



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DEL NRF2 Y SU RELACIÓN CON LA VÍA DE LA
INSULINA EN *Drosophila melanogaster***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

JESSICA PALOMA ÁLVAREZ RENDÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JULIO DE 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo a lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

**CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DEL NRF2 Y SU RELACIÓN CON LA VÍA DE
LA INSULINA EN *Drosophila melanogaster***

Que presenté para obtener el grado de DOCTOR(A) EN CIENCIAS, es original, de mí autoría y lo realicé con rigor metodológico exigido por el Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referenciadas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de obtención de mi grado académico.

Atentamente

ALVAREZ RENDON JESSICA PALOMA
No. de cuenta UNAM: 517005950

(Nombre, firma y número de cuenta del estudiante)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DEL NRF2 Y SU RELACIÓN CON LA VÍA DE LA
INSULINA EN *Drosophila melanogaster***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

JESSICA PALOMA ÁLVAREZ RENDÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JULIO DE 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

OFICIO: CGEP/CPCB/IFC/0450/2024

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted, que en la reunión del Comité Académico de (Biología Experimental) del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **26 de febrero de 2024** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **ÁLVAREZ RENDÓN JESSICA PALOMA** con número de cuenta **517005950** con la tesis titulada **“Caracterización de la vía del Nrf2 y su relación con la vía de la insulina en *Drosophila melanogaster*”**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR**, Tutor Principal, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. RUDOLF MARINUS BUIJS
Vocal: DR. MIGUEL ÁNGEL PÉREZ DE LA MORA
Vocal: DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ
Vocal: DRA. LUZ MARÍA LOPEZ MARÍN
Secretario: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 03 de junio de 2024

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/SEMI/EARR/semi



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por las oportunidades otorgadas para mi desarrollo académico y profesional.

Al CONAHCyT por el apoyo #612316 y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM por el apoyo #IG200216.

A mi tutor principal, el Doctor Juan Rafael Riesgo Escovar, por el invaluable apoyo y guía recibidos a lo largo de mi formación académica.

A las Doctoras Rocío Salceda Sacanelles y Rosa Estela Navarro González, miembros del Comité Tutorial, por toda la retroalimentación, comentarios y observaciones, cruciales durante el desarrollo de este trabajo.

Contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. La vía del Nrf2.....	6
1.2. Producción de EROs	9
1.3. Defectos en la señalización de la insulina y estrés oxidante	10
1.4. Las vías de la insulina y del Nrf2.....	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVO	17
4.1. Objetivos específicos.....	17
5. JUSTIFICACIÓN/RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO	18
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS	18
6.1 Cepas	18
6.2 Caracterización conductual	20
6.2.1. Medición de resistencia a Paraquat y H ₂ O ₂ 3% :	20
6.2.1.1. Dietas.....	20
6.2.1.2. Pruebas de supervivencia en grupos	20
6.2.1.3. Pruebas de supervivencia individuales y actividad motora	20
6.2.1.4. Pruebas de preferencia	21
6.3. Observación de reporteros fluorescentes	22
6.4. Caracterización metabólica	23
6.4.1. Glucosa y glucógeno.....	23
6.4.2. Proteínas.	23
6.4.3. Lípidos.	24
6.4.4. Glutatión.....	24
6.5. Transcriptómica.....	24
6.6. Estadística.....	25
7. RESULTADOS.....	26

7.1 Efecto de heterocigosis u homocigosis de <i>keap1</i> en la actividad locomotora de moscas silvestres y mutantes de la vía de la insulina	26
7.2 Resistencia a estrés oxidante	30
7.3 Efecto de heterocigosis para <i>Keap1</i> en parámetros metabólicos de mutantes de la vía de la insulina.....	47
7.4 Análisis transcriptómico de mutantes de <i>S6k</i>	51
8.DISCUSIÓN.....	59
9.CONCLUSIONES	64
10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
Anexo 1.....	75
Anexo 2.....	75
Anexo 3.....	75

SIGLAS Y ABREVIACIONES

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

GFP	Proteína verde fluorescente
Gln	Glucosamina
GlcNAc	N-acetil glucosamina
GSK3	Glucógeno sintetasa cinasa 3
GSSG	Glutación disulfuro
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IKK	Cinasa de IK β
ILP	Péptido parecido a la insulina (ILP, por sus siglas en inglés)
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IPC	Célula productora de insulina
IRS	Sustrato del InR.
JNK	Cinasa c-Jun <i>N</i> -terminal
keap1	Proteína Asociada a ECH parecida a Kelch
Maf/Maf-S	Proteína de fibrosarcoma músculo-aponeurótico
MG	Metilglioxal
NF-K β	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
Nrf2	Factor relacionado a NF-E2

PDK1	Cinasa dependiente de PIP3
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PQ	Paraquat
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RHEB	Homólogo de GTPasa enriquecido en el cerebro
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S6K	Cinasa de proteína ribosomal S6
SEM	Error estándar de la media
SREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides
TOR	Diana de la rapamicina
TOR-C1	Diana del complejo de rapamicina 1
TOR-C2	Diana del complejo de rapamicina 2
TSC1/2	Proteínas de esclerosis tuberosa 1 y 2.

RESUMEN

La señalización de la insulina es una vía evolutivamente conservada que regula el control metabólico. En *Drosophila melanogaster*, las mutaciones homocigóticas nulas en la señalización de la insulina son letales, mientras que reducciones menos severas conducen a desregulaciones metabólicas como hiperglicemia y dislipidemia, alteraciones del comportamiento como fluctuaciones en la actividad locomotora, y cambios en la respuesta al estrés oxidativo, que pueden contribuir al deterioro de la salud del organismo. La vía de señalización Nrf2 funciona para contrarrestar el estrés oxidativo, y se han descrito funciones emergentes en el metabolismo y la ritmicidad circadiana en vertebrados, por lo que buscamos entender si su manipulación podía aumentar la resistencia a los agentes prooxidantes y/o mejorar la desregulación metabólica y conductual en moscas de la fruta adultas con problemas en la señalización de la insulina.

Usando moscas macho y hembra de 7 días post-eclosión con 1) mutaciones heteroalélicas para *InR* (el homólogo en la mosca del receptor de insulina) o *dS6K* (proteína ribosomal S6 cinasa beta-1, bajo el control de TORC1) y 2) una mutación heterocigótica para *Keap1* (un regulador negativo de CncC, Nrf2 en *Drosophila*), así como controles silvestres con el mismo fondo genético, encontramos que las moscas control y las afectadas en la señalización de insulina mostraban a menudo una resistencia similar a dosis elevadas de ambos prooxidantes, mientras que el mayor efecto en la mejora de la supervivencia se observó en los machos *dS6k* con la mutación heterocigota *Keap1* expuestos a paraquat 10 mM.

Nuestros resultados apuntan a que la manipulación de la vía CncC es un método útil para proporcionar una mayor resistencia a agentes prooxidantes exógenos en moscas de la fruta. Además, la heterocigosis para *Keap1* también puede rescatar los niveles basales de actividad locomotora, así como disminuir los niveles de lípidos y carbohidratos en algunos genotipos mutantes, en particular en moscas mutantes para *InR*, destacando el potencial de la manipulación de la vía CncC para la mitigación del desequilibrio metabólico en animales con desregulación en la señalización de la insulina.

ABSTRACT

Insulin signaling is an evolutionary conserved pathway that regulates metabolic control. In *Drosophila melanogaster*, homozygous null mutations for insulin signaling are lethal, while milder reductions lead to metabolic dysregulations like hyperglycemia and dyslipidemia, behavioral alterations like fluctuations in locomotor activity and changes in the response to oxidative stress, all of which can contribute to the organism's health deterioration. The Nrf2 signaling pathway functions to counteract oxidative stress. Emerging roles in metabolism and circadian rhythmicity have been described in vertebrates. We sought to understand whether altering Nrf2 signaling could enhance resistance to pro-oxidant agents and/or ameliorate metabolic and behavioral dysregulation in adult insulin-compromised fruit flies.

Using one-week-old male and female flies with 1) heteroallelic mutations for *InR* (the fly homologue of the insulin receptor) or *dS6K* (the fly homologue of ribosomal protein S6 kinase beta-1, under the control of TORC1) and 2) a heterozygous mutation for *Keap1* (a negative regulator of CncC, Nrf2 in *Drosophila*), as well as wild-type controls, all with the same genetic background, we found that wild-type and insulin signaling-affected flies often showed similar resistance to high doses of both pro-oxidants, whereas the biggest effect in enhanced survival was seen in *dS6k* males with the heterozygous *Keap1* mutation when exposed to paraquat 10 mM.

Our results point to the manipulation of the CncC pathway as a useful method to provide enhanced resistance to exogenous pro-oxidant agents in fruit flies. Furthermore, heterozygosity for *Keap1* can also rescue locomotor activity levels, as well as decrease lipid and carbohydrate levels in some mutant flies, particularly *InR* mutants, highlighting the potential of manipulating the Nrf2 pathway for the mitigation of metabolic imbalance in insulin-signaling compromised animals.

1. INTRODUCCIÓN

Hasta hace aproximadamente dos mil quinientos millones de años, la atmósfera terrestre era reductora, con el oxígeno libre representando menos del 1% de la atmósfera. Esto cambió debido en parte al aumento de organismos fotosintéticos que empleaban dióxido de carbono para obtener energía generando oxígeno como un producto de las reacciones del metabolismo. La concentración de oxígeno libre en la atmósfera eventualmente creció. Algunos organismos perecieron debido a la nueva composición atmosférica, afectados por la característica capacidad del oxígeno de aceptar electrones y generar con cierta facilidad especies muy reactivas, conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROs). Otros tantos sobrevivieron en ambientes donde el oxígeno era poco, como algunos sedimentos marinos. Finalmente, surgieron organismos aeróbicos no sólo capaces de sobrevivir en contacto con la atmósfera actual que contiene 21% de oxígeno, al haber evolucionado no sólo para sobrevivir en esta nueva atmósfera, sino para emplear (en muchos casos de manera necesaria para su supervivencia) al oxígeno como sustrato para generar energía, además de presentar mecanismos protectores contra el exceso de EROs (1).

Hoy, si bien para la gran mayoría de los organismos aeróbicos la generación de EROs a niveles moderados es indispensable (2), un desequilibrio en la generación de EROs que lleve a que la maquinaria antioxidante (sistema que transforma a los EROs en moléculas no dañinas) sea superada puede generar daño celular mediante la oxidación de biomoléculas y la interferencia con vías celulares de señalización, y al deterioro del individuo. Este fenómeno se conoce como estrés oxidativo, y puede contribuir al desarrollo o progresión de enfermedades como hepatotoxicidad por alcoholismo; enfisemas por la exposición crónica al humo del cigarro, y diversas enfermedades neurodegenerativas, como diabetes, Alzheimer, Parkinson y Huntington. Entre las fuentes endógenas de EROs se halla la respiración aeróbica, la beta-oxidación de los ácidos grasos, y la estimulación de la fagocitosis, mientras que la exposición a agentes ambientales, endotoxinas producidas por microorganismos, radiación, consumo excesivo de nutrientes, alcohol, etcétera, representan fuentes externas.

En 1936, Hans Selye propuso el concepto de "estrés" al estudiar las respuestas adaptativas suprarrenales, y el concepto de estrés oxidativo se formula de manera formal en 1985 como "una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor de la primera" (3). A partir de esta definición inicial han existido recomendaciones para actualizar y redefinir los límites del término, como "disrupción de la señalización y control redox" (4), conforme el conocimiento al respecto ha ido ampliándose.

Los radicales libres son moléculas con uno o más electrones no apareados. Son inestables y extremadamente reactivos, con la capacidad para oxidar y modificar moléculas cercanas. Estas moléculas oxidadas se pueden convertir en radicales libres ellos mismos (5). Además de radicales libres existen derivados no radicales pero también reactivos y oxidantes como el peróxido de hidrógeno. Colectivamente los radicales y no radicales son llamadas especies reactivas. Las especies reactivas más comunes y más estudiadas son las especies reactivas de oxígeno. Los EROs derivan del oxígeno molecular, O_2 , por reducción química parcial. Algunos de los productos de reducción de oxígeno son de naturaleza de radicales libres, teniendo un electrón libre (por ejemplo, el radical anión superóxido y el radical hidroxilo), mientras que otros como el peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , son moléculas relativamente estables (6).

El mantenimiento de este estado reductor de las células se logra en parte gracias al sistema de defensa antioxidante, pues existe un patrón óptimo de prooxidantes y antioxidantes para una condición fisiológica dada. La defensa antioxidante es proporcionada principalmente por enzimas, y luego por compuestos de bajo peso molecular (3). Las sustancias antioxidantes son moléculas que pueden eliminar los radicales libres aceptando o donando un electrón para eliminar la condición no apareada. Por lo general, la molécula antioxidante se convierte en un radical libre en el proceso de transformar una ERO a una molécula menos reactiva. En la mayoría de los casos, la molécula antioxidante proporciona un radical hidrógeno que se combina con el radical libre. En consecuencia, se genera un nuevo radical que tiene una vida media más larga en comparación con el inicial, lo que le permite reaccionar con un segundo radical mediante la formación de una nueva molécula y, por tanto, una molécula antioxidante puede eliminar dos radicales. La

protección al daño oxidante en las células se puede clasificar en: prevención (minimización de la exposición al estrés, por ejemplo síntesis de melanina para prevenir estrés fotooxidativo), intercepción (una vez que se forman las especies reactivas, los sistemas enzimáticos y no enzimáticos mantienen un nivel fisiológico, y también se puede dar control transcripcional, traslacional y postraduccional) y reparación (cuando la prevención y la intercepción no son suficientes, especialmente durante periodos largos de estrés) (3).

Las principales enzimas antioxidantes endógenas son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px). La SOD convierte el anión superóxido en H_2O_2 , que es un sustrato para CAT y GSH-Px. La catalasa metaboliza el H_2O_2 en agua y oxígeno y GSH-Px reduce tanto el H_2O_2 como los hidroperóxidos orgánicos cuando reacciona con GSH. El glutatión reducido está presente en altas concentraciones en todas las células de los mamíferos, especialmente en las células renales, hepatocitos y eritrocitos. Este tripéptido protege a los grupos tiol de las proteínas de la oxidación no enzimática o como cosustrato de GSH-Px (7). Otras enzimas, como el glutamato: cisteína ligasa, que es necesaria para la síntesis de glutatión, sirven indirectamente.

La intercepción no enzimática se produce por antioxidantes de baja masa molecular (usualmente <900 Daltons), como las vitaminas E y C. Reaccionan con EROs para eliminarlos o para interrumpir sus reacciones oxidantes. El interior lipídico hidrofóbico de las membranas requiere un espectro diferente de antioxidantes, donde la vitamina E soluble en grasa es el antioxidante más importante y protege contra la pérdida de la integridad de la membrana. Los antioxidantes solubles en grasa son importantes para evitar que los ácidos grasos poliinsaturados de membrana (PUFA) sufran peroxidación lipídica. El glutatión elimina los radicales ya generados. Además, los antioxidantes solubles en agua, incluida la vitamina C, juegan un papel clave en la eliminación de EROs en la fase hidrofílica. Otras pequeñas moléculas antioxidantes también están presentes de forma natural en el plasma, como el ácido úrico y la bilirrubina (7).

Un aspecto importante a considerar es el uso de compuestos con potencial antioxidante en la dieta, cuyo uso es común en la población general y los estudios al respecto abundan. Pero hay que considerar que a menudo se han utilizado tratamientos antioxidantes no específicos para

tratar una variedad de enfermedades, y se asume que cualquier antioxidante, en cualquier concentración, -o a menudo mientras mayor sea, mejor-, será beneficioso para la salud, lo que no necesariamente es cierto. Un ejemplo es Nrf2 (Factor relacionado a NF-E2), factor de transcripción regulador de la respuesta antioxidante, cuya activación podría ser una estrategia para la quimioprevención, es decir para prevenir o tratar el riesgo de enfermedades como el cáncer. Sin embargo, las células cancerosas también pueden beneficiarse del aumento de la actividad enzimática controlada por Nrf2, por ejemplo, mediante la desintoxicación de medicamentos contra el cáncer. Por ende, el contexto, la frecuencia, el tipo de sujetos tratados (con riesgo general o alto), las dosis (cantidades nutricionales o superiores), y el tipo de ingesta (única o en combinación equilibrada), son factores críticos que pueden generar resultados diversos (3).

1.1. La vía del Nrf2

Como se mencionó, uno de los mecanismos que nos permite responder al estrés oxidativo es precisamente el regulado por Nrf2 (**figura 1**), un factor que influye positivamente en la síntesis de diferentes moléculas antioxidantes como las tiorredoxinas y enzimas sintetizadoras/reguladoras de glutatión que mantienen el equilibrio redox y desintoxican xenobióticos, chaperonas moleculares que facilitan el plegamiento óptimo de proteínas, y subunidades del proteasoma (8).

Nrf2 es un factor de transcripción de la subfamilia *cap'n'collar* que contiene un dominio de zipper de leucina y 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 proteosoma. Cuando la célula se expone a un estrés oxidante o a xenobióticos electrofílicos se dispara la liberación de Nrf2 mediante la fosforilación de una subunidad del complejo de Keap1 por las sustancias oxidantes (se lleva a cabo una reacción redox con sus residuos de cisteína). Nrf2 libre de Keap1 se transloca entonces al núcleo donde junto con Maf (*Musculo-Aponeurotic Fibrosarcoma*), se une a regiones ARE (*antioxidant response element*) del DNA, regulando positivamente la activación de elementos antioxidantes (9,10) (**figura 1**).

Respuesta antioxidante de Nrf2

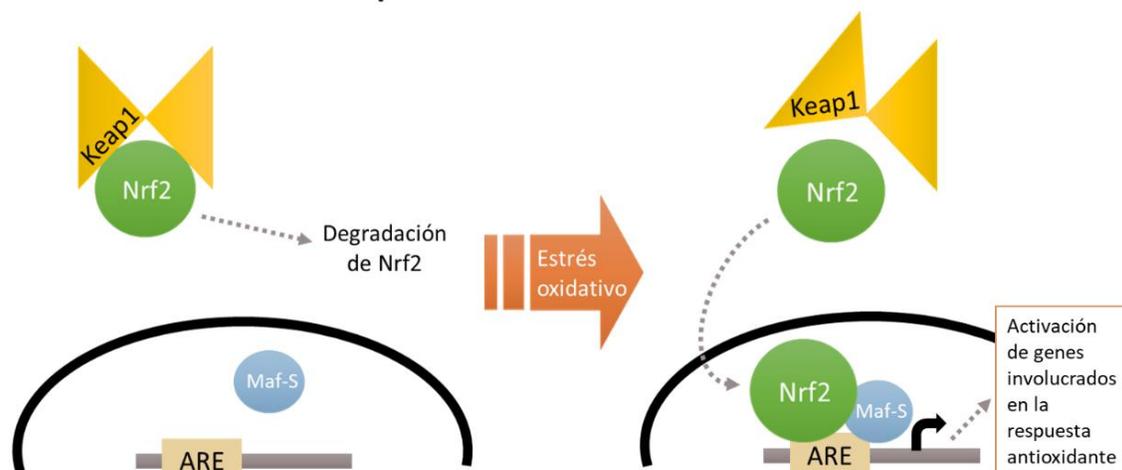


Figura 1. Vía de Nrf2.

Las proteínas MAF poseen un dominio básico que se une al ADN, y un dominio de cremallera o zipper de leucina que media la dimerización con factores de transcripción bZIP. En mamíferos los miembros de la familia MAF se pueden dividir en MAF pequeñas y grandes (participes en la regulación génica, diferenciación celular y oncogénesis), mientras que *Drosophila* posee una sola Maf, Maf-S. Las MAF pequeñas son proteínas altamente homólogas y de localización nucleica; forman heterodímeros con miembros de la familia de factores de transcripción de Cap 'n' collar (CNC) que no pueden unirse al ADN por su cuenta) (11).

Además de la regulación de la actividad de Nrf2 por Keap1, Nrf2 también es reprimida por la proteína que contiene un dominio de repetición de la transducina β (β -TrCP). Dicha regulación aumenta si Nrf2 es previamente fosforilado por la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3), a su vez regulada negativamente por la activación de la proteína cinasa B (PKB) (también conocida como Akt), afectada por mTORC2. También se ha observado que la sirtuina Sirt1 puede desacetilar Nrf2 y aumentar la actividad antioxidante (12-14).

En mamíferos, además de Nrf2, Nrf1 y Nrf3 también pueden regular el ARE, pero no son

funcionalmente redundantes. Los ratones mutantes homocigotos de Nrf1 mueren durante el desarrollo embrionario, los mutantes homocigotos de Nrf2 son susceptibles a estrés ambiental y sufren neurodegeneración en edad avanzada, mientras que los mutantes homocigotos de Nrf3 no tienen defectos obvios (15).

La familia Cap'n'collar (Cnc) está conservada en animales, representada en *C. elegans* por SKN-1 (Skinhead 1), y Cnc en *Drosophila*. *C. elegans* no posee homólogos de Keap1 ni Maf-S, y SKN-1 se une a los sitios que regula como monómero. Está presente en las células epiteliales del intestino y también en un conjunto de células del cerebro necesarias para traducir información sobre la disponibilidad de alimentos en señales endocrinas que influyen en el desarrollo y la reproducción del nemátodo (15).

En *Drosophila* el locus de *Cnc* produce varios transcritos por splicing alternativo, principalmente *CncA*, *CncB*, *CncC*, que median, además de la respuesta antioxidante, aspectos del crecimiento celular, el mantenimiento de células troncales, el desarrollo embrionario y la metamorfosis (16,17). El patrón de expresión embrionaria de CncB le da al embrión la apariencia de tener “una gorra y un collar” y da el origen al nombre de la familia de proteínas (18). CncC se halla presente desde la embriogénesis tardía hasta la vida adulta y es el homólogo de Nrf2. Al igual que SKN-1 y Nrf2, CncC puede ser activado por varios oxidantes, como el paraquat y el peróxido de hidrógeno (19-22).

Se ha estudiado poco la vía de Nrf2 en la mosca de la fruta, aunque se sabe que las mutaciones heterocigotas en el gen *Keap1* en *Drosophila* dan como resultado la activación de CncC a nivel transcripcional, con efectos positivos en la supervivencia de las moscas tras la exposición a agentes pro-oxidantes (17), de la misma manera que el aumento de la actividad de Nrf2 en otros organismos (mediante fármacos, por ejemplo) lleva a una respuesta mejorada. A su vez, tanto en ratones como en la mosca de la fruta, se ha observado que la supresión de la actividad de Nrf2 lleva a un estado de susceptibilidad aumentada al estrés oxidativo. En la mosca de la fruta una activación constante de Nrf2 también puede llevar al acortamiento de la vida del insecto (15, 21,

23). Como ya se mencionó, en diversos tipos de cáncer, la actividad de Nrf2 es importante para prevenir el daño que puede contribuir a su desarrollo, pero una sobre activación de Nrf2 también puede llevar a que las células cancerosas sean muy resistentes a tratamientos médicos, o los mecanismos de muerte celular propios. Esta área es un área de investigación prometedora, donde la manipulación de la vía de Nrf2 podría ayudar en el tratamiento de diversas enfermedades (21).

En los últimos años se ha comenzado a estudiar también el efecto que Nrf2 tiene sobre la regulación de genes implicados en el metabolismo intermedio, regulando positivamente los implicados en la generación de NADPH, la biosíntesis de purinas y la β -oxidación de ácidos grasos, al tiempo que suprime los implicados en la lipogénesis y la gluconeogénesis (12).

1.2. Producción de EROs

Las mitocondrias son importantes fuentes intracelulares de EROs. La cadena de transporte de electrones mitocondrial es la principal fuente de ATP en los mamíferos. El trifosfato de adenosina (ATP), la "moneda de energía" de la célula, es el producto final de una serie de vías que involucran la oxidación de sustratos, principalmente carbohidratos y grasas, en el citosol (glucólisis) y en las mitocondrias (descarboxilación del piruvato, ciclo del ácido tricarboxílico, y fosforilación oxidativa). El complejo de la cadena respiratoria consta de cuatro complejos de múltiples subunidades (I-IV) y dos portadores de electrones, que generan un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial, que a su vez impulsa la ATP sintasa (complejo V) para generar ATP (23). En los animales, el transporte de electrones mitocondrial "con fugas" es la principal fuente de estrés oxidativo. Tanto en animales como en las plantas, la NADPH oxidasa, aminas oxidasas y la xantina oxidasa también producen EROs. Además, las oxidasas microsomales pueden producir EROs como subproductos de la desintoxicación xenobiótica.

Varios factores externos influyen también en la producción de EROs. Estos incluyen compuestos químicos (por ejemplo, compuestos industriales en el ambiente como plomo, mercurio, dióxido

de azufre y cadmio) y factores de estilo de vida (por ejemplo, fumar y consumo de alcohol). El estrés por nutrientes en los animales puede incluir deficiencias específicas en nutrientes requeridos como aminoácidos esenciales, vitaminas y metales. Estas deficiencias pueden provocar estrés oxidativo, especialmente si faltan vitaminas antioxidantes. Se ha visto que la restricción calórica en los animales prolonga la vida útil y una de las teorías principales al respecto es que se debe al menos en parte a que minimiza la acumulación de daño oxidativo correlacionado con la edad.

1.3. Defectos en la señalización de la insulina y estrés oxidante

La vía de la insulina, al igual que la vía de Nrf2, está conservada evolutivamente entre organismos (**figura 2**). En *Drosophila*, la vía de la insulina Inicia con la unión de un péptido parecido a la insulina (ILP, por sus siglas en inglés) al receptor de insulina -InR-, el cual se autofosforila y recluta IRSs (sustratos del receptor de insulina), que a su vez permiten el reclutamiento de PI3K (una cinasa, que consta de una subunidad catalítica, Dp110, y una subunidad adaptadora, p60) a la membrana. La actividad de PI3K produce fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), reclutando y activando las cinasas PDK1 y Akt. Akt actúa en una gran variedad de proteínas objetivo, entre ellos FOXO (FKH), al cual inhibe e induce la activación de TORC1, que tiene a su vez varios blancos de fosforilación, como la cinasa S6K, que, una vez activada por fosforilación, fosforila a la proteína S6 de la subunidad ribosomal 40S, y activa así la traducción de proteínas (24).

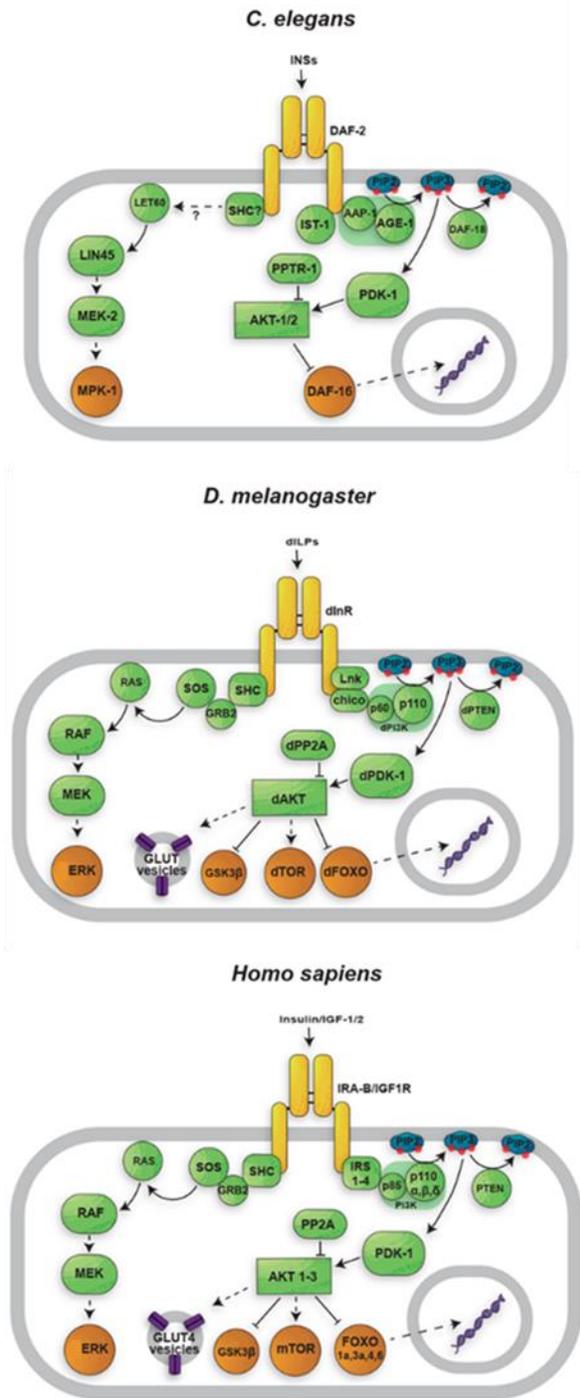


Figura 2. Esquema general de la vía de la insulina en diferentes organismos (Adaptado de 25, anexo 3). Abreviaturas: IRA-B/IGF-1R: receptor de la insulina/factor de crecimiento similar a la insulina, respectivamente. Shc: proteína adaptadora. Grb2 Sos (Son of sevenless): factor de intercambio de nucleótidos de guanidina. Ras: pequeña proteína de unión a GTP; Raf: serina-treonina cinasa. MEK: cinasa de doble especificidad. ERK: serina-treonina cinasa. Glut4: transportador de glucosa de membrana. IRS 1-4: sustratos del receptor de insulina 1 a 4. p85 y p110: subunidades reguladora p110 y catalítica de la PIP3K, o fosfatidilinositol-3-quinasa. PIP2: fosfatidil inositol bifosfato, un fosfolípido de membrana. PIP3: fosfatidilinositol trifosfato. PTEN: fosfatasa lipídica. PDK-1: proteína quinasa. PP2A: proteína fosfatasa. AKT 1-3 o PKB: proteínas quinasas de serina-treonina. GSK3 β : glucosa sintasa quinasa, una proteína cinasa de serina-treonina. mTOR: diana de la rapamicina, una serina-treonina cinasa. Foxo: factor de transcripción tipo cabeza de horquilla. Para *C. elegans*: Daf-2 es el receptor de insulina, Let-60 es el homólogo de Ras, Lin-45 es el homólogo de Raf, AAP-1 es el homólogo de la proteína adaptadora para PI3K, Age-1 es el homólogo de PI3K, Daf-16 es el homólogo de PTEN, PPTR-1 es el homólogo de PP2A, y Faf-16 es el homólogo de Foxo. Para *D. melanogaster*: dInR es el homólogo del receptor de insulina, y Link y Chico son homólogos de las proteínas IRS.

Está ampliamente documentado el aumento en daño oxidante cuando hay una desregulación en

la señalización de la insulina, incluyendo el daño al ADN, pero los mecanismos permanecen elusivos, lo que no es de sorprender dado la cantidad de intercomunicación que debe de existir entre mecanismos que regulan el consumo y metabolismo de nutrientes, el crecimiento y muerte celular, los mecanismos de respuesta al estrés y reparación de daño, etc. Entre los cambios documentados, resaltan aquellos que se han encontrado y usado como parámetro para medir el grado de daño oxidante, como los niveles de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) elevados en la orina, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, alteración de los complejos respiratorios mitocondriales, liberación de citocromo c, etc. (26). En general no sólo se observa un aumento de daño oxidante en el ADN, sino también mayor susceptibilidad a los mutágenos y alteraciones en la reparación del ADN. La extensión general del daño del ADN a su vez puede estar relacionado con la inestabilidad genómica que puede desembocar en cáncer (27).

Cuando se ve afectada la señalización de la insulina, el daño en el ADN puede darse directamente si las especies reactivas de oxígeno atacan al ADN, y se puede considerar como una vía directa. De manera indirecta, el daño puede ocurrir a través de las vías de señalización celular y por la eficacia reducida para reparar el daño del ADN. La vía de la insulina por mediación de Akt es una vía importante implicada en el crecimiento celular que puede ser activada por niveles altos de insulina, glucosa, productos finales de glicosilación avanzada (AGE) y ácidos grasos libres (28). Además, en vertebrados, la hiperglicemia y dislipidemia pueden llevar a un aumento del estrés oxidante.

En mamíferos, se han propuesto varios mecanismos por los cuales la hiperglicemia aumenta el estrés oxidativo: La hiperglicemia directamente incrementa la cantidad de EROs en el organismo debido a la autooxidación de la glucosa con la subsecuente generación de radicales hidroxilo (29). Además, la producción excesiva de superóxido por la mitocondria conduce a la inactivación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, provocando la acumulación de metabolitos anteriores a este punto de la glucólisis, que se procesan por las otras vías alterando la homeostasis celular:

- a) un mayor flujo en la vía del poliol, donde el exceso de glucosa se convierte en sorbitol

mediante la aldosa reductasa, lo que conlleva al consumo de NADPH, que es usado normalmente para la regeneración del antioxidante glutatión;

b) la activación de la proteína cinasa C (PKC), por los altos niveles de diacilglicerol lo que a su vez activa NOXes (oxidasas de NADPH);

c) la generación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), que consiste en la unión de glucosa a diferentes proteínas membranales, circulantes, estructurales, etc. que normalmente no serían glucosiladas; y

d) mayor flujo en la vía de las hexoaminas donde el incremento de fructosa 6 fosfato que entra a la vía de hexosaminas lleva a la mayor producción de UDP-N acetil glucosamina que también modifica proteínas.

En el caso de la dislipidemia, en *Drosophila* se ha observado que moscas obesas acumulan triacilgliceroles en el cuerpo graso, un órgano homólogo al tejido adiposo de los mamíferos y presentan complicaciones metabólicas y fisiológicas que incluyen hiperglucemia, desequilibrio redox y reducción de la longevidad; todos estos son similares a los observados en humanos obesos. Los modelos de obesidad y diabetes inducidos por dieta reflejan en efecto defectos metabólicos como los comúnmente observados en humanos: Cuando la cantidad de grasa excede la capacidad de los órganos que almacenan lípidos, los ácidos grasos libres afectan y dañan otros órganos que no almacenan lípidos. Esta lipotoxicidad puede dañar al organismo y acelerar el declive de su salud. Además, el aumento de ácidos grasos puede provocar el aumento de señalización de vías pro-inflamatorias. La inflamación juega un papel importante en el desarrollo y progresión de enfermedades metabólicas como la diabetes. La producción excesiva de EROs activa las vías de señalización relacionadas con la inflamación, como PKC, MAPK y NF- κ B, y conduce a la producción de un gran número de citocinas e incluso factores de crecimiento, donde la actividad excesiva de citosinas y ácidos grasos estimula también procesos de fosforilación que modifican la señalización de vías como la de la insulina, lo que resulta en un incremento de la resistencia a la insulina (30). Dado que la vía de la insulina ejerce normalmente un efecto antiinflamatorio (29), la afectación de señalización de la insulina 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 H₂O₂ y por tanto el estrés oxidativo. Además, en vertebrados también se afectan los niveles de glutatión (30, 31). Esta interconexión entre el estado inflamatorio, el estrés oxidativo y la vía de la insulina no es sorprendente dado que el sistema inmunitario 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 (32).

En *Drosophila* las mutaciones en la vía de la insulina suelen ser letales si son homocigotas, por lo que a menudo se usan moscas heteroalélicas viables. Entre los fenotipos viables más comunes provocados por mutantes en la vía de la insulina, además de la dislipidemia e hiperglucemia, se observa la disminución de la talla del individuo y disminución en la longevidad (o un aumento de longevidad cuando existe restricción calórica) (33,34). Estudios previos de nuestro grupo han mostrado que mutantes heteroalélicos *InR^{el9/3t5}* muestran defectos severos, particularmente en la cantidad de carbohidratos, además de hiperactividad. Las mutantes de *S6k^{-1/p1713}* muestran niveles altos de lípidos a edades avanzadas e hipoactividad (publicado en 35, anexo 1).

1.4. Las vías de la insulina y del Nrf2

Los estudios sobre la interacción entre la vía de la insulina y del Nrf2 se han llevado a cabo principalmente en ratones, donde se usan ratones *Knock-out* para *Nrf2* o *Knock-down* para *keap1*, o se usan inductores de *Nrf2*. Existe controversia en estos modelos: aunque se suele observar que la activación puntual de Nrf2 mejora la salud, la activación crónica de Nrf2 provoca el efecto contrario (36). Un punto de interacción directo entre la vía de la insulina y la vía de Nrf2 es la inhibición de la glucógeno sintasa cinasa 3 beta (GSK-3β) por la vía de la insulina, lo que incrementa la protección oxidante de Nrf2 (34 37). En general, los efectos beneficiosos de Nrf2 se han demostrado en diferentes organismos, pero parecen ser contexto-dependientes y los mecanismos subyacentes son aún poco comprendidos (38-40). En *Drosophila* se conoce

relativamente poco sobre la función de la vía de CncC además de su papel en el estrés oxidativo, y se conoce aún menos sobre cómo podría interaccionar la vía de CncC con la vía de la insulina.

Debido a la variedad de mecanismos que se ven alterados cuando se afecta la señalización de la insulina, es difícil dilucidar la contribución de cada uno. Además, las diferencias entre individuos: genéticas, nutricionales, de actividad, etc., se añaden a la dificultad de esclarecer el papel de los diferentes procesos involucrados. Por ejemplo, si bien en *Drosophila* algunas mutaciones en la vía de la insulina pueden llevar a un aumento de estrés oxidante, curiosamente 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. Esto podría deberse a la hormesis mitocondrial, donde el aumento de generación de especies reactivas de oxígeno bajo ciertos límites puede causar una respuesta adaptativa donde se mejora la respuesta antioxidante a corto plazo. También pueden mostrar una extensión de vida en condiciones de restricción calórica (17); esto es consistente con la interpretación del envejecimiento en parte como consecuencia de la acumulación de daño oxidativo (41-43). Se observado que la respuesta antioxidante se deteriora con la edad desde moscas a humanos (44, 45). También hay diferencia en la longevidad de hembras y machos de *Drosophila*, algo que al parecer está ligado al menos en parte a diferencias en la capacidad basal de ambos sexos de responder ante el estrés oxidativo (21), por lo que es importante esclarecer la forma en que las mutaciones en la vía de la insulina en estos organismos afectan el estrés oxidativo durante la vida del organismo.

Como en los mamíferos, los relojes circadianos de las moscas generan ritmos de transcripción en una variedad de vías metabólicas relacionadas con la alimentación y la desintoxicación, y la arritmia causada por mutaciones en los genes del reloj central conduce a síntomas de envejecimiento acelerado tanto en moscas como en mamíferos, incluidos fenotipos neurodegenerativos, por ejemplo los análisis del transcriptoma circadiano en cabezas de mosca revelaron que la expresión de muchos genes implicados en la defensa contra especies reactivas de oxígeno (EROs) siguen un ritmo circadiano (estudios descritos en (46)). Dado que la

alimentación de las moscas es rítmica, se puede esperar que la susceptibilidad a las toxinas y EROs esté controlada por un reloj. De hecho, las moscas muestran una variación en la mortalidad cuando la exposición a la misma dosis de un compuesto tóxico específico se da en diferentes momentos del día.

Aunque el sueño parece estar ampliamente conservado en los animales, las funciones fisiológicas del sueño siguen sin estar claras. Una hipótesis controvertida para la función del sueño es la teoría del flujo de radicales libres, que propone que la función central del sueño es actuar como un antioxidante para el cerebro. A pesar del atractivo de esta hipótesis, los datos que la respaldan son contradictorios, y podrían no sólo involucrar al cerebro. En un estudio reciente, se buscó identificar un defecto fisiológico común a las moscas que duermen poco que podría proporcionar información sobre la función y la regulación del sueño, encontrándose que mutantes que duermen poco son sensibles al estrés oxidativo agudo y exhiben tiempos de supervivencia más cortos que los controles, y que el aumento de la duración total del sueño de las moscas silvestres promueve la supervivencia después del desafío oxidativo (47). Otro trabajo reciente encontró que la falta de sueño conducía a la acumulación de especies reactivas de oxígeno específicamente en el intestino. Las EROs no solo se correlacionaban con la falta de sueño, sino que su neutralización prevenía el estrés oxidante y permitía que las moscas tuviesen una vida normal con poco o ningún sueño. El rescate se podía lograr con compuestos antioxidantes orales o con expresión transgénica dirigida al intestino de enzimas antioxidantes (48). Aún no ha sido dilucidado por qué el daño se observa en el intestino y no en el cerebro, pero el sistema nervioso tiene altas demandas energéticas y es casi seguro que sea fundamental mantener la oxidación generalmente baja en las neuronas porque no pueden ser reemplazadas, en contraste con las células intestinales que experimentan un recambio constante. Estos ejemplos revelan la conservación de los mecanismos de homeostasis subyacentes entre mamíferos y la mosca de la fruta, en particular respecto al papel del estrés oxidante.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad del CncC/Nrf2 se conoce de manera fragmentaria en la mosca; en particular, es limitado el conocimiento de las funciones específicas de la vía de CncC en la respuesta antioxidante en el contexto de una señalización de la insulina alterada.

3. HIPÓTESIS

La manipulación de la vía de CncC puede contrarrestar el deterioro conductual y metabólico que la desregulación en la señalización de la insulina produce en *Drosophila melanogaster*.

4. OBJETIVO

Dilucidar cómo una mutación en la vía de CncC puede afectar la conducta y metabolismo de moscas con desregulación en la vía de insulina.

4.1. Objetivos específicos

- Determinar si hay cambios en la actividad locomotora y ritmicidad de moscas con mutaciones en genes de la vía de la insulina (*InR* o *S6k*) cuando presentan además una mutación en la vía de CncC (*keap1*).
- Comparar la supervivencia de moscas mutantes de la vía de la insulina y de la vía de CncC ante un reto oxidante.
- Medir niveles de lípidos y carbohidratos en moscas mutantes de la vía de la insulina y de la vía de CncC.
- Realizar un análisis transcriptómico de cepas mutantes para discernir posibles mecanismos subyacentes.

5. JUSTIFICACIÓN/RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO

Este trabajo permitirá generar conocimiento básico sobre cómo la vía de CncC puede afectar los fenotipos presentes en la mosca de la fruta ante la falta de señalización de la insulina, ampliando nuestro conocimiento sobre la interacción entre estas dos vías. El uso de *Drosophila* como modelo para este estudio tiene múltiples beneficios: su ciclo de vida corto y genoma con menor redundancia genética contribuyen a la relativa facilidad de obtener cepas con fondos genéticos homogenizados y permiten la manipulación de genes específicos; en este caso *InR*, *S6k*, *Keap1*, lo que nos permite asignar con mayor robustez los fenotipos observados a las mutaciones estudiadas.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

6.1 Cepas

Se utilizaron las siguientes cepas de *Drosophila melanogaster*:

Genotipo	Descripción
yw	Cepa control.
$yw; \frac{InR^{3t5}}{TM3}$	Cepa con alelo mutante de <i>InR</i> .
$yw; \frac{InR^{e19}}{TM3}$	Cepa con alelo mutante de <i>InR</i> .
$yw; keap1^{EY02032}$	Cepa con dos alelos mutantes para <i>Keap1</i>
$yw; \frac{S6k^{p1713}}{TM3}$	Cepa con un alelo mutante de <i>S6k</i> .
$yw; \frac{S6k^{l-1}}{TM3}$	Cepa con un alelo mutante de <i>S6k</i> .
$ARE - GFP$	Cepa con marcador GFP para ARE.

Estas cepas están en el cepario del laboratorio de Genética de Transducción de Señales del Instituto de Neurobiología, donde se cultivan en viales con alimento a base de piloncillo y levadura a una temperatura promedio de 25°C en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h c/u.

A partir de las cepas anteriores, se realizó una serie de cruza para obtener las siguientes cepas:

Genotipo	Descripción
$yw; \frac{keap1^{EY02032}, InR^{e19}}{TM3}$	Cepa con alelo mutante para <i>Keap1</i> y alelo mutante de <i>InR</i> .
$yw; \frac{keap1^{EY02032}, S6k^{p1713}}{TM3}$	Cepa con alelo mutante para <i>Keap1</i> y alelo mutante de <i>dS6k</i> .

Todas las cepas fueron isogenizadas en un mismo fondo genético con *yw*. El reportero de ARE consiste en 4 secuencias AREs río arriba de un promotor basal para controlar la expresión de GFP (17, 49), de tal manera que cuando Nrf2 se transloca al núcleo para activar la respuesta antioxidante ante condiciones estresantes como la administración del herbicida paraquat, se activa la expresión de GFP.

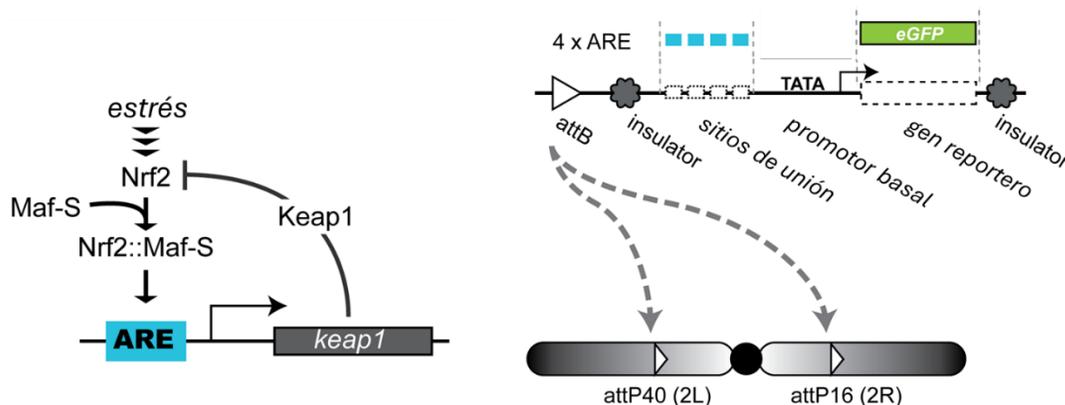


Figura 3. Reportero fluorescente de la activación de Nrf2. Consiste de un reportero para eGFP bajo el control de 4 copias de la secuencia conservada del Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE) a la que se une el heterodímero CnCC:Maf-S. Adaptado de (49).

6.2 Caracterización conductual

6.2.1. Medición de resistencia a Paraquat y H₂O₂ 3% :

6.2.1.1. Dietas

Las siguientes dietas fueron empleadas:

Nombre	Composición
Dieta estándar	10% piloncillo y 10% levadura en agar/grenetina, con ácido propiónico como agente antibacterial.
Agar	Sacarosa 10% en agar + ácido propiónico.
Carolina	Medio instantáneo comercial (50).
Sacarosa	Sacarosa 10% en papel filtro.

Para las pruebas de resistencia a agentes pro-oxidantes, se agregaron soluciones de H₂O₂ (concentración final 1.5% o 3%) o paraquat (concentración final 10 mM o 20 mM) a cada dieta.

6.2.1.2. Pruebas de supervivencia en grupos

Se colocaron grupos de 10 moscas de 7 días post-eclosión en viales con alimento ± agente pro-oxidante, y controles. El alimento se cambió cada dos días, y se registró la supervivencia una vez por día.

6.2.1.3. Pruebas de supervivencia individuales y actividad motora

Para obtener parámetros más precisos del comportamiento de las moscas tras la exposición a agentes pro-oxidantes, se colocaron moscas en viales individuales en el equipo DAM2 Drosophila Activity Monitor de TriKinetics (51), el cual detecta la cantidad de veces que la mosca pasa por en medio del vial por minuto, y los resultados se analizaron con los programas DAMFilescan110 (51), ShinyR-DAM (52) y rethomics (53) en R, así como scripts personalizados en Python. El monitor se conectó por 8 días para registrar hora de muerte. Para el análisis de actividad se consideraron los

primeros dos días. Se obtuvieron datos tanto en períodos de completa oscuridad como en regímenes 12:12 luz:oscuridad.

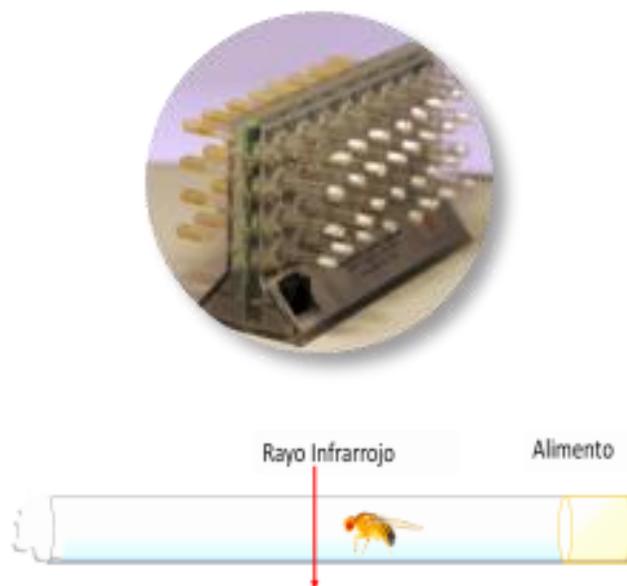


Figura 4. Monitor de actividad y vial individual.

6.2.1.4. Pruebas de preferencia

Para determinar si las moscas perciben la presencia de paraquat en el alimento, se usó la prueba de Ex-Q (**figura 4**, 54). Se colocaron grupos de 10 moscas en viales con dos depósitos de alimento estándar, uno de ellos adicionado con paraquat 20 mM. Ambas dietas contenían además uno de dos colorantes: Azul brillante FCP (Sigma 80717-100MG, abs 630nm) o Naranja II (Sigma 75370-25G, abs 483nm). Tras 8 horas, se cambiaron los depósitos por alimento estándar sin colorante. Luego de 24 horas, tiempo suficiente para digerir el colorante consumido, las moscas se cambiaron de vial y la excreta se diluyó con 400 μ L de agua. Se midieron las dos absorbancias en cada muestra, usando diluciones de los alimentos con colorante para obtener las curvas de concentración y determinar las cantidades de alimento ingerido.

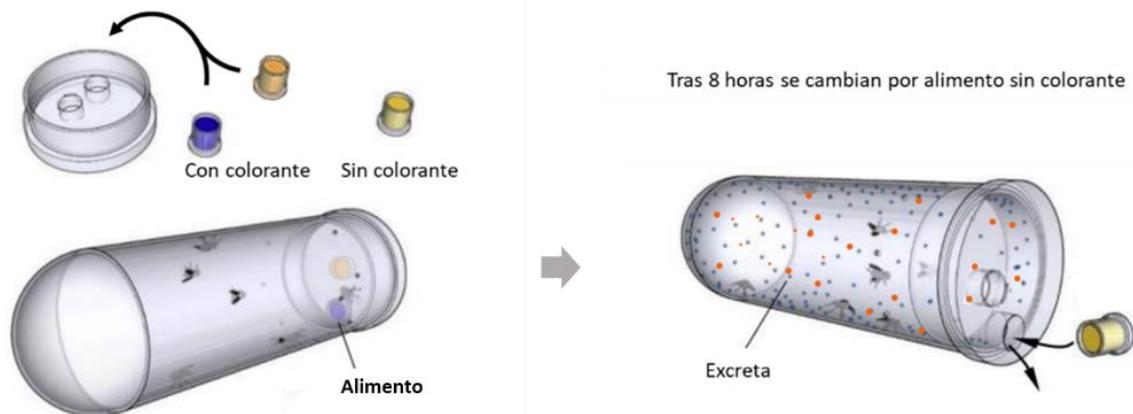


Figura 4. Esquema del vial usado para la prueba Ex-Q. Uno de los alimentos con colorante está adicionado con paraquat. La combinación colorante (naranja o azul)/paraquat se intercambia cada replicado para descartar efectos por el colorante mismo. Adaptado de (54).

6.3. Observación de reporteros fluorescentes

Moscas con reportero fluorescente para la activación de ARE se alimentaron con paraquat 20 mM o peróxido de hidrógeno 3% por 16 horas, y se observó la fluorescencia en la cabeza o en la mosca completa usando la técnica de bellymount (53 55) en un esteresocopio.

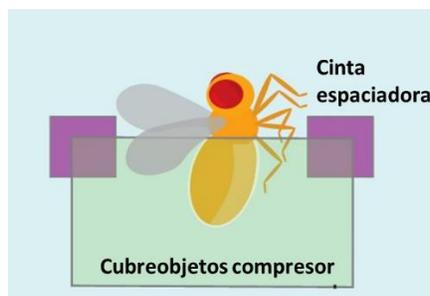


Figura 5. Técnica de Bellymount, consiste en comprimir el abdomen de la mosca con un cubreobjetos con pegamento transparente, que al secar permite observa con mayor claridad los órganos internos. Adaptado de (55).

6.4. Caracterización metabólica

6.4.1. Glucosa y glucógeno.

Para la medición de glucosa y glucógeno se utiliza el kit comercial Glucose (GO) Assay GAGO-20 de Sigma (57). 5 moscas de 7-8 días post-eclosión recién colectadas se enjuagaron con 1 ml de PBS frío y se colocaron en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml con 100 μ l de PBS frío donde se homogenizaron rápidamente con un pistilo automático (Kontes; 749540-0000) en hielo. Se extrajeron 10 μ L para medir el contenido proteico con el kit BioRad DC Protein (56). El sobrenadante se calentó 10 min a 70°C, y se centrifugó tres minutos a 13000 rpm a 4°C. Se pipetearon 30 μ L de cada muestra por duplicado (diluida 1:5 en PBS para machos y 1:8 para hembras), estándares de glucosa y glucógeno en diluciones de 0.01-0.16 mg/ml, y blancos de PBS en una placa de 96 pocillos. A uno de los duplicados de cada muestra y a las diluciones de glucosa se añadieron 100 μ l de reactivo GO (que consiste de glucosa oxidasa, peroxidasa y o-Dianisidina). La reacción consiste en la oxidación de la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, que a su vez participa en la generación de o-Dianisidina oxidada (57). Al resto de las muestras y a las diluciones de glucógeno se agregaron 100 μ l de reactivo GO con 0.1 μ l de amyloglucosidasa (Sigma A1602; 25mg), sellando los pocillos con parafilm para evitar la evaporación e incubando la placa a 37°C durante 30-60 min. Se añadieron entonces 100 μ l de H₂SO₄ 12N y se midió la absorbancia a 540 nm. Para determinar la concentración de glucógeno se restó la absorbancia de las mediciones de glucosa.

6.4.2. Proteínas.

Para la medición de proteínas, mediante el kit BioRad DC Protein (56), 10 μ l de muestra homogeneizada se diluyeron (1:5 para machos y 1:8 para hembras) en PBS frío. Se centrifugó la muestra a velocidad máxima durante 5 minutos y se pipetearon 5 μ l de un blanco de PBS, diluciones de BSA 0.18-1.45 mg/ml y muestras en una placa de 96 pozos. Se añadieron 25 μ L de una solución alcalina de tartrato de cobre y 200 μ L de reactivo de Folin, se mezclaron y tras 5 minutos de midió la absorbancia a 750 nm.

6.4.3. Lípidos.

Para la medición de lípidos totales, se trituró una mosca (previamente congelada a -70°C) por prueba en 500 μl de cloroformo-metanol 1:1 para extraer los lípidos. El homogenizado resultante se calentó hasta la evaporación de los solventes. Se agregaron 200 μl ácido sulfúrico y se calentó por dos minutos. Finalmente se agregaron 2.4 ml de reactivo de vainillina (1.2 mg de vainillina en 1L de ácido sulfúrico 68%) para generar derivados sulfónicos cuya absorbancia se midió a 490 nm. La curva de calibración se realizó con aceite de girasol comercial (58).

6.4.4. Glutación.

El ensayo se basa en el sistema de reciclaje de glutación por DTNB y la glutación reductasa de acuerdo a (59). El DTNB y el glutación (GSH) reaccionan para generar el ácido 2-nitro-5-tiobenzoico que tiene un color amarillo. El GSSG generado puede reducirse de nuevo a GSH mediante la glutación reductasa, y el GSH reacciona de nuevo con el DTNB para producir más ácido 2-nitro-5-tiobenzoico. Por lo tanto, el sistema de reciclado detecta glutación total. Se utilizaron 10 moscas de 7 días (previamente congeladas a -70°C) post-eclosión homogeneizadas en 80 microlitros de búfer de glutación, se agregaron 20 μl de SSA 5% y se centrifugó a 8000 x g por 10 minutos para obtener el sobrenadante. En una placa de 96 pozos se pipetearon 160 μl de la Mezcla de Reacción para generar NADPH y se incubó a temperatura ambiente 10 minutos. Se agregaron 20 μl de los estándares de GSH y las muestras y se incubó a temperatura ambiente 10 minutos. Se agregaron 20 μl de la Solución Sustrato y se midió la absorbancia a 415 nm 30 minutos después de iniciada la reacción.

6.5. Transcriptómica

Se usaron 10 moscas por genotipo, de la misma edad, previamente congeladas a -70°C . El ARN total se extrajo con Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, incluido un tratamiento con DNasa (QIAGEN) para obtener 25 μL de muestra, se le agregó 1 μL de Riboblock

y se congeló a -70°C hasta su análisis en un espectrofotómetro NanoDrop y su posterior secuenciación. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por condición.

La secuenciación del ARN se realizó con un Illumina NextSeq500, lecturas pareadas de 75 pb. Las secuencias resultantes se analizaron con FastQC, se removieron primers y poli-Gs con Trim Galore-0.6.10, se alineó el transcriptoma al genoma de referencia 6.1 de *Drosophila melanogaster* con Star-2.7.10b (Spliced Transcripts Alignment to a Reference), realizando el conteo luego con HTSeqCount, la normalización y el análisis de expresión diferencial en R.

6.6. Estadística

Los análisis estadísticos se realizan en las plataformas GraphPad Prism 9.3.1, Matlab 2020b y RStudio. Los gráficos se elaboraron en GraphPad Prism 9.3.1 y ShinyRDam en RStudio. Para la medición de actividad locomotora se emplean pruebas no paramétricas. Las curvas de supervivencia se representan como gráficos de Kaplan-Meier y se realizó análisis de rango logarítmico. La supervivencia mediana se definió como el tiempo en que la curva de supervivencia cruza el 50%. Para las comparaciones de pares, se empleó la corrección de Bonferroni.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de heterocigosis u homocigosis de *keap1* en la actividad locomotora de moscas silvestres y mutantes de la vía de la insulina

Para estudiar el efecto que la mutación de *keap1* pudiese tener en la ritmicidad y actividad locomotora de las moscas, se analizó la actividad de las moscas en:

- Luz y oscuridad 12:12 (**figuras 6 y 7**), donde se observa ritmicidad tanto para machos como para hembras silvestres (*yw*), mutantes heterocigotas de *keap1* y mutantes homocigotas de *keap1*. Los niveles de actividad de machos y hembras muestran dos picos al amanecer y al anochecer subjetivos, y muy poca actividad en la noche. En el caso de las hembras, éstas permanecen en constante actividad durante en el día, mientras que los machos muestran un segundo periodo de descanso durante el día.

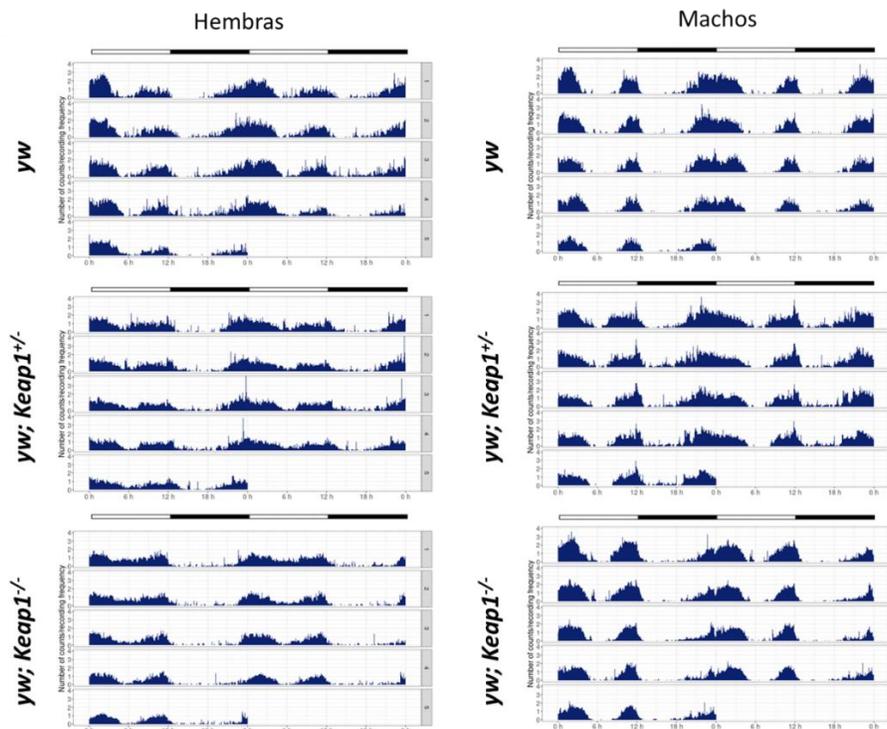


Figura 6. Actogramas de moscas silvestres y mutantes de *keap1* en Luz:Oscuridad 12:12 (periodos de luz y oscuridad indicados por las barras blancas y negras superiores). Se observa cómo la presencia de dos alelos mutantes de *keap1* influye en la ritmicidad, pues las moscas son mucho menos activas en la noche.

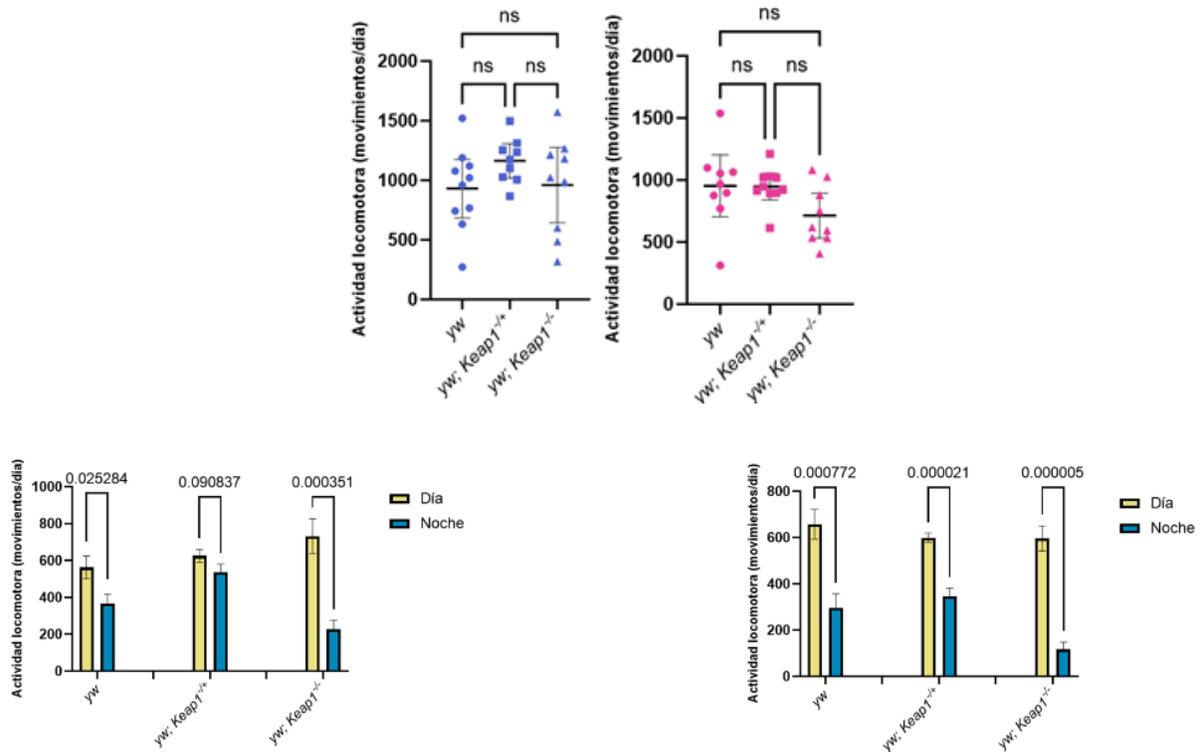


Figura 7. Arriba. Cuantificación de niveles de actividad de machos (izquierda) y hembras (derecha) en Luz:Oscuridad 12:12. El nivel de actividad total no muestra diferencias significativas. **Abajo.** Niveles de actividad en luz (barras amarillas) y oscuridad (barras azules). La actividad es mayor durante el día y la diferencia es más marcada en las mutantes homocigotas de *keap1*. N=9-10

- Oscuridad (**figura 8**), donde se observa una pérdida de ritmicidad para hembras silvestres (*yw*), y mutantes heterocigotas de *keap1*, pero no para mutantes homocigotas de *keap1*. Si bien los machos mantienen la ritmicidad, e incluso es más fuerte en machos mutantes homocigotas, como se observa al comparar la fuerza del ritmo (“Qp.act/Qp.sig”), los actogramas denotan cómo también pierden uno de sus dos periodos de descanso.

Como se observa en las figuras 6-8 y la **tabla 1**, las mutaciones de *keap1* influyen en la periodicidad y los niveles de actividad locomotora, aunque el efecto varía dependiendo del sexo y si la mutación está en homocigosis o si las moscas poseen sólo un alelo mutante (heterocigotas).

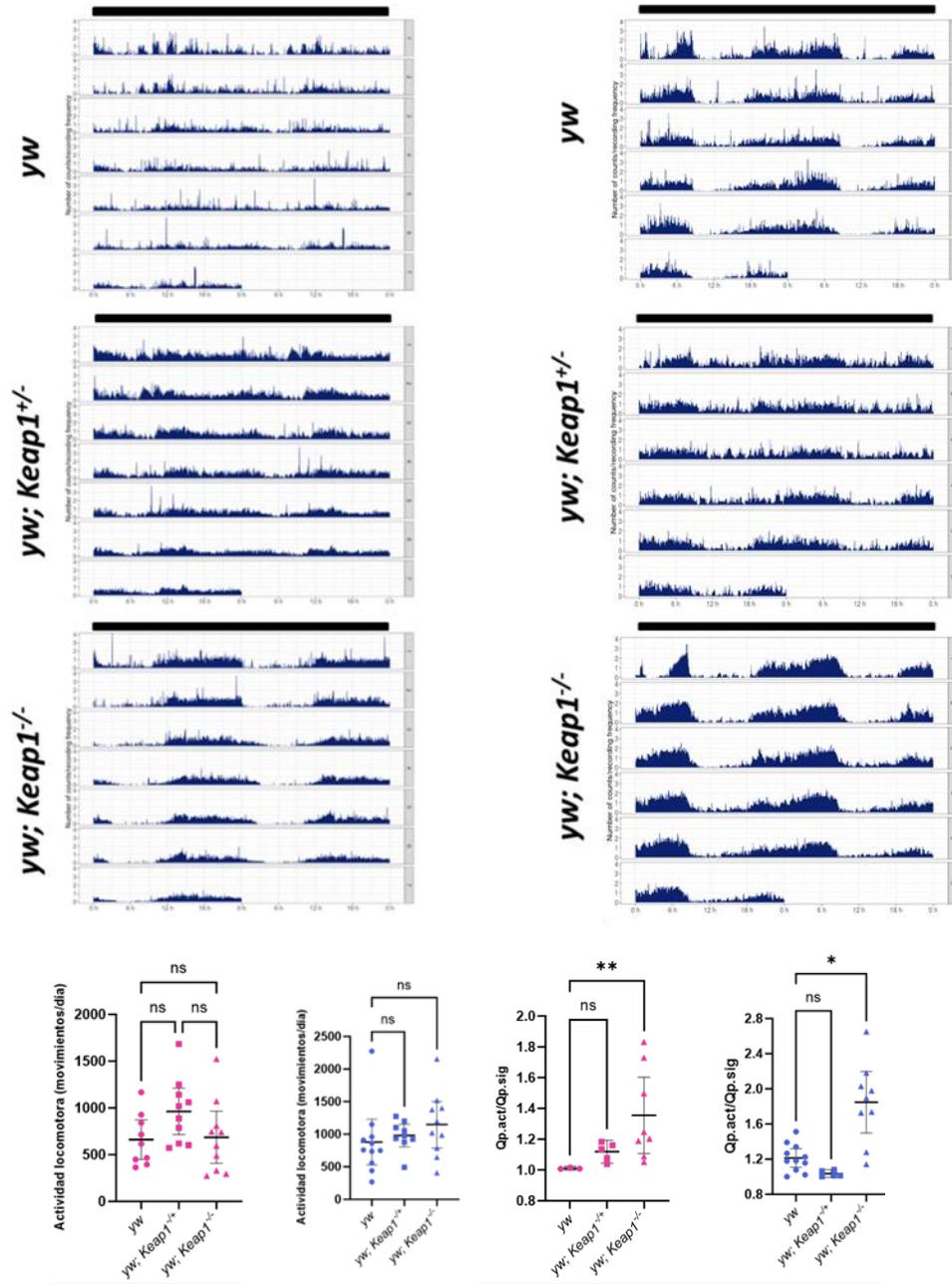


Figura 8. Actogramas de hembras (izquierda, gráficas rosa) y machos (derecha, gráficas azul) silvestres y mutantes de *keap1* en completa oscuridad. La presencia de un alelo mutante de *keap1* influye en los niveles de actividad de machos, y dos alelos mutantes de *keap1* mejoran la ritmicidad (como se observa en los actogramas) y la fuerza del periodo ($Qp.act/Qp.sig$) $Qp.act$: Potencia del periodograma calculado mediante chi-cuadrada. $Qp.sig$: Umbral de significancia (0.05). $N=9-11$. *** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$.

Tabla 1. Periodicidad de moscas *yw*, *yw; keap1^{+/-}* y *yw; keap1^{-/-}*

Machos				
<i>Genotipo</i>	<i>Mediana de periodo</i>	<i>Media</i>	<i>SEM</i>	<i>Moscas con ritmicidad</i>
<i>yw</i>	23.60	23.71	0.13	11/11
<i>yw; keap1^{+/-}</i>	23.80	23.60	0.23	5/10
<i>yw; keap1^{-/-}</i>	23.80	23.76	0.04	9/10
Hembras				
<i>yw</i>	24.00	23.93	0.05	8/10
<i>yw; keap1^{+/-}</i>	23.90	23.65	0.29	4/10
<i>yw; keap1^{-/-}</i>	24.00	23.76	0.10	9/10

En vista de estos resultados, y dado que las mutantes de *InR* son hiperactivas y las mutantes de *S6k* son hipoactivas (anexo 1), nos preguntamos cómo influiría en sus niveles de actividad locomotora la presencia de heterocigocis para *keap1* (con un alelo mutante de falta de función y otro silvestre). Encontramos que sus niveles de actividad vuelven a los niveles de moscas silvestres si poseen un alelo mutante de *keap1*, independientemente de si eran hiperactivas (*InR*) o hipoactivas (*S6K*) (**figura 9** y **figura 10**).

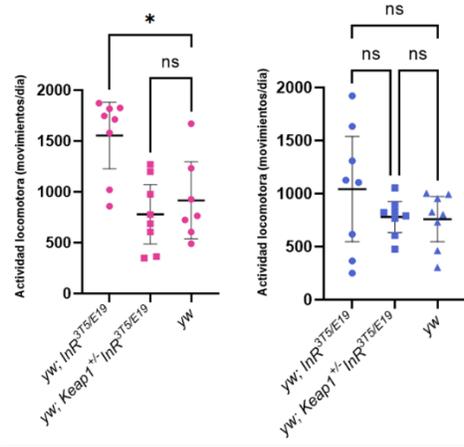


Figura 9. Niveles de actividad locomotora de hembras (izquierda, rosa) y machos (derecha, azul) controles, mutantes de *InR*, y además de mutantes en *InR* heterocigotos para *keap1* en Luz:Oscuridad 12:12. Es particularmente claro en hembras que la hiperactividad que presentan las mutantes de *InR* se pierde en la presencia de una mutación heterocigota de *keap1*, y que la hiperactividad de machos heterocigotos para *keap1^{+/-}* se pierde cuando son heteroalélicos para *InR*. N=8. * $p < 0.05$.

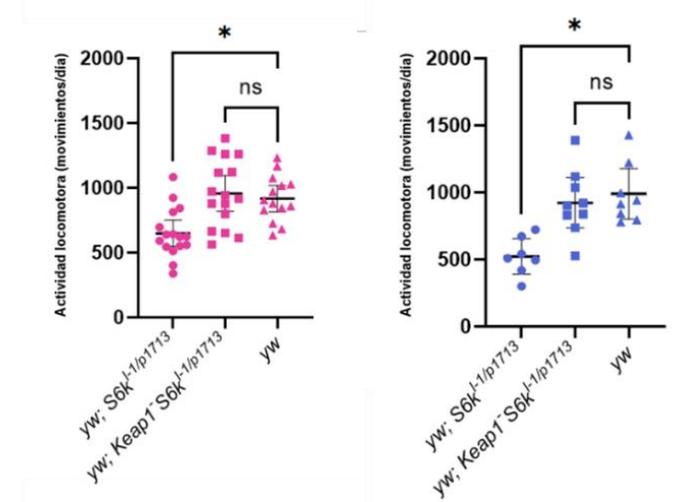


Figura 10. Niveles de actividad locomotora de hembras (izquierda, rosa, N=14-16) y machos (derecha, azul, N=7-9), controles, mutantes de *S6k*, y además de mutantes para *S6k* heterocigotos para *keap1* en Luz:Oscuridad 12:12. La hipoactividad que presentan las mutantes de *S6k* se pierde en la presencia de una mutación heterocigota de *keap1*. * $p < 0.05$.

7.2 Resistencia a estrés oxidante

Para estudiar la resistencia a estrés oxidante de nuestras distintas cepas, utilizamos dos agentes oxidantes distintos: Paraquat y peróxido de hidrógeno. El paraquat sufre una reducción dependiente de NADPH a una forma de radical libre, y su reoxidación conduce a la generación de aniones superóxido, que se convierten en H_2O_2 a través de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD). La catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) pueden convertir H_2O_2 en H_2O y O_2 (60).

Ambos agentes se usan comúnmente con *Drosophila melanogaster* para generar estrés oxidante que llevan a la activación de la respuesta antioxidante regulada por CncC (17, 49), lo que corroboramos en moscas silvestres con los reporteros fluorescentes de ARE-GFP, como se observa en la **figura 11**.

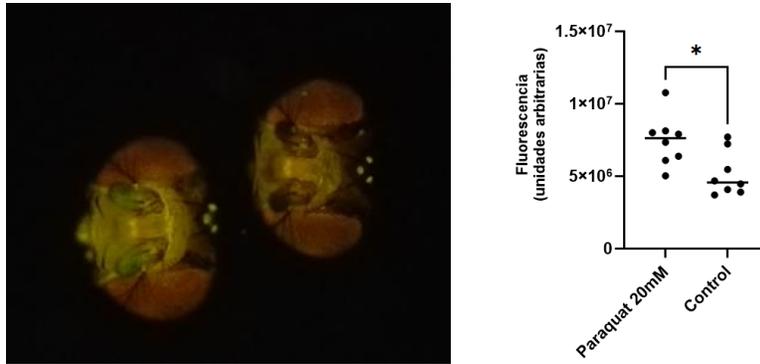


Figura 11. Imagen representativa de la expresión del reportero ARE-GFP (izquierda) y cuantificación de la fluorescencia mediante ImageJ en moscas que consumieron alimento control y moscas que consumieron alimento con paraquat 20 mM (derecha). Todas las moscas son de 7 días post-eclosión a menos que se indique lo contrario. N=10. Prueba t de Welch ($t=2.826$, $df=13.80$, $p=0.0136$)

El aumento de fluorescencia en el reportero era visible en las antenas y prosboscis, pero ambiguo en el abdomen. Usando la técnica de Bellymount para observar con mayor claridad el abdomen de la mosca pudimos corroborar el aumento de fluorescencia en el intestino, como se observa en la **figura 12**, un indicador claro de que el consumo del alimento dispara la respuesta antioxidante de CncC.

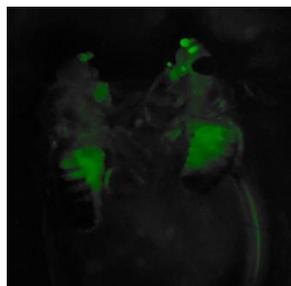


Figura 12. Patrones de expresión del reportero ARE-GFP en moscas vivas, tras consumo de alimento con paraquat 20 mM (izquierda) y peróxido de hidrógeno (derecha). La aplicación de pegamento transparente en el abdomen permite observar con mayor claridad la fluorescencia en el intestino.

Reportes previos indican que una dieta completa (es decir, con levadura como fuente de proteínas, lípidos y vitaminas) es mejor opción para no enmascarar el efecto del agente oxidante, en comparación con proveer una dieta sólo a base de sacarosa que suele disminuir la

supervivencia de las moscas (61). Realizamos pruebas de supervivencia en cuatro dietas diferentes en moscas silvestres *yw*.

- Dos dietas contenían sólo sacarosa, en agar o en solución en agua con la que se empapaba un papel filtro que se colocaba al fondo del vial.
- Una tercera dieta se preparó con alimento instantáneo comercial para moscas, de la compañía Carolina Biological Supply.
- Y la cuarta dieta fue el alimento estándar a base de piloncillo y levadura.

Separamos las moscas en grupos de hembras vírgenes (**figura 13, tabla 2**) y machos (**figura 14, tabla 3**) de 7 días post-eclosión y se colocaron en las dietas adicionadas con agentes prooxidantes. Por cada lote de alimento se colocaron también moscas en dietas sin agentes prooxidantes para corroborar la calidad del alimento. Como se observa en las figuras, no hay diferencias significativas entre los dos tipos de vehículo para las dietas de sacarosa, aunque las moscas tienden a tener una menor supervivencia cuando el PQ se provee en esas dietas comparadas con la dieta de Carolina, y en particular la dieta estándar. Corroboramos que esta diferencia en supervivencia en alimento con paraquat no se debe a una interacción diferente de las moscas con el alimento al percibir un cambio de sabor por la presencia del paraquat con una prueba de Ex-Q (**figura 15**). De estas observaciones se desprende que la sacarosa (en papel filtro en particular) exagera la susceptibilidad. Dado que estaríamos usando moscas con fenotipo mutante de la vía de la insulina, eso podría enmascarar los resultados. Los siguientes experimentos presentados se realizaron utilizando la dieta estándar.

Tabla 2. Supervivencia de hembras vírgenes expuestas a paraquat 10 mM y H₂O₂ 1.5% en diferentes dietas.

Dieta	Paraquat 10 mM		H ₂ O ₂ 1.5%	
	Supervivencia (mediana)	N	Supervivencia (mediana)	N
Estándar	5	27	5	30
Sacarosa	3	30	5	28
S. en agar	4	30	4	30
Carolina	6	29	2	29

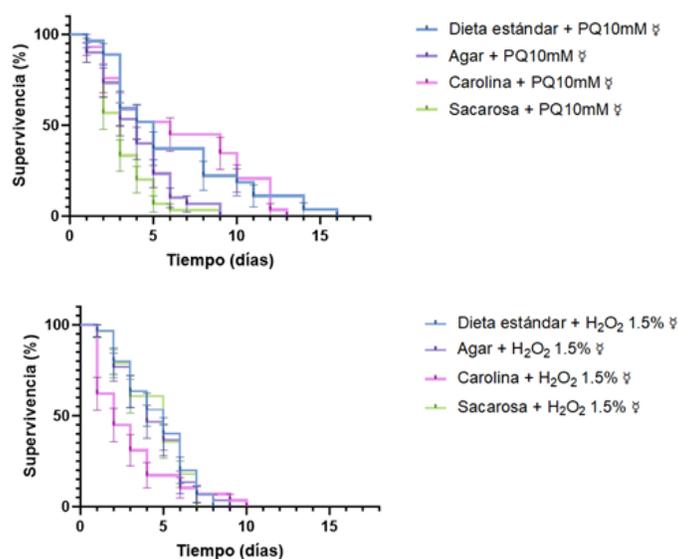


Figura 13. Supervivencia de hembras vírgenes en alimento con paraquat (arriba) y peróxido de hidrógeno (abajo). Usamos dosis menores (10 mM para paraquat y 1.5% de peróxido de hidrógeno) comparadas con las usadas para ver la expresión de reporteros fluorescentes para discernir posibles efectos sutiles. Todas las dietas fueron preparadas y probadas al mismo tiempo. Prueba de rango logarítmico con $p < 0.0001$ para hembras en PQ 10mM. Tras comparaciones múltiples con alfa de Bonferroni corregida ($p < 0.0083$), se observan diferencias significativas entre la dieta estándar y sacarosa en papel filtro ($p = 0.0004$) y el alimento de Carolina vs Sacarosa en agar ($p = 0.0028$) y papel filtro ($p = 0.0002$). Prueba de rango logarítmico no significativa en dietas con H₂O₂.

Tabla 3. Supervivencia de machos expuestos a paraquat 10 mM y H₂O₂ 1.5% en diferentes dietas.

Dieta	Paraquat 10 mM		H ₂ O ₂ 1.5%	
	Supervivencia (mediana)	N	Supervivencia (mediana)	N
Estándar	6	27	5	30
Sacarosa	3	29	4	30
S. en agar	4	30	5	29
Carolina	3	30	2	30

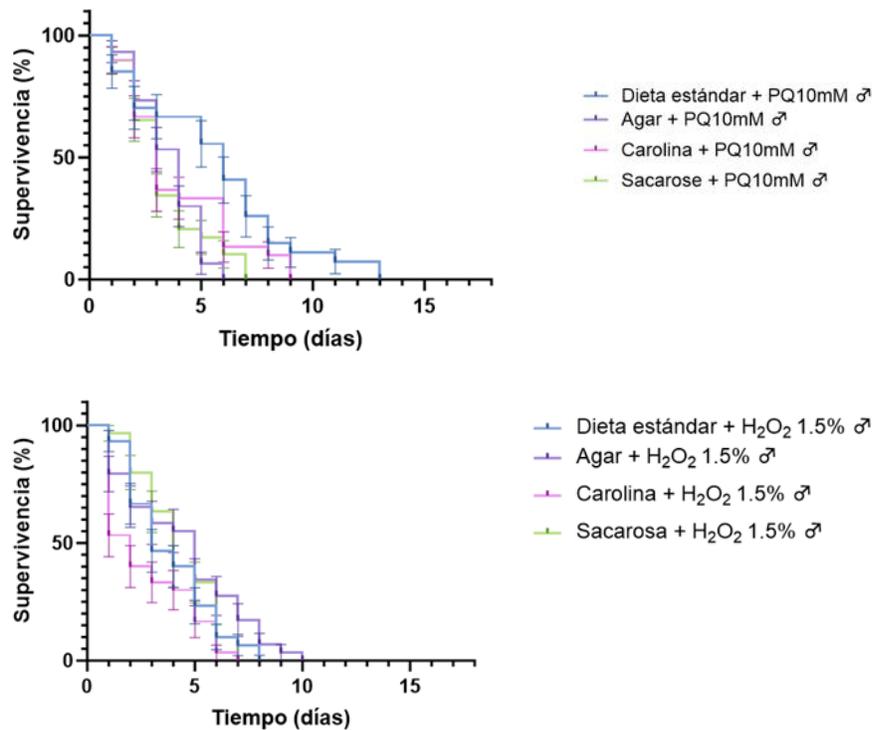


Figura 14. Supervivencia de machos en alimento con paraquat (arriba) y peróxido de hidrógeno (abajo). Prueba de rango logarítmico con $p < 0.0020$ para machos en PQ 10mM. Tras comparaciones múltiples con alfa de Bonferroni corregida ($p < 0.0083$), se observan diferencias significativas entre la dieta estándar y sacarosa en papel filtro ($p = 0.0018$) y sacarosa en agar ($p = 0.0003$). Comparaciones múltiples no significativas en dietas con H₂O₂.

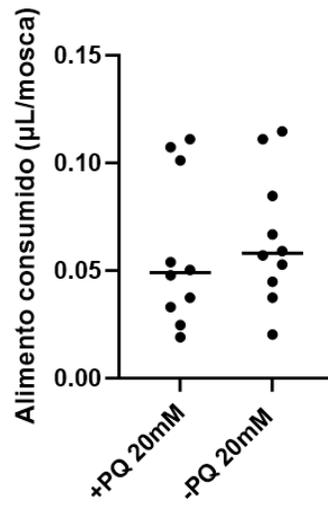


Figura 15. Consumo de alimento de hembras vírgenes en alimento estándar con paraquat y sin paraquat. N=10.

En los estudios de envejecimiento en la mosca se ha observado dimorfismo sexual en la esperanza de vida. Las hembras tienen una vida natural más larga (62, 63), y las hembras en dieta estándar con paraquat 10 mM también mostraron una mejor supervivencia comparadas con los machos. Estudiamos si el dimorfismo en supervivencia podía variar dependiendo de la edad comparando moscas silvestres jóvenes (7 días después de la eclosión) y de mediana edad (30 días después de la eclosión). La exposición a paraquat 20 mM mostró que los machos jóvenes mueren antes que las hembras jóvenes. Pero dicha tendencia se revirtió en moscas de 30 días post-eclosión, donde las hembras son más susceptibles (**figura 16**). Cuando el alimento contenía en cambio H₂O₂ al 3%, las hembras presentaron mayor susceptibilidad en ambas edades (**figura 17**). Además, en general, las moscas de mediana edad sobrevivieron menos en condiciones pro-oxidantes (tabla 4).

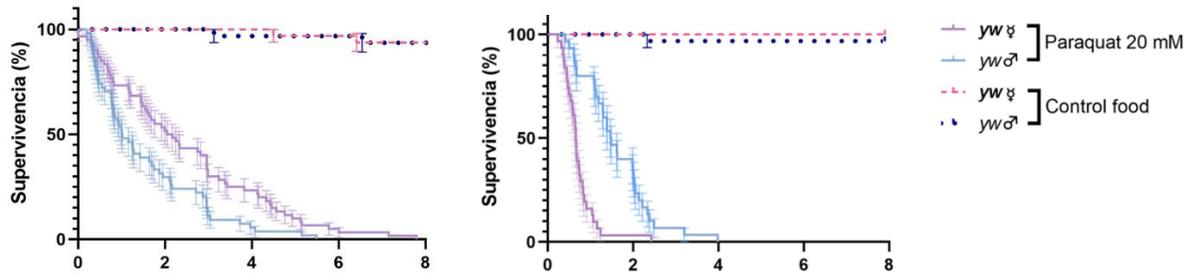


Figura 16. Supervivencia de hembras y machos yw de 7 días (izquierda, N=54-60) y 30 días (derecha, N=30-31) en alimento con 20mM de paraquat. P=0.0025 para machos vs hembras de 7 días en paraquat. $p < 0.0001$ para machos y hembras de 30 días en paraquat.

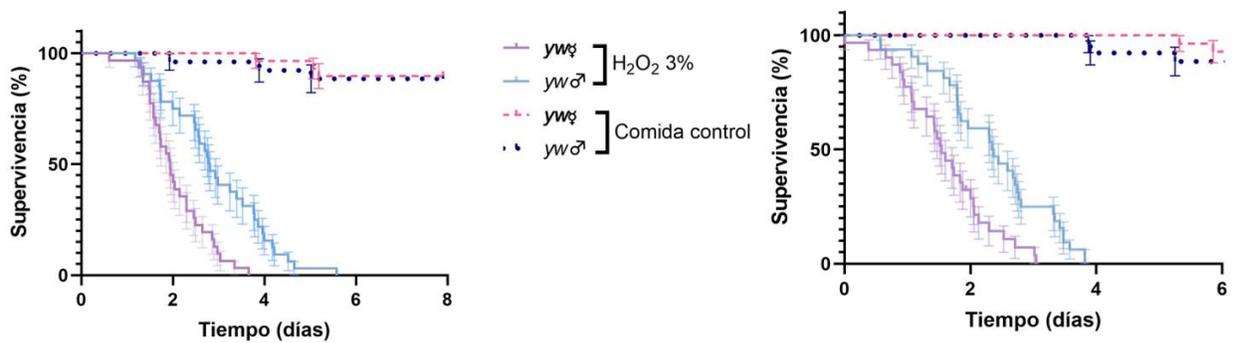


Figura 17. Supervivencia de hembras y machos yw de 7 días (izquierda, N=31-32) y 30 días (derecha, N=31-32) en alimento con H₂O₂. $p < 0.0001$ para machos vs hembras de 7 días en H₂O₂. $p = 0.0003$ para machos y hembras de 30 días.

Tabla 4. Supervivencia de machos y hembras silvestres expuestos a paraquat 20 mM y H₂O₂ 3%.

Paraquat 20 mM			
Sexo	Edad post-eclosión (días)	Supervivencia (mediana, días)	N
Machos	7	1.00521	54
Hembras	7	2.10764	60
Machos	30	1.47639	30
Hembras	30	0.65625	31

H ₂ O ₂ 3%				
Sexo	Edad (días)	post-eclosión	Supervivencia (mediana, días)	N
Machos	7		2.79583	32
Hembras	7		1.94306	31
Machos	30		2.35729	32
Hembras	30		1.54306	31

A continuación, para caracterizar primero cómo los cambios en la vía de respuesta antioxidante afectan su susceptibilidad al estrés, utilizamos cepas con una mutación en un alelo de *keap1*. Usamos condiciones de heterocigosidad dado que se cree que dan como resultado un aumento modesto en la actividad de la vía de Nrf2. La activación de Nrf2 mejora la vida útil cuando se activa moderadamente, pero la activación intensa y crónica provoca el fenotipo opuesto (57). Expusimos machos silvestres *yw* y *yw; keap1^{-/+}* a las mismas condiciones oxidantes y no observamos diferencias significativas en la resistencia al estrés oxidativo entre los genotipos (figura 19, tabla 5). El mismo resultado se obtuvo para hembras en paraquat y H₂O₂ (figura 19, tabla 5).

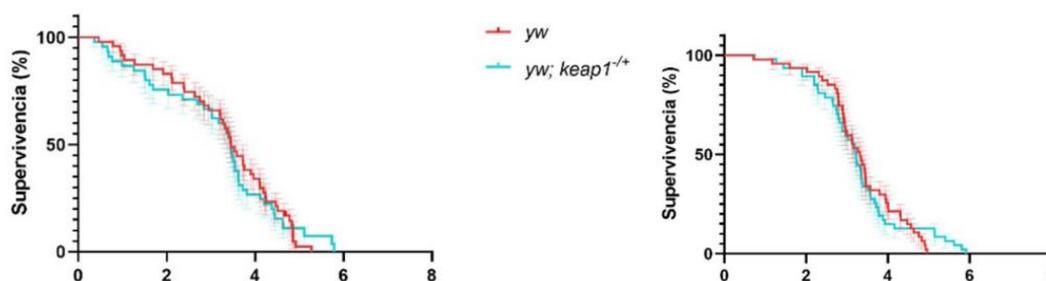


Figura 18. Supervivencia de machos *yw* y *keap1^{-/+}* de 7 días post-eclosión en alimento con 20mM de paraquat (izquierda) y H₂O₂ 3% (derecha). N=45-47.

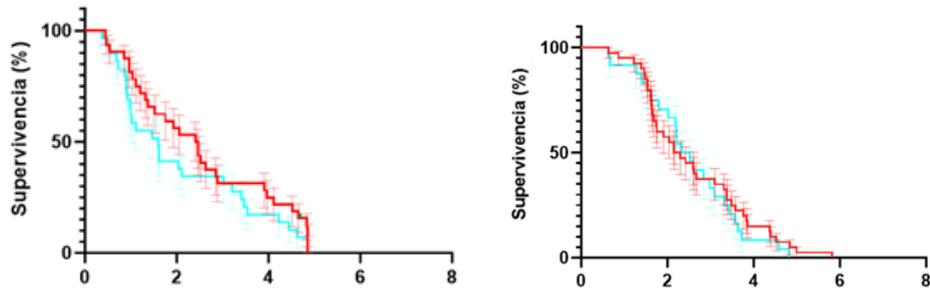


Figura 19. Supervivencia de hembras *yw* y *keap1^{-/+}* de 7 días post-eclosión en alimento con paraquat (izquierda) y H₂O₂ (derecha) 3%. N=24-40

Tabla 5. Supervivencia de moscas *yw* y *yw; keap1^{-/+}* expuestos a paraquat 20 mM y H₂O₂ 3%. No hay diferencias estadísticamente significativas.

Machos		
Paraquat 20 mM		
Genotipo	Supervivencia (mediana, días)	N
<i>yw</i>	3.46597	47
<i>yw; keap1^{-/+}</i>	3.45139	45
H ₂ O ₂ 3%		
Genotipo	Supervivencia	N
<i>yw</i>	3.31319	47
<i>yw; keap1^{-/+}</i>	3.21597	47
Hembras		
Paraquat 20 mM		
<i>yw</i>	2.430	32
<i>yw; keap1^{-/+}</i>	1.580	29
H ₂ O ₂ 3%		
Genotipo	Supervivencia	N
<i>yw</i>	2.227	40
<i>yw; keap1^{-/+}</i>	2.431	24

Si bien la heterocigosidad para *keap1* podría significar un mayor nivel basal de actividad CncC, esto puede no ser suficiente para superar la exposición crónica a las dosis de paraquat y H₂O₂ administradas en moscas de genotipo silvestre. Además, existen otros métodos de regulación de

CncC fuera de *keap1*: por ejemplo, se puede direccionar a la degradación proteasómica por el complejo β -TrCP-Cullin1. B-TrCP puede unirse a CncC después de la fosforilación en Ser342 y Ser338 por Gsk-3 β , regulado por la vía de la insulina (44).

Como se observó antes, la vía Nrf2 también exhibe una interacción con el ritmo circadiano, lo que también se ha reportado anteriormente (64, 65), pues la activación de la vía Nrf2 está directamente correlacionado con los ciclos de actividad y sueño; por ello también medimos cómo cambió la actividad locomotora total entre genotipos y condiciones. En tratamiento con paraquat, el número de episodios de sueño fue mayor en moscas silvestres pero la actividad locomotora no fue significativamente diferente (actividad (# movimientos registrados) promedio de dos días 807.0 ± 56.53 para *yw* y de 663.1 ± 36.44 para *yw; keap1^{-/+}*; sueño promedio 193.3 ± 4.727 para *yw* y de 154.8 ± 5.705 para *yw; keap1^{-/+}*), mientras que las moscas *yw* mostraron una mayor actividad locomotora en H₂O₂ 3% en comparación con *yw; keap1^{-/+}*, aunque sin cambios en el número de episodios de sueño, implicando que en sus episodios de actividad eran más activas (actividad promedio de dos días 1158 ± 54.24 (# movimientos registrados) para *yw* y de 886.6 ± 47.42 para *yw; keap1^{-/+}*, sueño promedio 161.6 ± 4.466 para *yw* y de 169.0 ± 5.811 para *yw; keap1^{-/+}*) (**figura 20**). La exposición al H₂O₂ aumenta la actividad locomotora en las moscas, pero la heterocigosis para *keap1* rescata este fenotipo sin tener un efecto general sobre la supervivencia.

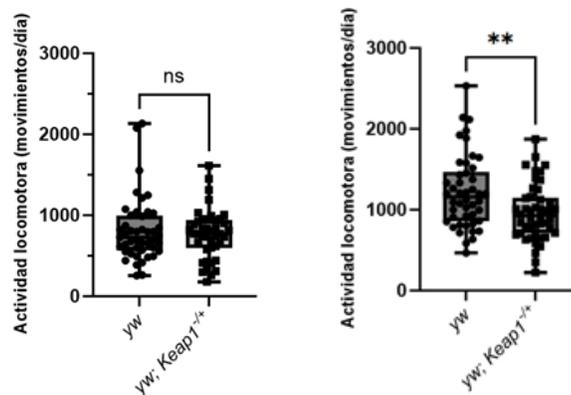


Figura 20. Niveles de actividad de moscas machos *yw* y *keap1^{-/+}* de 7 días post-eclosión en alimento con 20mM de paraquat (izquierda) y H₂O₂ 3% (derecha). N=45-47.

Se procedió entonces a comparar las mutantes heteroalélicas de los puntos de la vía de la insulina estudiados (*InR*, *S6k*). Se usaron las cepas control y las mutantes heteroalélicas para la vía de la insulina (*InR*, *S6k*) y las que además presentaban una mutación para *keap1* en heterocigosis, buscando estudiar cómo la señalización hipomórfica de la vía de la insulina interactuaba con la regulación positiva de la vía Nrf2 en moscas expuestas al estrés oxidante. Cuando se exponen a paraquat 20mM, los machos de genotipo *yw; InR^{3t5/e19}* no mostraron diferencias significativas en la supervivencia en comparación con el control *yw*. Pero la heterocigidad para *keap1*, al contrario de lo que sucedió con las moscas de control *yw*, mejoró su supervivencia (diferencias significativas entre *yw; InR^{3t5/e19}* y *yw; keap1^{-/+}, InR^{3t5/e19}* $p=0.0002$). En el caso de las hembras, no hubo diferencias significativas (**figura 21 y tabla 6**).

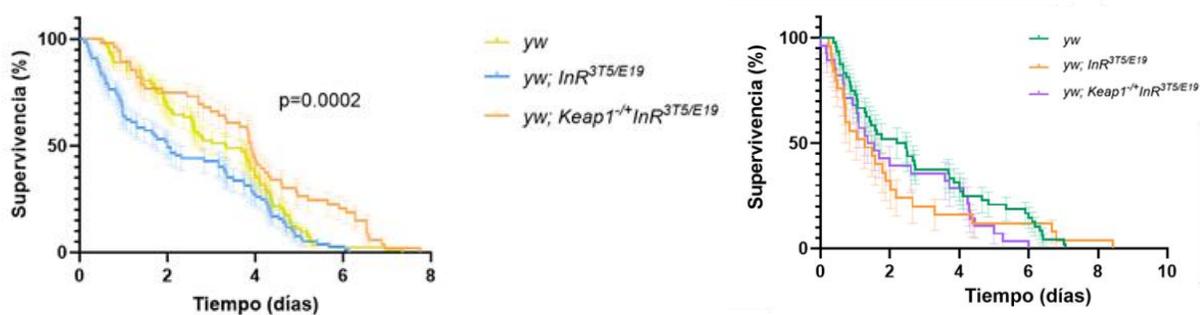
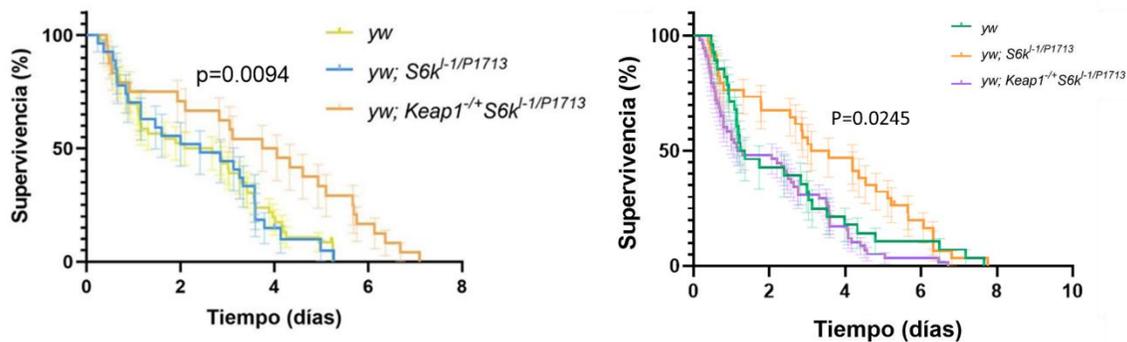


Figura 21. Supervivencia de machos mutantes de *InR* en alimento con 20 mM de paraquat. **Izquierda.** La presencia de un alelo mutante de *keap1* mejoró la supervivencia en moscas machos con mutación en *InR* (prueba de rango logarítmico, seguida de la prueba de comparaciones múltiples $p=0.0002$). $N=55-82$. **Derecha.** No hubo cambios significativos en la supervivencia de hembras. $N=25-48$.

Tabla 6. Supervivencia de machos y hembras mutantes de *InR* expuestos a paraquat 20 mM

Machos		
Genotipo	Supervivencia (mediana, días)	N
<i>yw</i>	3.32639	82
<i>yw; InR^{3t5/e19}</i>	2.00347	77
<i>yw; keap1^{-/+}, InR^{3t5/e19}</i>	3.90451	55
Hembras		
Genotipo	Supervivencia (mediana)	N
<i>yw</i>	1.458	28
<i>yw; InR^{3t5/e19}</i>	2.332	48
<i>yw; keap1^{-/+}, InR^{3t5/e19}</i>	1.267	25

Cuando se exponen a paraquat 20 mM, los machos de genotipo *yw; S6k^{-1/p1713}* no mostraron diferencias significativas en la supervivencia en comparación con el control *yw*. La heterocigosidad para *keap1* mejoró su supervivencia en comparación con ambos (comparaciones por pares mostraron diferencias solo entre *yw* frente a *yw, keap1^{-/+}, S6k^{-1/p1713}*, $p=0.0094$) (**figura 22, tabla 7**). En hembras se observó el mismo resultado (comparaciones por pares, *yw* frente a *yw, keap1^{-/+}, S6k^{-1/p1713}* con $p=0.0245$).



Figuras 22. Izquierda. Supervivencia de machos mutantes de *S6k* en alimento con 20 mM de paraquat. **Derecha.** Supervivencia de hembras mutantes de *S6k* en alimento con 20 mM de paraquat. La presencia de un alelo mutante *keap1* mejoró la supervivencia de los mutantes *S6k* (prueba de rango logarítmico, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn). N=24-46 para machos y N=33-58 para hembras.

Tabla 7. Supervivencia de machos y hembras mutantes de *S6k* expuestos a paraquat 20 mM

Machos		
Genotipo	Supervivencia (mediana)	N
<i>yw</i>	2.675	46
<i>yw; S6k^{l-1/p1713}</i>	2.41528	27
<i>yw; keap1^{-/+}, +S6k^{l-1/p1713}</i>	3.89687	24
Hembras		
Genotipo	Supervivencia (mediana)	N
<i>yw</i>	1.164	58
<i>yw; S6k^{l-1/p1713}</i>	1.300	33
<i>yw; keap1^{-/+}, S6k^{l-1/p1713}</i>	3.331	35

Respecto a la resistencia al agente oxidante H₂O₂, los resultados apuntan a que no hay diferencias significativas en la supervivencia de machos y hembras mutantes de *InR* o *yw; keap1^{-/+}, InR^{3t5/e19}* ante la exposición a 3% de H₂O₂ en el alimento (**figura 23 y tabla 8**).

Para los mutantes S6K, las comparaciones por pares mostraron diferencias entre machos *yw* frente a machos *yw; keap1^{-/+}, S6k^{l-1/p1713}* (p=0.0090) y *yw; S6k^{l-1/p1713}* frente a *yw; keap1^{-/+}, S6k^{l-1/p1713}* (p=0.0083) (**figura 24 y tabla 9**), y no se observaron cambios en las hembras.

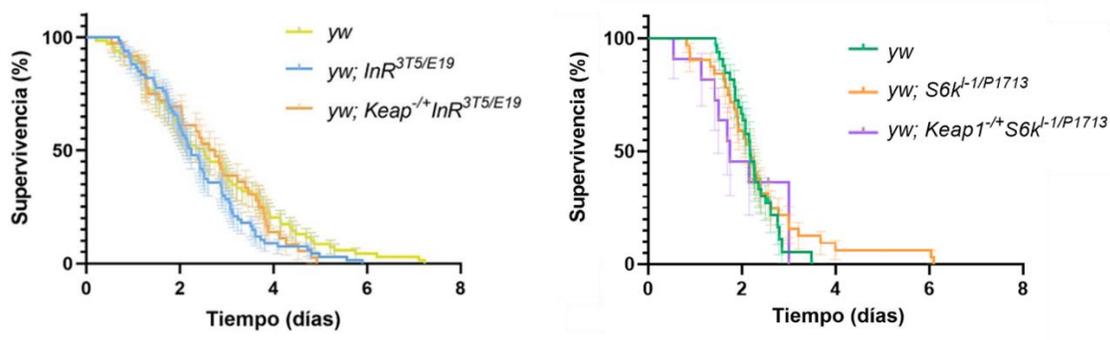


Figura 23. Izquierda. Supervivencia en machos mutantes de *InR* expuestos a 3% de H₂O₂ en el alimento. N= 36-69. **Derecha.** Supervivencia de hembras *InR* expuestas a alimento con H₂O₂ 3%. N=11-32.

Tabla 8. Supervivencia de machos mutantes de *InR* expuestos a H₂O₂ 3%.

Machos		
Genotipo	Supervivencia (mediana)	N
<i>Yw</i>	2.52361	69
<i>yw; InR^{3t5/e19}</i>	2.23681	67
<i>yw; keap^{-/+}, InR^{3t5/e19}</i>	2.68924	36

Hembras		
Genotipo	Supervivencia (mediana)	N
<i>Yw</i>	1.751	11
<i>yw; InR^{3t5/e19}</i>	2.170	33
<i>yw; keap^{-/+}, InR^{3t5/e19}</i>	2.179	32

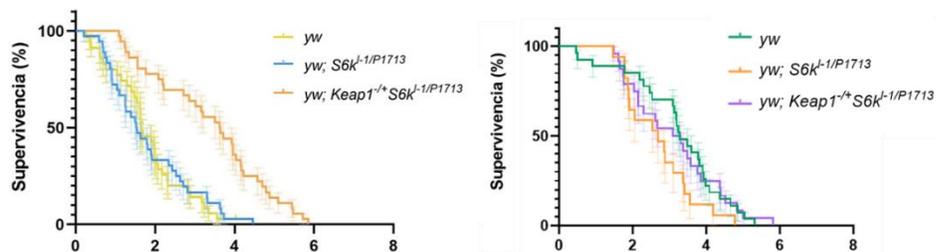


Figura 24. Supervivencia de machos (izquierda) y hembras (derecha) mutantes de *S6K* y controles *yw* expuestos a 3% de H₂O₂ en el alimento. N=35-36 para machos y N=17-27 para hembras. La presencia de un alelo mutante *keap1* mejoró la supervivencia de los mutantes *S6k* (prueba de rango logarítmico).

Tabla 9. Supervivencia de machos mutantes de *S6k* expuestos a H₂O₂ 3%.

Machos		
Genotipo	Supervivencia (mediana)	N
<i>yw</i>	1.64722	35
<i>yw; S6k^{l-1/p1713}</i>	1.53403	36
<i>yw; Keap1^{-/+}S6k^{l-1/p1713}</i>	3.62951	36

Hembras		
Genotipo	Supervivencia (mediana)	N
<i>yw</i>	3.205	24
<i>yw; S6k^{l-1/p1713}</i>	3.274	27
<i>yw; Keap1^{-/+}S6k^{l-1/p1713}</i>	2.694	17

Dado que las mayores diferencias se observaron con paraquat, se realizó también la medición de

supervivencia a dosis de 10 mM paraquat. En las **gráficas 25 y 26** y **tablas 10 y 11** se observa cómo a una menor dosis las mutaciones heterocigotas y homocigotas de *keap1* sí pueden mejorar la supervivencia en moscas silvestres machos y hembras, además de mejorar la supervivencia de los machos mutantes de *InR* y machos y hembras de *S6k* como se observó con las dosis de 20 mM. Interesantemente, los machos mutantes de *S6k* sin alelo mutante de *keap1* también mejoran su supervivencia a esta dosis.

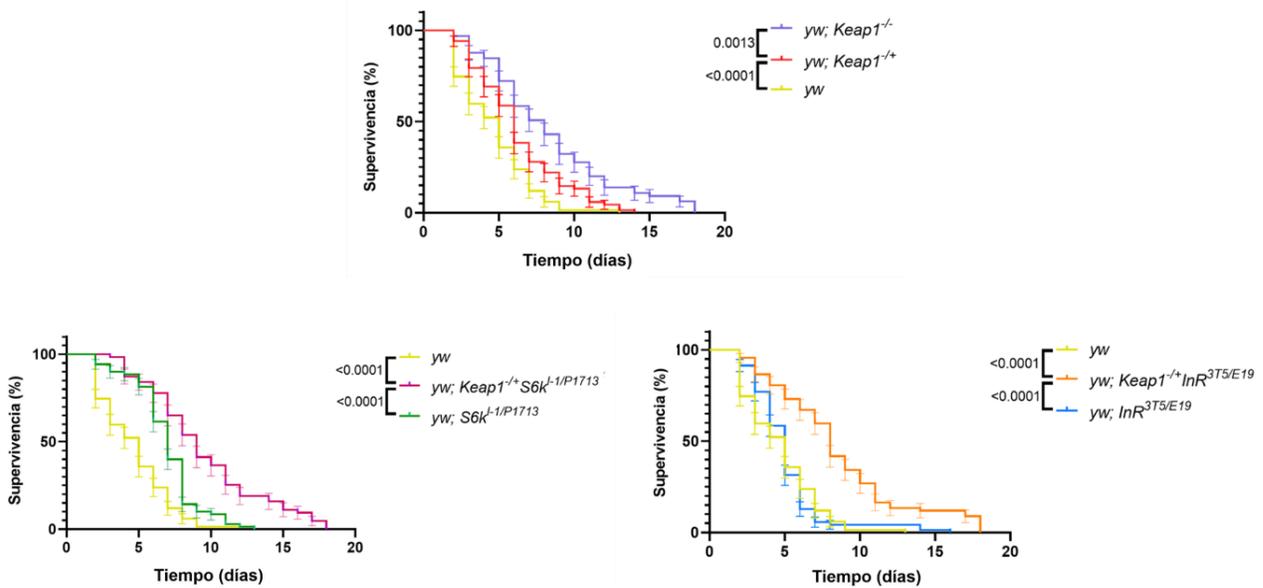


Figura 25. Supervivencia de machos expuestos a paraquat 10 mM en el alimento. N=63-70. La presencia de uno o dos alelos mutante *keap1* mejora la supervivencia de los silvestres y mutantes de *InR* y *S6k*. Prueba de rango logarítmico ($p < 0.0001$). Las comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni (0.00556) significativas se señalan en las gráficas.

Tabla 10. Supervivencia de machos expuestos a paraquat 10 mM

Machos		
Genotipo	Supervivencia (mediana, días)	N
<i>yw</i>	5.0	67
<i>yw; keap^{-/+}</i>	6.0	68
<i>yw; keap^{-/-}</i>	8.0	70
<i>yw; S6k^{-1/p1713}</i>	7.0	70
<i>yw; keap^{-/+}, S6k^{-1/p1713}</i>	9.0	63
<i>yw; InR^{3t5/e19}</i>	5.0	70
<i>Yw; keap^{-/+}, InR^{3t5/e19}</i>	8.0	67

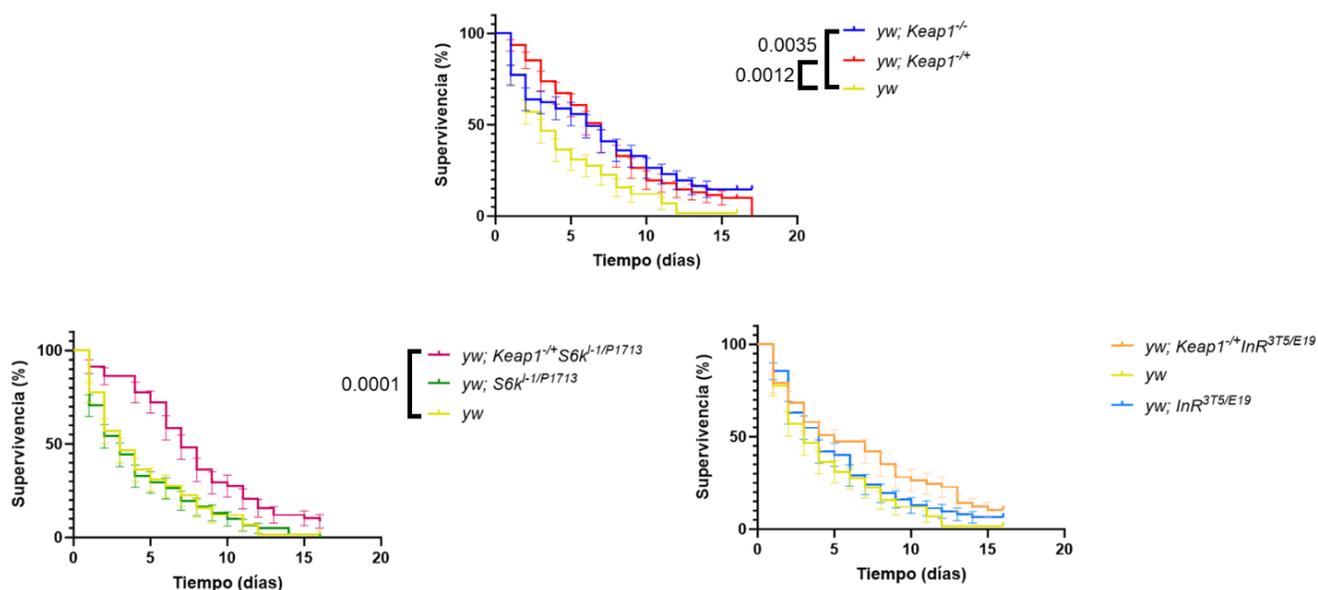


Figura 26. Supervivencia de hembras expuestas a paraquat 10 mM en el alimento. N=58-60. La presencia de uno o dos alelos mutante *keap1* mejora la supervivencia de las silvestres y mutantes de *S6k*. Prueba de rango logarítmico ($p < 0.0001$). Las comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni (0.00556) significativas se señalan en las gráficas.

Tabla 11. Supervivencia de hembras expuestas a paraquat 10 mM.

Hembras		
Genotipo	Supervivencia (mediana)	N
<i>yw</i>	3	59
<i>yw; keap^{-/+}</i>	7	60
<i>yw; keap^{-/-}</i>	6	60
<i>yw; S6k^{-1/p1713}</i>	3	60
<i>Yw; keap1^{-/+}, S6k^{-1/p1713}</i>	7	58
<i>yw; InR^{3t5/e19}</i>	4	60
<i>Yw; keap^{-/+}, InR^{3t5/e19}</i>	5	57

Para estudiar en detalle la respuesta antioxidante de las moscas mutantes de la vía en la insulina y de *Keap1*, medimos los niveles de glutatión en las mismas, tanto en condiciones de alimentación

normal como en moscas alimentadas por 24 hrs. con alimento con paraquat 20 mM. Como se observa en la **figura 27**, independientemente del genotipo las hembras tienen niveles basales de glutatión menores que los machos, y la exposición de moscas hembra a paraquat incrementa los niveles de glutatión, mientras que en machos los niveles de glutatión permanecen constantes entre condiciones de alimentación. Estos resultados van en línea con los observados en otros estudios (66), en donde Bayliak *et al.* encontraron una mayor variación en los niveles de tioles de baja masa molecular (antioxidantes no enzimáticos que contienen SH como el glutatión (GSH)) en las hembras mutantes homocigotas de *Keap1* en comparación con los machos. Es posible que las dosis usadas sean demasiado altas como para observar rescate en ellas.

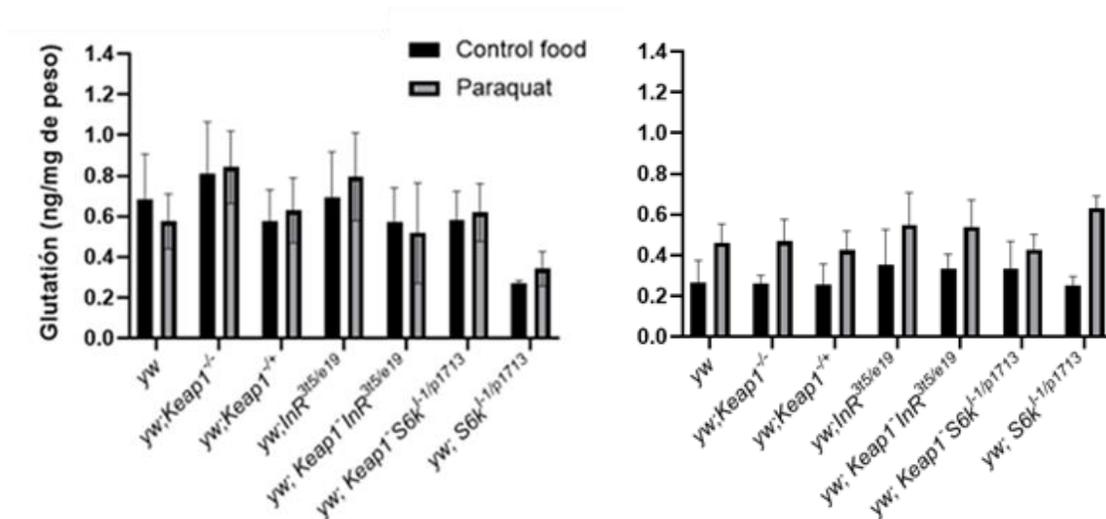


Figura 27. Niveles de glutatión en machos (izquierda) y hembras (derecha) en condiciones de alimentación control o con paraquat 20 mM en el alimento. Una prueba de Anova de dos vías arroja un efecto significativo del sexo ($p < 0.001$) y efecto significativo de paraquat en hembras ($p = 0.0021$), $N = 3$. Si bien la mediana de los valores basales de glutatión de moscas mutantes de *S6k* son menores en comparación con los otros genotipos, nuestra N es demasiado pequeña y no tenemos el suficiente poder estadístico para detectar una diferencia significativa.

Tabla 12. Valores de glutatión para machos y hembras.

Machos

Genotipo	Alimento Control	+ Paraquat 20mM
	Mediana±EE (ng/mg de peso)	
<i>Yw</i>	0.686±0.220	0.574±0.135
<i>yw; Keap1^{-/-}</i>	0.810±0.254	0.841±0.177
<i>yw; Keap1^{-/+}</i>	0.577±0.152	0.628±0.160
<i>yw; InR^{3t5/e19}</i>	0.692±0.226	0.794±0.217
<i>yw; Keap1^{-/+}, InR^{3t5/e19}</i>	0.573±0.167	0.517±0.247
<i>yw; S6k^{-1/p1713}</i>	0.269±0.015	0.342±0.085
<i>yw; Keap1^{-/+}, +S6k^{-1/p1713}</i>	0.579±0.144	0.618±0.141

Hembras

Genotipo	Alimento Control	+ Paraquat 20mM
	Mediana±EE	
<i>yw</i>	0.264±0.110	0.462±0.091
<i>yw; Keap1^{-/-}</i>	0.259±0.043	0.468±0.109
<i>yw; Keap1^{-/+}</i>	0.257±0.101	0.424±0.095
<i>yw; InR^{3t5/e19}</i>	0.356±0.170	0.547±0.160
<i>yw; Keap1^{-/+}, InR^{3t5/e19}</i>	0.333±0.072	0.540±0.130
<i>yw; S6k^{-1/p1713}</i>	0.253±0.042	0.630±0.060
<i>yw; Keap1^{-/+}, S6k^{-1/p1713}</i>	0.335±0.132	0.427±0.075

7.3 Efecto de heterocigosis para *Keap1* en parámetros metabólicos de mutantes de la vía de la insulina

Estudios recientes han demostrado que los genes cuyos productos están implicados en el metabolismo energético son también regulados por la vía de Nrf2/CncC, en particular en lo que respecta al metabolismo de lípidos. Por ejemplo, en modelos de ratón Knock-out para *Nrf-2* o Knock-down para *keap1* a menudo se observa que la activación de Nrf2 y el decremento de estrés oxidativo se correlaciona con un decremento en lipogénesis, mientras que una disminución de la actividad de Nrf2 no sólo tiene como consecuencia mayor estrés oxidante, sino también mayor lipogénesis (67). En *Drosophila* se ha observado que moscas mutantes de *Keap1* tenían menores

niveles de triglicéridos (58) y que la hiperactivación de CncC iba acompañada de una disminución de la formación de lípidos en el cuerpo graso (68). En estudios con ratones cuyos hígados no expresan *Nrf2* se identificó que el ARN mensajero de los genes que codifican para las enzimas de la vía de las pentosas fosfato eran bajos con la deficiencia de *Nrf2* y altos con la activación de *Nrf2*, y la concentración de NADPH era más baja en ratones sin *Nrf2*, además de que los genes implicados en la síntesis y desaturación de los ácidos grasos fueron regulados a la baja con la activación de *Nrf2*, indicando que *Nrf2* era importante para la producción de NADPH y su direccionamiento como principal recurso reductor para eliminar el estrés oxidativo (ayuda en la regeneración del glutatión y la tiorredoxina), en vez de su uso en la síntesis y desaturación de lípidos (69).

Para estudiar si la mutación de *Keap1* podría tener también un efecto en los niveles de lípidos de las mutantes de la vía de la insulina (en las que a menudo se encuentran regulados al alza), medimos los niveles totales de los mismos en machos y hembras de 7 días post-eclosión. En la **figura 28** se observa que, tanto para machos como hembras, la presencia del alelo mutante de *Keap1* disminuye los niveles de lípidos totales para mutantes de *InR*, y para hembras mutantes de *S6k*. En general, la activación de la vía del *Nrf2* por medio de la reducción de *Keap1* tiende a reducir los niveles de lípidos presentes.

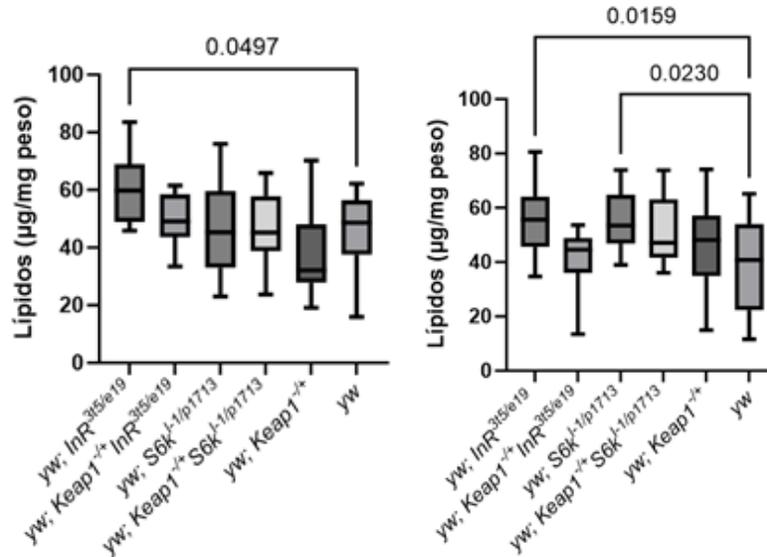


Figura 28. Niveles de lípidos totales en machos (izquierda) y hembras (derecha). Una prueba ANOVA reveló que existía una diferencia estadísticamente significativa en machos ($F(5, 66) = 3.544, p=0.0067$) y hembras ($F(5, 59) = 3.146, p=0.0139$). Las pruebas de Dunnett para comparaciones múltiples revelaron que la presencia de un alelo mutante de *Keap1* contribuye a la disminución de niveles de lípidos en machos y hembras mutantes. $N=12$.

Los niveles de glucosa son mayores en mutantes machos y hembras de *InR*, y varían a la baja cuando las moscas presentan también un alelo mutante de *Keap1*. Curiosamente, los machos mutantes heterocigotos y homocigotos de *Keap1* presentan menores niveles de glucosa, mientras que las hembras mutantes de *keap1*^{-/+}, *S6k*^{-1/p1713} muestran mayores niveles de glucosa (**figura 29**). Para los niveles de glucógeno también se observó un efecto positivo con la reducción de *Keap1* en machos mutantes de *InR* y *S6k* y en hembras mutantes de *InR*, aunque los niveles se mantuvieron altos para hembras mutantes de *S6k* (**figura 30**). Dichos resultados se discutirán en la siguiente sección, pero en general, la activación moderada de la vía del Nrf2 via la disminución de Keap1 tiende a reducir los niveles de lípidos y carbohidratos (medidos aquí para glucosa y glucógeno).

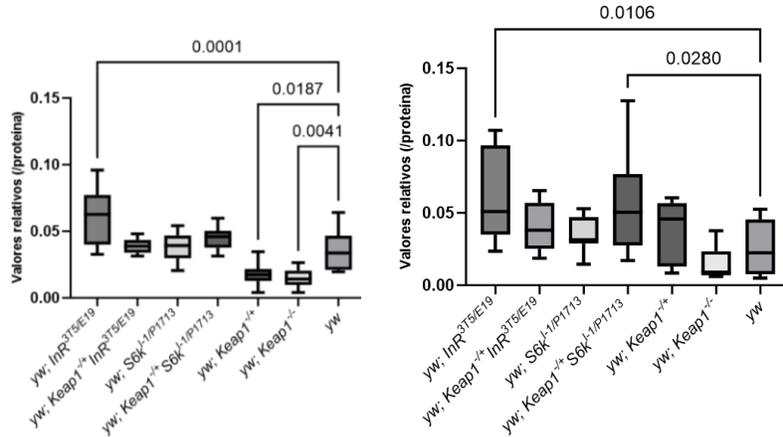


Figura 29. Niveles de glucosa en machos (izquierda) y hembras (derecha). N=9. Al igual que en el caso de los niveles de lípidos, la presencia de un alelo mutante de *Keap1* contribuye a la disminución de niveles de glucosa en machos y hembras. Prueba de Anova para hembras ($F(6, 56) = 4.701, p = 0.0006$), y machos ($F(6, 56) = 15.56, p = 0.0014$), seguidas de pruebas de Dunnett para comparaciones múltiples.

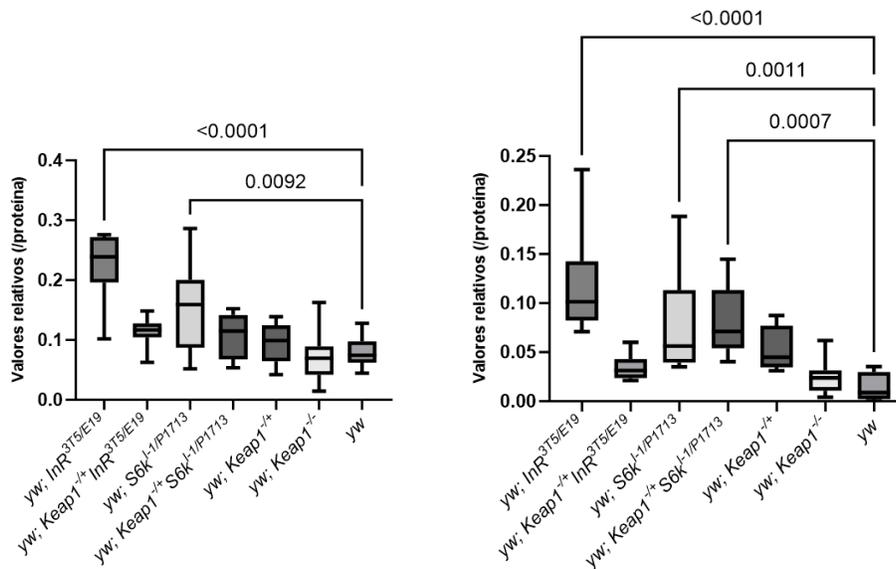


Figura 30. Niveles de glucógeno en machos (izquierda) y hembras (derecha). N=8-9. La presencia de un alelo mutante de *Keap1* contribuye a la disminución de niveles de glucógeno en machos y hembras de la insulina, y rescata los niveles en machos *S6k* también. En hembras se mantienen los niveles altos. Prueba de Anova para hembras ($F(6, 54) = 10.67, p < 0.0001$), y machos ($F(6, 56) = 12.35, p < 0.0001$), seguidas de pruebas de Dunnett para comparaciones múltiples.

En general, se observa que la reducción de la actividad de *Keap1* puede rescatar algunas de las desregulaciones metabólicas que presentan las mutantes de la vía de la insulina, con más claridad en las mutantes de *InR* que *S6k*, como se discute luego.

Los estudios en mamíferos y *Drosophila* han demostrado que las vías de la insulina y del Nrf2 interactúan entre sí para regular la homeostasis metabólica y la necesidad de nutrientes para la reproducción/supervivencia. Sin embargo, sigue siendo un desafío desentrañar los mecanismos y la aplicabilidad de las observaciones entre especies y estudios, ya que a veces dan resultados aparentemente contradictorios, probablemente debido a diferencias experimentales (sexo, dieta, antecedentes genéticos, respuestas horméticas, etc.). No obstante, una observación común es que Nrf2 influye en el metabolismo de lípidos. Es posible que el efecto positivo que la mutante de *Keap1* tiene sobre las mutantes de la insulina se deba no sólo a una regulación al alza de CncC, sino también a una regulación a la baja de los efectos nocivos de perturbar la señalización de la insulina, como lo es la dislipidemia e hiperglicemia. En estudios previos en la mosca de la fruta la regulación al alza o a la baja de CncC en animales tratados con metformina fue perjudicial para su supervivencia, mientras que la regulación a la baja de la señalización de la insulina mejoró el metabolismo y la esperanza de vida en moscas con sobreexpresión de CncC (66).

7.4 Análisis transcriptómico de mutantes de *S6k*

Dado que, además de los cambios metabólicos, observamos una mejora de supervivencia más clara en mutantes de *S6K* que de *InR*, realizamos un análisis transcriptómico de moscas de 7 días para dilucidar posibles mecanismos en juego. La **figura 31** muestra en análisis de componentes principales de los tres replicados biológicos usados para comparar las cepas *yw* y *S6k^{p1713/l-1}*, el gráfico de calor muestra los 50 genes con mayor diferencia entre cepas y señala la relación entre replicados, y el boxplot de los genes diferencialmente expresados. Se encontró que un total de 132 están regulados al alza en la cepa control comparada con la mutante *S6k*, mientras que 297 genes se hallaban a la baja. La **tabla 13** presenta la lista completa.

Tabla 13. Genes diferencialmente expresados en la cepa *yw* comparada con *S6k*.

Regulados al alza		Regulados a la baja en <i>yw</i> comparada con <i>S6k</i>			
Amy-p	Syx8	c(3)G	CG3775	CG11261	CG32267
Ddc	CG14456	Cp15	CG15721	CG14111	Drsl4
dwg	Osi24	dec_1	CG12716	CG10154	CG32373
fw	CG9801	fz	CG12398	CG10725	CG32581
Hsp23	CG9458	bnb	mthl1	CG9384	CG32642
E(spl)mbeta-HLH	CG12592	Glt	CG7322	Cad74A	Mur11Da
ncd	CG4570	l(2)tid	ND-15	CG13728	ssp7
T48	scpr-C	Men	CG5126	CG4306	CG32698
Klp67A	CG6118	mus308	CG5397	Cyp12c1	Cubn
Mdr49	CG5285	ndl	Cyp309a1	CG5618	CR32773
cas	MtnC	pwn	CG3285	CG1077	Muc4B
GstD3	sosie	rst	CG3036	CG7800	CG33062
l(2)03659	IntS12	Jon99Ciii	Cyp28d1	CG7352	LRP1
dhd	CG6296	spo	Tsp26A	CG9837	CG33120
Pxn	CG6283	Vm26Aa	Cyp4d21	CG9396	lectin-37Db
Taf2	CG5590	Vm34Ca	CG13795	CG12947	ND-AGGG
l(2)dtl	CG9682	Yp1	CG7149	CG14692	CG31808
Jon25Bi	CG18404	CrebA	CG7227	CG12224	GstE8
Cht4	CG15534	fs(1)N	CG12560	CG3397	CG34284
Syt4	Jon99Fi	fs(1)M3	LManIII	CG4830	Vml
Jhl-26	CG15547	Gel	LManIV	CG4066	Pde11
CG18480	meso18E	GstS1	LManVI	CG12279	Snoo
CG5888	ACXD	emp	CG9510	CG5999	CG34426
lcs	CG18661	Fkbp14	CG13114	Cyp304a1	CR40190
CG15784	llp7	ox	CG6508	CCHa2	psd
CG4078	Lerp	Ser12	CG16743	CG3259	Vm26Ac
CG1575	CG31106	AcCoAS	CG16965	Cad88C	apolpp
CG18262	CG31157	Cyp6a8	Tom70	CG14855	CG8628
CG15247	CG31436	Dhc36C	CG4650	CG6912	drd
CG15312	CG31683	Vm32E	CG17321	CG3984	CG30002
CG11802	CG31928	mia	fon	CG10407	HIP
Tango4	Cap-D3	Cyp4e3	Oseg5	CG4009	PPO3
CG12721	CG32537	Cyp4p1	ACC	CG14309	alpha-Est5
CG11679	CG33109	Cyp9b2	FANCI	CG4733	kdn
CG9723	lectin-37Da	Dot	Cyp4p2	CG5697	mid
CG15044	CG33926	Past1	egr	CG5793	CG42807
Ing3	snRNA:U11	Reg-2	Prx2540-2	CG5778	l(2)41Ab

CG14615	CG41378	Ork1	CG13185	CG13609	CG43085
CG4415	spn-F	Ser8	CG8550	CG11089	dati
CG4896	CG42397	ATPCL	CG8785	CG13658	CG43163
CG17260	CG42450	pug	St4	CG6277	CG33941
CG12795	CG42694	Tsf1	clu	CG17189	axo
Fnta	CR43250	Lip3	CG8303	CG9747	CR43242
Jon25Biii	Phae2	vig	CG10764	PH4alphaEFB	CG43333
Jon25Bii	Myo10A	IKKbeta	CG10936	CG15553	CR43361
CG14036	CG43689	Sodh-1	PIG-A	Asator	Cht6
CG7239	hwt	Mur2B	CG14500	Gat	CG43394
Nha1	CR44035	Torsin	CG15096	hgo	CG43402
CG7231	CG45071	scf	CG15117	CG3699	qin
CG7300	CR45192	CG8083	CG8654	Tep4	mwh
CG9377	CR46147	Ady43A	mRpL54	Femcoat	CR43837
CG8665	Drs	CG17322	Cht9	Cyp309a2	Hr4
CG11125	FBti0018967	CG4302	wdp	lambdaTry	CR44003
Drat	FBti0019110	CG6495	Liprin- γ	CG32444	CR44124
CG8027	FBti0019466	CG14526	Cyp6d2	Cpr49Ab	CG44153
CG8299	FBti0020031	PCB	CG3788	CG30091	CR44383
CG15711	FBti0059693	CG4757	CG2736	NT5E-2	CR44417
jtb	FBti0062820	kirre	CG9186	CG30151	CR45126
Jheh3		Drep2	Sherpa	CG30281	CR45601
CG4269		VhaM9.7-c	Cyp4d20	CG30431	CR45713
CG5554		Dhit	CG14985	Cyp12d1-p	CR45714
msd1		dao	CG10477	PH4alphaPV	CR46064
CG13921		CG7631	Jon65Aii	CG31087	FASN1
CR15821		Tollo	CG8562	CG31205	tyn
ntc		CG15571	PGRP-SD	CG31233	FBgn0286071
CG1311		CG15570	CG7565	CG31259	FBgn0287423
CG9948		CG16756	Jon66Ci	Gba1b	FBgn0287614
CG8038		frma	CG5194	CG31648	FBti0018869
Nf-YA		CG9650	UGP	Nnf1b	FBti0019220
CG10943		lr7c	CG18179	CG31661	FBti0019430
CG10222		CG3106	chrB	CG31664	FBti0019469
CG10738		CG1468	CG14125	CG31769	FBti0020178
CG10089		CG1889	CG14118	CG31869	FBti0061766
Cpr72Ec		CG2909	CG14117	CG31915	FBti0063565
					FBti0102111

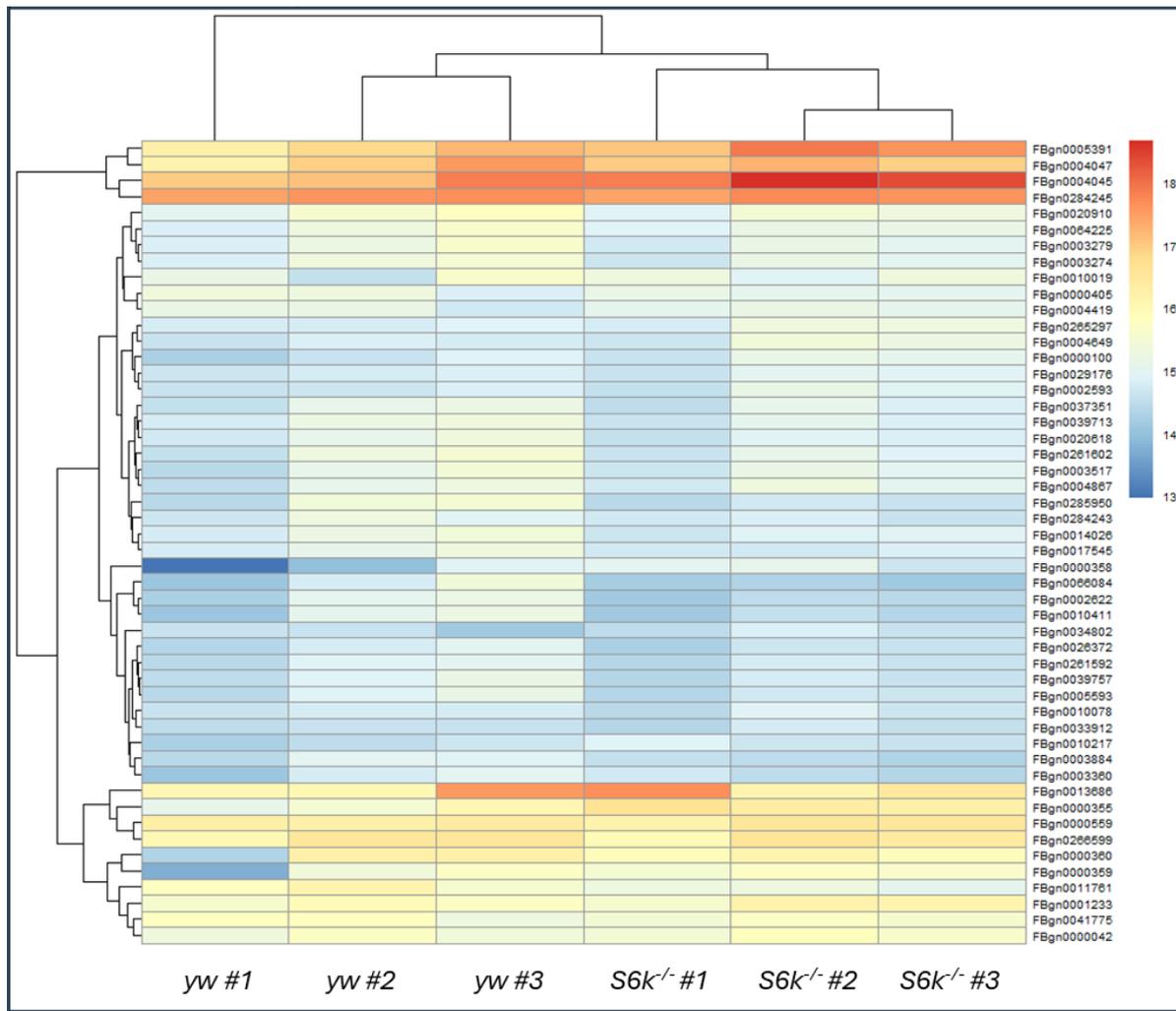
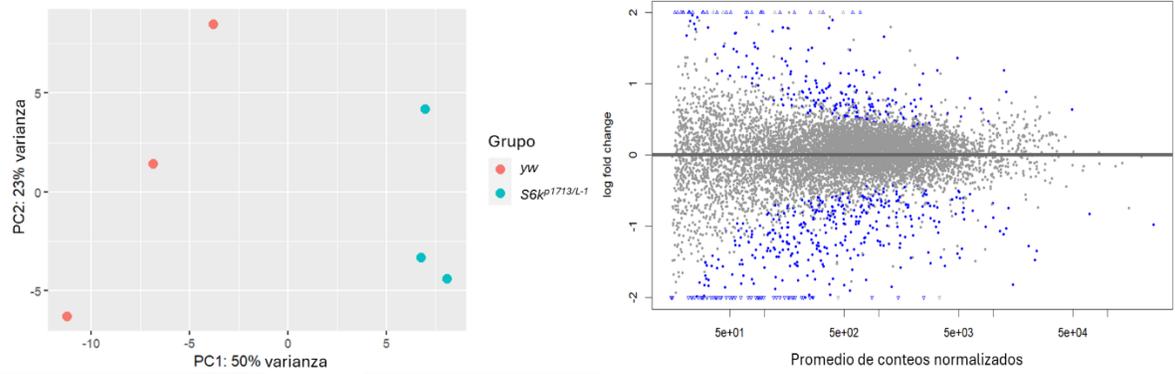


Figura 31. Arriba, izquierda. Análisis de principales componentes de las muestras usadas. **Arriba, derecha.** Boxplot mostrando los genes diferencialmente expresados. **Abajo.** Top 50 de genes regulados al alza y a la baja en *yw* comparada con *S6k*. Gráficas realizadas con DESeq2 y GSEA (70-72)

Entre los genes relacionados a la respuesta antioxidante afectados, se observa que la metalotioneina C, proteína relacionada con resistencia a múltiples drogas 49, y la peroxidasa están al alza en la cepa control, mientras que la glutatión-S transferasa S1 y E8, la subunidades del Citocromo P450 4e3, 4p1, 9b2, 4p2, 4d20 y 12c1, la UDP-glycosiltransferasa familia 36 miembro E1, peroxiredoxina 6c, sulfotransferasa 4, enzima málica, CG13658 y CG4009 están al alza en la cepa mutante.

Además utilizamos Metascape (73) y Pathview (74) para identificar rutas y genes de interés enriquecidos o suprimidos en la cepa control comparado con la cepa mutante. Como se observa en la **figura 32**, varias de las vías que se observan activadas en la cepa *S6k* refieren al metabolismo. En la **figura 33** se observa que para los genes cuya expresión es tejido-específica y que están diferencialmente expresados, se encuentran comúnmente en ovarios, intestino medio y cabeza. La **figura 34** representa un gráfico de red, donde los genes diferencialmente expresados al alza en la cepa *s6k* y que pertenecen a clústeres similares están conectados.

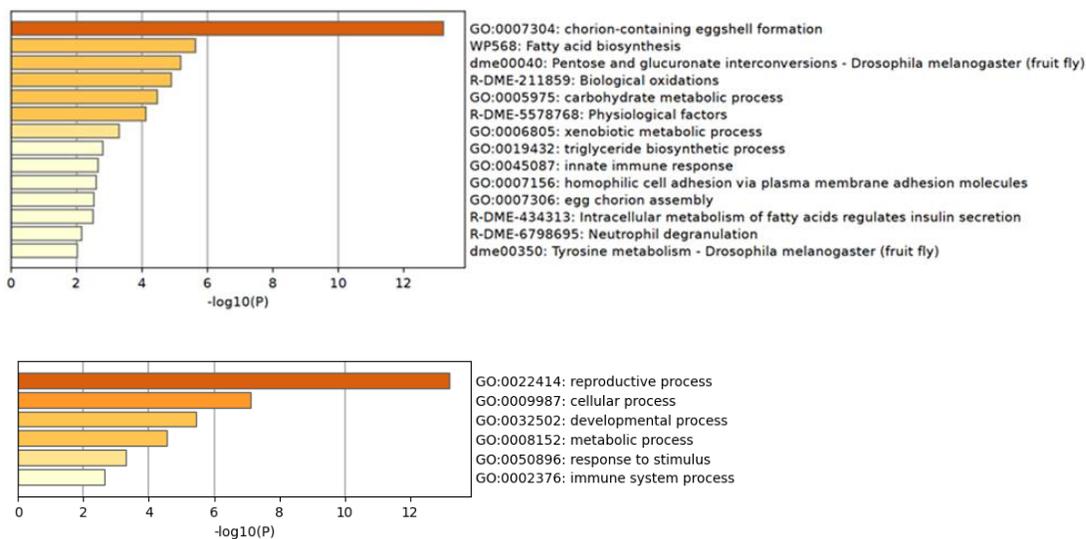


Figura 32. Gráficos de barras realizada con Metascape. **Arriba.** Se visualizan los principales grupos de enriquecimiento no redundantes en *s6k* comparada con *yw*. **Abajo.** Los principales procesos biológicos de Gene Ontology enriquecidos en *s6k* comparada con *yw*. Para los genes enriquecidos en *yw* no se observaron procesos biológicos específicos.

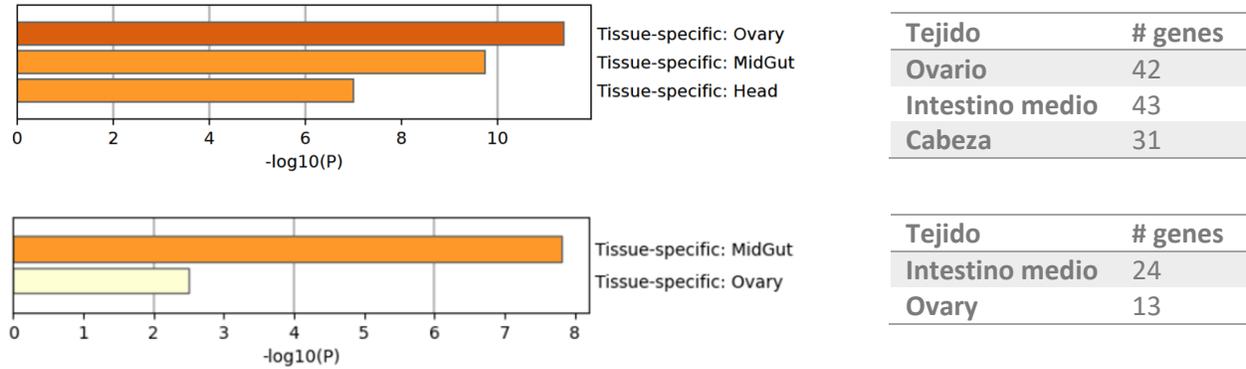


Figura 33. Gráficos de barras realizada con Metascape donde se identifica enriquecimiento de grupos de acuerdo al repositorio de PaGenBase (75), donde se recopilan patrones de expresión de genes específicos en diferentes tejidos. **Arriba.** Se visualizan los principales grupos de enriquecimiento en *S6k* comparada con *yw*. **Abajo.** Se visualizan los principales grupos de enriquecimiento en *yw* comparada con *S6k*.

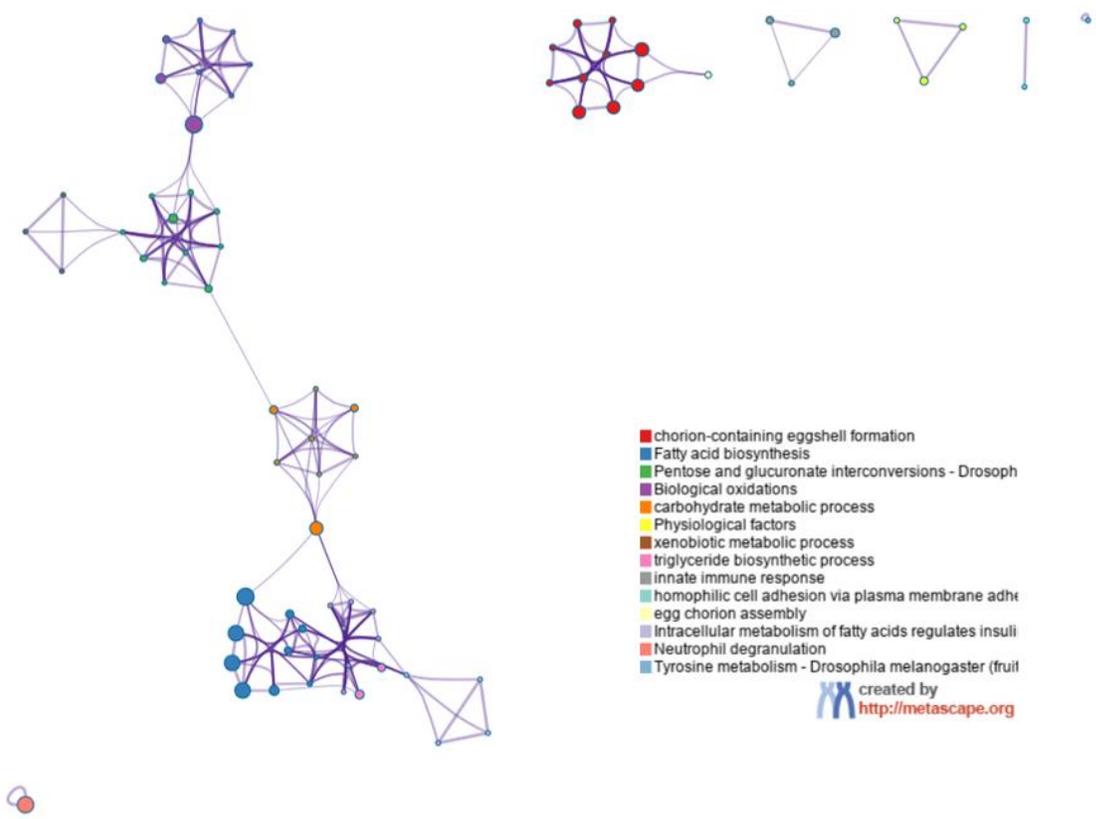


Figura 34. Red de términos enriquecidos realizada con Metascape y Cytoscape (76). Los colores de los nodos representan el ID de clúster, y los nodos con igual ID están conectados.

Mediante GSEA también se pudo observar a detalle dos de las vías con mayores diferencias entre las cepas. Las **figuras 35 y 36** muestran los cambios globales en las vías de la síntesis de lípidos y la vía de la pentosa fostato, donde se observa una supresión general en la cepa control comparada con la cepa *S6k*.

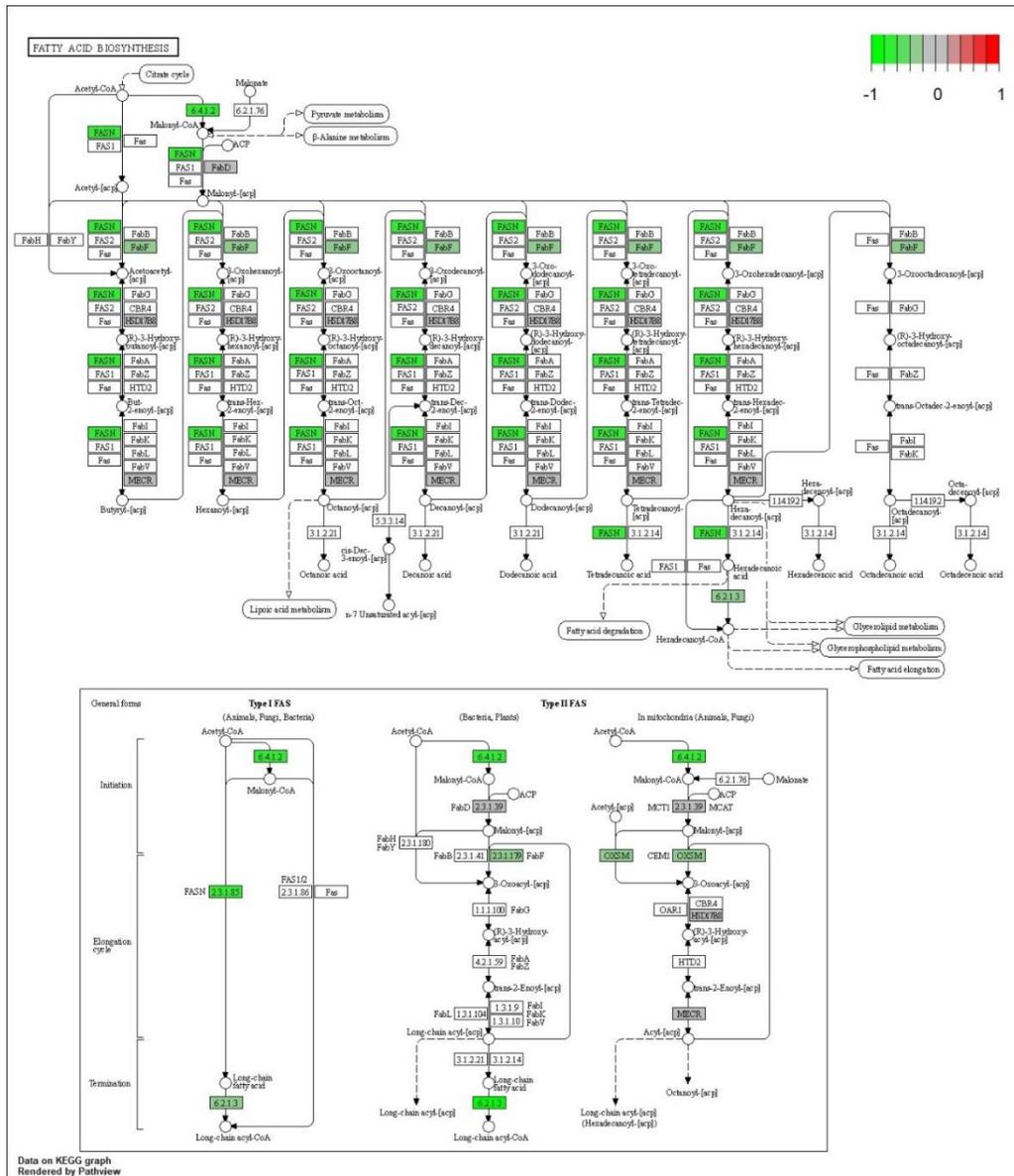


Figura 35. Vía de síntesis de ácidos grasos realizada con Pathview donde se observan genes consistentemente suprimidos en la cepa control *yw* comparada con *S6k*.

8.DISCUSIÓN

Ciclos de sueño y actividad en mutantes de Keap1.

Estudios previos en *Drosophila* han señalado que la regulación a la baja tanto de *CncC* como de *Keap1* mediada por ARNi en el sistema nervioso de la mosca tienen efectos complejos sobre los patrones de sueño y actividad; por ejemplo, regulan en sentido opuesto la longitud y número de episodios de sueño, pero el efecto neto de ambas manipulaciones genéticas es una disminución en los niveles de actividad (64), algo que posiblemente ocurre a través de interacciones con ciclos circadianos sensibles a niveles redox (77). En mamíferos se sabe que el reloj circadiano está involucrado en la regulación de los niveles de EROs y las actividades de la defensa antioxidante, como la señalización de Nrf2. Por ejemplo, proteínas reloj como Clock y Bmal1 pueden regular positivamente la transcripción de Nrf2 (34). Si como ocurre en mamíferos *CncC* es positivamente regulado por Cycle (Bmal1), es posible que al permitirse un mayor nivel de translocación de Nrf2/CncC al núcleo cuando hay menores niveles de Keap1 se esté acentuando la respuesta a la regulación circadiana, lo que explicaría nuestros resultados que corroboran un papel regulador de *CncC/Keap1* en los niveles de actividad y ritmicidad: Poseer un alelo mutante para *Keap1* fue suficiente para que tanto mutantes hiperactivas (*InR*) como hipoactivas (*S6k*) recuperaran los niveles basales de actividad.

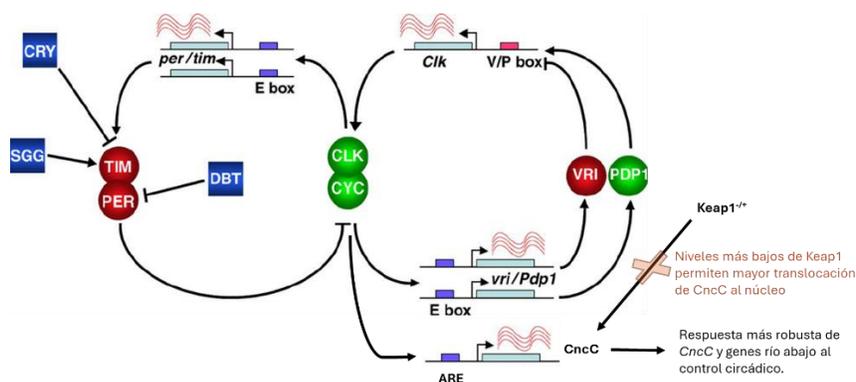


Figura 37. Adaptado de (78). Disminuir la actividad de Keap1 podría permitir una mejor respuesta de la vía de CncC al control circádico.

Metabolismo y supervivencia a retos oxidantes en mutantes de la vía de la insulina y mutantes de Keap1.

Mutantes de S6k.

Las mutantes *yw*; *S6k*^{p1713/l-1} presentan menor talla e hiperlipidemia que empeora con la edad (descrito en 35). Aunque se hubiese esperado que la hipoactividad que se presenta esta cepa pudiera ser beneficiosa (se ha visto que en *Drosophila* como en otros organismos el sueño ayuda a mejorar la respuesta al estrés oxidativo (47,48)), los resultados fueron mixtos pues si bien en machos la mutantes de *S6k* sí sobreviven por más tiempo en el alimento con paraquat 10 mM, en hembras no parecen diferir de la supervivencia con respecto de las silvestres ante la presencia de pro-oxidantes en el alimento. Al igual que en las mutantes de *InR*, la reducción moderada de *Keap1* restauró los niveles de actividad y mejoró la supervivencia, en este caso en ambos sexos, no sólo en machos, y también disminuyó los niveles de lípidos en hembras, aunque los niveles de glucosa y glucógeno sólo se rescataron en machos y no en hembras.

Los resultados del análisis transcriptómico arrojan posibles explicaciones detrás de estos resultados: se observó un mayor número de genes antioxidantes regulados positivamente en la cepa *S6k* comparada con la cepa control, en particular genes de subunidades de citocromo P450 y genes involucrados en la regeneración de NADPH (mediante la vía de pentosas fosfato) y glutatión, lo que explica la mejor resistencia a bajas dosis de paraquat. Además, los altos niveles de lípidos y glucógeno observados en esta cepa pueden explicarse por el amplio enriquecimiento de genes involucrados en el metabolismo de lípidos. En particular, la síntesis de ácidos grasos de novo requiere la acción enzimática de las enzimas Carboxilasa CoA (ACC) y Sintasa de ácidos grasos, con la FASN1 siendo la isoforma principal en el cuerpo graso (79) (y ambas expresadas al alza en *S6k*). Cuando el incremento de producción de glucógeno no es suficiente para metabolizar los carbohidratos consumidos y evitar que produzcan AGEs u otros productos no deseados, el

incremento de actividad de la FASN1 permite redireccionar el exceso de carbohidratos a la síntesis de ácidos grasos (80).

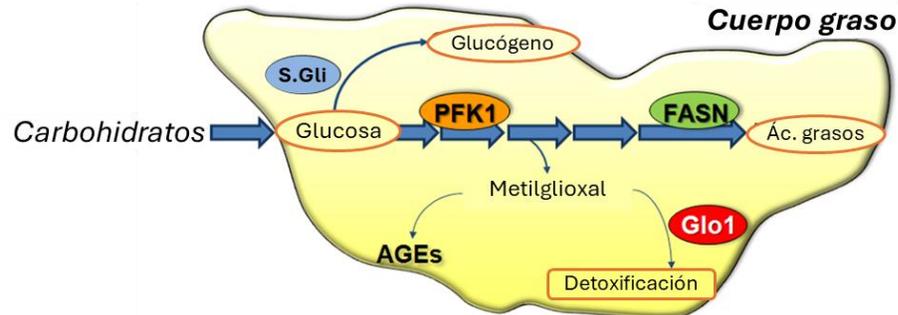


Figura 38. Adaptado de (80). La actividad de la FASN1 es imprescindible para aprovechar los nutrientes y disminuir la formación de AGEs. S.Gli: Sistema glioxalasa. PFK1: fosfofructocinasa 1. Glo1: Glioxalasa 1. FASN: Ácido graso sintasa. AGE: productos de glicación avanzada.

Dado que se ha propuesto que en mamíferos la vía de Nrf2 activa expresión de genes de la vía de la pentosa fosfato para producir más NADPH y usarlo en la reducción de glutatión y EROs, y a su vez suprime la expresión de genes que participan en la síntesis de lípidos y que requieren de NADPH, tales como la *FASN* (40), si los mismos mecanismos participan en la mosca de la fruta, se explicaría porqué la mutación heterocigota de *Keap1* puede mejorar aún más la resistencia a estrés oxidante y rescatar los niveles de lípidos, pero no necesariamente los niveles de glucosa/glucógeno en mutantes de *S6k*: ambas mutaciones (en *Keap1* y *S6k*) actúan en sinergia para incrementar la producción de NADPH y moléculas/enzimas antioxidantes, y se contrarrestan en la síntesis de lípidos, pero no necesariamente en la acumulación/síntesis de carbohidratos.

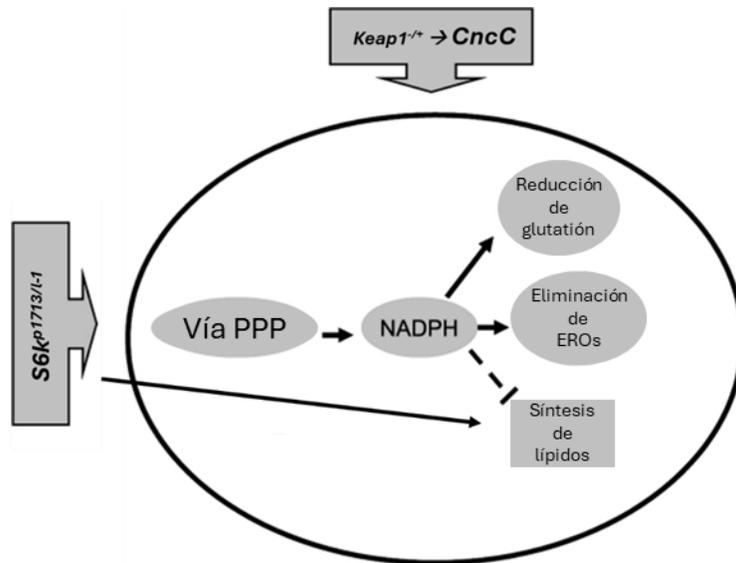


Figura 39. Adaptado de (40). Mecanismo propuesto de efecto de las mutaciones de *S6k* y *Keap1* en metabolismo de lípidos y respuesta antioxidante.

También es importante resaltar que en la cepa mutante de *S6k* el gen *outwardly rectifying K+ channel-1 (ORK1)* (homólogo de *TREK-1* en *Drosophila*) se encontraba enriquecido. Este gen participa en la regulación del sueño y su sobreexpresión aumenta el tiempo de sueño. Si bien se conoce el efecto de la vía de TOR y *S6k* en particular en el sueño (81), y a menudo se presume que se debe a una disminución generalizada de la síntesis de proteínas. Este resultado, junto con la plasticidad de la actividad locomotora en las mutantes de *S6k* (dado que los niveles de actividad locomotora se rescatan con la presencia de un alelo mutante de *Keap1*) indica que podría deberse a la desregulación de proteínas específicas, tales como *ORK1*.

Mutantes de InR.

Las moscas mutantes *yw; InR^{e19}/InR^{3t5}* muestran mayores defectos metabólicos en comparación con las moscas silvestres y las moscas mutantes de *S6k*, en términos de mayores niveles de carbohidratos y lípidos totales, que además son más visibles en hembras y empeoran con la edad. En este estudio no observamos un defecto obvio en la respuesta de estas moscas mutantes ante los retos oxidantes, pues si bien mejoró la supervivencia de machos por encima incluso de la

supervivencia observada en moscas silvestres, en hembras no tuvo efecto. Lo que sí se observó fue que una reducción moderada en la actividad de Keap1 disminuyó los niveles de lípidos, glucosa y glucógeno. Al igual que se propuso anteriormente, estos cambios también podrían deberse en parte al efecto negativo de Nrf2/CncC en la síntesis de lípidos, y es posible que para observar el efecto positivo de *Keap1*^{-/+} en la respuesta antioxidante se requiera en primera instancia de una mejora metabólica suficiente.

En general, se observó que la reducción de la actividad de *Keap1* puede disminuir las desregulaciones metabólicas y conductuales presentes en las mutantes de la vía de la insulina y mejorar su respuesta al estrés oxidante, pero es un efecto leve por lo que es más claro en machos (que tienen menor desregulación metabólica comparados con las hembras mutantes, y mayores niveles basales de glutatión total) y varía dependiendo del estrés oxidante administrado, siendo más notorio con paraquat 20 mM o 10 mM que con peróxido de hidrógeno al 3%. Este último caso es consistente con lo anterior, pero parece ser que, para fines prácticos, en estas condiciones, la exposición con peróxido de hidrógeno 3% termina generando una fuente de mayor estrés oxidante para las moscas a la concentración usada.

9.CONCLUSIONES

En la mosca de la fruta, mutaciones en los genes que participan en la vía de la insulina, como *InR* y *S6k*, inducen un incremento generalizado de carbohidratos (glucógeno, glucosa) y/o lípidos, además de cambios en la actividad locomotora.

En este trabajo observamos que en el caso de la respuesta antioxidante, **la heterocigosis para *Keap1* tanto en moscas silvestres como en mutantes de la vía de la insulina puede mejorar la supervivencia ante condiciones oxidantes**, con un beneficio más claro en

- Moscas alimentadas con paraquat 10 mM (vs dosis de paraquat de 20 mM).
- Machos (vs hembras).
- Mutantes *S6k* (vs mutantes de *InR*).

Además, la heterocigosis para *Keap1* también puede disminuir los niveles de lípidos y carbohidratos de las moscas mutantes de la vía de la insulina, lo que resalta el potencial de la manipulación de la vía de Nrf2 para la mitigación del desbalance metabólico en el estado diabético.

10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Wolfgang, Kaim & Schwederski, Brigitte. Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life pp.82-83.
- 2 Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 08(6809), 239-247., 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.).
- 3 Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- 4 Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10), 1865-1879.
- 5 Ahmad, P., Sarwat, M., & Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51(3), 167-173.
- 6 Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002). What is oxidative stress? *Japan medical association journal*, 45(7), 271-276.
- 7 Rodrigo, R. (2009). Oxidative stress and antioxidants: their role in human disease. Nova Science Publishers, Incorporated.
- 8 Lee, J. M., Li, J., Johnson, D. A., Stein, T. D., Kraft, A. D., Calkins, M. J., Jakel R.j. & Johnson, J. A. (2005). Nrf2, a multi-organ protector? *The FASEB Journal*, 19(9), 1061-1066. Matsuda, M., & Shimomura, I. (2013).
- 9 Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.

- 10** 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.
- 11** 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.
- 12** Tebay, L. E., Robertson, H., Durant, S. T., Vitale, S. R., Penning, T. M., Dinkova-Kostova, A. T., & Hayes, J. D. (2015). Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 108-146.
- 13** Huang, K., Gao, X., & Wei, W. (2017). The crosstalk between Sirt1 and *Keap1/Nrf2/ARE* anti-oxidative pathway forms a positive feedback loop to inhibit FN and TGF- β 1 expressions in rat glomerular mesangial cells. *Experimental cell research*, 361(1), 63-72.
- 14** Zhang L, Chen Z, Gong W, et al. Paeonol Ameliorates Diabetic Renal Fibrosis Through Promoting the Activation of the Nrf2/ARE Pathway via Up-Regulating Sirt1. *Front Pharmacol*. 2018;9:512. Published 2018 May 18.
- 15** Sykiotis, G. P., & Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci. Signal.*, 3(112), re3-re3.
- 16** 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.
- 17** Sykiotis, G. P., & Bohmann, D. (2008). *Keap1/Nrf2* signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Developmental cell*, 14(1), 76-85.

- 18** Veraksa, A., McGinnis, N., Li, X., Mohler, J., & McGinnis, W. (2000). Cap 'n'collar B cooperates with a small Maf subunit to specify pharyngeal development and suppress deformed homeotic function in the *Drosophila* head. *Development*, *127*(18), 4023-4037.
- 19** Pitoniak A, Bohmann, D. 2015. Mechanisms and functions of Nrf2 signaling in *Drosophila*, *Free Radic. Biol. Med.*
- 20** Pomatto, L. C., Sisliyan, C., Wong, S., Cline, M., Tower, J., & Davies, K. J. (2020). The Proteasome Beta 5 subunit is essential for sexually divergent adaptive homeostatic responses to oxidative stress in *D. melanogaster*. *Free Radical Biology and Medicine*.
- 21** Pomatto, L. C., Wong, S., Carney, C., Shen, B., Tower, J., & Davies, K. J. (2017). The age-and sex-specific decline of the 20s proteasome and the Nrf2/CncC signal transduction pathway in adaption and resistance to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY)*, *9*(4), 1153.
- 22** Pickering, A. M., Staab, T. A., Tower, J., Sieburth, D., & Davies, K. J. (2013). A conserved role for the 20S proteasome and Nrf2 transcription factor in oxidative stress adaptation in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, *216*(4), 543-553.
- 23** Adly, A. A. (2010). Oxidative stress & disease: an updated review. *Res J Immunol*, *3*(2), 129-45.
- 24** Garofalo, R. S. (2002). Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *13*(4), 156-162.
- 25** Álvarez-Rendón, J. P., Murillo-Maldonado, J. M., & Riesgo-Escovar, J. R. (2023). The insulin signaling pathway a century after its discovery: Sexual dimorphism in insulin signaling. *General and Comparative Endocrinology*, *330*, 114146.
- 26** Huang, Y., Chi, J., Wei, F., Zhou, Y., Cao, Y., & Wang, Y. (2020). Mitochondrial DNA: A new predictor of diabetic kidney disease. *International Journal of Endocrinology*, 2020.

- 27** Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Zadrozny, M., Kasznicki, J., Zurawska M. & Drzewoski, J. (2004). DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 554(1-2), 297-304.
- 28** Lee SC, Chan JC. Evidence for DNA damage as a biological link between diabetes and cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(11):1543-1548. doi:10.4103/0366-6999.157693
- 29** 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
- 30** Fantus, I. G., Goldberg, H. J., & Whiteside, C. I. (2006). The hexosamine biosynthesis pathway. In *The Diabetic Kidney* (pp. 117-133). Humana Press.
- 31** Dandona, P., Aljada, A., & Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in immunology*, 25(1), 4-7
- 32** Donath, M. Y. (2014). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nature reviews Drug discovery*, 13(6), 465-476.
- 33** Garofalo, R. S. (2002). Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(4), 156-162.
- 34** Wible, R. S., Ramanathan, C., Sutter, C. H., Olesen, K. M., Kensler, T. W., Liu, A. C., & Sutter, T. R. (2018). NRF2 regulates core and stabilizing circadian clock loops, coupling redox and timekeeping in *Mus musculus*. *Elife*, 7, e31656.
- 35** Álvarez-Rendón, J. P., & Riesgo-Escovar, J. R. (2020). Circadian and rhythmic-related behavioral co-morbidities of the diabetic state in *Drosophila melanogaster*. *General and comparative endocrinology*, 295, 113477.
- 36** Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2004). *Nrf2-Keap1* defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in molecular medicine*, 10(11), 549-557.

- 37** 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.
- 38** Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, McMahon M. Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: lessons for cancer chemoprevention from dioxin. *Toxicol Sci.* 2009 Oct;111(2):199-201.
- 39** Uruno, A., Furusawa, Y., Yagishita, Y., Fukutomi, T., Muramatsu, H., Negishi, T., ... & Yamamoto, M. (2013). The *Keap1-Nrf2* system prevents onset of diabetes mellitus. *Molecular and cellular biology*, 33(15), 2996-3010.
- 40** Kai Connie Wu, Julia Yue Cui, Curtis D. Klaassen, Beneficial Role of Nrf2 in Regulating NADPH Generation and Consumption, *Toxicological Sciences*, Volume 123, Is. 2, October 2011, p.590–600
- 41** 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.
- 42** Partridge, L., & Gems, D. (2002). Mechanisms of aging: public or private? *Nature Reviews Genetics*, 3(3), 165-175.
- 43** Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 6(3), 456-80
- 44** Zhang, H., Davies, K. J., & Forman, H. J. (2015) Pitoniak, A., & Bohmann, D. (2015). Mechanisms and functions of Nrf2 signaling in *Drosophila*. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 302-313.
- 45** Zhang, H., Davies, K. J., & Forman, H. J. (2015) Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 314-336
- 46** Giebultowicz, J. M. (2018). Circadian regulation of metabolism and healthspan in *Drosophila*. *Free Radical Biology and Medicine*, 119, 62-68.

- 47** Hill VM, O'Connor RM, Sissoko GB, Irobunda IS, Leong S, Canman JC, Stavropoulos N, Shirasu-Hiza M. A bidirectional relationship between sleep and oxidative stress in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 2018 Jul 12;16(7):e2005206.
- 48** Vaccaro, A., Dor, Y. K., Nambara, K., Pollina, E. A., Lin, C., Greenberg, M. E., & Rogulja, D. (2020). Sleep Loss Can Cause Death through Accumulation of Reactive Oxygen Species in the Gut. *Cell.* 2020 Jun 11;181(6):1307-1328.e15.
- 49** Chatterjee, N., & Bohmann, D. (2012). A versatile Φ C31 based reporter system for measuring AP-1 and Nrf2 signaling in *Drosophila* and in tissue culture. *PLoS one*, 7(4), e34063.
- 50** Carolina 2023, Formula 4-24 Safety Data Sheet, *página en línea de Carolina*, acceso 20 junio de 2023 <<https://www.carolina.com/pdf/msds/formula424ghs.pdf>>
- 51** TriKinetics 2021, Locomotor Activity Monitoring Systems for biological research, *página en línea de TriKinetics Inc Waltham, MA USA*, acceso agosto 2021 <<http://www.trikinetics.com/>>
- 52** Cichewicz, K., Hirsh, J. ShinyR-DAM: a program analyzing *Drosophila* activity, sleep and circadian rhythms. *Commun Biol* 1, 25 (2018).
- 53** Geissmann Q, Garcia Rodriguez L, Beckwith EJ, Gilestro GF (2019) Rethomics: An R framework to analyse high-throughput behavioural data. *PLOS ONE* 14(1): e0209331.
- 54** New 51 Wu Q, Yu G, Park SJ, Gao Y, Ja WW, Yang M. Excreta Quantification (EX-Q) for Longitudinal Measurements of Food Intake in *Drosophila*. *iScience*. 2020 Jan 24;23(1):100776.
- 55** Koyama LAJ, Aranda-Díaz A, Su YH, Balachandra S, Martin JL, et al. (2020) Bellymount enables longitudinal, intravital imaging of abdominal organs and the gut microbiota in adult *Drosophila*. *PLOS Biology* 18(1): e3000567.

56 Bio-Rad, DC Protein Assay, página en línea de Bio-Rad Laboratories, acceso agosto 2022 <<https://www.bio-rad.com/es-mx/product/dc-protein-assay?ID=22faf97a-6b8d-4763-8b97-3dc530dcab66>>

57 Merck, Glucose (GO) Assay Kit, página en línea de Merck, acceso agosto 2022 <<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/gago20>>

58 Van Handel E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 1985 Sep;1(3):302-4. PMID: 2906672.

59 Abcam, GSH+GSSG / GSH Assay Kit (Colorimetric) (ab239709), página en línea de Abcam, acceso agosto 2022 <<https://www.abcam.com/gshgssg--gsh-assay-kit-colorimetric-ab239709.html>>

60 Doran, M. L., Knee, J. M., Wang, N., Rzezniczak, T. Z., Parkes, T. L., Li, L., & Merritt, T. J. (2017). Metabolomic analysis of oxidative stress: superoxide dismutase mutation and paraquat induced stress in *Drosophila melanogaster*. *Free Radical Biology and Medicine*, 113, 323-334.

61 Kaneuchi T, Togawa T, Matsuo T, Fuyama Y, Aigaki T. Efficient measurement of H₂O₂ resistance in *Drosophila* using an activity monitor. *Biogerontology*. 2003;4(3):157-65.

62 Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan, N. (2015). Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—an update. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 25788-25816.

63 Niveditha, S., Deepashree, S., Ramesh, S. R., & Shivanandappa, T. (2017). Sex differences in oxidative stress resistance in relation to longevity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology B*, 187(7), 899-909.

- 64** Spiers, J. G., Breda, C., Robinson, S., Giorgini, F., & Steinert, J. R. (2019). *Drosophila Nrf2/Keap1* mediated redox signaling supports synaptic function and longevity and impacts on circadian activity. *Frontiers in molecular neuroscience*, *12*, 86.
- 65** Xu, Y. Q., Zhang, D., Jin, T., Cai, D. J., Wu, Q., Lu, Y., et al. (2012). Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice. *PLoS One* *7*:e44237. doi: 10.1371/journal.pone.0044237
- 66** Bayliak, M. M., Demianchuk, I., Gospodaryov, D. V., Abrat, O. B., Lylyk, M. P., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2020). Mutations in genes *cnc* or *dKeap1* modulate stress resistance and metabolic processes in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *248*, 110746.
- 67** Zhang, Z., Zhou, S., Jiang, X., Wang, Y. H., Li, F., Wang, Y. G. & Cai, L. (2015). The role of the Nrf2/Keap1 pathway in obesity and metabolic syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *16*(1), 35-45.
- 68** Karim, M. R., Taniguchi, H., & Kobayashi, A. (2015). Constitutive activation of *Drosophila CncC* transcription factor reduces lipid formation in the fat body. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *463*(4), 693-698.
- 69** Kai Connie Wu, Julia Yue Cui, Curtis D. Klaassen, Beneficial Role of Nrf2 in Regulating NADPH Generation and Consumption, *Toxicological Sciences*, Volume 123, Issue 2, October 2011, Pages 590–600.
- 70** Love MI, Huber W, Anders S (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome Biology*, **15**, 550.
- 71** Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., ... & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(43), 15545-15550.

- 72** Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., ... & Groop, L. C. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics*, *34*(3), 267-273.
- 73** Zhou et al., Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communications* (2019) *10*(1):1523.
- 74** Luo W, Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics*, 2013, *29*(14):1830-1831, doi: 10.1093/bioinformatics/btt285
- 75** Pan JB, et al. PaGenBase: a pattern gene database for the global and dynamic understanding of gene function. *PLoS One* *8*, e80747 (2013).
- 76** Shannon P. et al., Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* (2003) *11*:2498-2504.
- 77** Zheng, X., Yang, Z., Yue, Z., Alvarez, J. D., & Sehgal, A. (2007). FOXO and insulin signaling regulate sensitivity of the circadian clock to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(40), 15899-15904.
- 78** Collins, B., & Blau, J. (2007). Even a stopped clock tells the right time twice a day: circadian timekeeping in *Drosophila*. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, *454*, 857-867.
- 79** Heier, C., Klishch, S., Stilbytska, O., Semaniuk, U., & Lushchak, O. (2021). The *Drosophila* model to interrogate triacylglycerol biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1866*(6), 158924.
- 80** Garrido, D., Rubin, T., Poidevin, M., Maroni, B., Le Rouzic, A., Parvy, J. P., & Montagne, J. (2015). Fatty acid synthase cooperates with glyoxalase 1 to protect against sugar toxicity. *PLoS genetics*, *11*(2), e1004995.

81 Metaxakis, A., Tain, L. S., Grönke, S., Hendrich, O., Hinze, Y., Birras, U., & Partridge, L. (2014). Lowered insulin signalling ameliorates age-related sleep fragmentation in *Drosophila*. *PLoS biology*, *12*(4), e1001824.

Anexo 1

Álvarez-Rendón, J. P., & Riesgo-Escovar, J. R. (2020). Circadian and rhythmic-related behavioral co-morbidities of the diabetic state in *Drosophila melanogaster*. *General and comparative endocrinology*, 295, 113477. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113477>

Anexo 2

Álvarez-Rendón, J. P., & Riesgo-Escovar, J. R. (2023). Activation of the Cap'n'collar C pathway (Nrf2 pathway in vertebrates) signaling in insulin pathway compromised *Drosophila melanogaster* flies ameliorates the diabetic state upon pro-oxidant conditions. *General and Comparative Endocrinology*, 335, 114229. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2023.114229>

Anexo 3

Álvarez-Rendón, J. P., Murillo-Maldonado, J. M., & Riesgo-Escovar, J. R. (2023). The insulin signaling pathway a century after its discovery: Sexual dimorphism in insulin signaling. *General and Comparative Endocrinology*, 330, 114146. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2022.114146>