> .           | <b>27</b> |
| <b>Figura 24.</b> Cantidad de lípidos por mg de peso en machos y hembras de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión de <i>Pi3K92E</i> .       | <b>28</b> |
| <b>Figura 25.</b> Cantidad de lípidos por mg de peso en machos y hembras de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión de <i>S6k</i> .           | <b>28</b> |
| <b>Figura 26.</b> Cantidad de carbohidratos por mg de peso en machos y hembras de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión de <i>InR</i> .     | <b>29</b> |
| <b>Figura 27.</b> Cantidad de carbohidratos por mg de peso en machos y hembras de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión de <i>Pi3K92E</i> . | <b>30</b> |
| <b>Figura 28.</b> Cantidad de carbohidratos por mg de peso en machos y hembras de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión de <i>S6k</i> .     | <b>30</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 29.</b> Sorbos totales por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión.                                       | <b>32</b> |
| <b>Figura 30.</b> Número de ráfagas de actividad por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión.                       | <b>33</b> |
| <b>Figura 31.</b> Duración de ráfagas de actividad por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión.                     | <b>33</b> |
| <b>Figura 32.</b> Número de ráfagas de alimentación por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión.                    | <b>33</b> |
| <b>Figura 33.</b> Duración de ráfagas de alimentación por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión.                  | <b>34</b> |
| <b>Figura 34.</b> Duración de intervalos entre ráfagas de actividad por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión.    | <b>34</b> |
| <b>Figura 35.</b> Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión. | <b>34</b> |
| <b>Figura 36.</b> Peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .                                  | <b>53</b> |
| <b>Figura 37.</b> Niveles de carbohidratos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .              | <b>55</b> |
| <b>Figura 38.</b> Niveles de lípidos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .                    | <b>55</b> |
| <b>Figura 39.</b> Tasa metabólica promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .              | <b>56</b> |
| <b>Figura 40.</b> Actividad promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .                    | <b>57</b> |
| <b>Figura 41.</b> Descanso promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .                     | <b>57</b> |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 42.</b> Actividad por día para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .  | 57 |
| <b>Figura 43.</b> Número de sorbos por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .  | 59 |
| <b>Figura 44.</b> Sorbos por ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .  | 59 |
| <b>Figura 45.</b> Número de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .  | 59 |
| <b>Figura 46.</b> Duración de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .  | 60 |
| <b>Figura 47.</b> Número de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .   | 60 |
| <b>Figura 48.</b> Duración de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .   | 60 |
| <b>Figura 49.</b> Duración de intervalos entre ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .                           | 61 |
| <b>Figura 50.</b> Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .                        | 61 |
| <b>Figura 51.</b> Comportamiento de alimentación para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> . Alimento: Levadura al 10%, piloncillo al 10% en agar al 1%. | 62 |
| <b>Figura 52.</b> Comportamiento de alimentación para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> . Alimento: Levadura al 10%, piloncillo al 10% en agar al 1%. | 63 |
| <b>Figura 53.</b> Peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .   | 64 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 54.</b> Niveles de carbohidratos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .                          | 66 |
| <b>Figura 55.</b> Niveles de lípidos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .                                | 66 |
| <b>Figura 56.</b> Tasa metabólica promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .                          | 67 |
| <b>Figura 57.</b> Actividad promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .                                | 68 |
| <b>Figura 58.</b> Descanso promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .                                 | 68 |
| <b>Figura 59.</b> Actividad por día para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .                                 | 68 |
| <b>Figura 60.</b> Número de sorbos por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .                   | 70 |
| <b>Figura 61.</b> Sorbos por ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> . | 70 |
| <b>Figura 62.</b> Número de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .     | 70 |
| <b>Figura 63.</b> Duración de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .   | 71 |
| <b>Figura 64.</b> Número de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .  | 71 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 65.</b> Duración de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>PI3K92E</i> .  | 71 |
| <b>Figura 66.</b> Duración de intervalos entre ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>PI3K92E</i> .  | 72 |
| <b>Figura 67.</b> Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>PI3K92E</i> . El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control <i>yw</i> . | 72 |
| <b>Figura 68.</b> Peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .  | 73 |
| <b>Figura 69.</b> Niveles de carbohidratos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .  | 75 |
| <b>Figura 70.</b> Niveles de lípidos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .  | 75 |
| <b>Figura 71.</b> Tasa metabólica promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>PI3K92E</i> .  | 76 |
| <b>Figura 72.</b> Actividad promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .  | 77 |
| <b>Figura 73.</b> Descanso promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .   | 77 |
| <b>Figura 74.</b> Actividad por día para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .   | 77 |
| <b>Figura 75.</b> Número de sorbos por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .   | 79 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 76.</b> Sorbos por ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .  | 79 |
| <b>Figura 77.</b> Número de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .  | 79 |
| <b>Figura 78.</b> Duración de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .  | 80 |
| <b>Figura 79.</b> Número de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .   | 80 |
| <b>Figura 80.</b> Duración de ráfagas de alimentaci3n por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .   | 80 |
| <b>Figura 81.</b> Duraci3n de intervalos entre ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .                           | 81 |
| <b>Figura 82.</b> Duraci3n de intervalos entre ráfagas de alimentaci3n por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .                    | 81 |
| <b>Figura 83.</b> Comportamiento de alimentaci3n para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> . Alimento: Levadura al 10%, piloncillo al 10% en agar al 1%. | 82 |
| <b>Figura 84.</b> Comportamiento de alimentaci3n para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> . Alimento: Levadura al 10%, piloncillo al 10% en agar al 1%. | 83 |

## TABLAS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Tabla 1.</b> Cepas mutantes para la vía de la insulina.   | 13     |
| <b>Tabla 2.</b> Cepas con marcadores y mutaciones para la vía de Nrf2 y la vía de la insulina.                                   | 14     |
| <b>Tabla 3.</b> Resumen de tasa metabólica promedio ( $\pm$ SEM) y medianas en hembras y machos.                                 | 24     |
| <b>Tabla 4.</b> Resumen de pesos promedios ( $\pm$ SEM) y medianas de lípidos y carbohidratos en hembras y machos.               | 31     |
| <b>Tabla 5.</b> Resumen de parámetros de comportamiento alimenticio (medianas) en hembras y machos.                              | 35     |
| <b>Tabla 6.</b> Peso promedio $\pm$ SEM para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .                      | 53     |
| <b>Tabla 7.</b> Peso promedio $\pm$ SEM para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .                     | 53     |
| <b>Tabla 8.</b> Medianas de niveles de carbohidratos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .         | 54     |
| <b>Tabla 9.</b> Medianas de niveles de carbohidratos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .        | 54     |
| <b>Tabla 10.</b> Medianas de niveles de lípidos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .              | 54     |
| <b>Tabla 11.</b> Medianas de niveles de lípidos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> .             | 54     |
| <b>Tabla 12.</b> Parámetros de actividad para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> (promedio $\pm$ SEM). | 56     |
| <b>Tabla 13.</b> Parámetros de actividad para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> (promedio $\pm$ SEM) | 56     |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 14.</b> Parámetros de alimentación para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> (medianas).             | <b>58</b> |
| <b>Tabla 15.</b> Parámetros de alimentación para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>InR</i> (medianas).            | <b>58</b> |
| <b>Tabla 16.</b> Peso promedio $\pm$ SEM para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .                      | <b>64</b> |
| <b>Tabla 17.</b> Peso promedio $\pm$ SEM para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .                     | <b>64</b> |
| <b>Tabla 18.</b> Medianas de niveles de carbohidratos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .         | <b>65</b> |
| <b>Tabla 19.</b> Medianas de niveles de carbohidratos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .        | <b>65</b> |
| <b>Tabla 20.</b> Medianas de niveles de lípidos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .               | <b>65</b> |
| <b>Tabla 21.</b> Medianas de niveles de lípidos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> .              | <b>65</b> |
| <b>Tabla 22.</b> Parámetros de actividad para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> (promedio $\pm$ SEM).  | <b>67</b> |
| <b>Tabla 23.</b> Parámetros de actividad para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> (promedio $\pm$ SEM). | <b>67</b> |
| <b>Tabla 24.</b> Parámetros de alimentación para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> (medianas).         | <b>69</b> |
| <b>Tabla 25.</b> Parámetros de alimentación para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>Pi3K92E</i> (medianas).        | <b>69</b> |
| <b>Tabla 26.</b> Peso promedio $\pm$ SEM para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .                          | <b>73</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 27.</b> Peso promedio $\pm$ SEM para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .                     | <b>73</b> |
| <b>Tabla 28.</b> Medianas de niveles de carbohidratos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .         | <b>74</b> |
| <b>Tabla 29.</b> Medianas de niveles de carbohidratos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .        | <b>74</b> |
| <b>Tabla 30.</b> Medianas de niveles de lípidos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .               | <b>74</b> |
| <b>Tabla 31.</b> Medianas de niveles de lípidos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> .              | <b>74</b> |
| <b>Tabla 32.</b> Parámetros de actividad para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> (promedio $\pm$ SEM).  | <b>76</b> |
| <b>Tabla 33.</b> Parámetros de actividad para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> (promedio $\pm$ SEM). | <b>76</b> |
| <b>Tabla 34.</b> Parámetros de alimentación para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> (medianas).         | <b>78</b> |
| <b>Tabla 35.</b> Parámetros de alimentación para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de <i>S6k</i> (medianas).        | <b>78</b> |

## SIGLAS Y ABREVIACIONES

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>3DG-3</b>          | Deoxiglucosa  |
| <b>4E-BP</b>          | Proteína de unión 1 al factor de inicio de la traducción eucariótico 4. |
| <b>μl</b>             | Microlitro  |
| <b>AKT</b>            | Proteína cinasa B   |
| <b>ARE</b>            | Elemento de respuesta antioxidante                                      |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | Dióxido de carbono  |
| <b>CnCC</b>           | <i>Cap'n'Collar C</i> , homólogo de Nrf2 en <i>Drosophila</i>           |
| <b>DAG</b>            | Diacilgliceraldehído  |
| <b>DHAP</b>           | Dihidroxiacetona fosfato  |
| <b>Dp110</b>          | Subunidad catalítica de la PI3K   |
| <b>dS6K</b>           | Cinasa de la proteína ribosomal S6                                      |
| <b>F-6-P</b>          | Fructosa 6 fosfato  |
| <b>F-(1,6)-P2</b>     | Fructosa 1,6 difosfato  |
| <b>FOXO</b>           | Factor de transcripción de la clase Forkhead.                           |
| <b>G-1-P</b>          | Glucosa 1 fosfato   |
| <b>G-6-P</b>          | Glucosa 6 fosfato   |
| <b>GFA</b>            | Glutamina:fructosa 6 fosfato amidotransferasa                           |
| <b>GFP</b>            | Proteína verde fluorescente   |
| <b>Gln</b>            | Glucosamina   |

|   |  |
|---|--|
| <b>GlcNAc</b>                                   | N-acetil glucosamina   |
| <b>GSK3</b>                                     | Glucógeno sintetasa cinasa 3.  |
| <b>GWAS</b>                                     | Estudio de asociación del genoma completo  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>               | Peróxido de hidrógeno  |
| <b>IKK</b>                                      | <b>Cinasa de IK<math>\beta</math></b>  |
| <b>ILP</b>                                      | Péptido parecido a la insulina (ILP, por sus siglas en inglés)                                     |
| <b>iNOS</b>                                     | Óxido nítrico sintasa  |
| <b>IPC</b>                                      | Célula productora de insulina  |
| <b>IRS</b>                                      | Sustrato del InR.  |
| <b>JNK</b>                                      | Cinasas c-Jun N-terminal   |
| <b>Keap1</b>                                    | Proteína Asociada a ECH parecida a Kelch   |
| <b>Maf/Maf-S</b>                                | Fibrosarcoma musculo-aponeurótico  |
| <b>MG</b>                                       | Metilglioxal   |
| <b>NF-<math>\kappa</math><math>\beta</math></b> | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células<br>$\beta$ <b>activadas</b> |
| <b>NADPH</b>                                    | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida   |
| <b>Nrf2</b>                                     | Factor relacionado a <i>NF-E2</i>  |
| <b>PDK1</b>                                     | Cinasa dependiente de PIP3   |
| <b>PI3K</b>                                     | Fosfatidilinositol 3 cinasa  |
| <b>PIP2</b>                                     | Fosfatidilinositol bifosfato   |

|               |   |
|---------------|---|
| <b>PIP3</b>   | Fosfatidilinositol trifosfato                               |
| <b>PKC</b>    | Proteína cinasa C   |
| <b>PTEN</b>   | Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa            |
| <b>RHEB</b>   | Homólogo de GTPasa enriquecido en el cerebro                |
| <b>ROS</b>    | Especies reactivas de oxígeno                               |
| <b>S6K</b>    | Cinasa de proteína ribosomal S6                             |
| <b>SEM</b>    | Error estándar de la media                                  |
| <b>SREBP</b>  | Proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides |
| <b>TOR</b>    | Diana de la rapamicina                                      |
| <b>TOR-C1</b> | Diana del complejo de rapamicina 1                          |
| <b>TOR-C2</b> | Diana del complejo de rapamicina 2                          |
| <b>TSC1/2</b> | Proteínas de esclerosis tuberosa 1 y 2.                     |

## 1. INTRODUCCIÓN

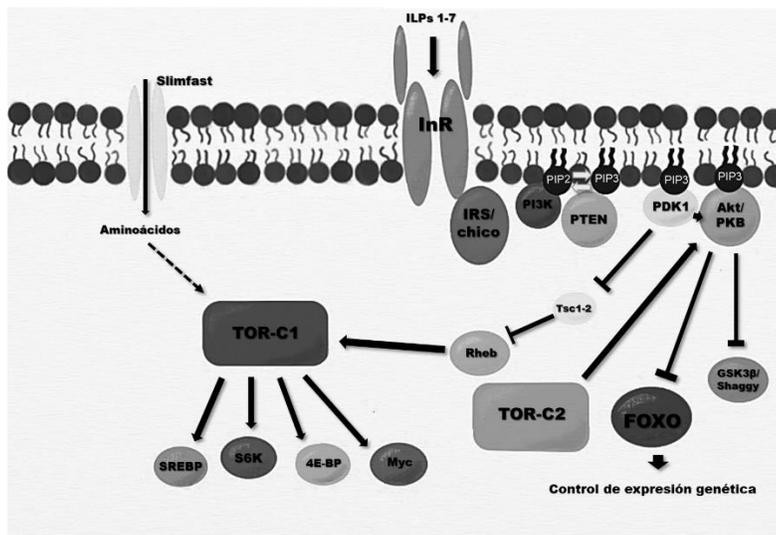
Se estima que más de 442 millones de personas padecen diabetes a nivel mundial (1). La diabetes representó en México la primera causa de muerte en 2015 (2). Se suele caracterizar a la diabetes tipo I como aquella donde se presenta una deficiencia en la síntesis de la insulina, la hormona peptídica encargada de la regulación del balance energético, principalmente mediante la absorción de glucosa y su almacenamiento. La diabetes tipo II es caracterizada por la deficiencia en el uso de la insulina, creando un estado “resistente” a la insulina en el organismo.

Influenciada por factores genéticos y ambientales, la diabetes tiene una serie de consecuencias en la calidad de vida del enfermo tanto a corto plazo como a largo plazo. La vía de señalización de la insulina, así como sus consecuencias fisiológicas, se encuentran ampliamente conservadas entre organismos. La *Drosophila melanogaster* también regula los niveles de azúcares circulantes en relación con las condiciones nutrimentales y de actividad del organismo, aunque una diferencia importante con los vertebrados es que en *Drosophila* la glucosa se convierte mayoritariamente en trehalosa (un azúcar no reductor), que es la principal forma circulante (3), además de la glucosa.

### 1.1. Vía de la insulina en *Drosophila*

La vía inicia con la unión de un péptido parecido a la insulina (ILP, por sus siglas en inglés) al receptor de la insulina, InR, el cual se autofosforila y recluta entonces IRSs (sustratos del receptor de insulina), que a su vez permiten el reclutamiento de la enzima fosfatidil inositol tres fosfato, PI3K, a la membrana. Existen 8 ILPs descritos en *Drosophila*, de los cuales siete tienen funciones parcialmente redundantes y regulan la longevidad, el metabolismo, la reproducción y la proliferación celular. De estos ILPs, el ILP2 posee mayor homología con la insulina de los mamíferos. (4) Como se menciona arriba, el InR de *Drosophila* se une a proteínas almacén llamadas colectivamente sustratos del receptor de insulina (IRSs). Los IRSs descritos en *Drosophila* son Chico y parcialmente Lnk; los mamíferos presentan una variedad mayor de IRSs.

La PI3K es una cinasa que consiste de una subunidad catalítica, Pi3K92E en la mosca, y una subunidad adaptadora, p60. La actividad de la PI3K produce fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). La fosfatasa PTEN tiene el papel opuesto y desfosforila al PIP3. Cuando se acumula PIP3 se reclutan y activan las cinasas PDK1 y Akt. La cinasa Akt actúa en una gran variedad de dianas, entre las cuales se encuentran el factor de transcripción de tipo *forkhead* FOXO (FKH) y la proteína Tsc2 (o *tuberous sclerosis complex 2*, por sus siglas en inglés), a los cuales inhibe. FOXO regula a más de 2000 genes en el núcleo; si es fosforilado se retiene en el citoplasma. Tsc2 inhibe a Rheb, una GTPasa que activa a TOR-C1, por lo que la inhibición de Tsc2 lleva a la activación de TOR-C1. TOR-C1 también responde a los niveles de aminoácidos en la células, activándose en su presencia. La activación de TOR-C1 conlleva a la activación del anabolismo, por ejemplo, mediante la activación de S6K, una cinasa conocida por fosforilar a la proteína S6 de la subunidad ribosomal 40S, aunque tiene otros sustratos involucrados en el inicio y procesividad de la traducción (5). En la **figura 1** se muestran los principales componentes de la vía de Insulina.



**Figura 1.** Esquema general de la vía de la insulina. **IRS:** Sustrato del InR. **PI3K:** Fosfatidilinositol 3 cinasa. **PIP2:** Fosfatidilinositol bifosfato. **PIP3:** Fosfatidilinositol trifosfato. **PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa **PDK1:** cinasa dependiente de PIP3

**AKT:** Proteína cinasa B **TSC1/2:** Proteínas de esclerosis tuberosa 1 y 2 **RHEB:** Homólogo de GTPasa enriquecido en el cerebro **TOR:** Blanco de la rapamicina. **FOXO:** Factor de transcripción de la clase Forkhead. **GSK3:** Glucógeno sintetasa cinasa 3. **S6K:** Cinasa de proteína ribosomal S6. **SREBP:** *proteína* de unión al elemento de respuesta a los esteroides. **4E-BP:** proteína de unión 1 al factor de inicio de la traducción eucariótico 4. **Myc:** el protooncogen *myc*.

### 1.1.1. El receptor de la insulina

El receptor de la insulina pertenece a la familia de proteín-cinasas de tirosinas. La estructura del InR comparte muchas similitudes con el receptor de la insulina de los mamíferos (Inr) y con el receptor del IGF1 (IGF1R), siendo un tetrámero compuesto por dos subunidades que unen al ligando y a dos subunidades transmembranales que contienen los dominios citoplásmicos de cinasa de tirosina. Una diferencia importante es que InR presenta una extensión de 400 aminoácidos C-terminales en comparación con el de los mamíferos, lo que le permite unirse a PI3K aún en ausencia de IRS, o Chico, el homólogo IRS1-4 (6).

En la *Drosophila*, el gen que codifica para el *InR* se encuentra en el tercer cromosoma, y las mutantes homocigotas para el mismo suelen ser letales, mientras que los heterocigotos o combinaciones heteroalélicas estudiadas suelen presentar retrasos en el desarrollo. En diferentes combinaciones heteroalélicas del *InR* se ha observado un menor número celular (6, 7). El alelo mutante *InR<sup>EL9</sup>*, que representa una mutación hipomórfica inducida químicamente, es un alelo viable en homocigosis, aunque las moscas viven menos (8), muestran defectos de reproducción (9), y tienen menor peso y tamaño (6).

Se ha observado que mutantes heteroalélicas que presentan *InR<sup>EL9</sup>* y el alelo mutante *InR<sup>3t5</sup>* exhiben un peso reducido y un incremento en el nivel de carbohidratos y lípidos en hembras de dos días post-eclosión (10).

### 1.1.2. La subunidad catalítica de PI3K: Pi3K92E

Pi3K92E es homólogo a las PI3K de mamíferos p110alfa y p110beta, y se divide en dominios con diferentes funciones predichas. Las regiones más conservadas, que se encuentran en el C-terminal, son el núcleo catalítico y el dominio PI. El extremo N contiene regiones que se sabe que son necesarias y suficientes para que p110alpha de mamífero se asocie con la subunidad reguladora p85 (11). El gen que codifica para *Pi3K92E*, al igual que el de *InR*, se encuentra en el cromosoma 3. El alelo *Dp110<sup>A</sup>* es una deleción en el extremo 3' de la región codificante. Las moscas heterocigotas con este alelo exhiben un fenotipo donde la proporción de individuos en diapausa es mayor que en las moscas silvestres (12) y se observa autofagia inducida en el cuerpo graso incluso en condiciones de no inanición (13). Las hembras adultas mutantes que presentan este alelo en combinaciones con *Dp110<sup>5w3</sup>* tienen un peso corporal reducido, y el contenido de lípidos y carbohidratos está aumentado en comparación con los controles a los dos días post-eclosión(11). Las moscas adultas mutantes homocigotas de *Dp110<sup>5w3</sup>* tienen un peso corporal reducido en comparación con los heterocigotos. El contenido de lípidos y carbohidratos no difiere a los dos días post-eclosión respecto al control (11).

### 1.1.3. La cinasa S6k

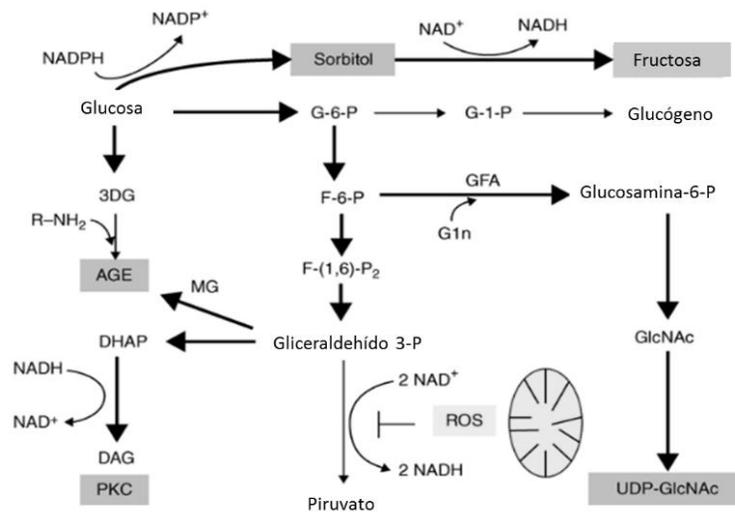
El alelo mutante *S6k<sup>L-1</sup>* de este gen, que también está localizado en el cromosoma 3, presenta una deleción en el extremo 5' de la región codificante. Se reportaron defectos de autofagia en las células del cuerpo graso larvario (14). Las larvas homocigóticas reducen su tamaño (15) y los pocos homocigotos que llegan a adultos emergen después de un retraso de 5 días y viven no más de dos semanas. Además, presentan una reducción severa en el tamaño del cuerpo adulto (16). El alelo *S6k<sup>P1713</sup>* tiene una inserción de un transpón en el gen, y las moscas hembras adultas heteroalélicas con estos dos alelos mutantes tienen un peso corporal reducido en comparación con los controles heterocigotos, y el contenido de lípidos se incrementa en comparación con los controles, mientras que el contenido de carbohidratos no difiere, a los dos días después de salir del pupario (11).

## 1.2. Diabetes y el estrés oxidativo

Si bien la generación de especies reactivas de oxígeno puede ser beneficiosa para el organismo bajo ciertas circunstancias (por ejemplo, en células fagocíticas), un desequilibrio en la generación de ROS puede llevar a daño celular (17).

En vertebrados, la ingesta excesiva de glucosa y macronutrientes puede llevar a la hiperglucemia y al aumento de ácidos grasos circulantes; en el primer caso, el estado hiperglucémico puede aumentar el número de especies reactivas de oxígeno que causan daño celular mediante la oxidación de biomoléculas y la interferencia con vías celulares de señalización (18), por ejemplo activando cinasas que pueden interferir con la vía de la insulina (19).

Se han propuesto varios mecanismos por los cuales la hiperglucemia aumenta el estrés oxidativo (20). La **figura 2** muestra cómo la producción excesiva de superóxido por la mitocondria inactiva a la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, provocando la acumulación de metabolitos anteriores a este punto de la glucólisis. Estos metabolitos entonces se procesan por otras vías.



**Figura 2.** La hiperglucemia puede generar un aumento de las especies reactivas de oxígeno que afectan el metabolismo del organismo. **G-6-P:** Glucosa 6 fosfato, **G-1-P:** Glucosa 1 fosfato, **3DG:** 3 deoxiglucosa, **MG:** Metilglioxal, **DAG:** Diacilglicerinaldehído, **PKC:** Proteína cinasa C, **F-6-P:** Fructosa 6 fosfato, **F-(1,6)-P<sub>2</sub>:** Fructosa 1,6 difosfato, **GFA:**

Glutamina:fructosa 6 fosfato amidotransferasa, **Gln**: Glucosamina, **DHAP**: Dihidroxiacetona fosfato, **GlcNAc**: N-acetil glucosamina, **ROS**: Especies reactivas de oxígeno. Tomado de (21).

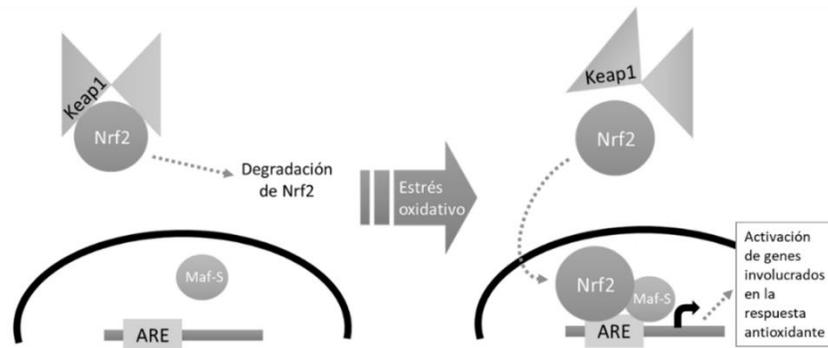
En un segundo caso, el aumento de ácidos grasos puede provocar el aumento de señalización en las vías pro-inflamatorias (vías NF-KB/IKK13/iNOS), donde la actividad excesiva de las citosinas y los ácidos grasos estimula también procesos de fosforilación que modifican la señalización de vías como la de la insulina (22). Dado que la vía de la insulina ejerce normalmente un efecto antiinflamatorio, esto sólo refuerza el estado inflamatorio; a largo plazo se provoca además la sobresaturación de la actividad beta oxidante de la mitocondria aumentando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por tanto el estrés oxidativo.

Cabe destacar que en vertebrados también se afectan los niveles de glutatión (23,24). Esta interconexión entre el estado inflamatorio, el estrés oxidativo y la vía de la insulina no es sorprendente dado que el sistema inmune está relacionado con el sistema metabólico y la respuesta antioxidante, así como la pro-inflamatoria que defienden al organismo. Estas respuestas requieren de una redistribución energética (25). Debido a la variedad de mecanismos que participan en la diabetes, es difícil dilucidar la contribución de cada uno. En vertebrados las diferencias entre individuos: genéticas, nutricionales, de actividad, etc., se añaden a la dificultad en esclarecer el papel de los diferentes procesos involucrados (26).

### **1.3. La vía antioxidante del Nrf2**

El sistema de señalización de Keap1/Nrf2 (**figura 3**) participa en la respuesta antioxidante del organismo, regulando la síntesis de antioxidantes como el glutatión y el NADPH. El Nrf2 (*NF-E2-Related Factor 2*, un factor de transcripción de la subfamilia *cap'n'collar* de cremalleras de leucina) suele encontrarse en el citoplasma unido al complejo de Keap1 (*Kelch-like ECH-Associated Protein 1*, familia de proteínas que se unen a actina), lo que permite que el complejo de ubiquitin-ligasa Cul3 interactúe con Nrf2 para permitir su ubiquitinación y subsecuente degradación en el proteasoma. Cuando la célula se expone a un estrés oxidante o a xenobióticos

electrofílicos se dispara la liberación de Nrf2, mediante la modificación de residuos de cisteína del complejo de Keap1 por las sustancias oxidantes, lo que desestabiliza la interacción entre Nrf2 y Keap1. Nrf2 se transloca al núcleo donde junto con el co-factor Maf (*Musculo-Aponeurotic Fibrosarcoma*) se une a las regiones ARE (*antioxidant response element*) del ADN, regulando positivamente la transcripción de genes de efecto neto antioxidante (27,28). La vía está evolutivamente conservada y en *Drosophila* los homólogos de Nrf2, Keap1 y Maf son *CncC*, *dKeap1* y *maf-S*, respectivamente (29). La conservación evolutiva de esta vía entre diferentes organismos se explica por la necesidad de regular el gasto de energía metabólica en relación con la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de estrés que se puedan afrontar.



**Figura 3.** Mecanismo de acción de la vía de Nrf2.

## 2. ANTECEDENTES

Para estudiar la señalización de la insulina, y específicamente el estado diabético en *Drosophila*, se han comparado cepas o poblaciones con diferentes metabolismos, o se han inducido defectos en la señalización de la vía de la insulina mediante modificaciones a la dieta y generación de mutantes hipomorfos o nulas de genes pertenecientes a la vía. Los estudios en los que se realizan manipulaciones a la dieta a menudo pueden encontrar resultados diferentes por estar sujetas a variaciones ambientales, de sexo, genotipo, etc. que afectan la penetrancia del fenotipo. Y si bien estos estudios demuestran que cambios en la dieta tienen efectos

claros en el organismo, la falta de una causalidad clara entre la composición de la dieta y el consumo total de las moscas también ha sido una limitante de este enfoque.

### *Dietas*

Cuando se provee a *Drosophila* de una dieta modificada, con aumento o disminución de nutrientes, se ha observado la desregulación del metabolismo y de la señalización de insulina. Las dietas ricas en azúcar, así como las dietas ricas en proteínas, incrementan la expresión de péptidos parecidos a la insulina (ILPs) (33,34). Este aumento inicial en la expresión de los ILPs es consistente con lo que se observa en vertebrados, donde el organismo trata inicialmente de aumentar su producción de insulina para compensar la resistencia, aunque en vertebrados el eventual deterioro de las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas conlleva al fallo de esta compensación inicial. De igual manera, el cuerpo graso en moscas sobrealimentadas disminuye su respuesta a la insulina con la edad y se vuelven resistentes a edad avanzada (35).

Morris *et al.* (2012) controlaron la cantidad de azúcares (sacarosa) o levadura (si bien la levadura provee diferentes nutrientes a la mosca, a menudo se considera que las variaciones que provoca en el fenotipo del organismo se deben principalmente al nivel de proteínas que provee) (35), observando que una dieta moderadamente alta en sacarosa provoca un aumento en peso constante con la edad, pero dietas más ricas en sacarosa provocan el efecto contrario, una pérdida de peso. Se ha observado que la cantidad de lípidos presentes en el cuerpo de moscas hembra presenta poca correlación con el número de puestas de las mismas, siendo los niveles de aminoácidos en la dieta los más importantes para definir el número de puestas (36).

Si bien el uso de dietas altas en azúcares o altas en levaduras han permitido una descripción de los efectos de ambos nutrientes en la mosca; en el estudio del efecto que las modificaciones a la dieta tienen en la longevidad del organismo ha sido de especial importancia la observación de que es el balance entre proteínas y

carbohidratos lo que determina la extensión de vida, siendo las dietas altas en carbohidratos y bajas en proteínas las que propician una mayor longevidad (aunque un exceso de carbohidratos pueden llevar al fenotipo contrario, reduciendo la longevidad de la mosca), acompañada a menudo de una menor fecundidad (37, 38, 39). Los estudios que modifiquen las dietas deben procurar que éstas estén bien definidas químicamente, además de que se debe medir el consumo total, ya que las moscas tienen acceso libre a su fuente de alimento y son capaces de regular su ingesta calórica, al menos en el caso de *D. melanogaster*.

Además, se han realizado comparaciones con otros miembros del género *Drosophila*; entre las especies con que se puede trabajar están otros comensales como *D. simulans*, donde se ha estudiado la tasa metabólica, la longevidad y la resistencia al estrés (40).

#### Mutantes para la vía de la insulina

Otro enfoque para el estudio del estado diabético ha sido mediante manipulaciones que afecten la vía de la insulina, que pueden ir desde la ablación de las células productoras de insulina (IPCs) (41), encargadas de la producción de los péptidos parecidos a la insulina (ILPs), hasta mutaciones en genes involucrados en puntos específicos de la vía. En el primer caso, se les puede utilizar como modelos de diabetes tipo I. Las mutaciones que afecten la cascada de señalización en otros puntos son consideradas modelos de diabetes tipo II. En este caso es importante hacer la distinción entre las mutaciones dirigidas a un solo tipo celular y las mutaciones que afectan a todo el organismo, ya que se ha demostrado que los efectos pueden variar.

Las mutaciones de falta de función para un ILP en particular suelen tener efectos moderados, y a menudo es necesario la pérdida de más de uno para generar letalidad. Esto evidencia la redundancia que existe entre estos ILPs (42). Por el contrario, las mutaciones en *InR*, *chico* (sustrato del receptor de insulina), y varios componentes aguas río abajo de la vía suelen ser letales si son homocigotas, por lo que a menudo se usan moscas heterocigotas o heteroalélicas; éstas segundas

tienen el beneficio de permitir adjudicar más robustamente los defectos observados al gen estudiado.

Entre los fenotipos más comunes provocados por mutantes en la vía de la insulina se observa la disminución de la fertilidad y de la talla del individuo, cambios en la longevidad (una disminución en condiciones normales, a menudo un aumento de longevidad cuando existe restricción calórica), un aumento de triacilglicéridos, con defectos en la morfología del cuerpo graso, y un mayor número de azúcares circulantes en la hemolinfa (5, 41, 43, 44)

Dado que TOR participa en la regulación del crecimiento, la autofagia, la supervivencia celular, y el anabolismo (regulando la homeostasis de lípidos y carbohidratos), la falta de nutrientes o ATP impiden su función, y la sobrealimentación puede llevar a la pérdida de balance: TOR participa en la acumulación de lípidos, por lo que una ingesta excesiva de nutrientes puede llevar a su hiperactivación y la acumulación de lípidos y glucógeno. TOR no sólo es regulado por la señalización de la insulina, sino por la cantidad de aminoácidos presentes, y en vertebrados se ha observado que aún cuando existe resistencia a la insulina TOR puede permanecer activo si la cantidad de nutrientes consumidos se mantiene (45), lo que empeora el fenotipo.

Cuando se han comparado diferentes cepas con defectos en la vía de la insulina, a menudo las líneas que se comparan se han seleccionado basándose en la longevidad de las mismas. Las líneas con defectos en la señalización de la vía de la insulina suelen ser longevas, y Hoffman *et al.* (2014) comprobaron que los metabolitos que declinan con la edad están asociados a la glicólisis y al metabolismo de glicofosfolípidos; también observaron cambios en las aminos biogénicas asociadas con la edad y el sexo, y cambios asociados al ciclo de Krebs.

También influencia al fenotipo la respuesta sistémica ante el estrés. La activación de Toll en el cuerpo graso lleva a la inducción de la inmunidad y la redistribución de recursos (46). El factor de transcripción FOXO regula genes de respuesta al estrés

y de control metabólico, y es regulado negativamente por la señalización de la insulina; esta última lleva al bloqueo de la gluconeogénesis, la glucogenólisis y el uso de lípidos de almacén para el catabolismo. Se ha observado que una menor señalización de la insulina y mayor actividad de FOXO puede incrementar la longevidad, si esta expresión aumentada se da en tejido adiposo o intestino. En otros tejidos tiene el efecto opuesto (47). Además, la pérdida de actividad de FOXO en el intestino puede llevar a la desregulación de la homeostasis de lípidos (48).

Se ha observado que algunas mutantes de *C. elegans* y *D. melanogaster* deficientes en la vía de la insulina muestran una respuesta al estrés oxidativo mejorada y una extensión de vida en condiciones de restricción calórica (29,49). Esto concuerda con la interpretación del envejecimiento como consecuencia de la acumulación de daño oxidativo (50, 51, 52).

Los estudios sobre la interacción entre la diabetes y la vía de Nrf2 se han llevado cabo principalmente en ratones, donde se estudia la habilidad de diferentes inductores de Nrf2 para mejorar el estado diabético; también se utilizan ratones *Knock-out* para Nrf2 o *Knock-down* para Keap. En estos modelos se suele observar que la activación de Nrf2 puede mejorar la salud de los organismos diabéticos, aunque algunos estudios señalan que la activación crónica de Nrf2 provoca el efecto contrario (53). En este mismo organismo modelo se observó cómo el eje de PI3K-Akt, a través de la inhibición de la glucógeno sintasa **cinasa 3 beta (GSK-3 $\beta$ ) incrementa la** protección oxidante de Nrf2 (54), lo que representa un punto de interacción directa entre ambas vías.

### **3.JUSTIFICACIÓN**

La diabetes aqueja a millones de personas a nivel mundial, y dada la variedad de mecanismos que participan en la diabetes, dilucidar la contribución relativa de cada uno ha sido un reto. Con este trabajo se caracterizaron parámetros metabólicos de tres modelos de diabetes tipo II en *Drosophila melanogaster*, observando el progreso de la enfermedad a diferentes edades en ambos sexos, para dilucidar cómo progresa la enfermedad en ellos. Dado que los modelos estudiados presentan defectos en tres puntos diferentes de la vía de la insulina, y en base a esto es que se realizó un estudio midiendo parámetros metabólicos a diferentes edades y en ambos sexos, su descripción permite una caracterización de la manera en que la enfermedad progresa en este organismo modelo. Además, se buscó observar la manera en que la vía de la insulina interactúa con el estrés oxidativo a través de la vía antioxidante de Nrf2. El uso de la *Drosophila melanogaster* como objeto de estudio permite obtener resultados que no están influenciados por diferencias genéticas entre individuos y que en principio reflejan las principales contribuciones de diferentes componentes de la vía de la insulina.

### **4.HIPÓTESIS**

Las características del estado diabético se podrán observar de manera diferencial en las mutantes heteroalélicas estudiadas.

### **5.OBJETIVOS**

Caracterizar la progresión del fenotipo diabético en mutantes heretoalélicas de la vía de la insulina en *Drosophila melanogaster*.

#### **5.1. Objetivos específicos**

- Medir los niveles de carbohidratos y de lípidos a lo largo de la vida de moscas adultas con defectos en la vía de la insulina.
- Analizar los niveles de actividad y alimentación de las mutantes de la vía de la insulina.
- Analizar la interacción entre la vía de Nrf2 y la vía de la insulina.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Sujetos

Diferentes cepas de *Drosophila melanogaster* (controles, mutantes de la vía de la insulina y del Nrf2 y cepas con construcciones que evidencian la expresión de genes que participan en la respuesta antioxidante) pertenecientes al cepario del laboratorio de Genética de Transducción de Señales del Instituto de Neurobiología, donde se mantienen en viales con alimento (10% piloncillo, 10% levadura) a una temperatura promedio de 25°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h c/u.

Se realizaron cruzas entre las siguientes cepas heterocigotas con el propósito de obtener crías heteroalélicas viables (**tabla 1**).

**Tabla 1.** Cepas mutantes para la vía de la insulina.

| <i>InR</i>   |   |
|--|---|
| <i>F0</i>  | <i>F1</i>   |
| Hembras <i>yw; InR<sup>E19</sup>/TM6B</i><br>x<br>Machos <i>yw; InR<sup>3T5</sup>/TM3</i>        | <i>yw; InR<sup>3T5</sup>/InR<sup>el9</sup></i><br><i>yw; InR<sup>E19</sup>/TM3</i><br><i>yw; InR<sup>3T5</sup>/TM6B</i>             |
| <i>PI3K92E</i>   |   |
| <i>F0</i>  | <i>F1</i>   |
| Machos <i>yw; PI3K92E<sup>A</sup>/TM6B</i> (<br>x<br>Hembras <i>yw; PI3K92E<sup>w3</sup>/TM3</i> | <i>yw; PI3K92E<sup>a</sup>/PI3K92E<sup>5w3</sup></i><br><i>yw; PI3K92E<sup>A</sup>/TM3</i><br><i>yw; PI3K92E<sup>5w3</sup>/TM6B</i> |
| <i>dS6K</i>  |   |
| <i>F0</i>  | <i>F1</i>   |
| Machos <i>yw; S6k<sup>-1</sup>/TM3</i><br>x<br>Hembras <i>yw; S6k<sup>P1713</sup>/TM3</i>        | <i>yw; S6k<sup>-1</sup>/S6k<sup>P1713</sup></i><br><i>yw; S6k<sup>-1</sup>/TM3</i><br><i>yw; S6k<sup>P1713</sup>/TM3</i>            |

\* *TM3* Y *TM6B* son cromosomas balanceadores con extensos rearrreglos y mutaciones recesivas letales que impiden la recombinación (y por ende conservan intacto el alelo estudiada) y poseen marcadores que permiten determinar su presencia.

Se usaron machos y hembras vírgenes de F1 para los experimentos. Como control se utilizaron machos y hembras vírgenes *yw*. Todas las cepas cuentan con el mismo fondo genético.

Se realizaron cruzas entre cepas con marcadores de la expresión de maf-S, cofactor de Nrf2, y mutantes de la vía de la insulina, para generar y establecer cepas que posean ambos elementos. En la **tabla 2** se presentan las cruzas obtenidas:

**Tabla 2.** Cepas con construcciones de expresión y mutaciones para la vía de Nrf2 y la vía de la insulina.

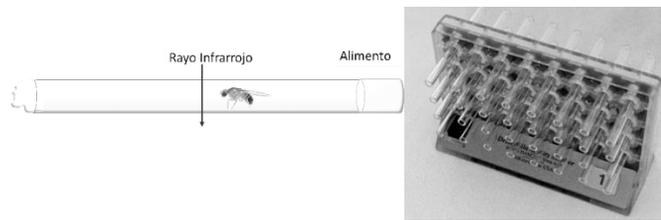
| Genotipo  | Descripción   |
|---|---|
| $yw; \frac{\{Maf - S - GFP\}, PI3K92E^{5w3}}{TM3B}$ | Cepa con 1) marcador de GFP para la expresión de Maf-S y 2) alelo mutante de <i>PI3K92E</i> (subunidad catalítica de PI3K). |
| $yw; \frac{\{maf - S - GFP\}, S6k^{l-1}}{TM3}$      | Cepa con 1) marcador GFP para la expresión de Maf-S y 2) alelo mutante de <i>S6k</i> .                                      |
| $yw; \frac{\{maf - S - GFP\}, InR^{3t5}}{TM3}$      | Cepa con 1) marcador GFP para la expresión de Maf-S y 2) alelo mutante de <i>InR</i> .                                      |

Estas moscas, embriones, se sometieron a dos condiciones estresantes diferentes: temperatura ambiental de 37°C por una hora o radiación UV por una hora y se observó la expresión de los marcadores de GFP.

## 6.2. Medición de parámetros metabólicos para las mutantes de la vía de la insulina

### 6.2.1. Medición de la actividad y ritmo circadiano

Para el estudio de actividad se utilizó el equipo DAM2 Drosophila Activity Monitor de TriKinetics de acuerdo a las instrucciones del fabricante (56) (**figura 4**) y los resultados se analizaron con los programas ImageJ y DAMFilescan110. Se colocaron moscas de los genotipos a estudiar en viales individuales con alimento, los cuales se colocaron en la placa del monitor DAM2 Drosophila Activity Monitor, el cual registra el movimiento de las moscas cada cinco minutos en términos del número de veces que el paso de la mosca interrumpe un rayo infrarrojo que atraviesa un punto del vial. El monitor se conectó a una computadora y se dejó correr el equipo por 7 días. El primer día se descartó (período de aclimatación) para el análisis. Se analizaron los siguientes 6 días.

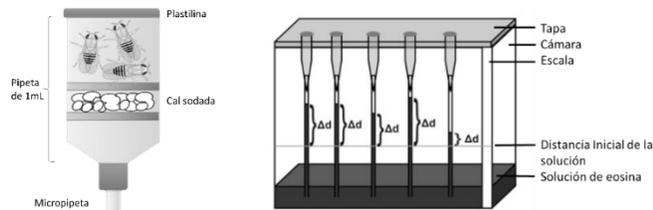


**Figura 4.** Sistema DAM2.

## 6.2.2. Medición de parámetros metabólicos

### 6.2.2.1. Medición de tasa metabólica

Se preparó un respirómetro para determinar la tasa metabólica en relación a la cantidad de CO<sub>2</sub> producido de acuerdo a (57). Brevemente, se colocan cinco moscas del mismo genotipo en un sistema cerrado donde se absorbe el CO<sub>2</sub> producido por la respiración y el cambio en presión resultante se mide por el desplazamiento de un líquido en un capilar conectado a la cámara con las moscas (figura 5).



**Figura 5.** Respirómetro

Las moscas fueron anestesiadas con CO<sub>2</sub> y se colocaron 5 respirómetros en paralelo, 4 conteniendo moscas de la misma edad (7 días) y sexo de diferentes genotipos y un control atmosférico sin moscas. Se colocaron a 25°C por dos horas. Se tomó una fotografía al comienzo del experimento y una más dos horas después. Se analizaron las imágenes con ImageJ para calcular la distancia recorrida por el líquido y se calculó la cantidad de CO<sub>2</sub> producido (μl / hr / mosca) con la fórmula:

$$\frac{((\pi \times R^2) \times (\Delta d) - (\Delta c)) \times 1000}{n \times h}$$

donde R = radio del tubo de micropipeta en centímetros; Δd = distancia que el líquido se ha movido hacia arriba, medida en centímetros; Δc = distancia que el

líquido ha subido en la micropipeta de la muestra de control negativo (sin moscas);  
n = número de moscas usado; y h = horas. Esto se dividió entre el peso en mg.

### **6.2.2.2 Determinación de lípidos.**

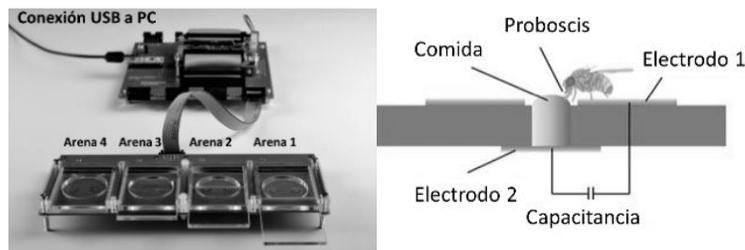
La determinación de lípidos totales se realizó siguiendo el procedimiento de Van Handel (58). Machos y hembras congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión se pesaron individualmente, se colocaron en un tubo de ensaye y se calentaron a  $90^{\circ}\text{C}$  por una hora. Tras enfriar, se homogenizaron con un pistilo de vidrio con 500  $\mu\text{l}$  de cloroformo:metanol 1:1. Los sobrenadantes se calentaron a  $100^{\circ}\text{C}$  por 2 horas hasta evaporar el solvente. Se agregaron 0.2 ml de ácido sulfúrico concentrado (95-98%) y se calentaron a  $100^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Se dejaron enfriar y se les agregaron 2.4 ml del reactivo de vainillina (vainillina, ácido sulfúrico 95-98%, agua), se mezclaron y se incubaron por 10 min. Se realizó una curva estándar con aceite de vegetal comercial en solución de 1mg/ml en cloroformo, usando 25, 50, 100, 200 y 300  $\mu\text{l}$  y aforando con cloroformo y sometidos al mismo tratamiento que a los experimentales. Las diferentes muestras se colocaron en una placa de 96 multipozos y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA.

### **6.2.2.3 Determinación de carbohidratos.**

La determinación de carbohidratos totales se realizó con la técnica de Van Handel (59). Machos y hembras congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión se pesaron individualmente, se homogenizaron con un pistilo de vidrio en 100  $\mu\text{l}$  de etanol al 25%. A los sobrenadantes se les agregó 2.4 ml del reactivo de antrona, se mezclaron y calentaron a  $92^{\circ}\text{C}$  por 17 min. Se realizó una curva estándar a partir de una solución de glucosa de 1 mg/2 ml de etanol al 25%, usando 10, 25, 50, 100 y 150  $\mu\text{l}$  y sometidos al mismo tratamiento que a los experimentales. Se colocaron en una placa multipozos y se midió la absorbancia a 625 nm en un lector de ELISA. Los valores de lípidos y carbohidratos fueron normalizados con relación al peso, dada las diferencias observadas en este parámetro.

#### 6.2.2.4 Medición de consumo de alimento

Se utilizó el sistema flyPAD (*fly Proboscis and Activity Detector*) (60) para monitorear el comportamiento alimenticio de machos y hembras de 7 días. El sistema utiliza mediciones capacitivas para detectar la interacción física de *Drosophila* con el alimento (**figura 6**). Las moscas se dejaron sin alimento por 8 horas, únicamente con un papel filtro empapado en agua desionizada como fuente de hidratación, y después se transfirieron a la arena conductual por aspiración bucal y se dejaron alimentar con una solución de sacarosa al 10% en agarosa al 1% por 30 minutos. Las soluciones preparadas se dividieron en alícuotas de 0.5 ml y se congelaron a -20 ° C hasta su uso. Para cada experimento, las alícuotas se fundieron de nuevo inmediatamente antes del experimento. Alternativamente, las moscas se colocaron en la arena sin periodo de hambruna previo y se colocó alimento con piloncillo al 10% y levadura al 10% en agarosa al 1%. Para la adquisición de datos se utilizó el software abierto Bonsai y el análisis de datos se realizó con el programa FlyPadDataAnalysis, provisto por el fabricante.



**Figura 6.** FlyPAD.

#### 6.2.2.5 Estadística

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en la plataforma IBM SPSS Statistics 23. Los niveles de actividad motora fueron analizados mediante ANOVA y pruebas *post-hoc* Tukey HSD. El peso corporal, la tasa metabólica, los niveles de lípidos y carbohidratos y la alimentación fueron analizados mediante comparación de distribuciones de datos con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se reportan las medianas cuando la N es pequeña y/o la muestra presenta valores extremos, y el promedio y error estándar en caso contrario.

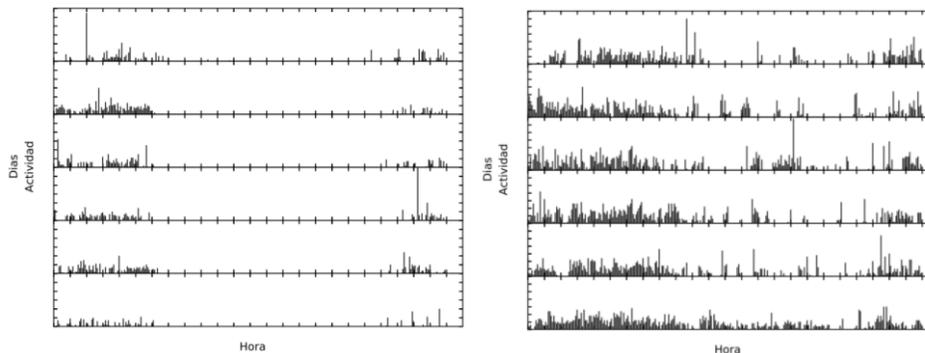
## 7.RESULTADOS

### 7.1. *InR*, *PI3K92E* y *S6k*

El interés en analizar el período y nivel de actividad de estas mutantes se deriva de las observaciones del papel que juega el ritmo circadiano en el balance energético de los organismos, donde defectos en genes del control circadiano afectan el metabolismo del organismo (61, 62). De la misma manera, un defecto en el aprovechamiento de energía podría interrumpir un patrón endógeno de actividad.

#### 7.1.1. *Ritmo circadiano y actividad de mutantes de la vía de la insulina.*

Se colocaron hembras de cada fenotipo por ocho días en el monitor de TriKinetics, en oscuridad las 24 horas del día. El primer día (de aclimatación) se descartó y se consideraron sólo los siguientes seis días para el análisis. Se observó cómo la cepa silvestre mostró un patrón más constante de períodos de actividad y descanso cada día. Se muestran en la **figura 7** dos actogramas representativos del patrón de movimiento de las moscas, con dos períodos de actividad alta y uno de poca actividad durante cada día, y cómo las moscas exhiben un ciclo circadiano endógeno pese a estar en completa oscuridad todo el día.

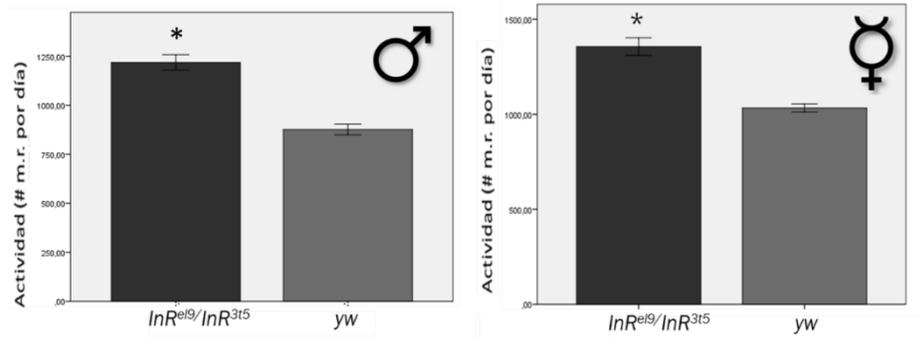


**Figura 7. Actogramas representativos de los diferentes genotipos estudiados.**

Las filas corresponden a un día y cada división del eje de las equis representa una hora. La altura de cada pico representa el número de registros (número de veces que el rayo infrarrojo fue interrumpido por el paso de la mosca) en períodos de cinco

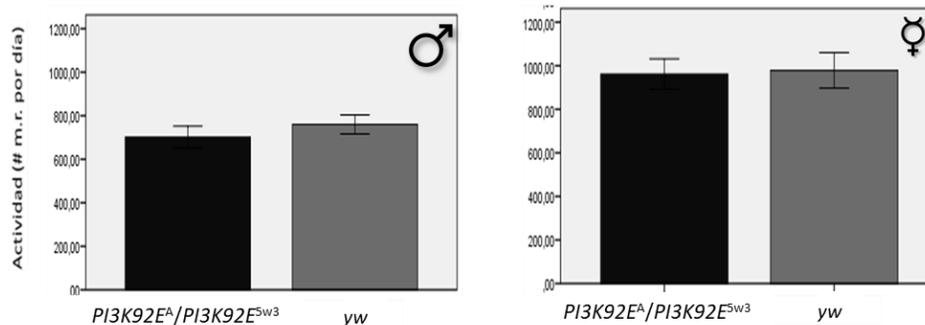
minutos. Mutante hembra heteroalélica de *InR* a la derecha y hembra silvestre a la izquierda.

La **figura 8** muestra que los niveles de actividad que presentaron las cepas de *InR* en machos y en hembras; se observó significativamente mayor actividad de movimiento promedio por día en los mutantes, indicando que son más activas.



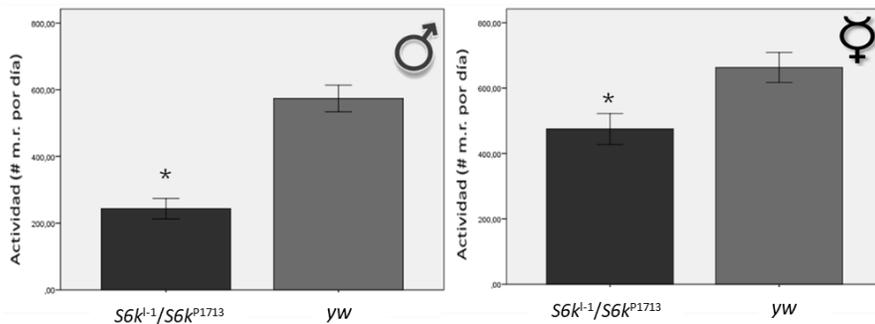
**Figura 8.** Actividad de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de *InR*. Promedio de movimientos registrados por día. El asterisco denota diferencias significativas (ANOVA y prueba post-hoc de Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). Barras de error: error estándar. N=25 para cada cepa.

La comparación de la actividad en mutantes de *PI3K92E* (**figura 9**) mostró que el nivel de actividad no se ve disminuido significativamente entre la mutante heteroalélica y las moscas silvestres hembras y machos.



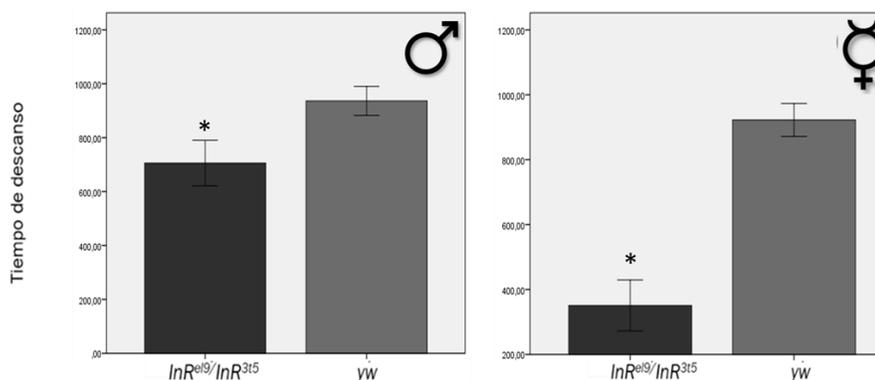
**Figura 9.** Actividad de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de *PI3K92E*. Promedio de movimientos registrados por día. Sin diferencias significativas (ANOVA y prueba post-hoc de Tukey HSD,  $p > 0.05$ ). Barras de error: error estándar. N=25 para cada cepa.

Los niveles de actividad en las moscas mutantes de *S6k* en cambio se vieron disminuidos significativamente comparados con las moscas silvestres (**figura 10**), tanto en machos como hembras.



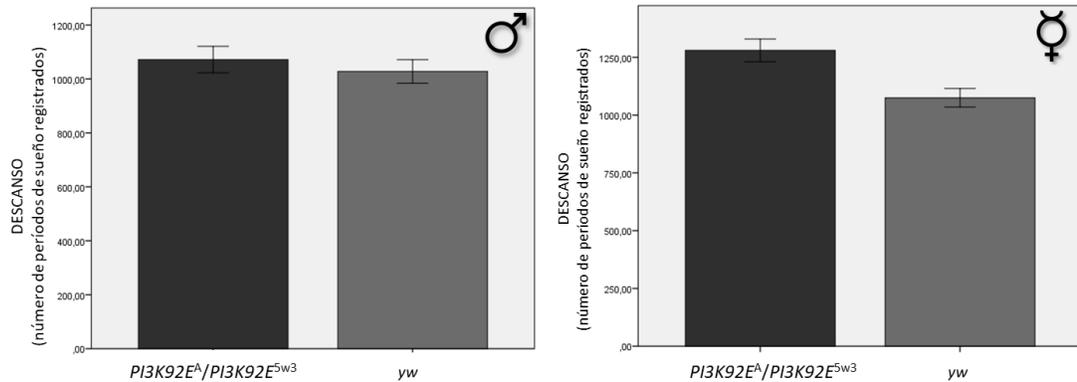
**Figura 10.** Actividad de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de *S6K*. Promedio de movimientos registrados por día. El asterisco denota diferencias significativas (ANOVA y prueba post-hoc de Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). Barras de error: error estándar.  $N=30$  para cada cepa.

El análisis complementario de la cantidad de tiempo que pasan las moscas sin interrumpir el rayo infrarrojo (convencionalmente cada período de cinco minutos sin interrumpir el rayo infrarrojo se considera como un episodio de sueño), muestra en concordancia cómo las moscas mutantes de *InR* (**figura 11**) presentan menos descanso, mientras que las mutantes de *PI3K92E* y *S6k* tienen mayor tiempo de descanso (**figuras 12 y 13**), aunque sólo es significativo para *S6k*.

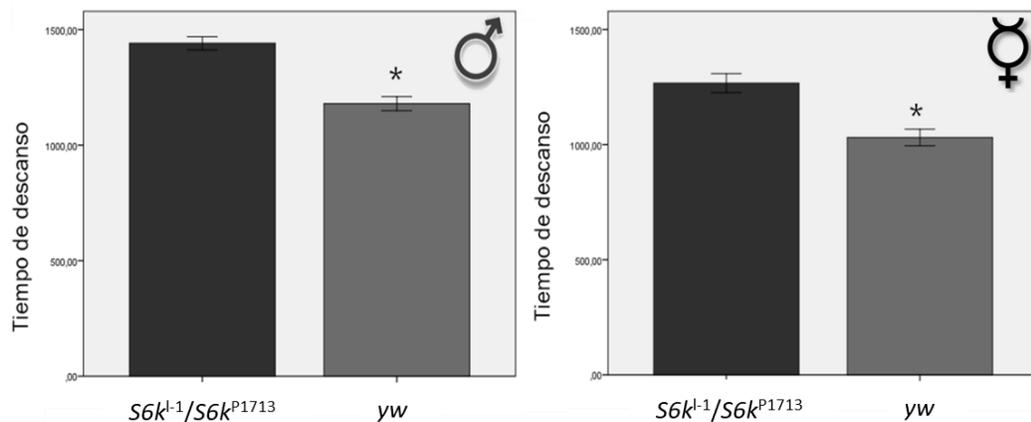


**Figura 11.** Tiempo de descanso de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de *InR*. Promedio de número de períodos de sueño por día. El asterisco

denota diferencias significativas (ANOVA y prueba post-hoc de Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). Barras de error: error estándar.

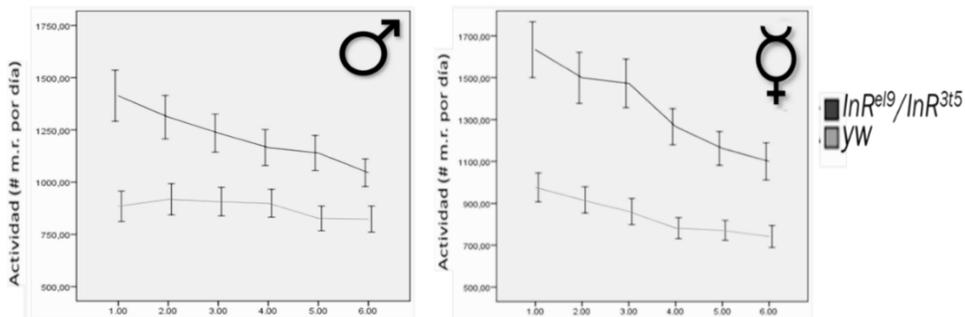


**Figura 12.** Tiempo de descanso de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de *PI3K92E*. Promedio de número de períodos de sueño por día. Sin diferencias significativas (ANOVA y prueba post-hoc de Tukey HSD,  $p > 0.05$ ). Barras de error: error estándar.

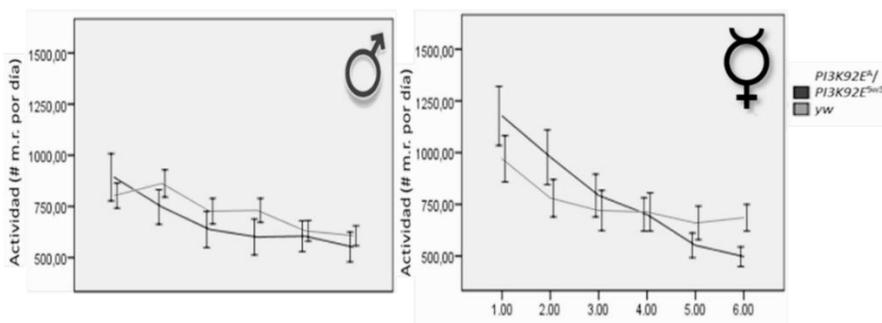


**Figura 13.** Tiempo de descanso de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de *S6k*. Promedio de número de períodos de sueño por día. El asterisco denota diferencias significativas (ANOVA y prueba post-hoc de Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). Barras de error: error estándar.

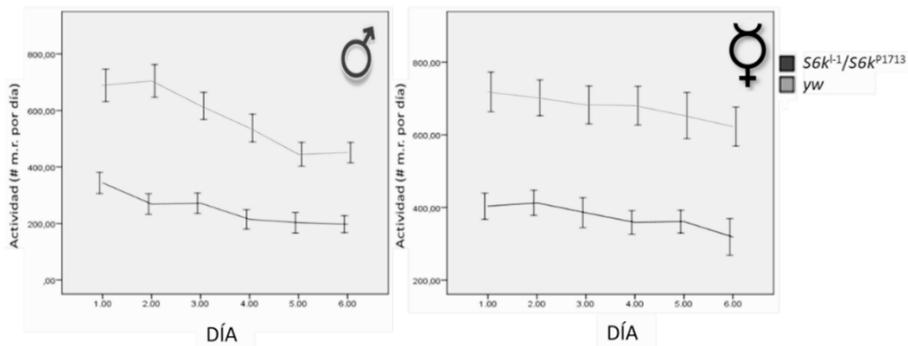
El análisis del nivel de actividad de cada cepa en cada uno de los 6 días que conforman en estudio muestra un decline a lo largo del tiempo, si bien éste suele ser poco pronunciado, particularmente en el caso de los controles (figuras 14-16).



**Figura 14.** Actividad promedio por cada día consecutivo de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de *InR*. Promedio de movimientos registrados por día. Barras: error estándar.



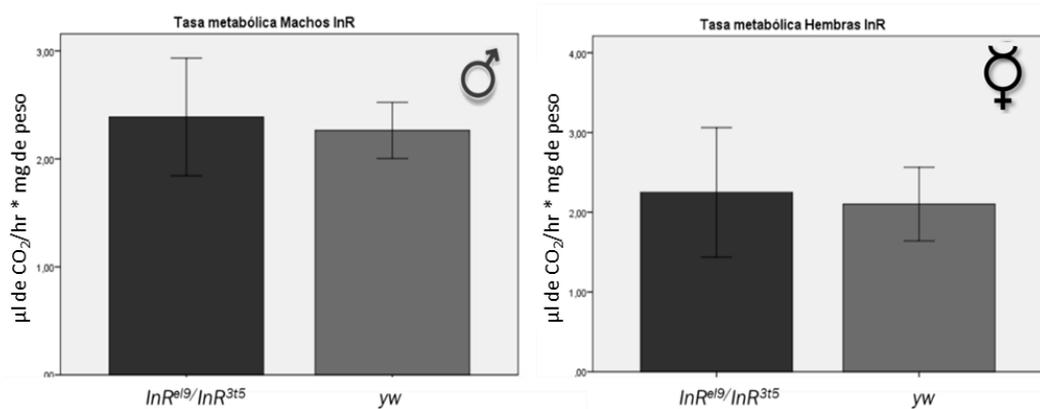
**Figura 15.** Actividad por día de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de *PI3K92E*. Promedio de movimientos registrados por día. Barras: error estándar.



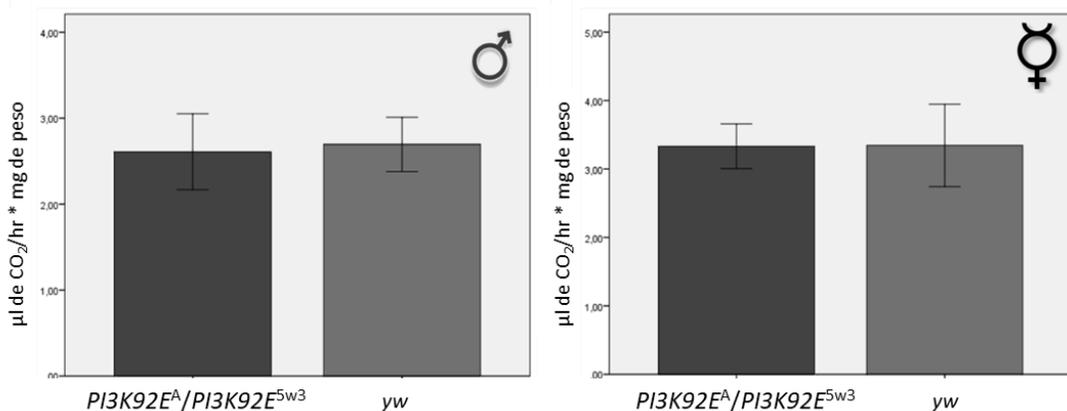
**Figura 16.** Actividad por día de machos y hembras vírgenes mutantes y controles de *S6k*. Promedio de movimientos registrados por día. Barras: error estándar.

### 7.1.2. Medición de la tasa metabólica

La observación de un nivel de actividad mayor en mutantes de *InR* y menor en las mutantes de *PI3K92E* y *S6k*, con un efecto más claro en hembras, llevó a analizar la tasa metabólica de producción de bióxido de carbono de las mismas cepas. Sin embargo, no se observaron diferencias entre grupos al analizarse moscas de 7 días de *InR* (figura 17). El mismo resultado negativo se obtuvo para *PI3K92E* (figura 18) y *S6k* (figura 19). Estos resultados se resumen en la tabla 3.

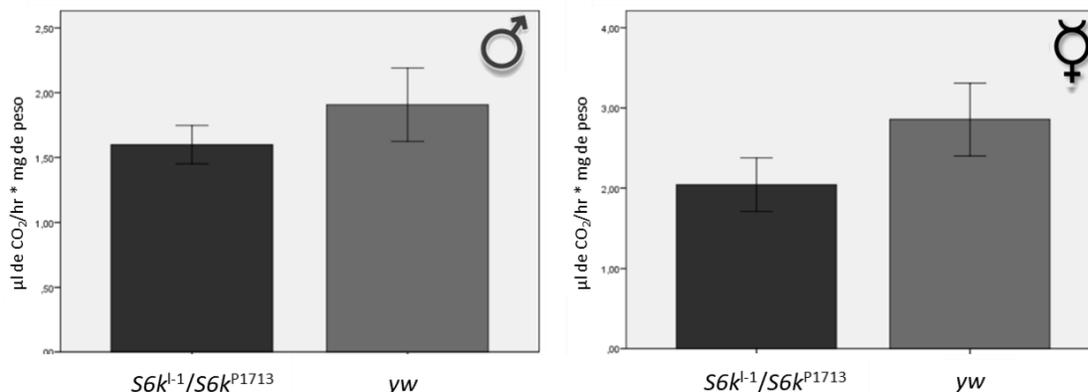


**Figura 17.** *InR*. Tasa metabólica de machos de 7 días de edad (N=6) y hembras vírgenes de 7 días de edad (N=8). Unidades:  $\mu\text{l de CO}_2/\text{hr} * \text{mg de peso}$ . No hay diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ). Barras de error: error estándar.



**Figura 18.** *PI3K92E* Tasa metabólica de machos de 7 días de edad (N=9) y hembras vírgenes de 7 días de edad (N=6). Unidades:  $\mu\text{l de CO}_2/\text{hr} * \text{mg de peso}$ . No hay

diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ). Barras de error: error estándar.



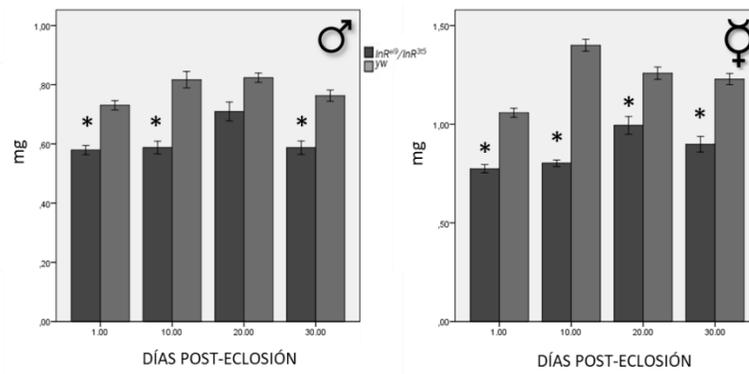
**Figura 19.** *S6k*. Tasa metabólica de machos de 7 días de edad (N=7) y hembras vírgenes de 7 días de edad (N=7). Unidades:  $\mu\text{l de CO}_2/\text{hr} * \text{mg de peso}$ . No hay diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ). Barras de error: error estándar.

**Tabla 3.** Resumen de tasa metabólica promedio ( $\pm$ SEM).

|   | MACHOS                         |                   | HEMBRAS                        |                   |
|---|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|
|   | <i>InR<sup>3t5/el9</sup></i>   | <i>yw</i>         | <i>InR<sup>3t5/el9</sup></i>   | <i>yw</i>         |
| Tasa metabólica<br>( $\mu\text{L CO}_2/\text{h}/\text{mg}$<br>peso) | <i>2.39 ± .54</i>              | <i>2.26 ± .26</i> | <i>2.25 ± .81</i>              | <i>2.10 ± .46</i> |
|   | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>yw</i>         | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>yw</i>         |
|   | <i>2.03 ± .49</i>              | <i>2.60 ± .58</i> | <i>3.33 ± .32</i>              | <i>3.34 ± .60</i> |
|   | <i>S6k<sup>l-1/P1713</sup></i> | <i>yw</i>         | <i>S6k<sup>l-1/P1713</sup></i> | <i>yw</i>         |
|   | <i>1.60 ± .15</i>              | <i>1.91 ± .28</i> | <i>1.86 ± .32</i>              | <i>2.63 ± .45</i> |

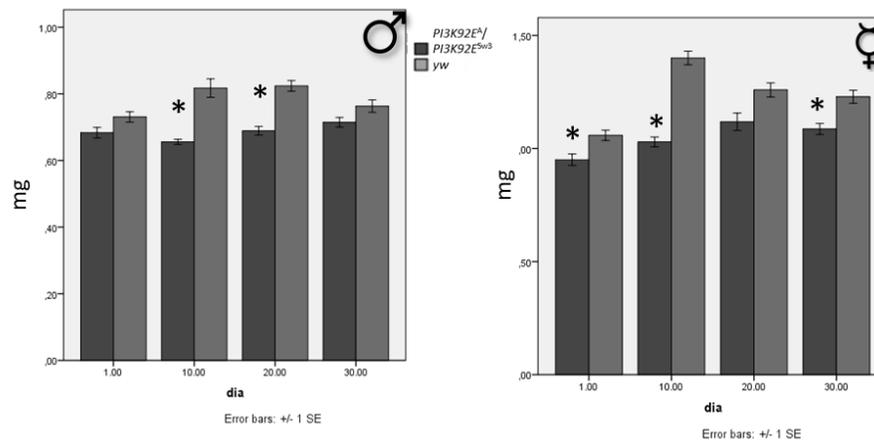
### 7.1.3. Medición del peso corporal.

En la **figura 20** se observa cómo tanto machos y hembras heteroalélicos de *InR* exhiben un peso menor comparado con la cepa silvestre en la mayoría de las edades medidas.



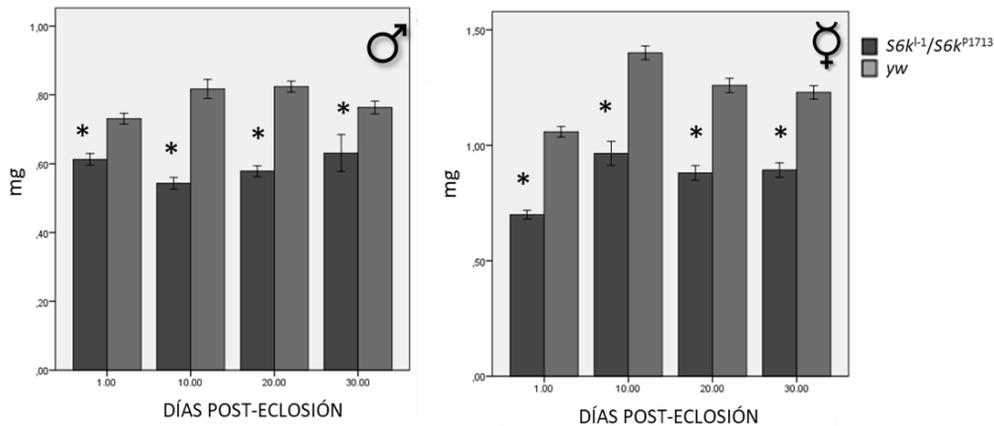
**Figura 20.** Peso (mg) de machos (izquierda) y hembras (derecha) de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión. N= 15. El \* denota diferencias significativas con respecto al control silvestre (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Barras de error: error estándar.

Machos heteroalélicos de *PI3K92E* de 10 y 20 días post-eclosión y hembras de 1, 10 y 30 días post-eclosión exhiben un menor peso corporal comparado con la cepa silvestre (**figura 21**).



**Figura 21.** *PI3K92E*. Peso (mg) de machos (izquierda) y hembras (derechas) de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión. N= 18. El \* denota diferencias significativas con respecto al control silvestre (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Barras de error: error estándar.

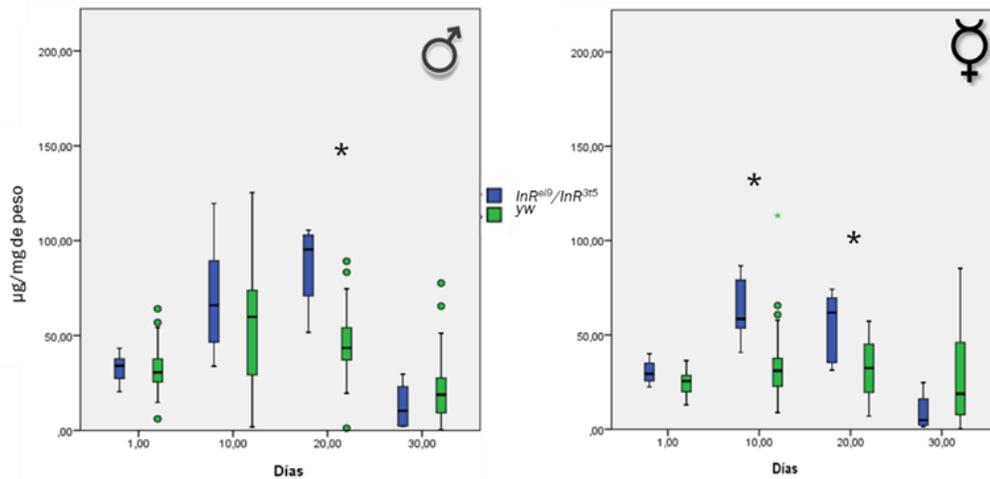
Para *S6k* también hay un menor peso corporal comparado con la cepa silvestre (**figura 22**). Las diferencias entre la cepa mutante heteroalélica y la cepa silvestre son significativas en todos los casos.



**Figura 22.** Peso (mg) de machos (izquierda) y hembras (derechas) de 1,10,20 y 30 días post-eclosión. N= 12. El \* denota diferencias significativas con respecto al control silvestre (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Barras de error: error estándar.

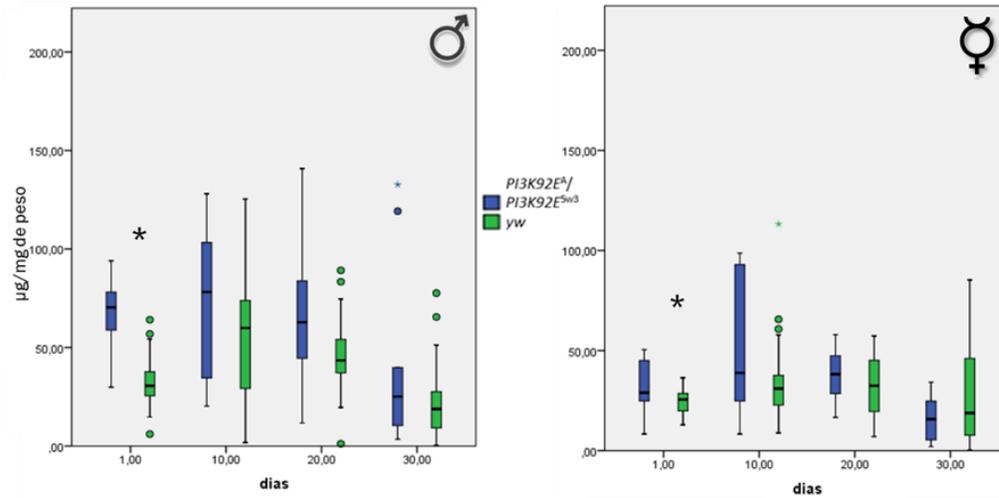
#### 7.1.4. Lípidos por miligramo de peso

En general, se observó que las las cepas mutantes mostraban una tendencia donde los niveles más altos de lípidos se daban a los 10 y 20 días post-eclosión, con una disminución subsecuente al día 30. Únicamente las mutantes de *S6k* presentaban aún altos niveles de lípidos en el día 30. También se observó que las diferencias significativas entre silvestres y mutantes no siempre coinciden entre machos y hembras de cada cepa. Para *InR* hubo diferencias significativas a los 10 y 20 días para hembras y a los veinte días para machos (**figura 23**). En esta cepa se dio el deline más severo en niveles de lípidos en el día 30 post-eclosión.



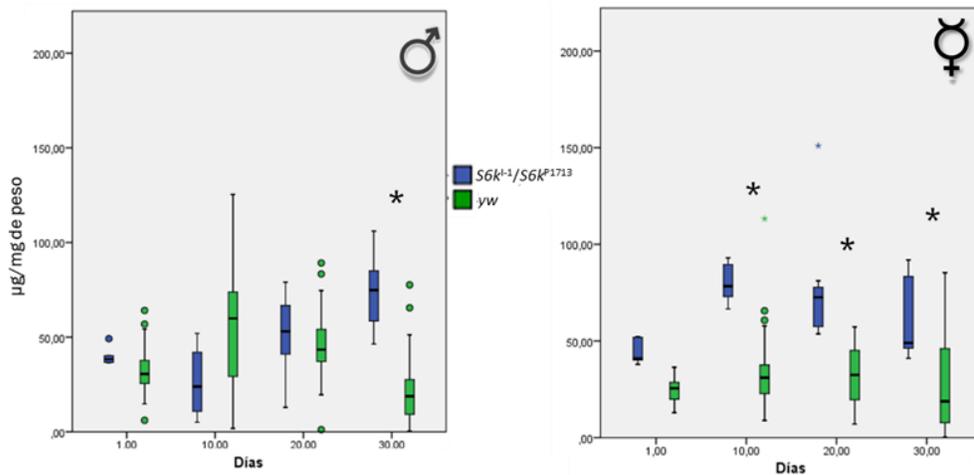
**Figura 23.** Cantidad de lípidos ( $\mu\text{g}$ ) por mg de peso en machos y hembras de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión.  $N=7$ . El \* negro denota diferencias significativas con respecto al control silvestre (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Para todos los boxplots, la caja representa el rango intercuartil (IQ) que contiene el 50% medio de los registros. La línea que la cruza es la mediana. Los bigotes (líneas en forma de T) se extienden hasta los valores más altos y más bajos que no son mayores que 1,5 veces el rango IQ. Los valores atípicos son casos con valores entre 1.5 y 3 veces el rango de IQ (círculos), o más de 3 veces (asteriscos de color).

A través del tiempo, *PI3K92E* presenta un patrón de niveles de lípidos (**figura 24**) donde se da un pico a los 10 días, y disminuye subsecuentemente a los 30 días. Las diferencias en la cantidad de lípidos por mg de peso entre los grupos silvestres controles y el grupo heteroalélico son sólo significativas en hembras al día post-eclosión 1, y en machos al día 1 post-eclosión. Estas mutantes muestran el patrón más cercano al observado en la cepa silvestre.



**Figura 24.** *PI3K92E*. Cantidad de lípidos ( $\mu\text{g}$ ) por mg de peso en machos (izquierda) y hembras (derecha) de 1, 10, 20 y 30 días de edad.  $N=10$ . El \* denota diferencias significativas con respecto al control silvestre (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).

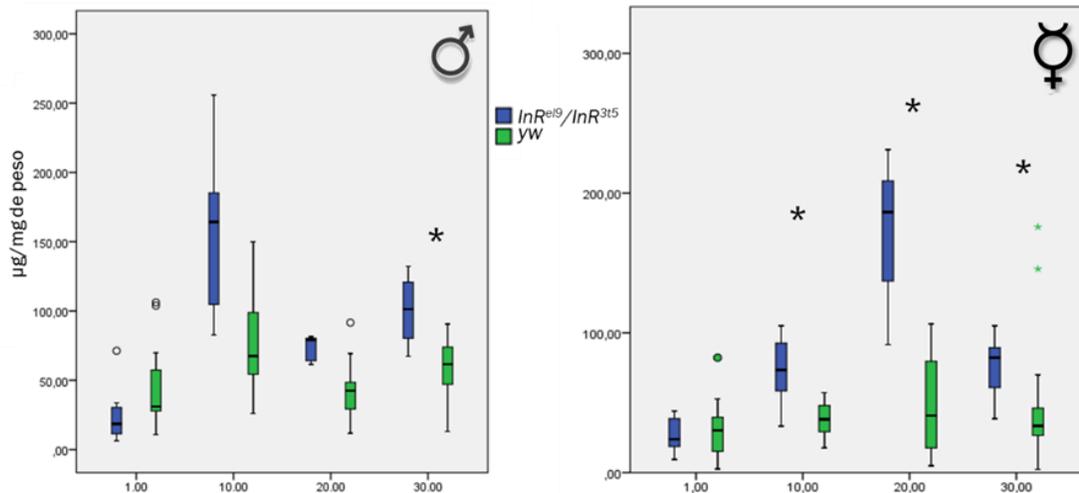
Para *S6k* se observaron las mayores diferencias significativas para machos a los 30 días, donde las moscas mutantes mostraron mayores niveles de lípidos y para las hembras mutantes el pico en los niveles de lípidos se observó al día 10, y continuó en los días 20 y 30 post-eclosión (**figura 25**).



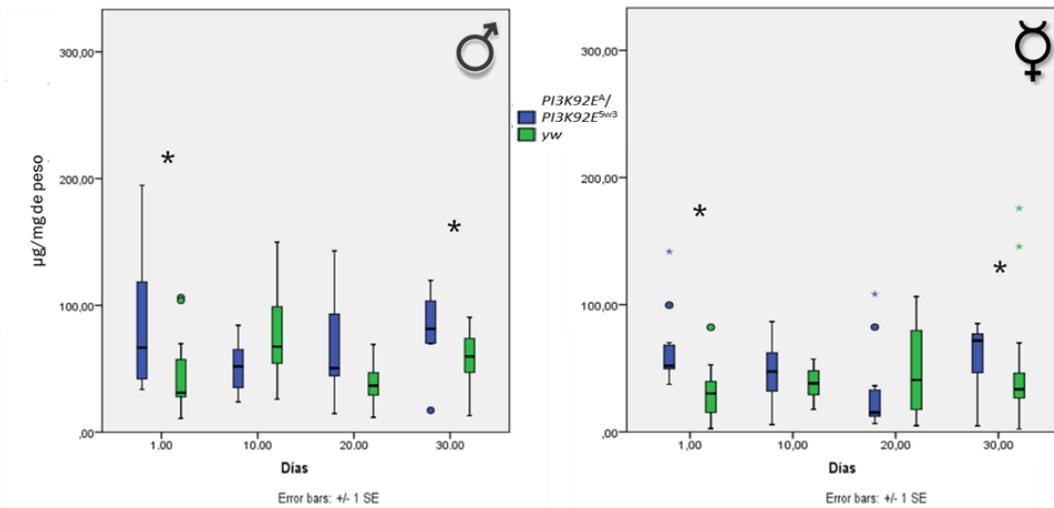
**Figura 25.** *S6k*. Cantidad de lípidos ( $\mu\text{g}$ ) por mg de peso en machos (izquierda) y hembras (derecha) de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión.  $N=6$ . El \* denota diferencias significativas con respecto al control silvestre (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).

### 7.1.5. Carbohidratos por miligramo de peso

Los niveles de carbohidratos se mostraron más constantes a través de las diferentes de las moscas silvestres, y se observaron menos diferencias en las mutantes, siendo las mutantes de *InR* donde se observó la mayor desregulación: existe una diferencia significativa en los niveles de carbohidratos totales en hembras de 10, 20 y 30 días post-eclosión, con un pico a los 20 días (**figura 26**). En machos se observa diferencias al día 30. El patrón con que varían los niveles de carbohidratos de *PI3K92E* (**figura 27**) también muestra un patrón fijo entre los diferente grupos, con un pico en el primer día, una disminución a los 10 y 20 días y un ligero aumento a los 30 días. Las diferencias en el nivel de carbohidratos entre cepas heteroalélicas y silvestres son significativas en hembras y machos en el primer día y al 30, donde se encuentran incrementados.

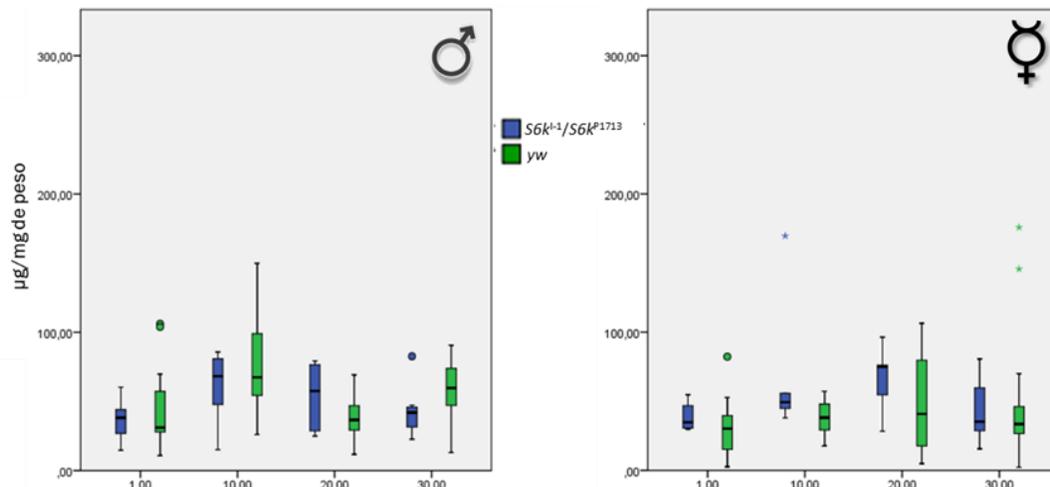


**Figura 26.** *InR*. Cantidad de carbohidratos ( $\mu\text{g}$ ) por mg de peso en machos y hembras de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión.  $N=8$ . El \* denota diferencias significativas con respecto al control silvestre (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



**Figura 27.** *PI3K92E*. Cantidad de carbohidratos ( $\mu\text{g}$ ) por mg de peso en machos y hembras de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión.  $N=8$ . El \* denota diferencias significativas con respecto al control silvestre (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).

Para machos y hembras mutantes de *S6k* no se observaron diferencias significativas (**figura 28**), en contraste con los niveles de lípidos, que mostraron grandes diferencias.



**Figura 28.** *S6k*. Cantidad de carbohidratos ( $\mu\text{g}$ ) por mg de peso en machos y hembras de 1, 10, 20 y 30 días post-eclosión.  $N=6$ . El \* denota diferencias significativas con respecto al control silvestre (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).

La **tabla 4** resumen los resultados observados, donde las líneas heteroalélicas muestran en general un menor peso y mayor número de lípidos y carbohidratos en comparación con los controles, con la mayor desregulación en los niveles de carbohidratos observándose en la cepa mutante de *InR*, y de lípidos en la cepa mutante de *S6k*.

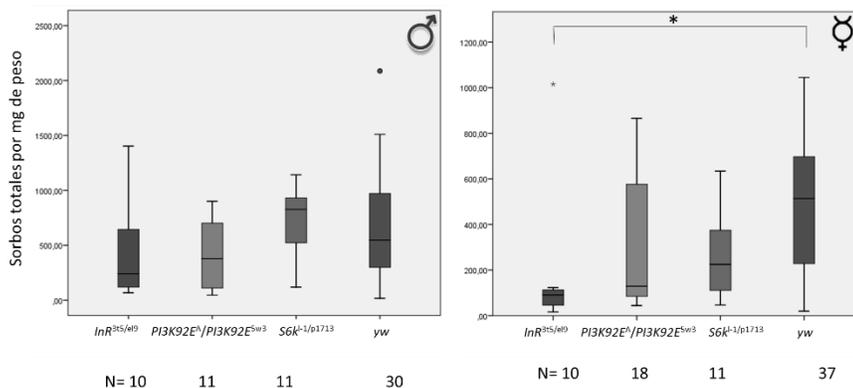
**Tabla 4.** Resumen de pesos promedios ( $\pm$ SEM) y medianas de lípidos y carbohidratos en hembras y machos. Los asteriscos señalan diferencias significativas con respecto al control.

|                            |    | MACHOS                        |                         |                                |                 | HEMBRAS                       |                         |                                |                  |
|----------------------------|----|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------|
| Días post-eclosión         |    | <i>InR</i> <sup>3t5/el9</sup> | <i>PI3K92E</i><br>a/5w3 | <i>S6k</i> <sup>-1/P1713</sup> | <i>yw</i>       | <i>InR</i> <sup>3t5/el9</sup> | <i>PI3K92E</i><br>a/5w3 | <i>S6k</i> <sup>-1/P1713</sup> | <i>yw</i>        |
| Peso (mg)                  | 1  | .580 $\pm$ 0.015*             | .684 $\pm$ .016         | .613 $\pm$ .017*               | .731 $\pm$ .016 | .774 $\pm$ .021*              | .950 $\pm$ .025*        | .700 $\pm$ .019*               | 1.504 $\pm$ .057 |
|                            | 10 | .588 $\pm$ .021*              | .656 $\pm$ .008*        | .543 $\pm$ .016*               | .817 $\pm$ .028 | .802 $\pm$ .017*              | 1.029 $\pm$ .022*       | .965 $\pm$ .052*               | 1.400 $\pm$ .030 |
|                            | 20 | .71 $\pm$ .032                | .689 $\pm$ .013*        | .578 $\pm$ .016*               | .824 $\pm$ .016 | .994 $\pm$ .045*              | 1.119 $\pm$ .038        | .880 $\pm$ .032*               | 1.259 $\pm$ .031 |
|                            | 30 | .588 $\pm$ .022*              | .715 $\pm$ .014         | .631 $\pm$ .054*               | .763 $\pm$ .019 | .898 $\pm$ 0.394*             | 1.086 $\pm$ .024*       | .893 $\pm$ .032*               | 1.229 $\pm$ .029 |
| Carbohidratos (ug/mg peso) | 1  | 18.56                         | 66.65*                  | 68.2                           | 31.03           | 23.92                         | 51.96*                  | 34.8                           | 30.22            |
|                            | 10 | 164.18                        | 51.78                   | 57.53                          | 67.46           | 73.44*                        | 47.48                   | 49.28                          | 38.16            |
|                            | 20 | 79.01                         | 50.56                   | 41.95                          | 36.63           | 186.39*                       | 15.26                   | 74.96                          | 40.86            |
|                            | 30 | 42.51*                        | 81.50*                  | 38.43                          | 59.73           | 82.7047*                      | 71.79*                  | 35.28                          | 33.45            |
| Lípidos (ug per mg peso)   | 1  | 34.05                         | 70.35*                  | 38.43                          | 30.61           | 29.39                         | 28.92*                  | 30.61                          | 25.55            |
|                            | 10 | 65.89                         | 78.21                   | 45.53                          | 59.72           | 58.55*                        | 38.85                   | 59.72*                         | 31.06            |
|                            | 20 | 95.35*                        | 62.78                   | 53.08                          | 43.42           | 61.82*                        | 38.2                    | 43.42*                         | 32.44            |
|                            | 30 | 10.36                         | 23.47                   | 74.89*                         | 18.83           | 4.89                          | 15.66                   | 18.83*                         | 18.80            |

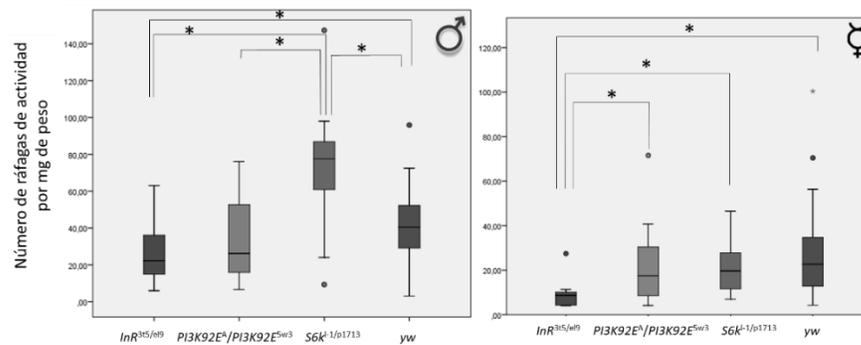
### 7.1.6 Consumo de alimento

Con la intención de corroborar si los resultados obtenidos en relación con los niveles de actividad de las diferentes cepas estaban relacionados con cambios en la búsqueda y consumo de alimento de las moscas, se determinó el comportamiento alimenticio de las 3 cepas heteroalélicas cuando se sometían a 8 horas de hambruna y se les colocaba luego en presencia de sacarosa al 10% (**figuras 29-35 y tabla 5**). Se obtuvieron y analizaron las ráfagas de actividad (momentos durante los cuales la mosca entraba en contacto con el alimento), y los momentos en que el sorbo de alimento comenzaba (contacto de la proboscis con el alimento) y terminaba, además de los intervalos entre sorbos y actividad. Se definieron además las ráfagas de alimentación (tres o más sorbos consecutivos separados por intervalos entre ráfagas menores que la mediana de los intervalos entre sorbos), con la intención de caracterizar la manera en que las moscas mutantes

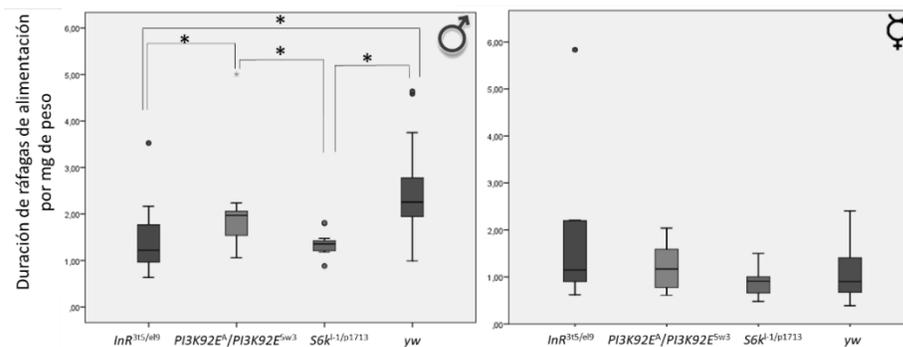
interactuaban con el alimento (60). Únicamente las hembras mutantes de *InR* muestran un número total de sorbos menor (**figura 29**), es decir menor consumo de alimento, lo que señala una resistencia a la hambruna en ellas. La comparación con la cepa control, así como entre cepas mutantes, permite observar cómo pueden darse variaciones en diferentes aspectos de la conducta alimenticia, sin que éstas se traduzcan en una variación en el consumo total de alimento. Las cepas de mutantes de *InR* muestran el comportamiento más divergente comparado con el resto de las cepas, particularmente en el número y duración de ráfagas de actividad (**figura 30**) tanto de machos y hembras, lo que señala que ambos sexos interactúan menos con el alimento, pero sólo los machos presentan una disminución en la duración de las ráfagas de alimentación (**figura 31**), mientras que las hembras presentan diferencias en la duración de ráfagas de actividad y los intervalos entre éstas y los intervalos entre ráfagas de alimentación (**figuras 33, 34 y 35**), señalando que sus interacciones con el alimento y su consumo son menos frecuentes. Las cepas mutantes de *S6k* y *PI3K92E* en algunos mostraron un comportamiento similar al de la cepa mutante de *InR* (**figura 35**), pero en la mayoría de los casos no diferían de la cepa silvestre (y por ende entre sí), con la excepción del número de ráfagas de actividad donde los machos mutantes de *S6k* mostraron un incremento no observado en el resto de las cepas (**figura 30**).



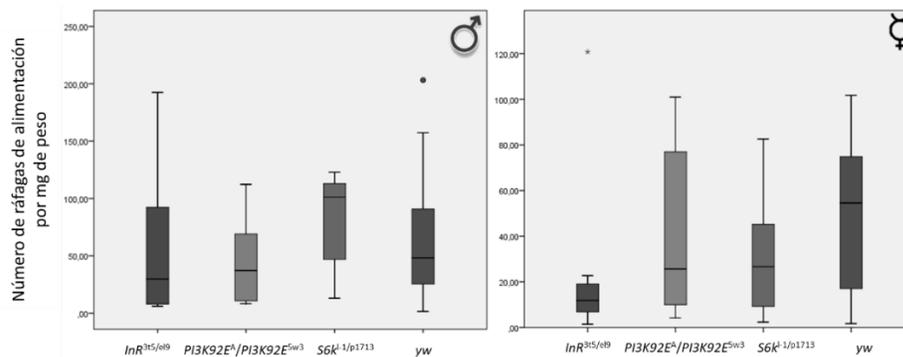
**Figura 29.** Sorbos totales por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión. El \* denota diferencias significativas (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



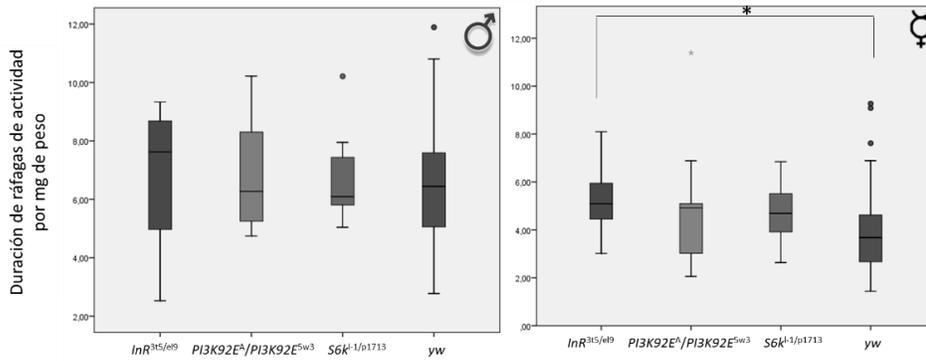
**Figura 30.** Número de ráfagas de actividad por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión. El \* denota diferencias significativas (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



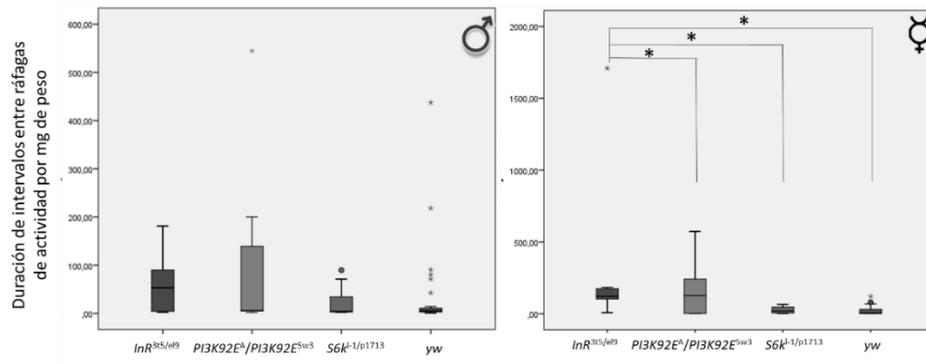
**Figura 31.** Duración de ráfagas de alimentación por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión. El \* denota diferencias significativas (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



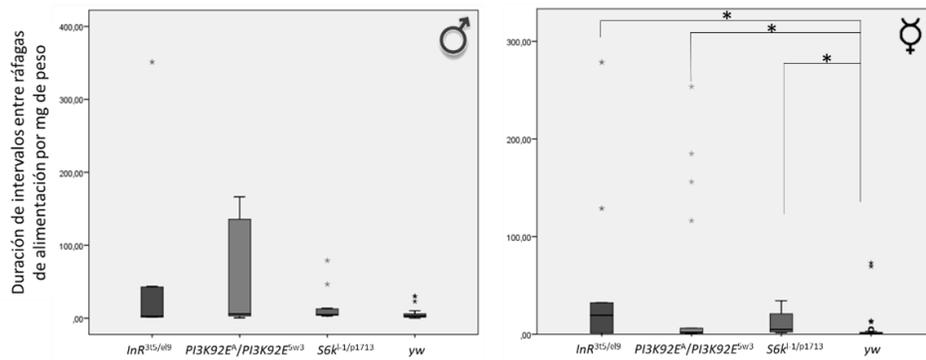
**Figura 32.** Número de ráfagas de alimentación por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión. El \* denota diferencias significativas (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



**Figura 33.** Duración de ráfagas de actividad por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión. El \* denota diferencias significativas (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



**Figura 34.** Duración de intervalos entre ráfagas de actividad por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión. El \* denota diferencias significativas (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



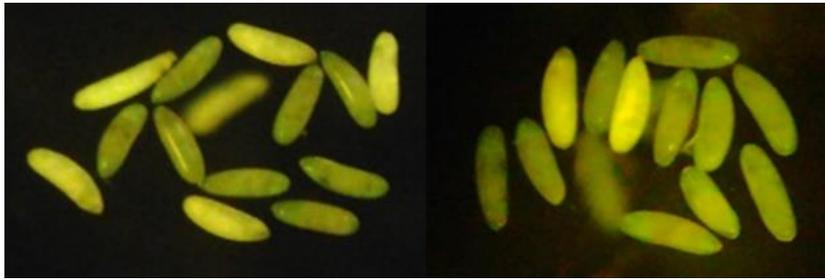
**Figura 35.** Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación por mg de peso en machos y hembras de 7 días de post-eclosión. El \* denota diferencias significativas (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).

**Tabla 5.** Resumen de parámetros de comportamiento alimenticio (medianas) en hembras y machos. Los asteriscos señalan diferencias con el control.

|  | Machos                        |                         |                                    |           | Hembras                       |                         |                                    |           |
|--|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------|
|  | <i>InR</i> <sup>3t5/el9</sup> | <i>PI3K92E</i><br>a/5w3 | <i>S6k</i> <sup>l</sup><br>1/P1713 | <i>Yw</i> | <i>InR</i> <sup>3t5/el9</sup> | <i>PI3K92E</i><br>a/5w3 | <i>S6k</i> <sup>l</sup><br>1/P1713 | <i>Yw</i> |
| Sorbos totales                                       | 241.53                        | 376.97                  | 827.71                             | 547.55    | 90.67*                        | 129.02                  | 224.75                             | 513.58    |
| Sorbos por ráfaga de alimentación                    | 8.07                          | 7.49                    | 7.13                               | 8.17      | 5.92                          | 5.54                    | 4.65                               | 4.46      |
| # Ráfagas de actividad                               | 22.25*                        | 26.26                   | 77.55*                             | 40.46     | 8.69*                         | 17.42                   | 19.70                              | 22.68     |
| Duración de ráfagas de actividad                     | 7.63                          | 6.28                    | 6.09                               | 6.44      | 5.09*                         | 4.92                    | 4.69                               | 3.68      |
| # Ráfagas de alimentación                            | 29.79                         | 37.26                   | 101.29                             | 48.33     | 11.82                         | 25.64                   | 26.69                              | 54.57     |
| Duración de ráfagas de alimentación                  | 1.22*                         | 1.97                    | 1.36*                              | 2.26      | 1.15                          | 1.17                    | .91                                | .90       |
| Duración de intervalos entre ráfagas de actividad    | 53.16                         | 5.78                    | 4.63                               | 5.05      | 121.62*                       | 9.99                    | 19.89                              | 4.77      |
| Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación | 2.55                          | 5.70                    | 5.88                               | 2.39      | 19.33*                        | 1.83*                   | 4.83*                              | 1.09      |

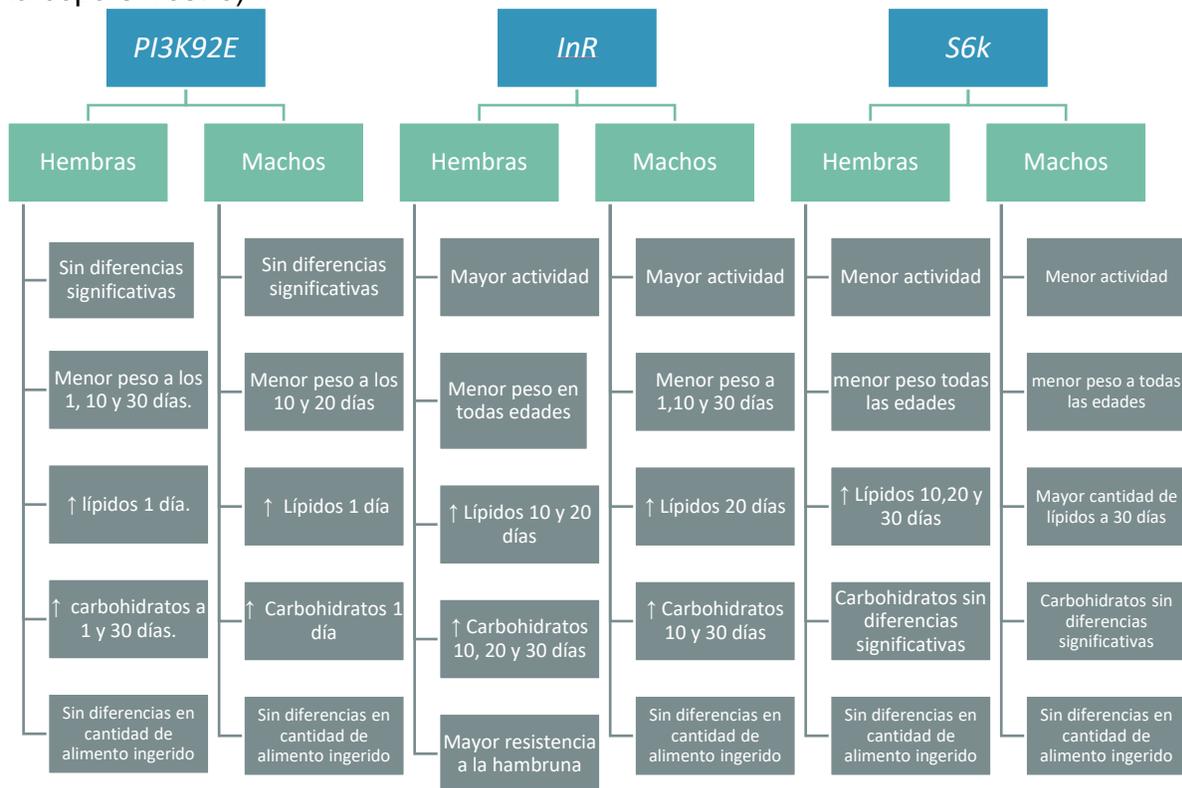
Para *InR* y *S6k*, las cepas que mostraron cambios claros y opuestos en los niveles de actividad también se midió la ingesta de alimento compuesto de piloncillo y levadura en la misma concentración que el alimento que suelen consumir en el laboratorio, sin colocarlas previamente en hambruna. El estudio del comportamiento alimenticio en mutantes de *InR* y *S6k* sin hambruna previa (**figuras 51 y 52**, apéndice A para *InR* y **figuras 83 y 84**, apéndice C para *S6k*), no mostró diferencias significativas entre el control y las moscas heteroalélicas.

Por último, el sometimiento de embriones o moscas adultas controles y mutantes de la vía de la insulina a condiciones estresantes de temperatura o radiación UV no tuvieron efecto en la expresión de Maf-S-GFP (**figura 35**).



**Figura 35.** Expresión de GFP en controles (izquierda) y mutantes de InR (derecha) tras exposición a UV por 1 h.

Se muestra a continuación un resumen de los resultados obtenidos (comparados con la cepa silvestre):



## 8. DISCUSIÓN

### **Sobre la Naturaleza de las Mutantes Estudiadas**

Los resultados que se muestran y se discuten a continuación tienen un par de limitantes: a pesar de contar con fondos genéticos homogenizados, estas cepas no son isogénicas, por lo que no se puede afirmar que todo el complemento genómico de estas cepas es idéntico. Sin embargo, dentro de lo posible y razonable, el fondo genético se uniformizó para poder tener comparaciones entre las diferentes mutantes. A pesar de eso, pueden existir diferencias debido a la posible distribución asimétrica debida a errores de muestreo, similar a la deriva génica, entre las cepas estudiadas, de uno o más posibles modificadores del fenotipo dentro del genoma de las cepas.

La otra limitante se debe a la naturaleza de las mutaciones empleadas. Por fuerza, se tiene que trabajar con mutaciones hipomórficas, que retienen algo de actividad, dado que mutaciones o condiciones nulas son letales, e imposibilitarían los experimentos. Por eso, el nivel de hipomorfismo entre las cepas de los diferentes genes estudiados es distinto, además de que los genes estudiados están a diferentes niveles de la vía y, por tanto, afectan de manera distinta a la actividad de la vía en general, y esto se puede reflejar en el fenotipo resultante. Sin embargo, representan una rica fuente de variación y de estudio, evidenciando su complejidad, y son una aproximación a la “norma de reacción” de todas las alteraciones que puedan encontrarse. Teniendo esto en cuenta, no se pueden generar conclusiones definitivas y particulares para cada mutante, y se debe de tomar más en cuenta efectos comunes en los fenotipos encontrados.

### **Niveles de movilidad**

Se ha observado que las hembras de *Drosophila* son más activas comparadas con los machos, y que esto está en parte correlacionado con la necesidad de buscar e ingerir más alimento para la producción de huevos (63). Este estudio también muestra mayores niveles de actividad generalizada en hembras. Se observó

también claramente una desregulación en el nivel de actividad de las cepas heteroalélicas, que se da de forma contraria entre las moscas mutantes de *InR*, que muestran mayor actividad, y machos y hembras mutantes de *S6k*, que muestran menor actividad comparados con la cepa control.

En el caso de la medición de actividad metabólica, estudios previos han observado que en moscas de edades avanzadas la eficiencia aeróbica disminuye y producen menos energía, pero el consumo de oxígeno permanece constante, por lo que la medición de liberación de CO<sub>2</sub> podría estar sujeta a las mismas limitantes, o diferencias sutiles podrían no evidenciarse con el grado de sensibilidad de nuestro equipo, dado que las moscas continúan moviéndose dentro del respirómetro (63). En efecto, la relación podría ser débil, ya que se observa una tendencia a una menor tasa metabólica en mutantes de *S6k*, que muestran menor actividad.

### **Peso corporal y niveles de lípidos y carbohidratos**

Los resultados del estudio de las mutantes de *InR* permiten observar un efecto más severo en peso y cantidad de carbohidratos comparado con las mutantes de *PI3K92E* y *S6k*; esta tendencia es de esperarse considerando que *InR* se encuentra antes en la vía de la insulina, por lo que defectos en su funcionamiento pueden tener consecuencias mayores en el funcionamiento de otros componentes a los que influye en la vía, además de *PI3K92E* y *S6k*.

Existe un patrón general en el peso y la cantidad de lípidos y carbohidratos en las moscas: muestran niveles más altos en los puntos intermedios medidos (10 y 20 días post-eclosión), y menores a los días 1 y 30 post-eclosión. Para las cepas analizadas el peso suele ser menor en las mutantes heteroalélicas. Los niveles de carbohidratos y lípidos varían en el tiempo con el mismo patrón entre mutantes heteroalélicos y controles pero se encuentran alterados los niveles de los mismos, siendo significativamente mayores en diferentes etapas de la vida del organismo. cuales son los cambios qué edad tiempo y que puede significar en la fisiología del

animal. Se observa que las edades a las que se dan diferencias significativas entre silvestres y mutantes no siempre coinciden entre machos y hembras. Esto indica que la manera en que las mutaciones en *InR*, *PI3K92E* y *S6k* afectan el metabolismo de ambos sexos difiere, teniendo efectos más intensos a diferentes edades para machos y hembras, lo que pone de relieve la necesidad de considerar la edad y sexo del organismo cuando se estudia el estado diabético y se investigan tratamientos para el mismo. Considerar la forma en que varían los niveles de carbohidratos y lípidos también contribuye con una base a partir de la cual estudiar cómo ambos factores pueden afectar las respuestas del organismo a diferentes condiciones. *PI3K92E* mostró defectos particularmente en el primer día post-eclosión, y para carbohidratos a los 30 días post-eclosión.

*InR* y *S6k* mostraron niveles significativamente elevados de carbohidratos y lípidos a edades posteriores al primer día post-eclosión. Si bien para los niveles de carbohidratos totales se ha observado que las mutantes heteroalélicas de *InR* presentaban los niveles más elevados, en el caso de los niveles de lípidos éstos se veían más alterados en las mutantes de *S6k*. Este resultado parecería estar en contradicción con lo que se ha observado en mamíferos, donde se observa que TOR-C1 controla positivamente el almacenamiento de lípidos mediante S6K1 (TOR inhibe la autofagia y la lipofagia, que se describió por primera vez en hepatocitos, donde la inhibición de la autofagia no alteró la síntesis de triglicéridos, pero disminuyó las tasas de lipólisis y de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos condujo a una acumulación de lípidos (67)). Si bien los ratones knock-out de S6K1 pueden mostrar menor cantidad de lípidos comparado con un grupo silvestre, este fenotipo parece ser dependiente de someter al animal a una dieta rica en grasas (68), es decir, las mutantes de S6K1 son resistentes a desarrollar obesidad, y en condiciones de alimentación normal no difieren del silvestre, por lo que es posible que en estas condiciones la actividad de 4E-BP y otros componentes de la vía insulina rescatan el fenotipo. Es importante notar que los mamíferos poseen dos cinasas S6K: S6K1 y S6K2 (69), y que los niveles de S6K2 se ven incrementados en los knock-outs de

S6K1, lo que podría compensar para mantener el fenotipo silvestre. Además, Scott *et. al* (70) argumentaron contra la visión prevaleciente del efecto negativo de S6K en la autofagia, ya que su estudio de mutantes nulas de S6K mostró que, si bien TOR tiene un efecto negativo en la autofagia y positivo en la actividad de S6K, S6K mismo parecía ser un activador de autofagia moderada en condiciones normales, y el efecto inhibitorio neto que TOR ejercía en la regulación de la autofagia ocurría principalmente mediante otros efectores. Nuestros resultados parecen concordar con el modelo de Scott *et. al.*: si S6K mismo es un activador de autofagia (y lipofagia), las mutaciones de *S6k* podrían llevar a una acumulación de lípidos como la que observamos. También podrían estar contribuyendo al incremento lipídico en las mutantes de *S6k* el menor nivel de actividad que muestran y el que su grado de alimentación no cambia con respecto al control.

Los insectos poseen células de origen ectodérmico, normalmente arregladas en agrupaciones en los segmentos abdominales, llamados oenocitos. Estas células tienen un papel en el crecimiento del organismo, la metamorfosis y la respiración, entre otros, y principalmente se ha estudiado su papel en el metabolismo de los lípidos. En *Drosophila* hay oenocitos especiales en la larva, que se desintegran y sus reservas lipídicas son usadas durante la metamorfosis. Se ha observado que los oenocitos de adultos, al igual que de las células del cuerpo graso del adulto o larva, responden ante la señalización de PI3K aumentando las reservas de lípidos cuando se tienen nutrientes. Sin embargo, los oenocitos de larva tienen una respuesta opuesta, donde la señalización de PI3K disminuye la reserva de lípidos. Es posible que los niveles altos de lípidos que observamos en moscas mutantes de *PI3K92E* recién eclosionadas, y que se pierde en los días siguientes, correspondan a los lípidos acumulados por la pérdida de señalización de PI3K en los oenocitos larvarios. La respuesta normal de los oenocitos a la inanición es similar al esteatosis fisiológica en mamíferos, con acumulación de lípidos en los hepatocitos como respuesta al ayuno, a diferencia de la mayoría de los otros tejidos, que tienden a perderlos (65, 66).

## Ritmo de Alimentación

Para regular la cantidad de alimento que consumen, en lugar de aumentar la duración de los sorbos ó acelerar la velocidad de alimentación ó el vigor de alimentación, al igual que los roedores, organizan las comidas en "ráfagas" y pueden reducir el intervalo entre las ráfagas. Después de un período de hambruna, la mosca primero está activa en la comida por períodos más largos y acorta los intervalos entre las ráfagas de alimentación. También aumenta la duración de las ráfagas de alimentación si la hambruna ha sido intensa (57).

En el caso del comportamiento de alimentación de las mutantes estudiadas, en condiciones de hambruna las hembras mutantes de *InR* interactúan menos con el alimento, aunque cuando lo hacen permanecen un mayor tiempo. No hay diferencias significativas en la duración de ráfagas de alimentación, pero el número de ráfagas tiende a la baja. En general, parecen interactuar menos con el alimento, en ráfagas más intensas, pero más distanciadas y menos frecuentes, consumiendo como resultado menos alimento que los controles y sin mostrar un patrón que se asemeje al de una mosca hambrienta. No hay diferencias significativas en la cantidad de alimento consumido en el resto de las moscas mutantes estudiadas en condiciones de hambruna. Hembras *PI3K92E* toman más sorbos por ráfagas, pero las ráfagas son más espaciadas y limitan el número de veces que interactúan con el alimento, incrementando el tiempo de estas interacciones. *S6k* muestra pocas diferencias. Los machos mutantes en general interactúan (entran en contacto) más con el alimento y tienen ráfagas de alimentación más largas, sin que ello se traduzca en una diferencia en la cantidad de alimento consumido. Esto indica que únicamente las mutantes de *InR* hembra son claramente resistentes a la hambruna (no se ven afectadas por un período de escasez de alimento en el mismo grado que el resto de las cepas). El estudio de la cantidad de alimento que comen las mutantes de *InR* y *S6k* sin hambruna y con un alimento similar al que normalmente consumen no mostró diferencias.

Las moscas criadas en el laboratorio que pasan por hambruna suprimen el sueño y aumentan la actividad, posiblemente en busca de alimento, al igual que los roedores hambrientos. En experimentos de selección de cepas con resistencia a la hambruna se ha observado una estrategia opuesta, donde las moscas disminuyen su nivel actividad para conservar energía (71). Eso llevó a pensar que el nivel de actividad incrementado en las mutantes de *InR* y la disminución en mutantes de *S6k* podría deberse a estas estrategias opuestas para lidiar con la percepción de falta de energía producto del desbalance energético producido en el estado diabético. Sin embargo, las mutantes de *InR* mostraron resistencia a la hambruna, en concordancia con estudios previos donde se afectaron las IPCs (células productoras de insulina) provocando un estado diabético (72). La falta de diferencias entre la cantidad de alimento ingerido sin hambruna previa, y la resistencia a la hambruna observada sólo en las hembras de *InR* parecen indicar que no hay una relación directa entre el estado nutricional de las moscas (o su percepción del mismo) y sus niveles de actividad.

### **Estrés Oxidativo**

La aproximación inicial para observar cambios en la expresión del reportero de Maf-S en mutantes de la vía de la insulina no arrojó resultados conclusivos. Maf-S se expresa de manera ubicua, aunque moderada, durante los estados embrionario y adulto (73). La exposición a luz UV o a altas temperaturas no pareció modificar su nivel de expresión. Si bien toda la luz UV puede provocar daño oxidativo, el rango de luz UV que provoca la mayor generación de ROS es el UV de onda larga (320-400 nm) y la lámpara utilizada emite UV de 302 nm (UV de onda media) (MacroVue UVis20, Hoefer); además, los niveles de expresión de Maf-S parecen ser más sensibles a cambios tras exposición a temperaturas bajas en comparación con temperaturas altas (73), por lo que no se puede descartar que la exposición no haya generado suficiente estrés oxidativo en las moscas. Una cuantificación de los niveles de estrés oxidativo provocados con los métodos utilizados puede corroborar que las condiciones necesarias para incitar una respuesta antioxidante clara se

están presentando, de lo contrario se pueden utilizar otros agentes oxidantes como paraquat o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Confirmada la generación de estrés oxidativo se puede proceder a cuantificar los niveles de Maf-S con un método más sensible para corroborar cambios de expresión.

En humanos, la obesidad (acumulación excesiva de grasa en el cuerpo) es uno de los factores que predispone el desarrollo de la resistencia a la insulina. Una vez que ésta se da, la inhabilidad del organismo de obtener glucosa de la sangre puede llevar a quemar las reservas de lípidos y músculo para obtener energía. En general, la observación de que las cepas mutantes de *InR* muestran niveles altos de lípidos en los días intermedios, con una disminución al día 30 post-eclosión, y niveles altos de carbohidratos en el día 30 post-eclosión para machos, y del día 10 post-eclosión en adelante en las hembras, podría indicar que en esta cepa mutante el fenotipo se asemeja al observado en humanos, observándose primero la acumulación de lípidos, seguida de aumento de carbohidratos y luego la pérdida de reservas lipídicas. Este patrón, acompañado de los altos niveles de actividad en estas mutantes, que puede asemejarse a las disrupciones que los pacientes diabéticos pueden presentar en los patrones de sueño, señalan que la cepa mutante de *InR* parece ser como el modelo más adecuado para continuar el estudio comparativo con la enfermedad humanos. Esto no limita el potencial de las cepas mutantes de *PI3K92E* y *S6k* para ser usadas en estudios complementarios, particularmente dado que los altos niveles de lípidos, pero no de carbohidratos en la cepa mutante de *S6k* podrían permitir el estudio del efecto de los niveles de lípidos en otros parámetros de interés para la descripción del fenotipo diabético, como el estrés oxidativo, desacoplado del efecto de los niveles de carbohidratos. A su vez, *PI3K92E* tiene el potencial de ser un nodo de la vía de la insulina a partir del cual ahondar en las diferencias en la regulación del metabolismo en el estadio larvario (dedicado al crecimiento del organismo y obtención de reservas) y adulto (enfocado en la reproducción) de *Drosophila* y otros insectos.

## 9. CONCLUSIONES

Se caracterizaron diferentes parámetros que se conocen son afectados durante la diabetes en tres líneas heteroalélicas mutantes de la vía de la insulina en *Drosophila melanogaster*, encontrándose que:

- Hay una tendencia al incremento de peso en moscas silvestres con la edad, y una disminución a los 30 días post-eclosión; las mutantes estudiadas pesan menos que sus contrapartes silvestres, aunque su peso varía con la misma tendencia.
- Los niveles de lípidos y carbohidratos en las mutantes no fueron constantes en la vida del organismo, comúnmente con picos a los 10 y 20 días post-eclosión, y mostraron dimorfismo sexual, con el fenotipo más exarcebado en hembras. En las mutantes de *InR* se observó el efecto más severo, particularmente en cantidad de carbohidratos. En mutantes de *PI3K92E* hubo menos cambios; particularmente se observaron niveles altos de lípidos y carbohidratos en los primeros días post-eclosión. En mutantes de *S6k* no hubo diferencias en los niveles de carbohidratos, pero los niveles de lípidos fueron más altos.
- Las hembras mutantes de *InR* mostraron una mayor resistencia a la hambruna.
- Las mutantes de *InR* son más activas, mientras que las mutantes de *S6k* son menos activas que sus contrapartes silvestres.

De estos resultados se desprende que la progresión de un fenotipo diabético que más se asemeje al descrito en humanos fue mejor caracterizado en la cepa mutante de *InR*, con la cepa mutante de *PI3K92E* mostrando el fenotipo más moderado y la cepa mutante de *S6k* mostrándose adecuada para el estudio de las consecuencias de una hiperlipidemia en el organismo.

## 10.LITERATURA CITADA

1. Temas de salud. Diabetes. (2016, October 13). Retrieved from [http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/es/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/)
2. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. (2016, October 13). Retrieved from <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
3. Otero-Moreno, D., Peña-Rangel, M. T., & Riesgo-Escovar, J. R. (2016). Crecimiento y Metabolismo: La regulación y la vía de la Insulina desde la Mosca de la Fruta, *Drosophila melanogaster*. *TIP*, *19*(2), 116-126.
4. Grönke, S., Clarke, D. F., Broughton, S., Andrews, T. D., & Partridge, L. (2010). Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. *PLoS genetics*, *6*(2), e1000857.
5. Teleman, A. A. (2010). Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochemical Journal*, *425*(1), 13-26.
6. Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., & Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current biology*, *11*(4), 213-221.
7. Lin, S., Marin, E.C., Yang, C.P., Kao, C.F., Apenteng, B.A., Huang, Y., O'Connor, M.B., Truman, J.W., Lee, T. (2013). Extremes of Lineage Plasticity in the *Drosophila* Brain. *Curr. Biol.* *23*(19): 1908--1913.
8. Biteau, B., Karpac, J., Supoyo, S., DeGennaro, M., Lehmann, R., & Jasper, H. (2010). Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS genetics*, *6*(10), e1001159.
9. LaFever, L., & Drummond-Barbosa, D. (2005). Direct control of germline stem cell division and cyst growth by neural insulin in *Drosophila*. *Science*, *309*(5737), 1071-1073.
10. Murillo-Maldonado, J. M., Sánchez-Chávez, G., Salgado, L. M., Salceda, R., & Riesgo-Escovar, J. R. (2011). *Drosophila* insulin pathway mutants affect

visual physiology and brain function besides growth, lipid, and carbohydrate metabolism. *Diabetes*, 60(5), 1632-1636.

11. Leever, S. J., Weinkove, D., MacDougall, L. K., Hafen, E., & Waterfield, M. D. (1996). The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *The EMBO journal*, 15(23), 6584-6594.
12. Williams, K. D., Busto, M., Suster, M. L., So, A. K. C., Ben-Shahar, Y., Leever, S. J., & Sokolowski, M. B. (2006). Natural variation in *Drosophila melanogaster* diapause due to the insulin-regulated PI3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43), 15911-15915.
13. Scott, R. C., Schuldiner, O., & Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental cell*, 7(2), 167-178.
14. Piracs, K., Nagy, P., Varga, A., Venkei, Z., Erdi, B., Hegedus, K., & Juhasz, G. (2012). Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*. *PloS one*, 7(8), e44214.
15. Radimerski, T., Montagne, J., Hemmings-Mieszczak, M., & Thomas, G. (2002). Lethality of *Drosophila* lacking TSC tumor suppressor function rescued by reducing dS6K signaling. *Genes & development*, 16(20), 2627-2632.
16. Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C., & Thomas, G. (1999). *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science*, 285(5436), 2126-2129.
17. Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
18. Matsuda, M., & Shimomura, I. (2013). Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity research & clinical practice*, 7(5), e330-e341.

19. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2003). Are Oxidative Stress- Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction?. *Diabetes*, 52(1), 1-8.
20. Ahmad, S.I., (2013) *Diabetes an old disease, a new insight*. Advances in Experimental Medicine and Biology Volume 771. New York, N.Y.: Springer-Verlag
21. Fantus, I. G., Goldberg, H. J., & Whiteside, C. I. (2006). The hexosamine biosynthesis pathway. In *The Diabetic Kidney* (pp. 117-133). Humana Press.
22. Hotamisligil, G. S. (2003). Inflammatory pathways and insulin action. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders*, 27.
23. Ahmad, S.I., (2013) *Diabetes an old disease, a new insight*. Advances in Experimental Medicine and Biology Volume 771. New York, N.Y.: Springer-Verlag.
24. Dandona, P., Aljada, A., & Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in immunology*, 25(1), 4-7.
25. Löbner, K., & Füchtenbusch, M. (2004). [Inflammation and diabetes]. *MMW Fortschritte der Medizin*, 146(35-36), 32-3.
26. Donath, M. Y. (2014). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nature reviews Drug discovery*, 13(6), 465-476.
27. Lee, J. M., Li, J., Johnson, D. A., Stein, T. D., Kraft, A. D., Calkins, M. J., ... & Johnson, J. A. (2005). Nrf2, a multi-organ protector?. *The FASEB Journal*, 19(9), 1061-1066.
28. Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in molecular medicine*, 10(11), 549-557.
29. Sykiotis, G. P., & Bohmann, D. (2008). Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Developmental cell*, 14(1), 76-85.

30. Kannan, M. B., Solovieva, V., & Blank, V. (2012). The small MAF transcription factors MAFF, MAFG and MAFK: current knowledge and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(10), 1841-1846.
31. Katsuoka, F., Motohashi, H., Ishii, T., Aburatani, H., Engel, J. D., & Yamamoto, M. (2005). Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. *Molecular and cellular biology*, 25(18), 8044-8051
32. Teleman, A. A. (2010). Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochemical Journal*, 425(1), 13-26.
33. Musselman, L. P., Fink, J. L., Narzinski, K., Ramachandran, P. V., Hathiramani, S. S., Cagan, R. L., & Baranski, T. J. (2011). A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease models & mechanisms*, 4(6), 842-849.
34. Buch, S., Melcher, C., Bauer, M., Katzenberger, J. and Pankratz, M. J. (2008). Opposing effects of dietary protein and sugar regulate a transcriptional target of *Drosophila* insulin-like peptide signaling. *Cell Metab.* 7, 321-332.
35. Morris, S. N. S., Coogan, C., Chamseddin, K., Fernandez-Kim, S. O., Kolli, S., Keller, J. N., & Bauer, J. H. (2012). Development of diet-induced insulin resistance in adult *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(8), 1230-1237.
36. Grandison, R. C., Piper, M. D., & Partridge, L. (2009). Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature*, 462(7276), 1061-4. Bruce, K. D., Hoxha, S., Carvalho, G. B., Yamada, R., Wang, H. D., Karayan, P., ... & William, W. J. (2013). High carbohydrate–low protein consumption maximizes *Drosophila* lifespan. *Experimental gerontology*, 48(10), 1129-1135.
37. Lee, K. P. (2015). Dietary protein: carbohydrate balance is a critical modulator of lifespan and reproduction in *Drosophila melanogaster*: a test using a chemically defined diet. *Journal of insect physiology*, 75, 12-19.

38. Skorupa, D. A., Dervisevendic, A., Zwiener, J., & Pletcher, S. D. (2008). Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging cell*, 7(4), 478-490.
39. Melvin, R. G., Van Voorhies, W. A., & Ballard, J. W. O. (2007). Working harder to stay alive: metabolic rate increases with age in *Drosophila simulans* but does not correlate with life span. *Journal of insect physiology*, 53(12), 1300-1306.
40. Broughton, S. J., Piper, M. D., Ikeya, T., Bass, T. M., Jacobson, J., Drieger, Y., ... & Partridge, L. (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 3105-3110.
41. Grönke, S., Clarke, D. F., Broughton, S., Andrews, T. D., & Partridge, L. (2010). Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. *PLoS genetics*, 6(2), e1000857.
42. Alfa, R. W., & Kim, S. K. (2016). Using *Drosophila* to discover mechanisms underlying type 2 diabetes. *Disease models & mechanisms*, 9(4), 365-376.
43. Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., & White, M. F. (2000). The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 9047-9054.
44. Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(1), 21-35
45. DiAngelo, J. R., Bland, M. L., Bambina, S., Cherry, S., & Birnbaum, M. J. (2009). The immune response attenuates growth and nutrient storage in *Drosophila* by reducing insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49), 20853-20858.

46. Biteau, B., Karpac, J., Supoyo, S., DeGennaro, M., Lehmann, R., & Jasper, H. (2010). Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS genetics*, 6(10), e1001159.
47. Karpac, J., Biteau, B., & Jasper, H. (2013). Misregulation of an adaptive metabolic response contributes to the age-related disruption of lipid homeostasis in *Drosophila*. *Cell reports*, 4(6), 1250-1261.
48. Fuse, Y., & Kobayashi, M. (2017). Conservation of the Keap1-Nrf2 System: An Evolutionary Journey through Stressful Space and Time. *Molecules*, 22(3), 436.
49. Gems, D., & Partridge, L. (2008). Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". *Cell metabolism*, 7(3), 200-203.
50. Partridge, L., & Gems, D. (2002). Mechanisms of aging: public or private?. *Nature Reviews Genetics*, 3(3), 165-175.
51. Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 6(3), 456-80.
52. Hyun-Ae Seo and In-Kyu Lee, "The Role of Nrf2: Adipocyte Differentiation, Obesity, and Insulin Resistance," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, Article ID 184598, 7 pages, 2013. doi:10.1155/2013/184598
53. Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., ... & Motohashi, H. (2012). Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer cell*, 22(1), 66-79.
54. Greenspan R. 2004. Fly Pushing: The Theory and Practice of *Drosophila* Genetics, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA
55. TriKinetics. Locomotor Activity Monitoring Systems for biological research (2016, October 13). Retrieved from <http://www.trikinetics.com/>
56. Yatsenko, A. S., Marrone, A. K., Kucherenko, M. M., & Shcherbata, H. R. (2014). Measurement of metabolic rate in *Drosophila* using respirometry. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (88)
57. Van Handel E. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 1985;1:299 – 301.

58. Van Handel E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 1985;1:302 – 304
59. Itskov, P. M., Moreira, J. M., Vinnik, E., Lopes, G., Safarik, S., Dickinson, M. H., & Ribeiro, C. (2014). Automated monitoring and quantitative analysis of feeding behaviour in *Drosophila*. *Nature communications*, 5, 4560.
60. Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., ... & Eckel, R. H. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, 308(5724), 1043-1045.
61. Gale, J. E., Cox, H. I., Qian, J., Block, G. D., Colwell, C. S., & Matveyenko, A. V. (2011). Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction. *Journal of biological rhythms*, 26(5), 423-433.
62. Ferguson, C. T., O'Neill, T. L., Audsley, N., & Isaac, R. E. (2015). The sexually dimorphic behaviour of adult *Drosophila suzukii*: elevated female locomotor activity and loss of siesta is a post-mating response. *Journal of experimental biology*, 218(23), 3855-3861.
63. Bohni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss, BF, Beckingham, K, Hafen, E. 1999. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97(7): 865--875.
64. Makki, R., Cinnamon, E., y Gould, A. P. (2014). El desarrollo y las funciones de los oenocytes. *Revisión anual de entomología*, 59, 405-425.
65. Cinnamon, E., Makki, R., Sawala, A., Wickenberg, L. P., Blomquist, G. J., Tittiger, C., ... & Gould, A. P. (2016). *Drosophila* Spidey/Kar regulates oenocyte growth via PI3-kinase signaling. *PLoS genetics*, 12(8), e1006154.
66. Dong, H., & Czaja, M. J. (2011). Regulation of lipid droplets by autophagy. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(6), 234-240.
67. Lamming DW, Sabatini DM. A central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell metabolism*. 2013;18(4):10.1016/j.cmet.2013.08.002. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.002.

68. Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., ... & Thomas, G. (2004). S6K1<sup>-/-</sup>/S6K2<sup>-/-</sup> mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and cellular biology*, 24(8), 3112-3124.
69. Scott, R. C., Schuldiner, O., & Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Developmental cell*, 7(2), 167-178.
70. Masek, P., Reynolds, L. A., Bollinger, W. L., Moody, C., Mehta, A., Murakami, K., ... & Keene, A. C. (2014). Altered regulation of sleep and feeding contribute to starvation resistance in Drosophila. *Journal of Experimental Biology*, jeb-103309.
71. Broughton, S. J., Piper, M. D., Ikeya, T., Bass, T. M., Jacobson, J., Drieger, Y., ... & Partridge, L. (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in Drosophila from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 3105-3110.
72. Maf-S, Flybase (2018, September) Retrieved from <http://flybase.org/reports/FBgn0034534>

# Apéndice A

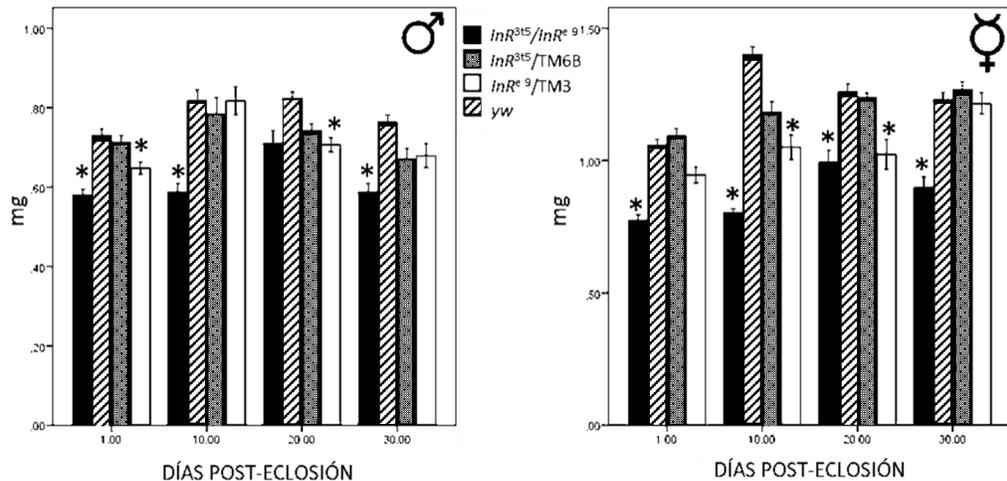
Descripción de mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*

**Tabla 6.** Peso promedio  $\pm$  SEM para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

|                    | PESO (mg)                    |                            |                            |                  |
|--------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|
| Días post-eclosión | <i>InR<sup>3t5/eI9</sup></i> | <i>InR<sup>3t5/+</sup></i> | <i>InR<sup>eI9/+</sup></i> | <i>yw</i>        |
| 1                  | .580 $\pm$ 0.015*            | .713 $\pm$ .097            | .648 $\pm$ .085*           | .731 $\pm$ .016  |
| 10                 | .588 $\pm$ .021*             | .783 $\pm$ .043            | .818 $\pm$ .035            | .817 $\pm$ .028  |
| 20                 | .71 $\pm$ .032               | .743 $\pm$ .017            | .707 $\pm$ .018*           | .824 $\pm$ .016  |
| 30                 | .588 $\pm$ .022*             | .671 $\pm$ .025            | .752 $\pm$ .037            | .763 $\pm$ .0190 |

**Tabla 7.** Peso promedio  $\pm$  SEM para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

|                    | PESO (mg)                    |                            |                            |                  |
|--------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|
| Días post-eclosión | <i>InR<sup>3t5/eI9</sup></i> | <i>InR<sup>3t5/+</sup></i> | <i>InR<sup>eI9/+</sup></i> | <i>Yw</i>        |
| 1                  | .774 $\pm$ .021*             | 1.093 $\pm$ .028           | .946 $\pm$ 0.029           | 1.504 $\pm$ .057 |
| 10                 | .802 $\pm$ .017*             | 1.182 $\pm$ .041           | 1.051 $\pm$ .046*          | 1.400 $\pm$ .030 |
| 20                 | .994 $\pm$ .045*             | 1.237 $\pm$ .018           | 1.024 $\pm$ .057*          | 1.259 $\pm$ .031 |
| 30                 | .898 $\pm$ 0.394*            | 1.268 $\pm$ .030           | 1.216 $\pm$ .041           | 1.229 $\pm$ .029 |



**Figura 36.** Peso promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw* (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Las barras error representan el error estándar.

**Tabla 8.** Medianas de niveles de carbohidratos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

| CARBOHIDRATOS (µg) POR MG DE PESO |                              |                            |                            |       |
|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| Días post-eclosión                | <i>InR<sup>3t5/eI9</sup></i> | <i>InR<sup>3t5/+</sup></i> | <i>InR<sup>eI9/+</sup></i> | Yw    |
| 1                                 | 18.56                        | 28.21                      | 17.63                      | 31.03 |
| 10                                | 164.18                       | 124.75                     | 121.96                     | 67.46 |
| 20                                | 79.01                        | 155.85*                    | 216.39*                    | 36.63 |
| 30                                | 42.51*                       | 101.30                     | 79.24                      | 59.73 |

**Tabla 9.** Medianas de niveles de carbohidratos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

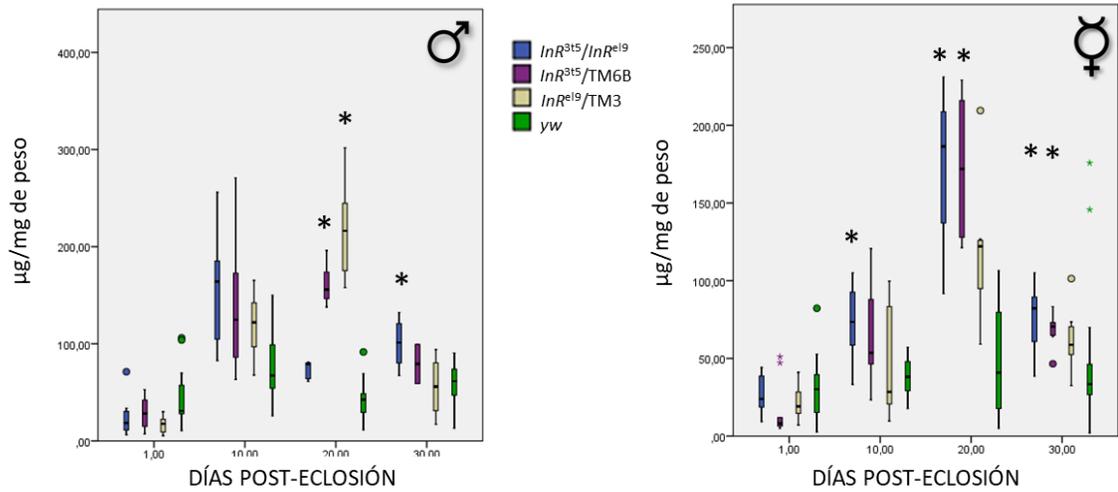
| CARBOHIDRATOS (µg) POR MG DE PESO |                              |                            |                            |       |
|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| Días post-eclosión                | <i>InR<sup>3t5/eI9</sup></i> | <i>InR<sup>3t5/+</sup></i> | <i>InR<sup>eI9/+</sup></i> | Yw    |
| 1                                 | 23.92                        | 8.15                       | 19.13                      | 30.22 |
| 10                                | 73.44*                       | 53.6                       | 28.45                      | 38.16 |
| 20                                | 186.39*                      | 172.00*                    | 122.12                     | 40.86 |
| 30                                | 82.7047*                     | 70.47*                     | 58.77                      | 33.45 |

**Tabla 10.** Medianas de niveles de lípidos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

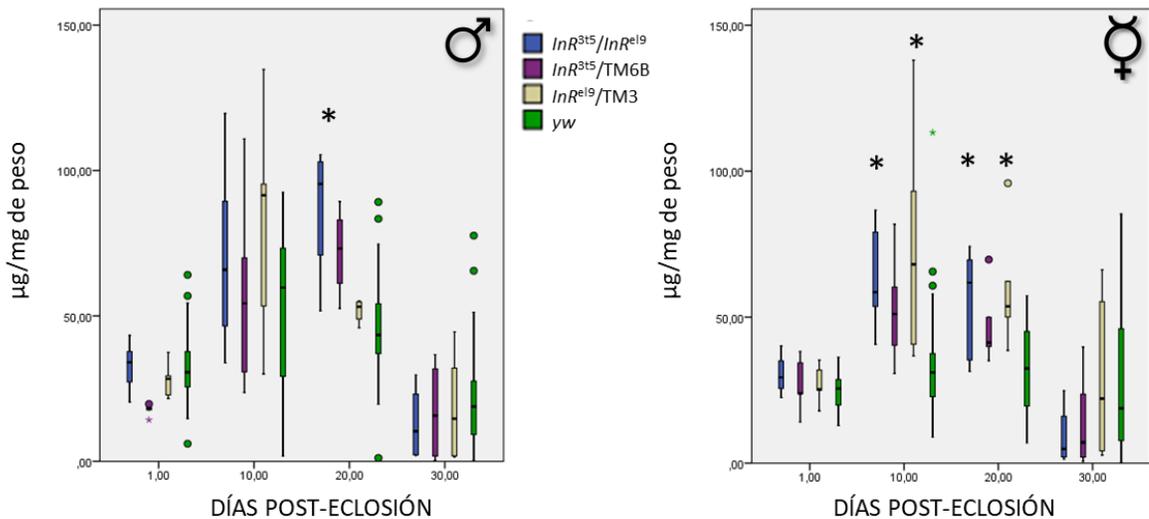
| LÍPIDOS (µg) POR MG DE PESO |                              |                            |                            |       |
|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| Días post-eclosión          | <i>InR<sup>3t5/eI9</sup></i> | <i>InR<sup>3t5/+</sup></i> | <i>InR<sup>eI9/+</sup></i> | Yw    |
| 1                           | 34.05                        | 18.27                      | 28.36                      | 30.61 |
| 10                          | 65.89                        | 54.32                      | 91.49                      | 59.72 |
| 20                          | 95.35*                       | 73.19                      | 53.18                      | 43.42 |
| 30                          | 10.36                        | 15.77                      | 14.68                      | 18.83 |

**Tabla 11.** Medianas de niveles de lípidos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

| LÍPIDOS (µg) POR MG DE PESO |                              |                            |                            |       |
|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| Días post-eclosión          | <i>InR<sup>3t5/eI9</sup></i> | <i>InR<sup>3t5/+</sup></i> | <i>InR<sup>eI9/+</sup></i> | Yw    |
| 1                           | 29.39                        | 23.90                      | 25.23                      | 25.55 |
| 10                          | 58.55*                       | 51.10                      | 68.09*                     | 31.06 |
| 20                          | 61.82*                       | 41.30                      | 53.70*                     | 32.44 |
| 30                          | 4.89                         | 22.13                      | 7.11                       | 18.80 |



**Figura 37.** Niveles de carbohidratos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El \* negro denota diferencias significativas con respecto al control silvestre. Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ . Para todos los boxplots, la caja representa el rango intercuartil (IQ) que contiene el 50% medio de los registros. La línea que la cruza es la mediana. Los bigotes (líneas en forma de T) se extienden hasta los valores más altos y más bajos que no son mayores que 1,5 veces el rango IQ. Los valores atípicos son casos con valores entre 1.5 y 3 veces el rango de IQ (círculos), o más de 3 veces (asteriscos de color).



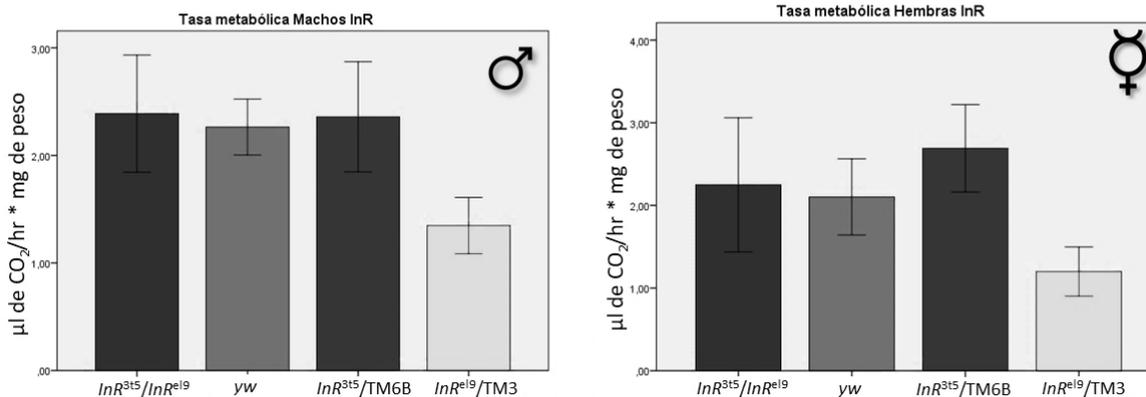
**Figura 38.** Niveles de lípidos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.

**Tabla 12.** Parámetros de actividad para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR* (promedio ± SEM). Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

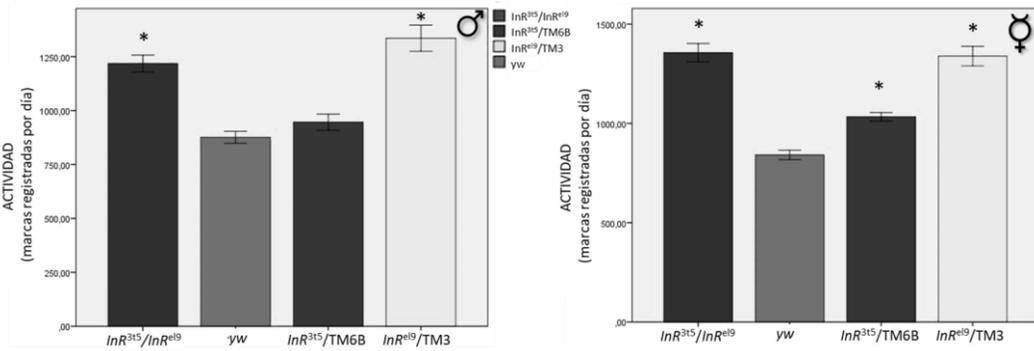
|   | NIVELES DE ACTIVIDAD         |                            |                            |              |
|---|------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
|   | <i>InR<sup>3t5/eI9</sup></i> | <i>InR<sup>3t5/+</sup></i> | <i>InR<sup>eI9/+</sup></i> | <i>Yw</i>    |
| Producción de CO <sub>2</sub> (µl CO <sub>2</sub> /hr*mg de peso) | 2.39± .54                    | 2.36± .51                  | 1.3476± .26                | 2.26± .26    |
| Períodos de sueño durante el día                                  | 705.8±84.64*                 | 856.96±75.43               | 858.77±94.80               | 936.21±53.93 |

**Tabla 13.** Parámetros de actividad para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR* (promedio ± SEM). Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

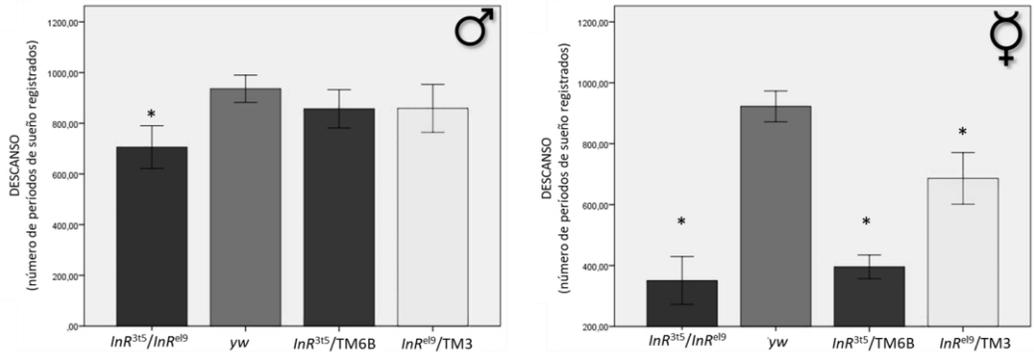
|   | NIVELES DE ACTIVIDAD         |                            |                            |              |
|---|------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
|   | <i>InR<sup>3t5/eI9</sup></i> | <i>InR<sup>3t5/+</sup></i> | <i>InR<sup>eI9/+</sup></i> | <i>Yw</i>    |
| Producción de CO <sub>2</sub> (µl CO <sub>2</sub> /hr*mg de peso) | 1.86±.32                     | 1.54±.39                   | 2.63±.45                   | 1.86±.32     |
| Períodos de sueño durante el día                                  | 350.84±78.44*                | 395.62±38.91*              | 686.06±84.74*              | 922.42±50.72 |



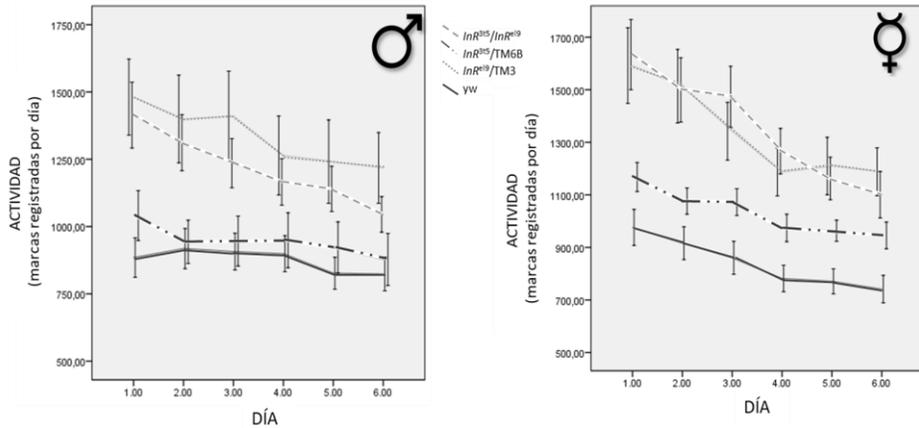
**Figura 39.** Tasa metabólica promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw* (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Las barras error representan el error estándar.



**Figura 40.** Actividad promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw* (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Las barras error representan el error estándar.



**Figura 41.** Descanso promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw* (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Las barras error representan el error estándar.



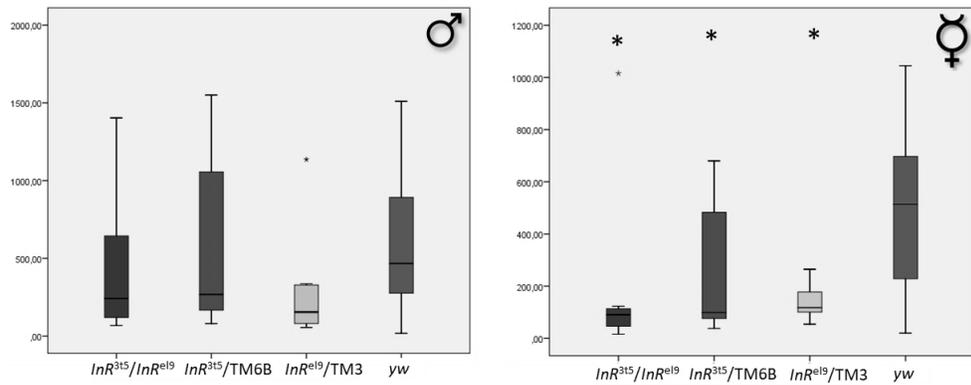
**Figura 42.** Actividad por día para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. Barras: error estándar.

**Tabla 14.** Parámetros de alimentación para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*, medianas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

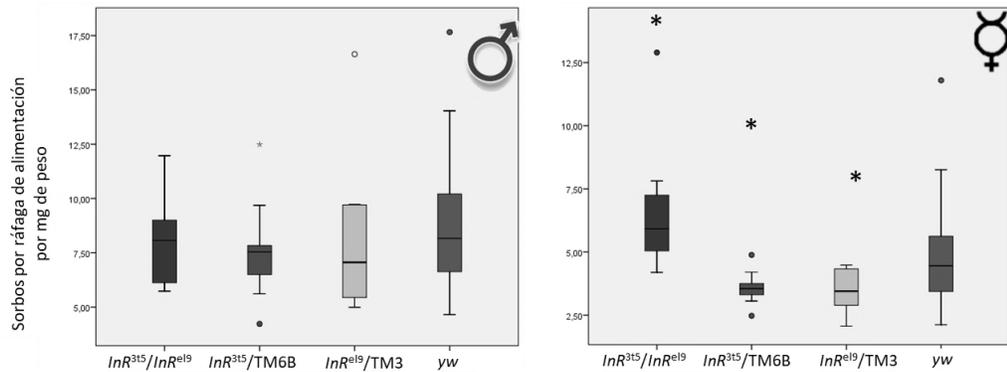
| ALIMENTACIÓN   |                               |                             |                             |           |
|--|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|
|  | <i>InR</i> <sup>3t5/el9</sup> | <i>InR</i> <sup>3t5/+</sup> | <i>InR</i> <sup>el9/+</sup> | <i>Yw</i> |
| Sorbos totales                                       | 241.53                        | 267.81                      | 1544.46                     | 467.06    |
| Sorbos por ráfaga de alimentación                    | 8.07                          | 7.54                        | 7.06                        | 8.17      |
| # Ráfagas de actividad                               | 22.25                         | 22.0                        | 13.8*                       | 40.46     |
| Duración de ráfagas de actividad                     | 7.63                          | 6.08                        | 5.23*                       | 6.44      |
| # Ráfagas de alimentación                            | 29.79                         | 27.53                       | 15.76                       | 48.33     |
| Duración de ráfagas de alimentación                  | 1.22*                         | 1.69*                       | 1.66*                       | 2.26      |
| Duración de intervalos entre ráfagas de actividad    | 53.16                         | 2.12                        | 33.68                       | 5.05      |
| Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación | 2.55                          | 1.58                        | 5.33                        | 2.39      |

**Tabla 15.** Parámetros de alimentación para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*, medianas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

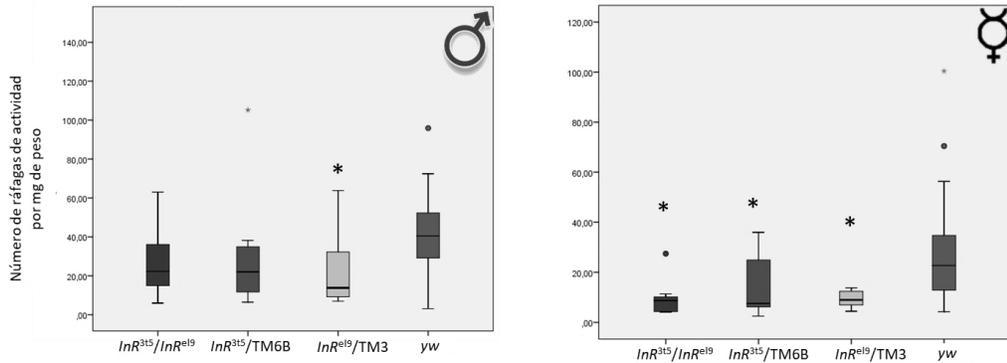
| ALIMENTACIÓN   |                               |                             |                             |           |
|--|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|
|  | <i>InR</i> <sup>3t5/el9</sup> | <i>InR</i> <sup>3t5/+</sup> | <i>InR</i> <sup>el9/+</sup> | <i>Yw</i> |
| Sorbos totales                                       | 90.67*                        | 90.38*                      | 117.19*                     | 382.08    |
| Sorbos por ráfaga de alimentación                    | 5.92*                         | 3.56*                       | 3.45*                       | 4.46      |
| # Ráfagas de actividad                               | 8.69*                         | 7.57*                       | 8.98*                       | 22.68     |
| Duración de ráfagas de actividad                     | 5.09*                         | 3.50                        | 2.84                        | 3.68      |
| # Ráfagas de alimentación                            | 11.82                         | 11.76                       | 12.71                       | 54.57     |
| Duración de ráfagas de alimentación                  | 1.15                          | .74                         | .75*                        | .90       |
| Duración de intervalos entre ráfagas de actividad    | 121.62*                       | 6.33                        | 36.53                       | 4.77      |
| Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación | 19.33*                        | .94                         | 1.48                        | 1.09      |



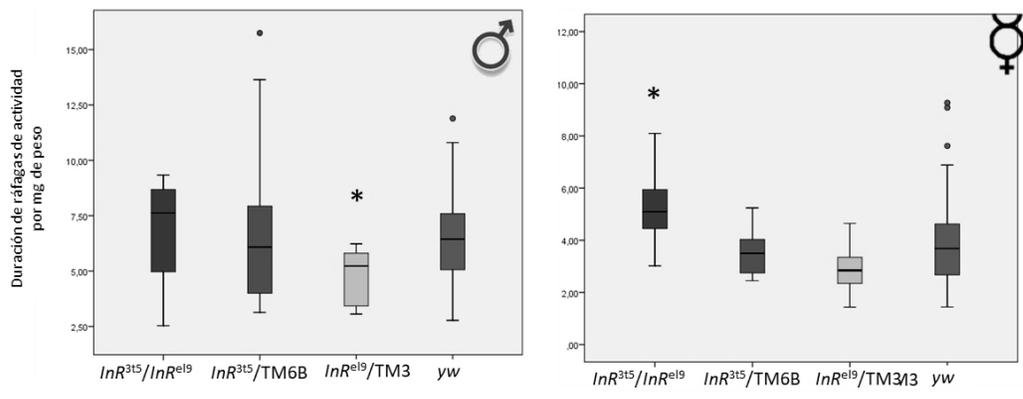
**Figura 43.** Número de sorbos por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.



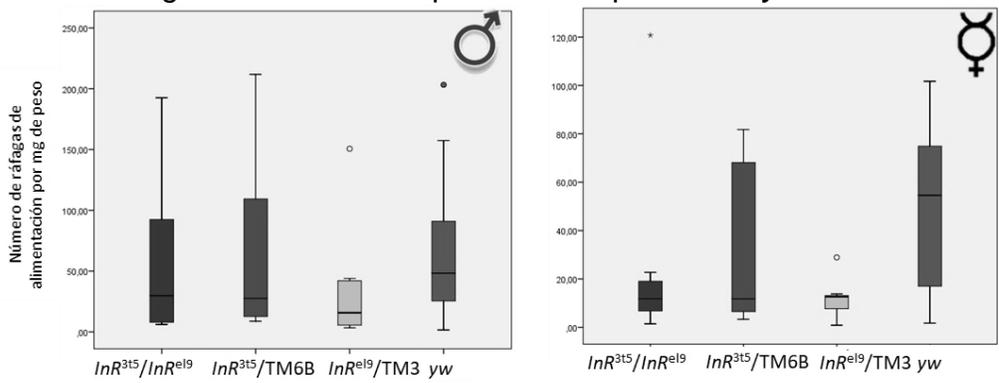
**Figura 44.** Sorbos por ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.



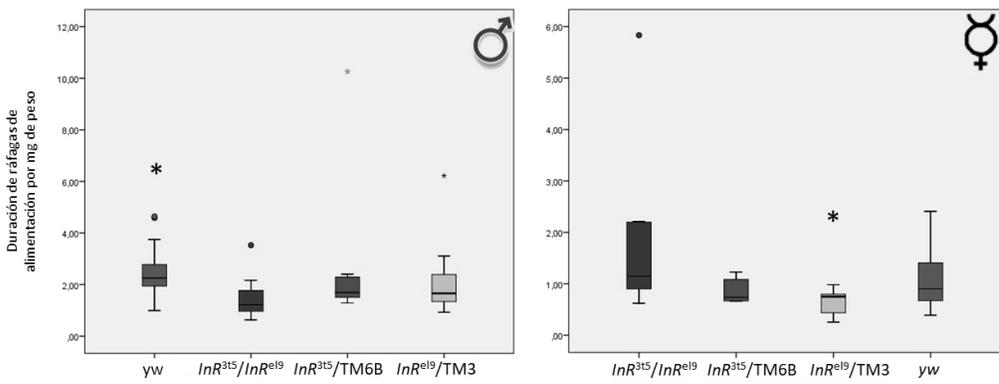
**Figura 45.** Número de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.



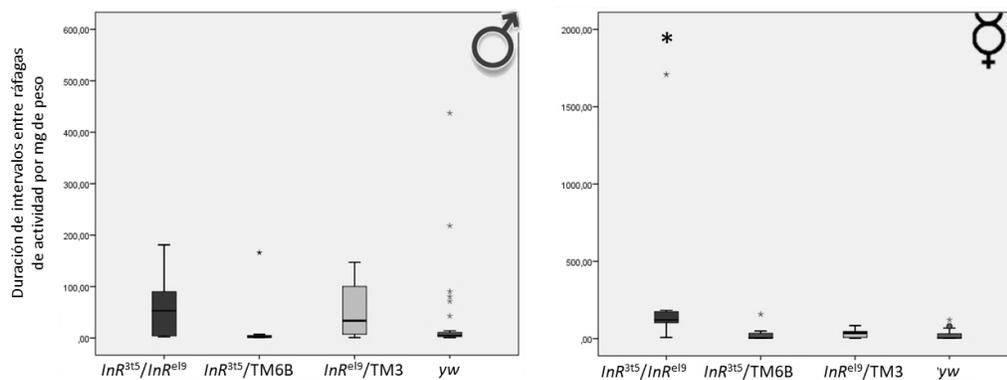
**Figura 46.** Duración de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.



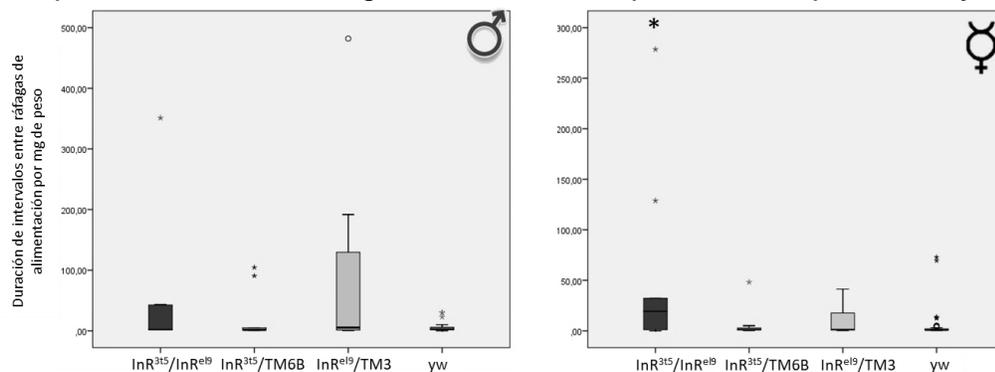
**Figura 47.** Número de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*.



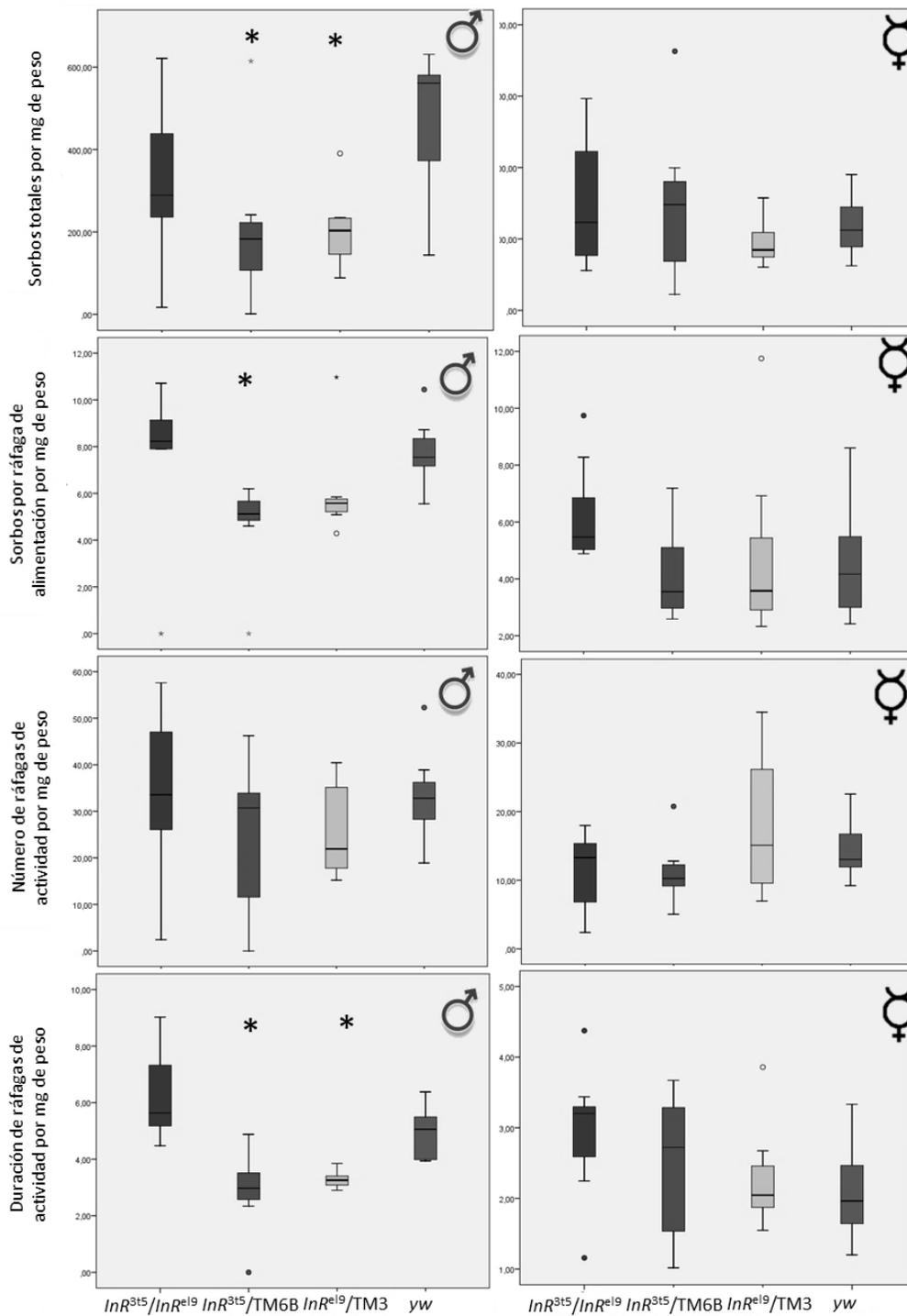
**Figura 48.** Duración de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.



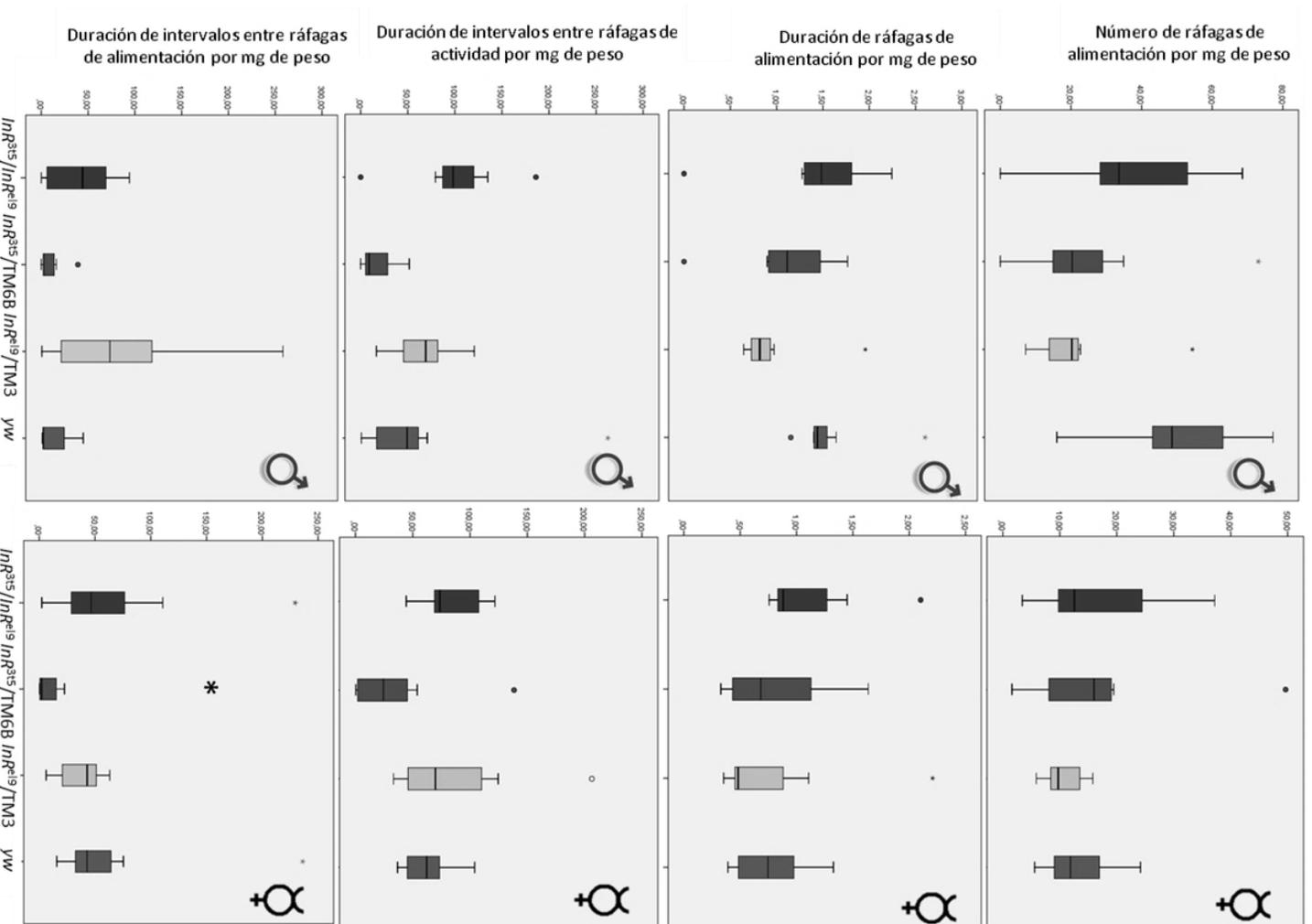
**Figura 49.** Duración de intervalos entre ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.



**Figura 50.** Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.



**Figura 51.** Comportamiento de alimentación para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *InR*. Alimento: Levadura al 10%, piloncillo al 10% en agar al 1%. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*. N=8



**Figura 52.** Comportamiento de alimentación para machos y hembras mutantes heterocigotas y heterocigotas de *InR*. Alimento: Levadura al 10%, pioncillo al 10% en agar al 1%. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*. N=8

## Apéndice B

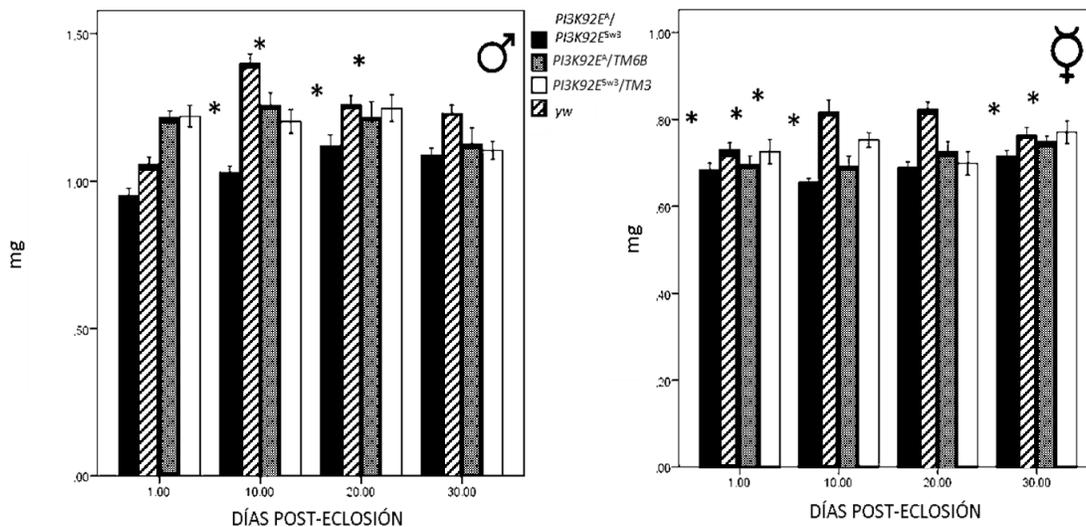
Descripción de mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*

**Tabla 16.** Peso promedio  $\pm$  SEM para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

| Días post-eclosión | PESO (mg)                      |                              |                                |                 |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------|
|                    | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>A/+</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>5w3/+</sup></i> | Yw              |
| 1                  | .684 $\pm$ .016                | .696 $\pm$ .021              | .726 $\pm$ .021                | .731 $\pm$ .016 |
| 10                 | .656 $\pm$ .008*               | .692 $\pm$ .023*             | .753 $\pm$ .017                | .817 $\pm$ .028 |
| 20                 | .689 $\pm$ .013*               | .727 $\pm$ .022*             | .699 $\pm$ .027                | .824 $\pm$ .016 |
| 30                 | .715 $\pm$ .014                | .748 $\pm$ .013              | .771 $\pm$ .026                | .763 $\pm$ .019 |

**Tabla 17.** Peso promedio  $\pm$  SEM para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*.

| Días post-eclosión | PESO (mg)                      |                              |                                |                  |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------|
|                    | <i>PI3K92E<sup>A/5w3</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>A/+</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>5w3/+</sup></i> | Yw               |
| 1                  | .950 $\pm$ .025*               | 1.215 $\pm$ .023*            | 1.220 $\pm$ .037*              | 1.504 $\pm$ .057 |
| 10                 | 1.029 $\pm$ .022*              | 1.257 $\pm$ .042             | 1.202 $\pm$ .040               | 1.400 $\pm$ .030 |
| 20                 | 1.119 $\pm$ .038               | 1.216 $\pm$ .052             | 1.246 $\pm$ .045               | 1.259 $\pm$ .031 |
| 30                 | 1.086 $\pm$ .024*              | 1.126 $\pm$ .054*            | 1.104 $\pm$ .030               | 1.229 $\pm$ .029 |



**Figura 53.** Peso promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control yw (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Las barras error representan el error estándar.

**Tabla 18.** Medianas de niveles de carbohidratos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

| CARBOHIDRATOS ( $\mu\text{g}$ ) POR MG DE PESO |                                |                              |                                |       |
|--|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------|
| Días post-eclosión                             | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>A/+</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>5w3/+</sup></i> | Yw    |
| 1  | 66.65*                         | 42.42                        | 42.51                          | 31.03 |
| 10   | 51.78                          | 82.44                        | 77.61                          | 67.46 |
| 20   | 50.56                          | 66.42*                       | 54.50                          | 36.63 |
| 30   | 81.50*                         | 54.48                        | 52.92                          | 59.73 |

**Tabla 19.** Medianas de niveles de carbohidratos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

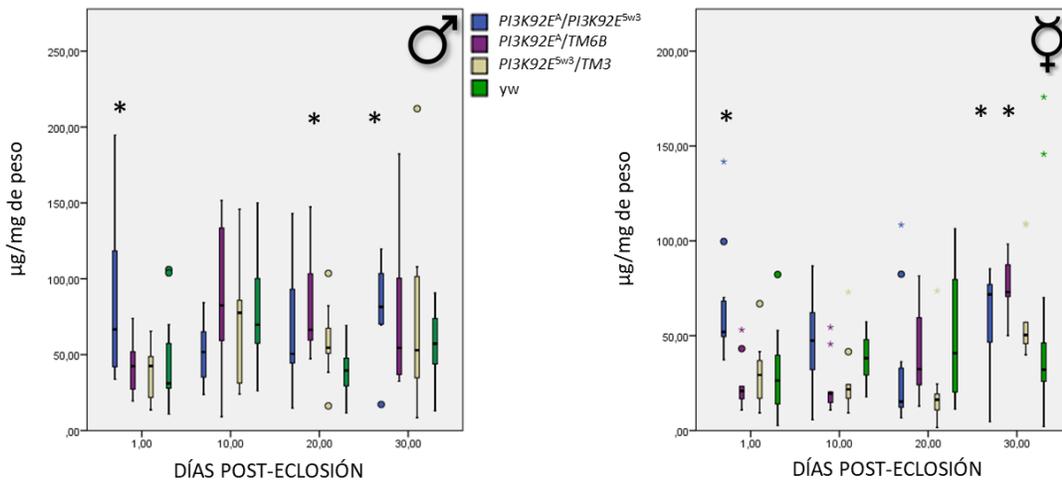
| CARBOHIDRATOS ( $\mu\text{g}$ ) POR MG DE PESO |                                |                              |                                |       |
|--|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------|
| Días post-eclosión                             | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>A/+</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>5w3/+</sup></i> | Yw    |
| 1  | 51.96*                         | 20.82                        | 29.32                          | 30.22 |
| 10   | 47.48                          | 19.46                        | 21.73                          | 38.16 |
| 20   | 15.26                          | 32.36                        | 16.27                          | 40.86 |
| 30   | 71.79*                         | 72.98*                       | 50.39                          | 33.45 |

**Tabla 20.** Medianas de niveles de lípidos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

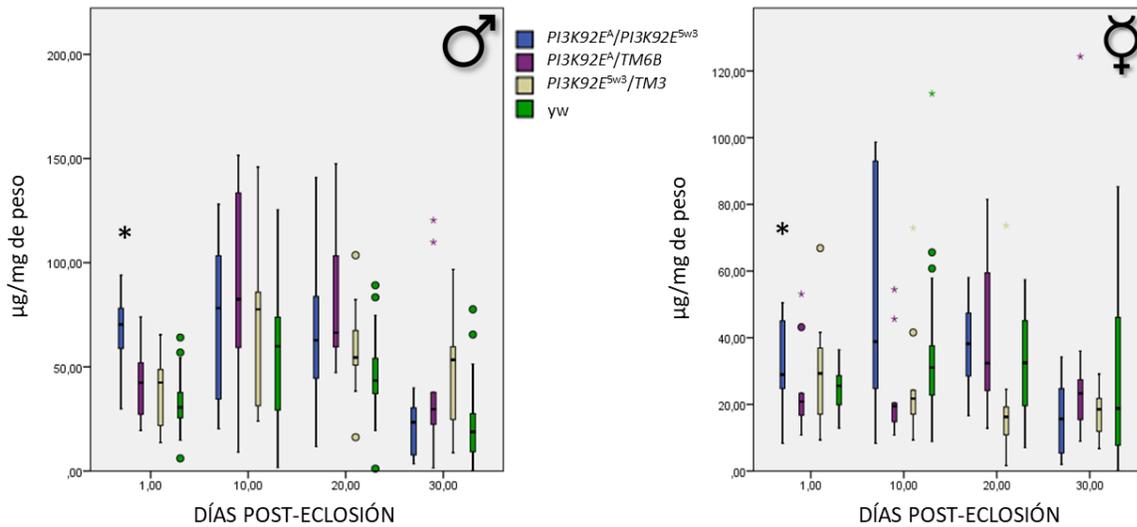
| LÍPIDOS ( $\mu\text{g}$ ) POR MG DE PESO |                                |                              |                                |       |
|--|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------|
| Días post-eclosión                       | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>A/+</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>5w3/+</sup></i> | Yw    |
| 1  | 70.35*                         | 42.42                        | 42.51                          | 30.61 |
| 10                                       | 78.21                          | 82.44                        | 77.61                          | 59.72 |
| 20                                       | 62.78                          | 66.42                        | 54.5                           | 43.42 |
| 30                                       | 23.47                          | 29.68                        | 53.35                          | 18.83 |

**Tabla 21.** Medianas de niveles de lípidos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

| LÍPIDOS ( $\mu\text{g}$ ) POR MG DE PESO |                                |                              |                                |       |
|--|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------|
| Días post-eclosión                       | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>A/+</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>5w3/+</sup></i> | yw    |
| 1  | 28.92*                         | 20.82                        | 29.32                          | 25.55 |
| 10                                       | 38.85                          | 19.46                        | 21.73                          | 31.06 |
| 20                                       | 38.2                           | 32.36                        | 16.27                          | 32.44 |
| 30                                       | 15.66                          | 23.28                        | 18.50                          | 18.80 |



**Figura 54.** Niveles de carbohidratos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. El \* negro denota diferencias significativas con respecto al control silvestre. Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ . Para todos los boxplots, la caja representa el rango intercuartil (IQ) que contiene el 50% medio de los registros. La línea que la cruza es la mediana. Los bigotes (líneas en forma de T) se extienden hasta los valores más altos y más bajos que no son mayores que 1,5 veces el rango IQ. Los valores atípicos son casos con valores entre 1.5 y 3 veces el rango de IQ (círculos), o más de 3 veces (asteriscos de color).



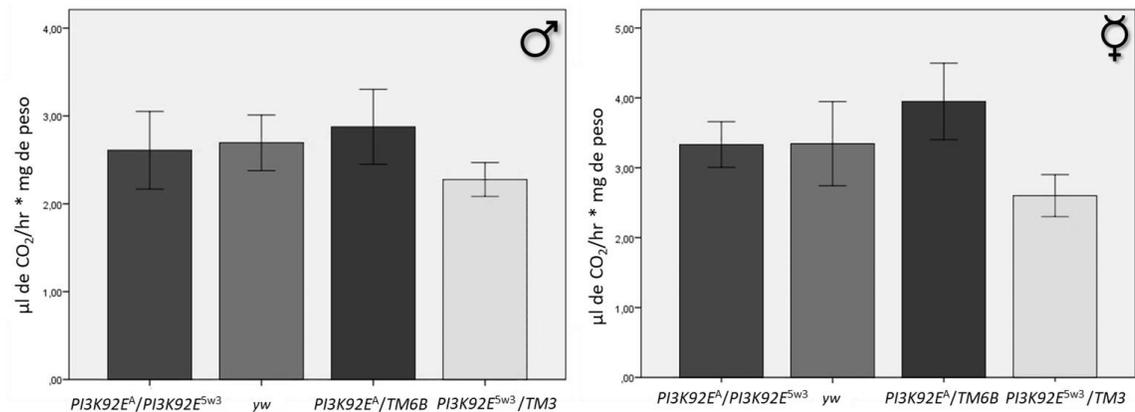
**Figura 55.** Niveles de lípidos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control yw. Barras: error estándar.

**Tabla 22.** Parámetros de actividad para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E* (promedio  $\pm$  SEM). Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

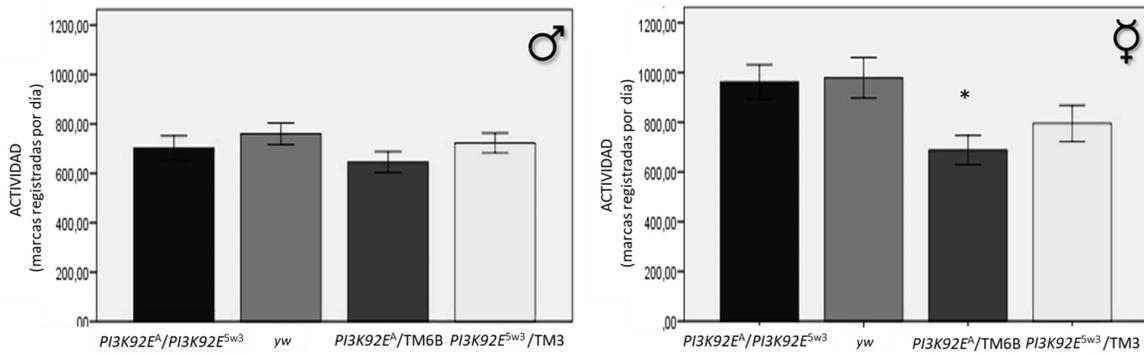
|   | NIVELES DE ACTIVIDAD           |                              |                                |                     |
|---|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------|
|   | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>A/+</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>5w3/+</sup></i> | <i>yw</i>           |
| Producción de CO <sub>2</sub> ( $\mu$ l CO <sub>2</sub> /hr*mg de peso) | 2.03 $\pm$ .49                 | 2.85 $\pm$ .66               | 2.36 $\pm$ .32                 | 2.60 $\pm$ .58      |
| Periodos de sueño durante el día  | 1071.97 $\pm$ 49.11            | 1094.69 $\pm$ 52.80          | 935.43 $\pm$ 40.50             | 1028.04 $\pm$ 43.88 |

**Tabla 23.** Parámetros de actividad para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E* (promedio  $\pm$  SEM). Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

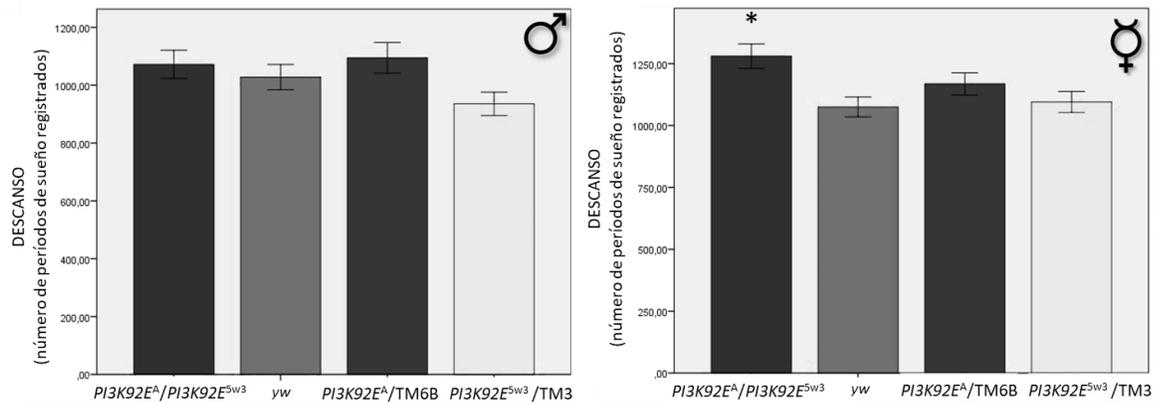
|   | NIVELES DE ACTIVIDAD           |                              |                                |                     |
|---|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------|
|   | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>A/+</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>5w3/+</sup></i> | <i>yw</i>           |
| Producción de CO <sub>2</sub> ( $\mu$ l CO <sub>2</sub> /hr*mg de peso) | 3.33 $\pm$ .32                 | 3.95 $\pm$ .55               | 2.66 $\pm$ .27                 | 3.34 $\pm$ .60      |
| Periodos de sueño durante el día  | 1280.03 $\pm$ 49.39*           | 1168.11 $\pm$ 45.21          | 1095.19 $\pm$ 42.45            | 1074.94 $\pm$ 40.08 |



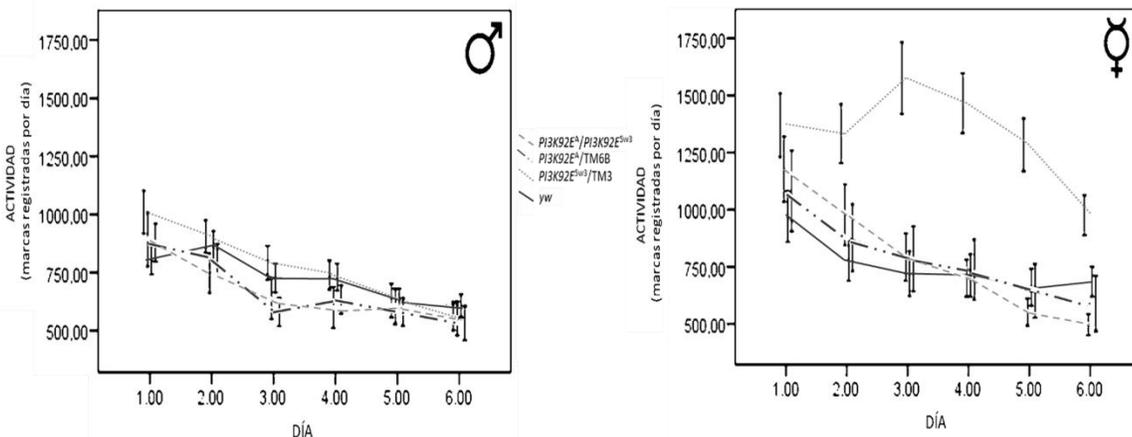
**Figura 56.** Tasa metabólica promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. Barras de error: error estándar.



**Figura 57.** Actividad promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control yw (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Las barras error representan el error estándar.



**Figura 58.** Descanso promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control yw. Barras de error: error estándar.



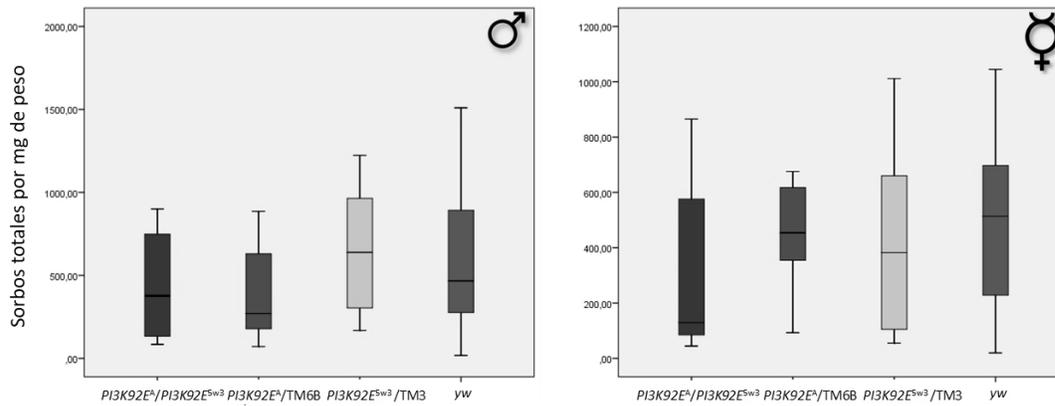
**Figura 59.** Actividad por día para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. Barras: error estándar.

**Tabla 24.** Parámetros de alimentación para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*, medianas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

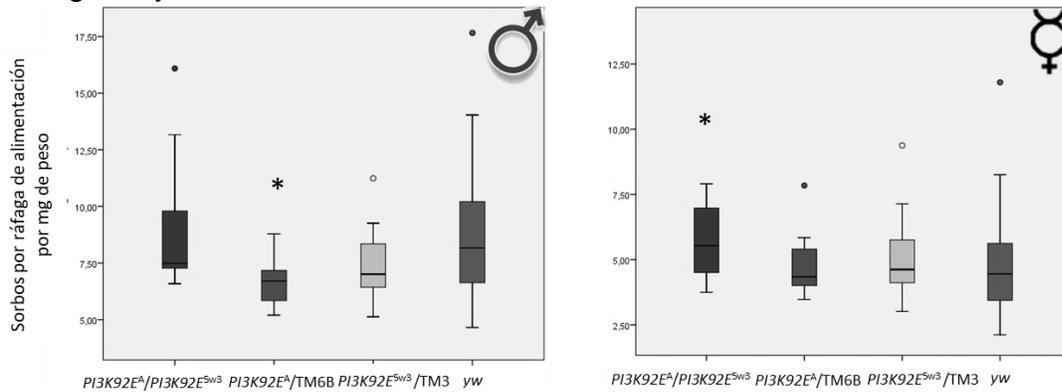
| ALIMENTACIÓN   |                                |                              |                                |        |
|--|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------|
|  | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>A/+</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>5w3/+</sup></i> | Yw     |
| Sorbos totales                                       | 376.97                         | 269.66                       | 638.52                         | 467.06 |
| Sorbos por ráfaga de alimentación                    | 7.49                           | 6.71*                        | 7.01                           | 8.17   |
| # Ráfagas de actividad                               | 26.26                          | 30.41                        | 35.72                          | 40.47  |
| Duración de ráfagas de actividad                     | 6.28                           | 4.14*                        | 5.52                           | 6.44   |
| # Ráfagas de alimentación                            | 37.26                          | 34.27                        | 81.22                          | 48.33  |
| Duración de ráfagas de alimentación                  | 1.97                           | 2.30                         | 1.76                           | 2.26   |
| Duración de intervalos entre ráfagas de actividad    | 5.78                           | 17.20                        | 7.20                           | 5.05   |
| Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación | 5.70                           | 5.36                         | 1.80                           | 2.39   |

**Tabla 25.** Parámetros de alimentación para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*, medianas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

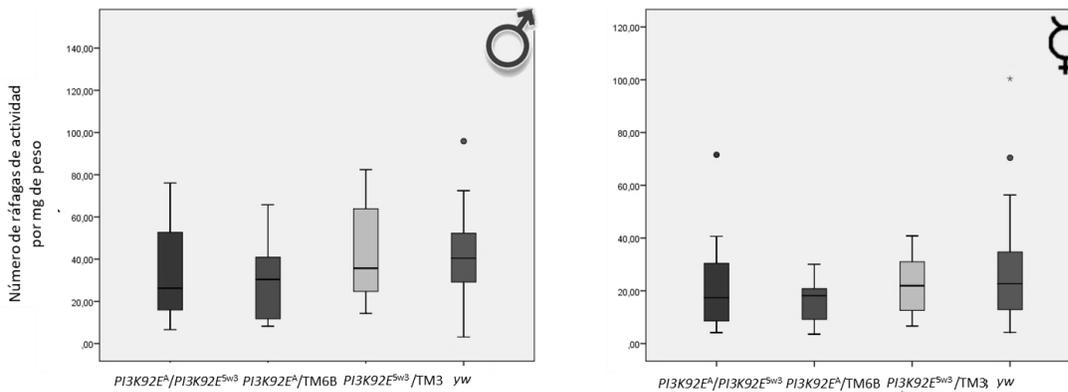
| ALIMENTACIÓN   |                                |                              |                                |        |
|--|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------|
|  | <i>PI3K92E<sup>a/5w3</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>A/+</sup></i> | <i>PI3K92E<sup>5w3/+</sup></i> | Yw     |
| Sorbos totales                                       | 129.02                         | 453.95                       | 382.08                         | 382.08 |
| Sorbos por ráfaga de alimentación                    | 5.54*                          | 4.35                         | 4.62                           | 4.46   |
| # Ráfagas de actividad                               | 17.42                          | 18.15                        | 21.90                          | 22.68  |
| Duración de ráfagas de actividad                     | 4.92                           | 3.75                         | 3.02                           | 3.68   |
| # Ráfagas de alimentación                            | 25.64                          | 37.70                        | 39.20                          | 54.57  |
| Duración de ráfagas de alimentación                  | 1.17                           | 1.02                         | .98                            | .90    |
| Duración de intervalos entre ráfagas de actividad    | 9.99                           | 7.99                         | 2.67                           | 4.77   |
| Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación | 1.83*                          | .50                          | 1.42                           | 1.09   |



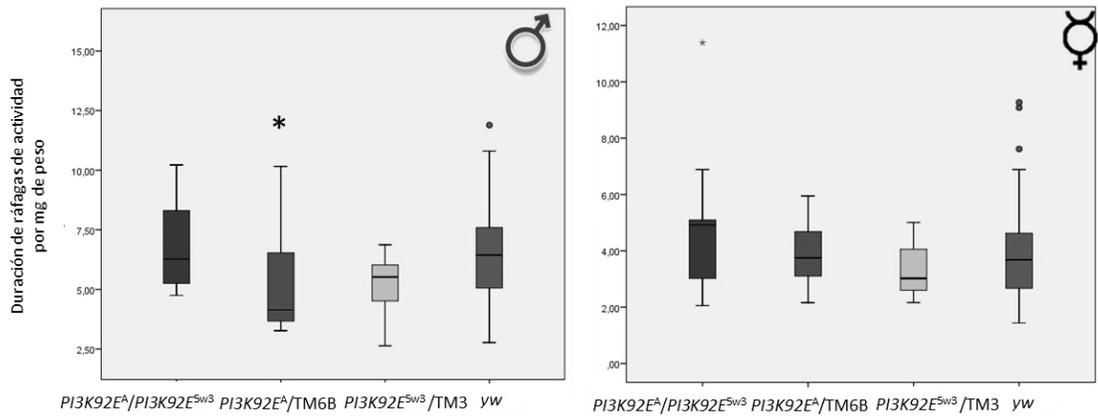
**Figura 60.** Número de sorbos por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*.



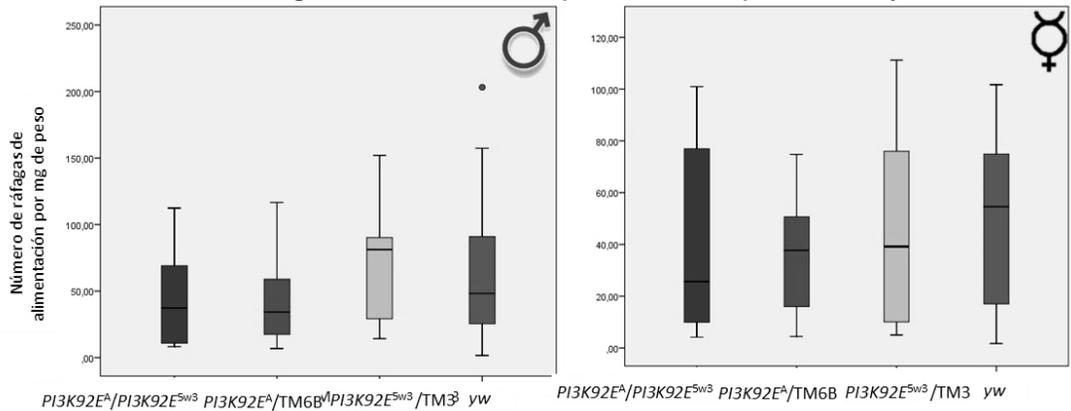
**Figura 61.** Sorbos por ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control yw.



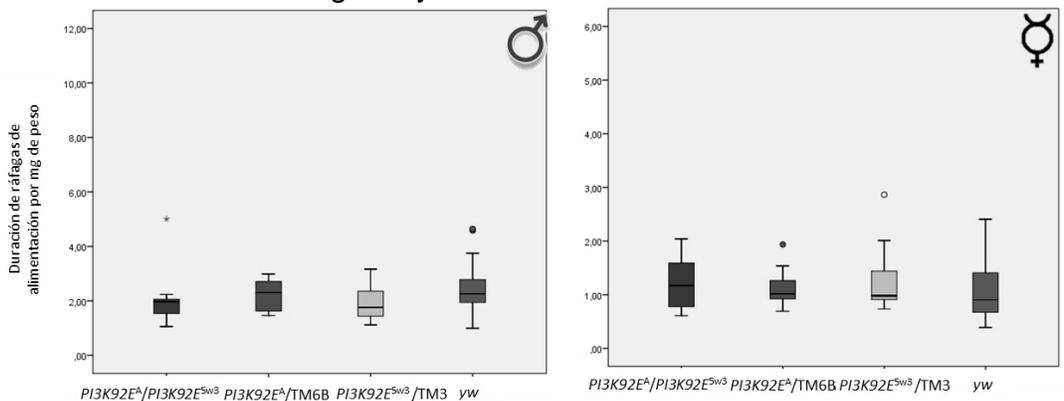
**Figura 62.** Número de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*.



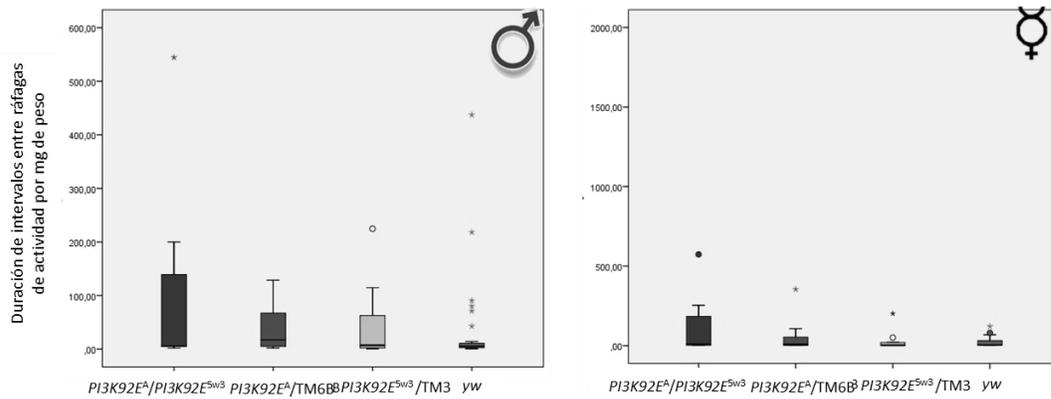
**Figura 63.** Duración de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.



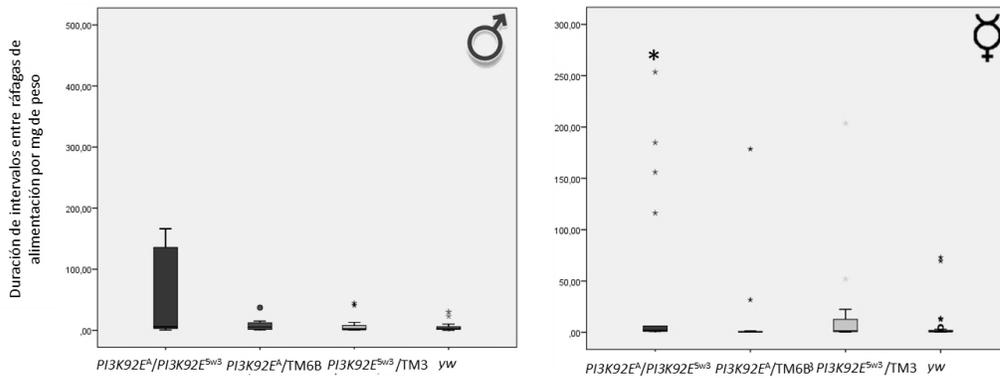
**Figura 64.** Número de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*.



**Figura 65.** Duración de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*.



**Figura 66.** Duración de intervalos entre ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*.



**Figura 67.** Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *PI3K92E*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control  $yw$ .

## Apéndice C

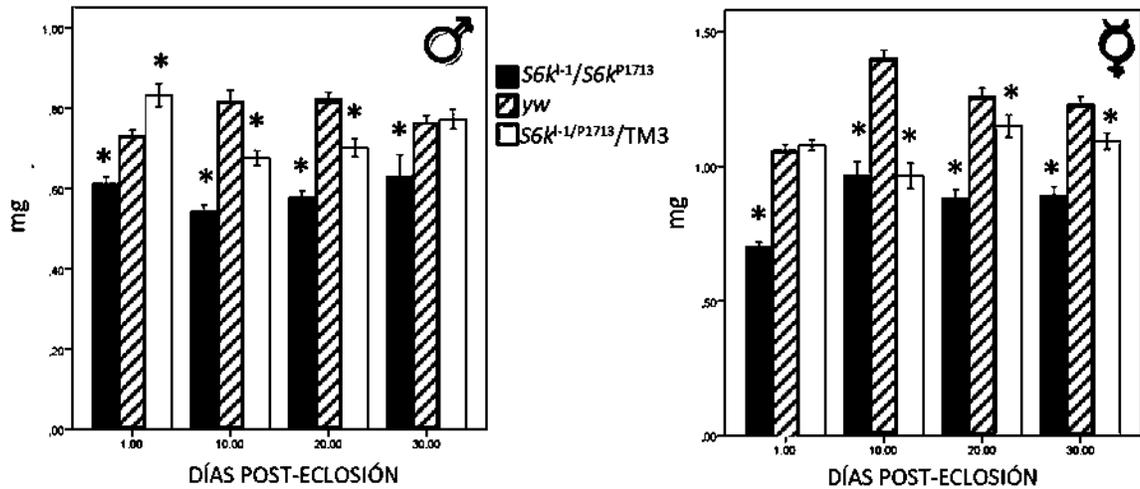
Descripción de mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*

**Tabla 26.** Peso promedio  $\pm$  SEM para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

| Días post-eclosión | PESO (mg)                      |                         |                 |
|--------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------|
|                    | <i>S6k<sup>p1713/l-1</sup></i> | <i>S6k heterocigoto</i> | <i>yw</i>       |
| 1                  | .613 $\pm$ .017*               | .834 $\pm$ .028*        | .731 $\pm$ .016 |
| 10                 | .543 $\pm$ .016*               | .676 $\pm$ .019*        | .817 $\pm$ .028 |
| 20                 | .578 $\pm$ .016*               | .702 $\pm$ .022*        | .824 $\pm$ .016 |
| 30                 | .631 $\pm$ .054*               | .773 $\pm$ .024         | .763 $\pm$ .019 |

**Tabla 27.** Peso promedio  $\pm$  SEM para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

| Días post-eclosión | PESO (mg)                      |                         |                  |
|--------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------|
|                    | <i>S6k<sup>p1713/l-1</sup></i> | <i>S6k heterocigoto</i> | <i>yw</i>        |
| 1                  | .700 $\pm$ .019*               | 1.078 $\pm$ .020        | 1.504 $\pm$ .057 |
| 10                 | .965 $\pm$ .052*               | .964 $\pm$ .047*        | 1.400 $\pm$ .030 |
| 20                 | .880 $\pm$ .032*               | 1.150 $\pm$ .041*       | 1.259 $\pm$ .031 |
| 30                 | .893 $\pm$ .032*               | 1.093 $\pm$ .030*       | 1.229 $\pm$ .029 |



**Figura 68.** Peso promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*. Barras: error estándar.

**Tabla 28.** Medianas de niveles de carbohidratos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

| CARBOHIDRATOS (µg) POR MG DE PESO |                                |                         |           |
|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------|
| Días post-eclosión                | <i>S6k<sup>p1713/l-1</sup></i> | <i>S6k heterocigoto</i> | <i>Yw</i> |
| 1                                 | 38.22                          | 32.74                   | 31.03     |
| 10                                | 68.2                           | 45.61                   | 67.46     |
| 20                                | 57.53                          | 75.21*                  | 36.63     |
| 30                                | 41.95                          | 50.87                   | 59.73     |

**Tabla 29.** Medianas de niveles de carbohidratos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

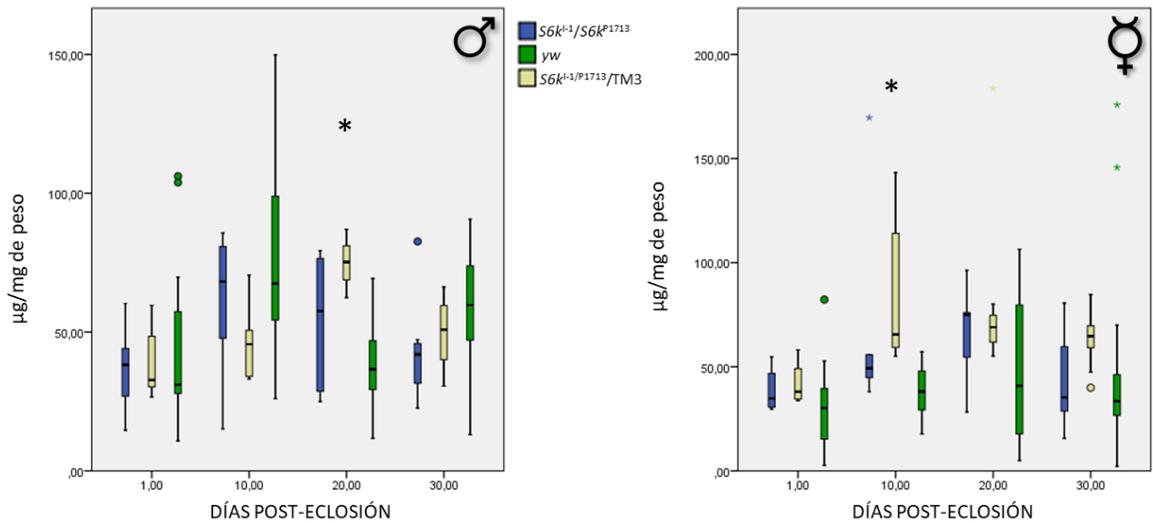
| CARBOHIDRATOS (µg) POR MG DE PESO |                                |                         |           |
|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------|
| Días post-eclosión                | <i>S6k<sup>p1713/l-1</sup></i> | <i>S6k heterocigoto</i> | <i>Yw</i> |
| 1                                 | 34.8                           | 38                      | 30.22     |
| 10                                | 49.28                          | 65.55*                  | 38.16     |
| 20                                | 74.96                          | 68.96                   | 40.86     |
| 30                                | 35.28                          | 64.69                   | 33.45     |

**Tabla 30.** Medianas de niveles de lípidos para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

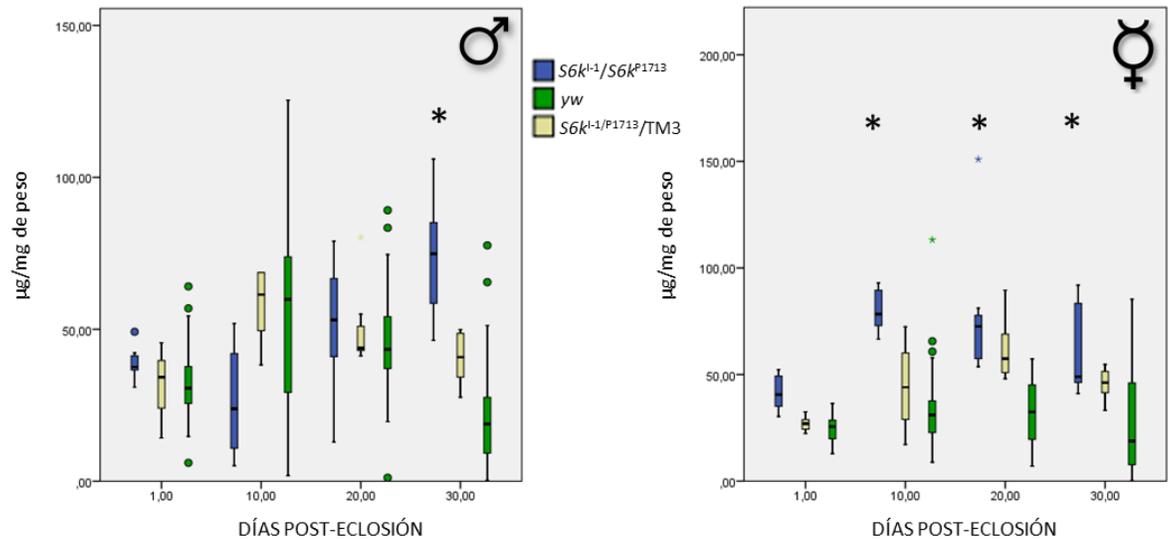
| LÍPIDOS (µg) POR MG DE PESO |                                |                         |           |
|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------|
| Días post-eclosión          | <i>S6k<sup>p1713/l-1</sup></i> | <i>S6k heterocigoto</i> | <i>Yw</i> |
| 1                           | 38.43                          | 34.25                   | 30.61     |
| 10                          | 45.53                          | 59.84                   | 59.72     |
| 20                          | 53.08                          | 45.39                   | 43.42     |
| 30                          | 74.89*                         | 40.82                   | 18.83     |

**Tabla 31.** Medianas de niveles de lípidos para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

| LÍPIDOS (µg) POR MG DE PESO |                                |                         |           |
|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------|
| Días post-eclosión          | <i>S6k<sup>p1713/l-1</sup></i> | <i>S6k heterocigoto</i> | <i>Yw</i> |
| 1                           | 41.03                          | 26.98                   | 25.55     |
| 10                          | 72.7*                          | 26.1                    | 31.06     |
| 20                          | 72.56*                         | 55.16                   | 32.44     |
| 30                          | 48.96*                         | 46.18                   | 18.80     |



**Figura 69.** Niveles de carbohidratos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. El \* negro denota diferencias significativas con respecto al control silvestre. Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ . Para todos los boxplots, la caja representa el rango intercuartil (IQ) que contiene el 50% medio de los registros. La línea que la cruza es la mediana. Los bigotes (líneas en forma de T) se extienden hasta los valores más altos y más bajos que no son mayores que 1,5 veces el rango IQ. Los valores atípicos son casos con valores entre 1.5 y 3 veces el rango de IQ (círculos), o más de 3 veces (asteriscos de color).



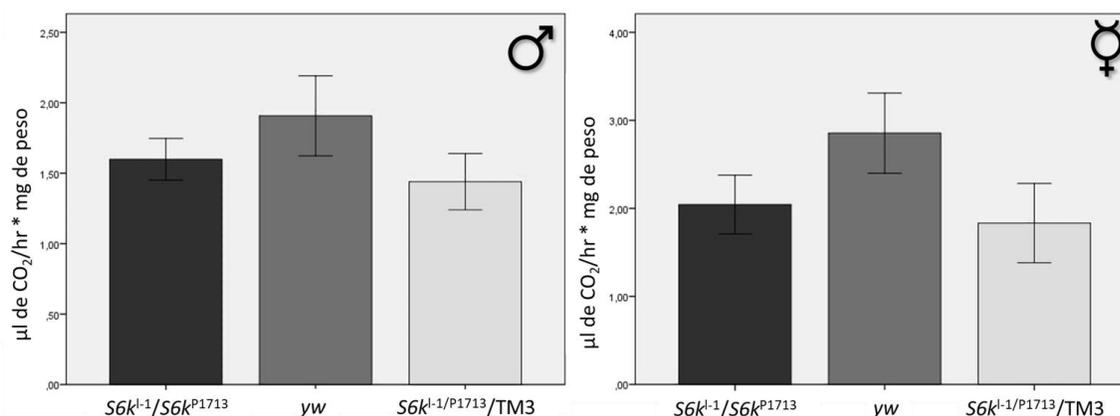
**Figura 70.** Niveles de lípidos para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.

**Tabla 32.** Parámetros de actividad para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k* (promedio  $\pm$  SEM). Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

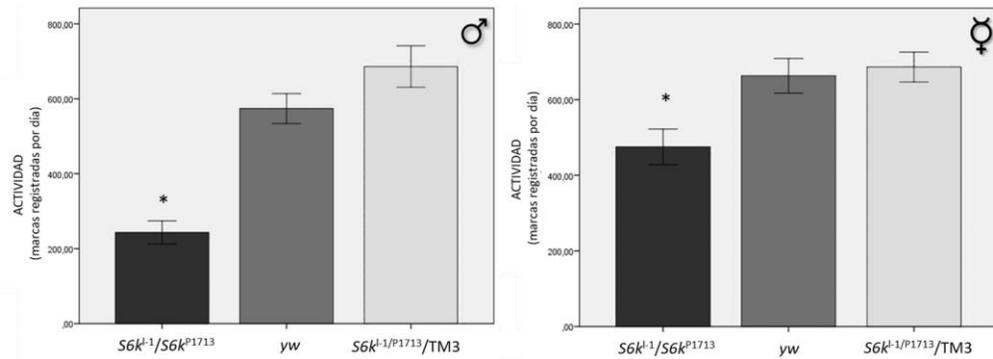
| NIVELES DE ACTIVIDAD  |                                |                         |              |
|---|--------------------------------|-------------------------|--------------|
|   | <i>S6k<sup>p1713/l-1</sup></i> | <i>S6k heterocigoto</i> | <i>Yw</i>    |
| Producción de CO <sub>2</sub> (μl CO <sub>2</sub> /hr*mg de peso) | 1.60 ±.15                      | 1.91± .28               | 1.44 ±.20    |
| Períodos de sueño durante el día                                  | 1440.8±28.54*                  | 1044.30±47.12           | 1179.48±30.8 |

**Tabla 33.** Parámetros de actividad para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k* (promedio ± SEM). Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

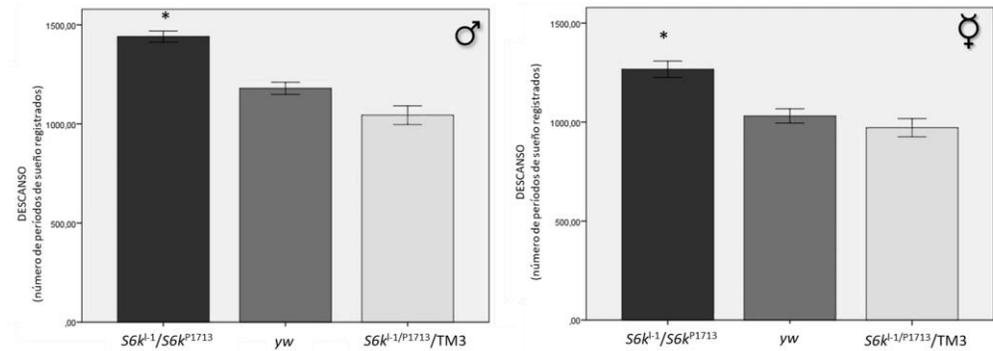
| NIVELES DE ACTIVIDAD  |                                |                         |               |
|---|--------------------------------|-------------------------|---------------|
|   | <i>S6k<sup>p1713/l-1</sup></i> | <i>S6k heterocigoto</i> | <i>Yw</i>     |
| Producción de CO <sub>2</sub> (μl CO <sub>2</sub> /hr*mg de peso) | 1.86±.32                       | 2.6265±.45              | 1.54±.39      |
| Períodos de sueño durante el día                                  | 1267.25±41.35*                 | 971.77±45.82            | 1031.40±36.04 |



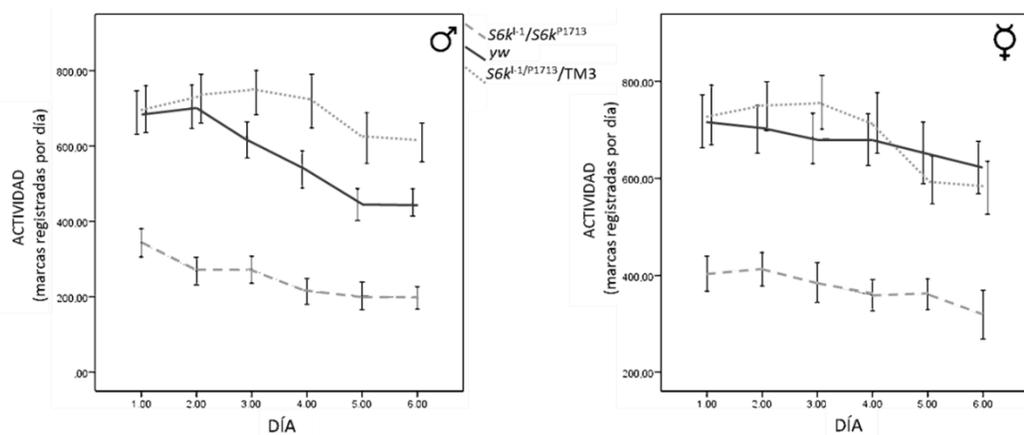
**Figura 71.** Tasa metabólica promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. Barras de error: error estándar.



**Figura 72.** Actividad promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control yw (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Las barras error representan el error estándar.



**Figura 73.** Descanso promedio para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control yw (Pruebas de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Las barras error representan el error estándar.



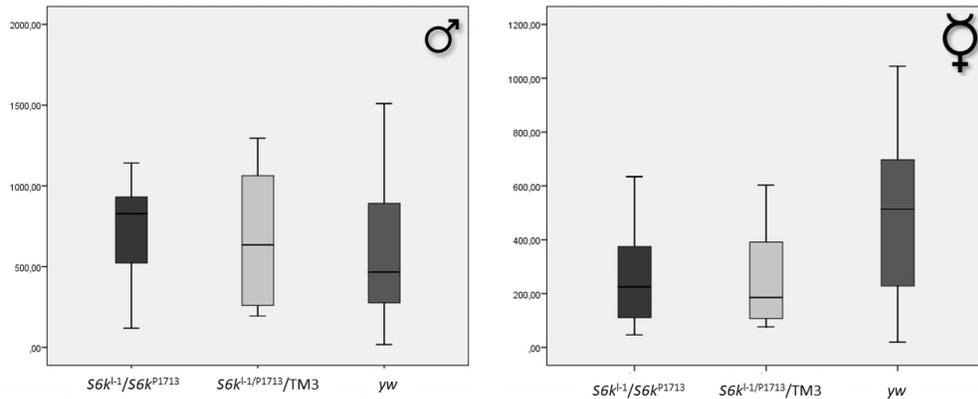
**Figura 74.** Actividad por día para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. Barras: error estándar.

**Tabla 34.** Parámetros de alimentación para machos mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*, medianas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

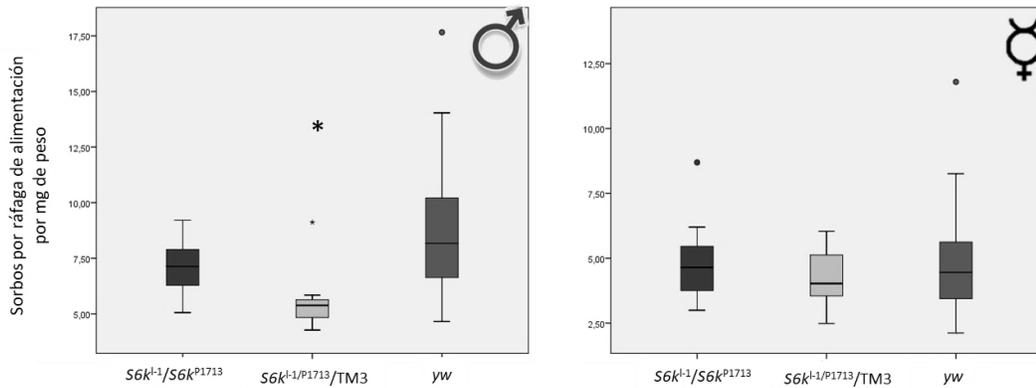
| ALIMENTACIÓN   |                                |                         |           |
|--|--------------------------------|-------------------------|-----------|
|  | <i>S6k<sup>p1713/l-1</sup></i> | <i>S6k heterocigoto</i> | <i>Yw</i> |
| Sorbos totales                                       | 827.71                         | 634.88                  | 467.06    |
| Sorbos por ráfaga de alimentación                    | 7.13                           | 5.38*                   | 8.17      |
| # Ráfagas de actividad                               | 77.55*                         | 71.06                   | 40.46     |
| Duración de ráfagas de actividad                     | 6.09                           | 5.27                    | 6.44      |
| # Ráfagas de alimentación                            | 101.29                         | 51.25                   | 48.33     |
| Duración de ráfagas de alimentación                  | 1.36*                          | 1.37*                   | 2.26      |
| Duración de intervalos entre ráfagas de actividad    | 4.63                           | 7.60                    | 5.05      |
| Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación | 5.00                           | 5.30                    | 2.39      |

**Tabla 35.** Parámetros de alimentación para hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*, medianas). Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

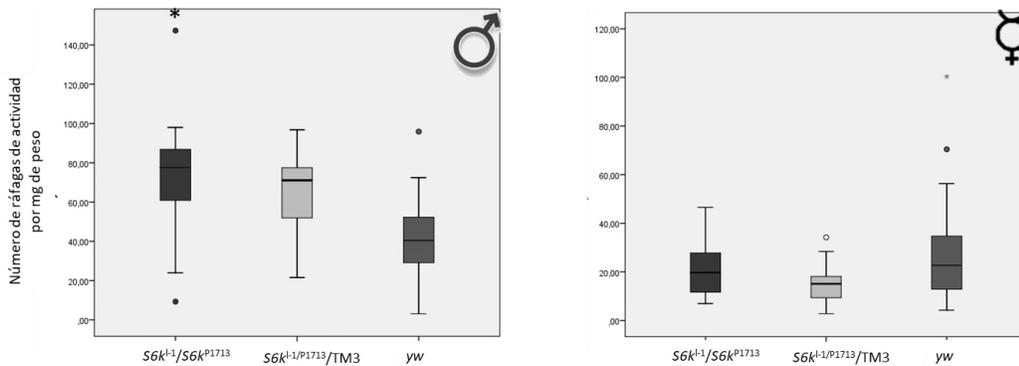
| ALIMENTACIÓN   |                                |                         |           |
|--|--------------------------------|-------------------------|-----------|
| H  | <i>S6k<sup>p1713/l-1</sup></i> | <i>S6k heterocigoto</i> | <i>Yw</i> |
| Sorbos totales                                       | 224.75                         | 185.76                  | 382.08    |
| Sorbos por ráfaga de alimentación                    | 4.65                           | 4.03                    | 5.46      |
| # Ráfagas de actividad                               | 19.70                          | 15.09                   | 22.68     |
| Duración de ráfagas de actividad                     | 4.69                           | 4.01                    | 3.68      |
| # Ráfagas de alimentación                            | 26.69                          | 23.13                   | 54.57     |
| Duración de ráfagas de alimentación                  | .91                            | .84                     | .90       |
| Duración de intervalos entre ráfagas de actividad    | 19.89                          | 3.45                    | 4.77      |
| Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación | 4.82*                          | 1.23                    | 1.09      |



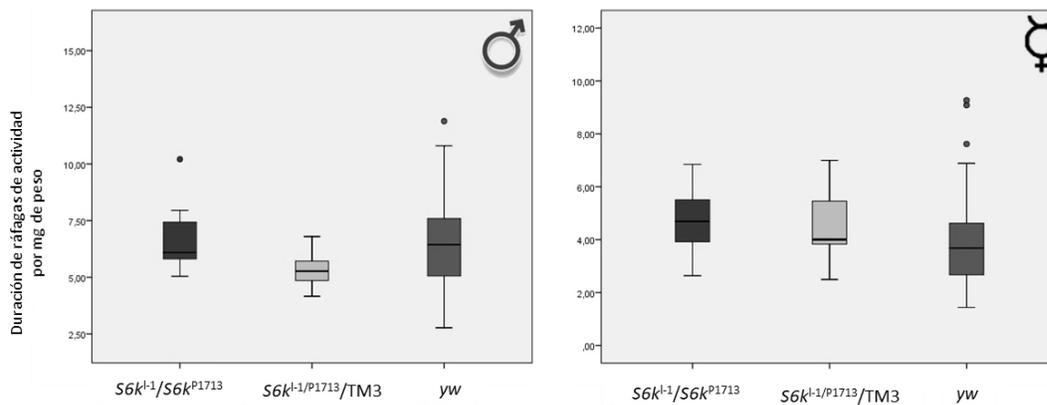
**Figura 75.** Número de sorbos por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*.



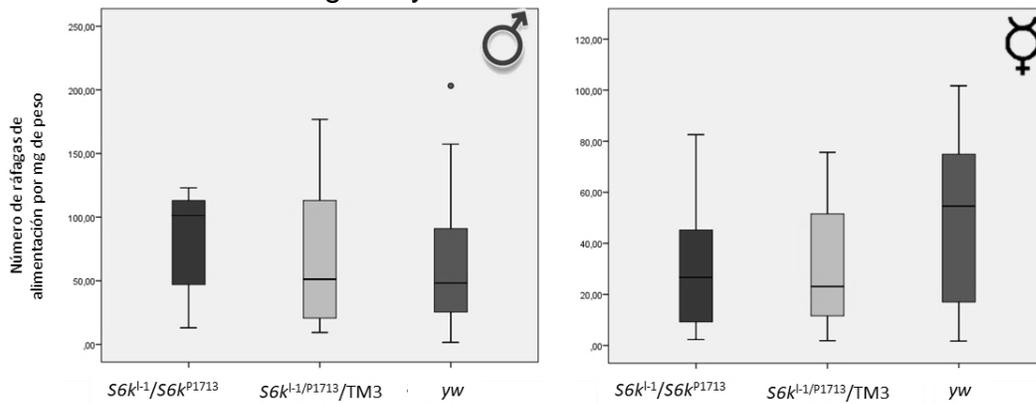
**Figura 76.** Sorbos por ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control  $yw$ .



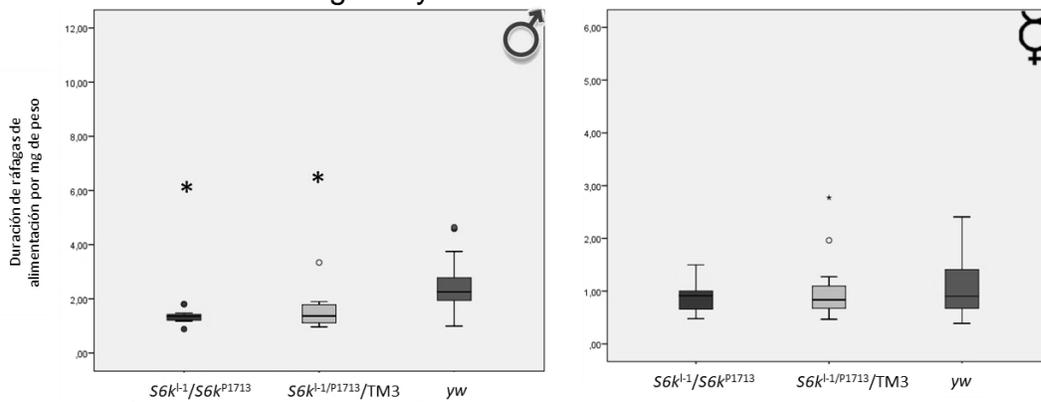
**Figura 77.** Número de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control  $yw$ .



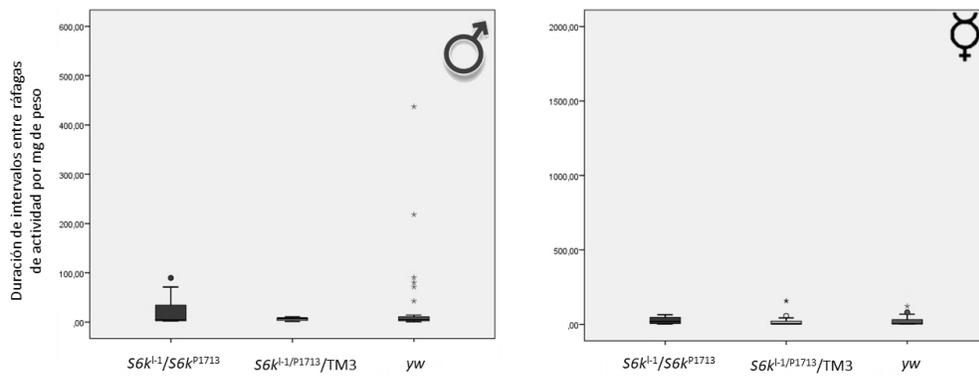
**Figura 78.** Duración de ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*.



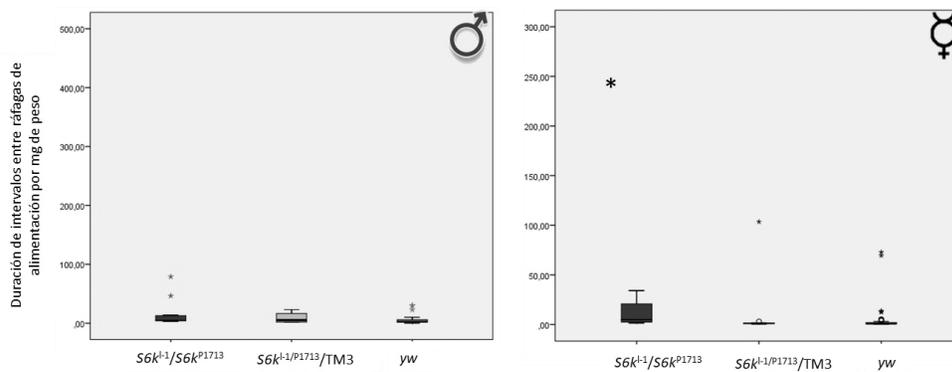
**Figura 79.** Número de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*.



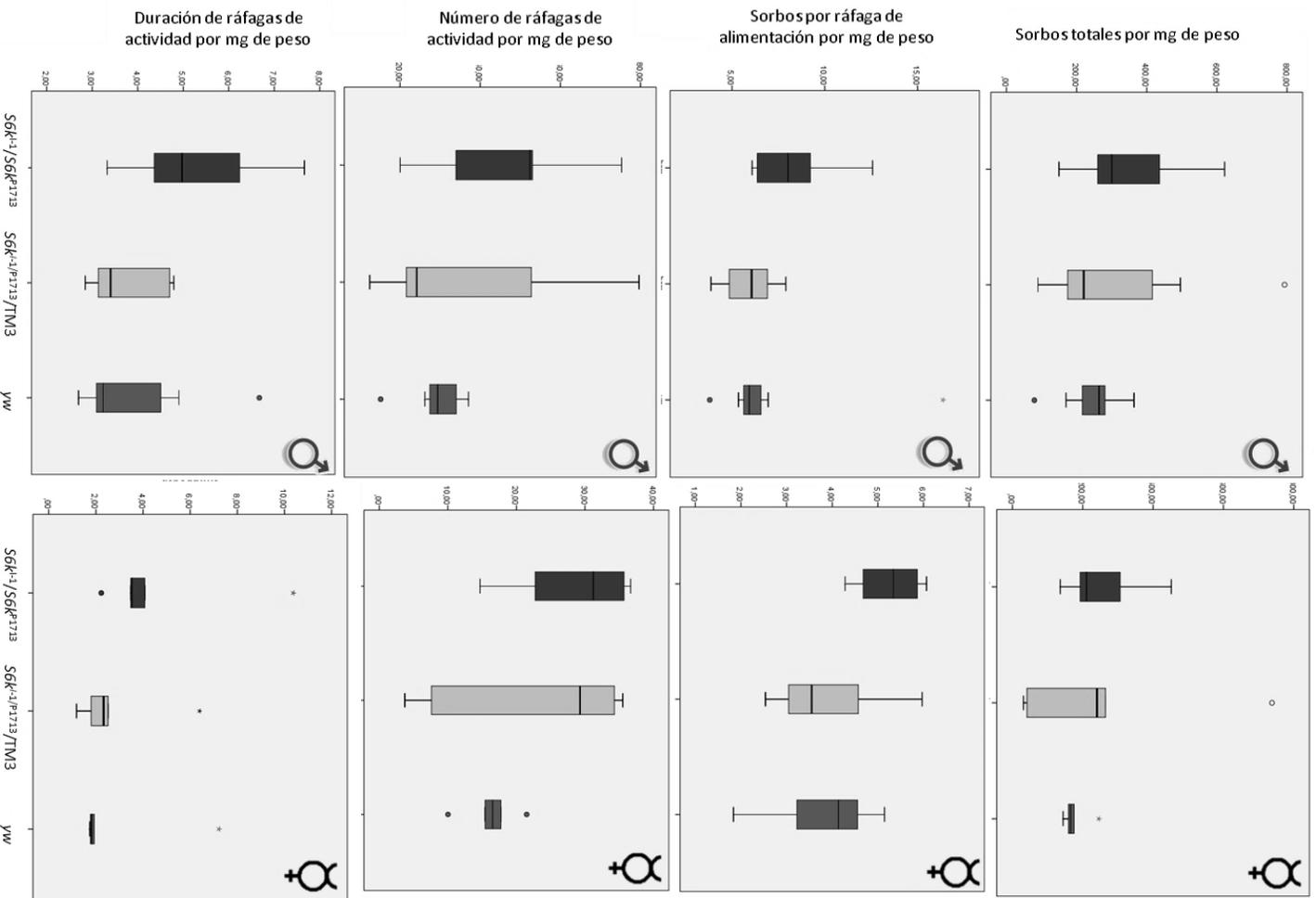
**Figura 80.** Duración de ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control  $yw$ .



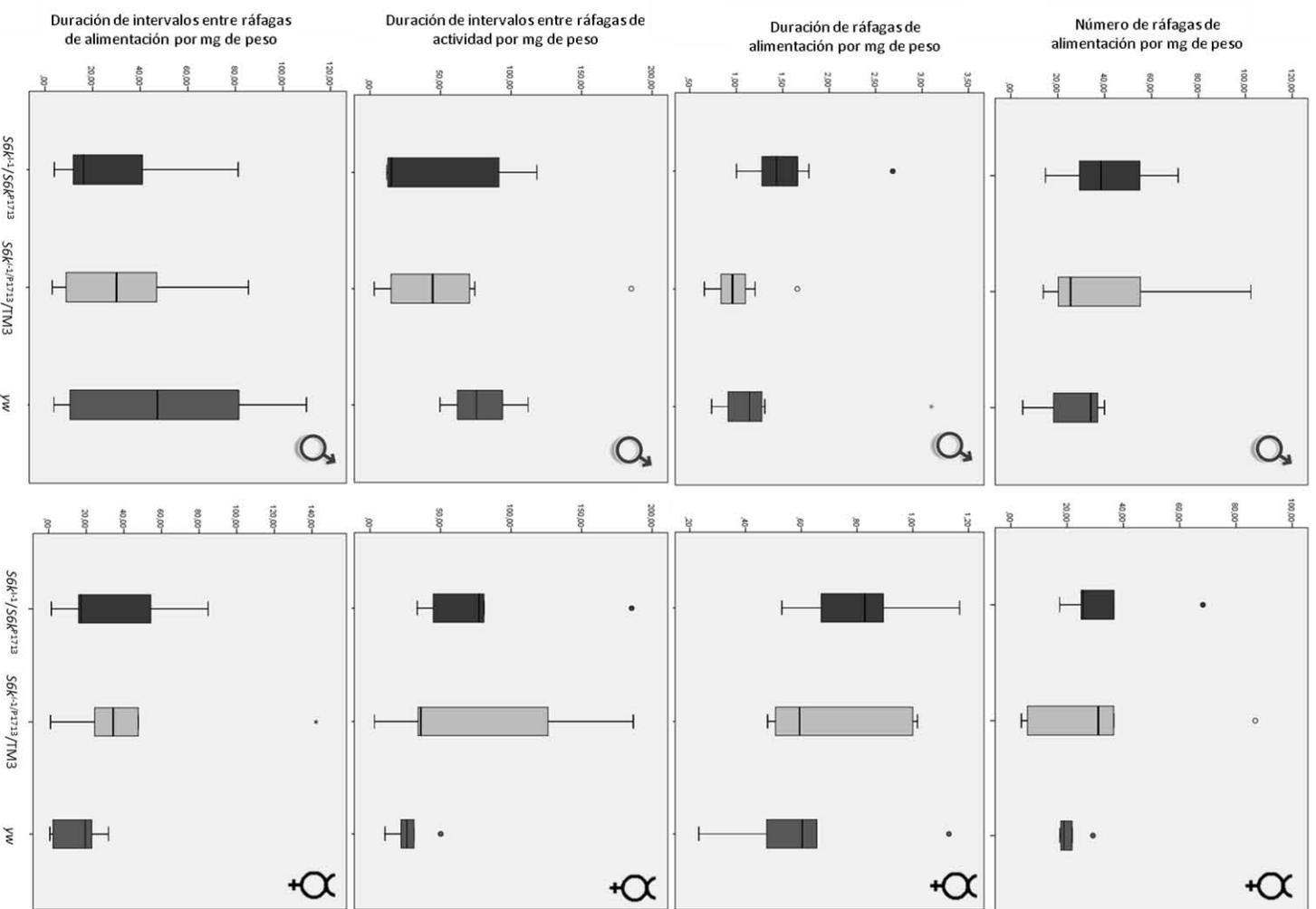
**Figura 81.** Duración de intervalos entre ráfagas de actividad por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*.



**Figura 82.** Duración de intervalos entre ráfagas de alimentación por mg de peso para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.



**Figura 83.** Comportamiento de alimentación para machos y hembras mutantes heterocigotas y heteroalélicas de *S6k*. Alimento: Levadura al 10%, piloncillo al 10% en agar al 1%. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*. N=7



**Figura 84.** Comportamiento de alimentación para machos y hembras mutantes heterocigotas y heterocigotas de *Sgk*. Alimento: Levadura al 10%, piloncillo al 10% en agar al 1%. El asterisco señala cepas con diferencias significativas con respecto a la cepa control *yw*.