



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

# **El estrés mitocondrial en tejido muscular provoca alteraciones de la ruta de señalización de la insulina de manera no autónoma**

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Curso 2017-2018

Valencia, junio de 2018

**Autora:** Cristina Amparo Devesa Arbiol

**Tutor:** Máximo Ibo Galindo Orozco

**Co-tutor externo:** Andrea Tapia González





# **El estrés mitocondrial en tejido muscular provoca alteraciones de la ruta de señalización de la insulina de manera no autónoma**

**Autora:** Cristina Amparo Devesa Arbiol

**Tutor:** Máximo Ibo Galindo Orozco

**Co-tutor externo:** Andrea Tapia González

Valencia, junio de 2018

## **RESUMEN**

La disfunción mitocondrial es uno de los factores relacionados estrechamente con el envejecimiento. En este trabajo se han silenciado las proteínas de fusión mitocondrial Opa1 y Mfn2 en el tejido muscular de *Drosophila melanogaster*. Se analizó, a 30 días y por tejidos (cabeza, tórax y abdomen), la expresión mediante PCRc de genes implicados en la ruta de señalización de la insulina. Por otra parte se cuantificó los paquetes musculares mediante estudios histológicos.

Los resultados mostraron el mantenimiento del tejido muscular y una alteración en la ruta de la insulina de los genotipos experimentales. En los tres tejidos estudiados se observaron estas alteraciones, lo que pone de manifiesto la existencia de una comunicación intertisular. Esto podría estar relacionado con el aumento de la esperanza de vida y el mantenimiento de la capacidad locomotora descrita en estudios anteriores. En lo que atañe a la histología, no se apreciaron cambios respecto a masa muscular.

Se demuestra, por tanto, la importancia de continuar estudiando la relación de la dinámica mitocondrial con la ruta de la insulina y el envejecimiento.

**PALABRAS CLAVE:** fusión mitocondrial, estrés oxidativo, silenciamiento, envejecimiento, insulina, *Drosophila melanogaster*.

# **Mitochondrial stress in muscle tissue causes alterations in the insulin signaling pathway in a non-autonomous manner**

**Author:** Cristina Amparo Devesa Arbiol

**Tutor:** Máximo Ibo Galindo Orozco

**External co-tutor:** Andrea Tapia González

Valencia, June 2018

## **ABSTRACT**

Mitochondrial dysfunction is one of the factors closely related to ageing. In this dissertation, mitochondrial fusion proteins Opa1 and Mfm2 have been silenced in muscular tissue of *Drosophila melanogaster*. Expression of genes implicated in the insulin signaling pathway was measured using qPCR of different tissue samples (head, thorax, and abdomen) at day 30. Furthermore, muscular packages were quantified via histological studies.

Results showed a maintenance of muscular tissue and alterations of the insulin pathway in the experimental genotypes. Alterations were observed in the three tissues studied, which shows the existence of an intertissular communication. This could be related with an increase in lifespan and the maintenance of locomotive capacity previously described. No histological differences were described in the muscular tissues.

It is therefore proven the importance of continuing to study the relationship of mitochondrial dynamics with the insulin pathway and ageing.

**KEY WORDS:** mitochondrial fusion, oxidative stress, silencing, ageing, insulin, *Drosophila melanogaster*.



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Envejecimiento y dinámica mitocondrial .....	1
1.2 Alteraciones en rutas metabólicas .....	3
1.3 Relación tejido muscular y el envejecimiento. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo animal .....	5
2. OBJETIVOS .....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
3.1 Cepas, manipulación y alimentación utilizada .....	8
3.2 Sistema UAS-Gal4 .....	9
3.3 Métodos moleculares .....	10
3.3.1 Extracción de ARN .....	10
3.3.2 RT-PCR (PCR con transcriptasa reversa) .....	10
3.3.3 PCR convencional (Reacción en cadena de la polimerasa) .....	11
3.3.4 PCRC (cuantitativa) .....	12
3.4 Métodos histológicos .....	13
3.5 Métodos estadísticos y representaciones gráficas empleado .....	14
4. RESULTADOS .....	15
4.1 Validación silenciamiento .....	15
4.1.1 Validación silenciamiento <i>OPAI</i> .....	15
4.1.2 Validación silenciamiento <i>Mfn2</i> .....	16
4.2 Alteraciones de la ruta de la insulina en los genotipos experimentales .....	16
4.2.1 Tórax .....	17
4.2.2 Cabeza .....	17
4.2.3 Abdomen .....	18
4.3 Expresión <i>Dilp2</i> y <i>Dilp6</i> .....	19
4.4 Estudios histológicos .....	19
5. DISCUSIÓN .....	23
6. CONCLUSIONES .....	25
7. BIBLIOGRAFÍA .....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de fusión y fisión mitocondrial .....	2
<b>Figura 2.</b> Ruta de señalización de la insulina en mamíferos .....	4
<b>Figura 3.</b> Validación del silenciamiento de <i>OPA1</i> en tórax .....	15
<b>Figura 4.</b> Validación del silenciamiento de <i>Mfn2</i> en tórax.....	16
<b>Figura 5.</b> Expresión, en tórax, de los genes <i>InR</i> y <i>4ebp</i> relacionados con la ruta de la insulina. 17	
<b>Figura 6.</b> Expresión, en cabeza, de los genes <i>InR</i> y <i>4ebp</i> relacionados con la ruta de la insulina .....	18
<b>Figura 7.</b> Expresión, en abdomen, de los genes <i>InR</i> y <i>4ebp</i> relacionados con la ruta de la insulina.....	18
<b>Figura 8.</b> Indicios de posibles alteraciones en la expresión de <i>Dilp2</i> y <i>Dilp6</i> .....	19
<b>Figura 9.</b> Estudios histológicos de los tres genotipos experimentales.....	20
<b>Figura 10.</b> Cuantificación de los estudios histológicos de los genotipos experimentales .....	20

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de las cepas de <i>D. melanogaster</i> usadas en el trabajo .....	8
<b>Tabla 2.</b> Reactivos realización RT-PCR .....	10
<b>Tabla 3.</b> Cebadores utilizados para la PCRc. Temperatura de fusión, estructura secundaria, dimerización y porcentaje de CGs de los mismos.....	11
<b>Tabla 4.</b> Volúmenes y reactivos PCR convencional .....	12
<b>Tabla 5.</b> Volúmenes y reactivos empleados en las PCRs cuantitativas .....	12

## ABREVIATURAS

**ATP:** adenosín trifosfato

**Fis1:** proteína de fisión mitocondrial 1

**Drp1:** proteína 1 relacionada con la dinamina

**Mfn1:** mitofusina 1

**Mfn2:** mitofusina 2

**OPA1:** atrofia óptica 1

**ROS:** especies reactivas del oxígeno

**GH:** hormona de crecimiento

**IGF-1:** factor insulínico tipo 1

**IIS:** ruta de señalización de la insulina y IGF-1

**FoxO:** forkhead box Other

**4ebp:** proteína de unión 4E

**AKT:** proteína quinasa B

**mTOR:** diana de rapamicina en células de mamífero

**InR:** receptor de la insulina

**IST-1:** factor asociado ESCRT-III

**PI-3 AGE-1:** age-1 fosfatidilinositol quinasa 3

**PIP-3:** fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato

**PDK1:** quinasa dependiente de fosfoinositol

**Dilp:** *Drosophila* insulin-like peptide

**AKT1:** quinasa RAC-alfa serina treonina

**AMPK:** proteína quinasa activada por AMP

**S6K:** proteína quinasa S6 ribosomal alfa 1

**IMP2:** factor insulínico 2 de unión al mRNA

**AMP:** adenosín monofosfato

**SIRT1:** sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD

**NAD<sup>+</sup>:** nicotin adenin dinucleótido

**PGC-1 $\alpha$ :** co-activador 1 alfa del receptor gamma activador del proliferador de peroxisomas

**orR:** oregón

**CyO**: curly oyster

**Cy**: curly

**Tm6b**: third multiple 6b

**Mch**: cadena pesada de la miosina

**Act**: actina

**UAS**: upstream activator sequence

**Rp49**: proteína ribosomal 49

**ADNc**: ADN complementario

**ARNi**: ARN interferente

**ARNi *Opal***: genotipo con el gen *Opal* silenciado

**ARNi *Mfn2***: genotipo con el gen *Mfn2* silenciado

**dNTPs**: desoxirribonucleótidos trifosfato

**EEUU**: Estados Unidos

**PCR**: reacción en cadena de la polimerasa

**PCRc**: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RT-PCR**: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

**N**: número de réplicas biológicas

# **1. INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Envejecimiento y dinámica mitocondrial

El envejecimiento es un proceso natural de deterioro fisiológico dependiente del tiempo, causado por la pérdida de homeostasis del organismo, que conlleva a la inhibición de funciones esenciales y lo hace vulnerable a la muerte (Otin et al., 2013; Klass, 1983).

Se han descrito varios factores que pueden ser causantes del envejecimiento, entre ellos se encuentran las alteraciones en rutas metabólicas y la disfunción mitocondrial (Otin et al, 2013).

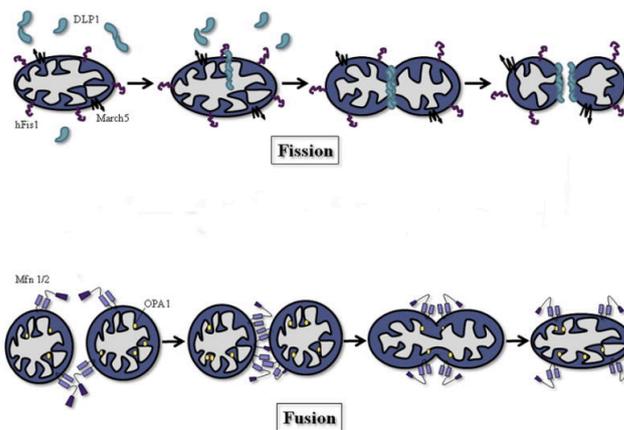
Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que juegan un papel clave en la conversión de energía e integran múltiples señales del entorno. La disrupción de la función mitocondrial desencadena en la desregulación de muchas cascadas de señalización que la célula intenta compensar (Owusu-Ansah et al., 2013; Liu y Butow, 2006).

Se observa una clara relación con el envejecimiento ya que a edades avanzadas aparecen fugas en la cadena de transporte de electrones y se reduce la producción de ATP (adenosín trifosfato) (Green et al., 2011). Además cuando las células envejecen la degradación de las mitocondrias es ineficiente y se presenta una disminución en la biogénesis de las mismas (Terman et al., 2010).

La dinámica mitocondrial se trata de una de las características más importantes de la mitocondria y está regulada, fundamentalmente, por procesos de fusión (unión) y fisión (fragmentación) que controlan cambios continuos en la posición, tamaño y forma de las mitocondrias dentro de las células. La existencia de estos procesos demuestra que las mitocondrias no son orgánulos aislados, si no que la actividad y funcionalidad de una mitocondria depende de otras, es decir, no se generan *de novo* si no por división y crecimiento de mitocondrias ya existentes (Jornayvaz y Shulman, 2010). Esto implica que fusión y fisión mitocondrial son mecanismos esenciales para mantener la homeóstasis.

Por una parte la fisión permite la mitofagia. Las mitocondrias, que están dañadas, se deben eliminar, se fisianan en pequeños trozos que son fácilmente degradados (Itoh et al, 2013). Asimismo permite la obtención de nuevas mitocondrias, evento muy importante cuando se realiza la división celular. La fusión permite la unión, dando lugar a intercambio y compensación de contenido celular y de ROS. Además se corrigen mutaciones (Halliwell y Whiteman, 2004; Dalmasso et al., 2017).

Estos mecanismos de fusión y fisión (Figura 1) están mediados por un conjunto de factores que interactúan. Es de gran importancia que estos mecanismo se mantengan en equilibrio, ya que la red mitocondrial está involucrada en todas las actividades celulares principales, como el metabolismo, la proliferación, la autofagia y la apoptosis, que afectan a la vida celular (Ciarlo et al., 2018).



**Figura 1.** Proceso de fusión y fisión mitocondrial. (Hom y Sheu, 2009)

Las proteínas implicadas en el proceso de fisión son Fis1 (proteína de fisión mitocondrial 1) y Drp1 (proteína 1 relacionada con la dinamina), situadas en la membrana mitocondrial externa y el citosol respectivamente.

En el caso de la fusión las proteínas implicadas en mamíferos son: mitofusina1 (MFN1), mitofusina2 (MFN2) y atrofia óptica1 (OPA1). Se trata de grandes GTPasas. MFN1 Y MFN2 se localizan en la membrana mitocondrial externa, mientras que OPA1 se localiza en la interna (Zhan et al., 2013). Se necesita cooperación de las mitofusinas y de OPA1 para poder llevar a cabo la fusión. Esta coordinación de los eventos de la membrana mitocondrial externa e interna no se realiza vía nuclear (Cipolat et al., 2004).

Este trabajo se centra en el proceso de fusión, por lo que se evaluará *OPA1*, *MFN2* genes que poseen ortólogos en *Drosophila*. Resulta, por tanto, interesante conocer algunas de las patologías más importantes relacionadas con estas proteínas. Se ha de destacar que ambas se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Van Laar et al., 2009). Por parte de OPA1 podemos destacar la atrofia óptica, como resultado de mutaciones intrónicas de este gen. Hay estudios que demuestran que variando ciertas secuencias puede mejorar el pronóstico (Bonifert et al., 2014). MFN2 se ha visto relacionada con una enfermedad conocida con el nombre Charcot-Marie-Tooth (CMT) que afecta a las neuronas motoras y sensoras del sistema nerviosa periférico (Bucci et al., 2012).

## ROS

La mitocondria genera ROS (especies reactivas del oxígeno) principalmente como subproducto de la respiración. Se ha demostrado que los niveles de ROS influyen en la expresión y actividad de Drp1, Opa1 y de las mitofusinas (Cid-Castro et al., 2018; Murphy, 2009). Cuando se pierde el balance entre fusión y fisión la producción de ROS se ve alterada. Este incremento lleva a una pérdida de potencial de membrana, a un desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones y a la caída de las concentraciones de ATP.

Hay muchas teorías que indican que el envejecimiento se produce debido a un incremento en ROS que causa daño mitocondrial (Otin et al., 2013; Harman, 1965). Sin embargo se han encontrado contradicciones: se observó que al incrementado ROS en *C.elegans* aumentaba la longevidad, pero realizando el mismo experimento en ratón el envejecimiento no producían alteraciones (Donnan et al., 2008; Van Remmen et al., 2003).

Toda esta controversia conlleva a plantear el verdadero papel de ROS. Una posibilidad sería considerar a ROS como una defensa ante un estrés. De esta forma cuando la célula va envejeciendo esto se detecta como un estrés y la cantidad de ROS aumenta (Hekimi et al., 2011), pero simplemente se trata de una teoría que hay que continuar estudiando.

### Mitohormesis

El concepto de mitohormesis explica como cierta dosis de estrés mitocondrial, crea un daño que desencadena respuestas compensatorias beneficiosas que superan la reparación del daño inicial. Estudios demuestran que las deficiencias respiratorias leves pueden aumentar la esperanza de vida, tal vez debido a un descenso en ROS (Haigis y Yankner, 2010). En *C.elegans* se demostró que no solamente se ha observado que este tipo de reacciones pueden inducir estrés mitocondrial, si no que ese estrés puede trasladarse a tejidos distantes (Durieux et al., 2011).

Las mitocondrias están completamente integradas en la célula y las tensiones mitocondriales activan rápidamente las vías de señalización citosólica que finalmente alteran la expresión del gen nuclear. Se advierte, por tanto, que la mitohormesis puede dar lugar consecuencias muy relevantes (Yun y Finkel, 2014).

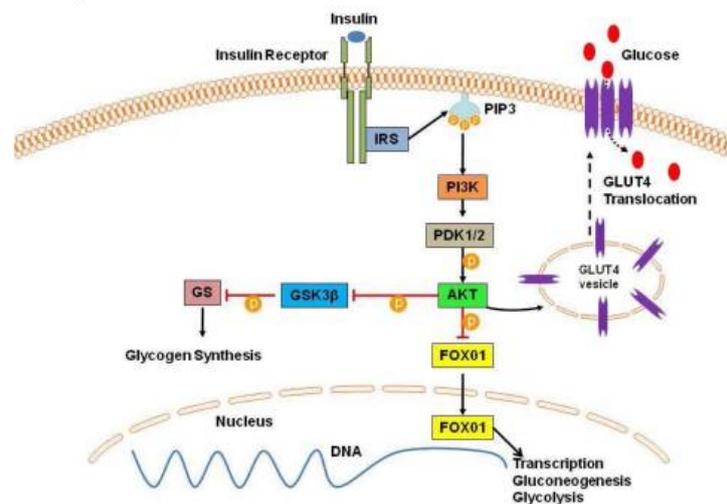
## 1.2 Alteraciones en rutas metabólicas

Las mitocondrias también participan en diferentes rutas metabólicas y la alteración de las mismas se ha visto relacionada con la disfunción mitocondrial (Wang y Klionsky, 2011).

Una de las rutas más destacadas como causante del envejecimiento es la ruta de la insulina (Figura 2). El eje fundamental de esta sensibilidad en mamíferos, se basa en la hormona de crecimiento (GH), y su mediador secundario, el factor de crecimiento insulínico tipo1 (IGF-1) que sigue una ruta de señalización igual a la insulina. Esta ruta (llamada ruta de señalización de la insulina y IGF-1 (IIS)) comienza estimulada por la GH y es la más conservada con respecto al envejecimiento. Se ha observado, tanto en humanos como en organismo modelo, que ciertas mutaciones que reducen la función de la GH y del receptor IGF-1, o efectores, aguas abajo, como FoxO (forkhead box Other), *4ebp* (proteína de unión 4E), AKT (proteína quinasa B) y mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) aumentan la longevidad (Barzilai et al., 2012; Kenyon, 2010).

En invertebrados existe solo un receptor tirosina quinasa común (receptor de la insulina; *InR*). Cuando se secretan péptidos insulínicos se unen a este receptor, el cual se activa y transduce la señal directamente a través del IST-1 (factor asociado ESCRT-III) a la quinasa PI-3 AGE-1 (age-1 fosfatidilinositol quinasa 3). Esta quinasa da lugar a un segundo mensajero PIP-3

(fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato) que, a altas concentraciones, activa PDK1 (quinasa dependiente de fosfoinositol) y AKT1 (quinasa RAC-alfa serina treonina) los cuales fosforilan a DAF-16 (cuyo homólogo en mamíferos es FoxO). Este factor de transcripción en su estado natural se encuentra en el núcleo y tiene como diana: genes metabólicos de respuesta al estrés, genes relacionados con el metabolismo y que codifican péptidos antimicrobianos. Sin embargo cuando se fosforila, se transloca al citoplasma y esos genes “protectores” no se expresan.



**Figura 2.** Ruta de señalización de la insulina en mamíferos (Elmadhun et al., 2013).

Por otro lado en *Drosophila melanogaster*, existen varios péptidos insulínicos conocidos como *Dilp* (*Drosophila insulin-like peptide*). Entre ellos destacan *Dilp2* y *Dilp6* por haberse relacionado con el envejecimiento (Bai et al., 2012).

Existen varias teorías que contemplan que, con la inactivación de la ruta, los genes “protectores” se transcribirán aumentando así la longevidad. El enfoque irá dirigido en este caso a encontrar mecanismos que permitan la inactivación de esta ruta, ya sea variando los niveles de insulina, la sensibilidad de los tejidos a la insulina o, buscando factores clave en la cascada de señalización (Van Heemst, 2010). Esto se ha demostrado en mosca, gusano y ratón (Fontana et al., 2010). En esta teoría encontramos una paradoja, es cierto que la inactivación de la IIS aumenta la longevidad, pero también es cierto que es un síntoma de envejecimiento (Garinis et al., 2008). Esta controversia se puede explicar si entendemos que, a una determinada edad, se utilizan mecanismos para prolongar la vida, por eso también se muestra un descenso de la IIS en organismos de edades avanzadas.

Además existen otras teorías que explican como la IIS baja los niveles de expresión de sirtuinas y disminuye la autofagia y, que cuando los niveles de insulina sean bajos la actividad de las sirtuinas y la autofagia serán óptimas (Dröge y Scyipper, 2007; Kenyon et al., 1993). Se conoce que la autofagia juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad celular, eliminando mitocondrias y orgánulos. Se ha observado en mutantes de *C.elegans* que la autofagia es requerida para aumentar la longevidad (Melendez et al., 2003).

Existen otras rutas metabólicas importantes como son mTOR, AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y las sirtuinas. Por una parte, mTOR se trata de un factor clave en la regulación del metabolismo y el crecimiento celular. Integra señales de diferentes factores de crecimiento. Se puede distinguir entre dos complejos estructurales mTORC1 y mTORC2. La represión de la actividad mTORC1 aumenta la longevidad en moscas, gusanos y levaduras (Johnson et al., 2013). Este complejo es capaz de fosforilar a S6K (proteína quinasa S6 ribosomal alfa 1), 4ebp y IMP2 (factor insulínico 2 de unión al mRNA) que son claves en la traducción del mRNA. Además mTORC1 inhibe la inducción de la autofagia.

Por otra parte AMPK es sensible a niveles bajos de energía (detecta niveles altos de AMP (adenosín monofosfato) desencadena muchas respuestas metabólicas, e inhibe mTORC1. Existen evidencias de que al administrar diferentes tóxicos (mitohormesis) los niveles de AMP aumentan y se produce la activación de AMPK y se retarda el envejecimiento (Hawley et al., 2010, Cabreiro et al., 2013).

Por último, las sirtuinas, que son enzimas deacetilasas de histonas con actividad NAD<sup>+</sup> (nicotin adenin dinucleótido) dependiente, también detecta niveles bajos de energía (niveles altos de NAD<sup>+</sup>) (Houtkooper et al., 2010). SIRT1 (sirtuina-1 deacetilasa dependiente de NAD) es capaz de deacetilar a PGC-1 $\alpha$  (co-activador 1 $\alpha$  del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas) el cual desemboca en respuestas importantes como la producción de defensas antioxidantes mejoradas, mejora de la oxidación de ácidos grasos y biogénesis mitocondrial. Los dos últimos sistemas responden ante la bajada de energía, por lo que pueden realizar una respuesta de forma conjunta (Price et al., 2012).

### 1.3 Relación tejido muscular y el envejecimiento. *Drosophila melanogaster* como modelo animal

El músculo es uno de los tejidos en los que los cambios relacionados con la edad son muy notables (Herndon et al., 2002). Se trata de un reservorio de aminoácidos que sostiene la síntesis de proteínas en otros tejidos. Las células musculares necesitan gran cantidad de mitocondrias a lo largo del citoplasma, puesto que son el tipo celular que más energía consumen. He aquí la relación entre músculo, mitocondrias y envejecimiento. Además todos esos cambios se transmiten a tejidos como el sistema nervioso mediante la unión neuromuscular, de hecho se ha observado en *Drosophila*, que el tamaño de la unión neuromuscular aumenta en longitud y tamaño y las ramificaciones nerviosas disminuyen durante el envejecimiento (Beramendi et al., 2007). En *Drosophila* la mayor parte del tejido muscular se encuentra en el tórax mientras que la cabeza es rica en sistema nervioso y el abdomen en tracto intestinal.

En *Drosophila melanogaster* la organización y metabolismo del tejido muscular, así como determinadas rutas de señalización (IIS), son similares en mamíferos. Sin embargo puede dar lugar a cambios más acentuados durante el envejecimiento, ya que carece de células troncales satélite y, por tanto la capacidad de reparación del músculo es limitada (Demontis y Perrimon, 2010). Además los mecanismos intrínsecos que regulan el tejido muscular están ampliamente conservados en muchas especies.

*Drosophila melanogaster* se puede considerar un buen organismo modelo ya que el 75% de los genes humanos tienen su ortólogo en la mosca de la fruta. Ha sido muy utilizado en diversas investigaciones puesto que se pueden manipular fácilmente (pequeño tamaño), tienen un ciclo de vida corto (40-120 días) y una esperanza de vida conocida. Además proporcionan gran cantidad de descendientes, con los cuales se puede realizar rápidos cribados, obteniendo así datos altamente significativos. Se pueden mantener de manera económica, sin ocupar grandes instalaciones pero imitando fácilmente su hábitat natural. Por otra parte tiene la ventaja de ser un organismo conocido genéticamente, existiendo grandes bases de datos y abundante información.

Debido a estas características podemos suponer que *Drosophila melanogaster* es un buen modelo animal para analizar la señalización entre el tejido muscular y otros tejidos y su papel en la esperanza de vida (Demontis et al., 2013).

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

El presente estudio se han silenciado los genes de fusión mitocondrial *Opa1* y *Mfn2* en el tejido muscular de *Drosophila melanogaster*, a estos genotipos se les ha denominado ARNi *Opa1* y ARINi *Mfn2*. Los objetivos de este trabajo son:

- Validar el silenciamiento de los genotipos experimentales generados en el laboratorio.
- Determinar alteraciones en la expresión de genes involucrados en la ruta de señalización de la insulina en tres tejidos (cabeza, tórax y abdomen).
- Identificar mediante técnicas histológicas las diferencias en el tejido muscular de los genotipos (control, ARNi *Opa1* y ARINi *Mfn2*).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Cepas, manipulación y alimentación utilizada.

La Tabla 1 muestra el nombre, el origen y el genotipo completo de todas las cepas empleadas en trabajo. En signo de puntuación “;” indica la separación entre los cromosomas 2 y 3.

**Tabla 1.** Características de las cepas de *D. melanogaster* usadas en el trabajo.

NOMBRE CEPA	ORIGEN	GENOTIPO
Oregón R	Bloomington	orR (genotipo salvaje)
ARNi <i>Mfn2</i>	Bloomington (B#31157)	+/+ ; RNAi- <i>Mfn2</i> /RNAi- <i>Mfn2</i>
ARNi <i>Opal</i>	Bloomington (B#32358)	+/+; RNAi- <i>Opal</i> /RNAi <i>Opal</i>
Mch-Gal4;UAS-Dcr	Generada en el laboratorio	Mch-Gal4/ Mch-Gal4; UAS-Dcr/ UAS-Dcr
Mch-Gal4;UAS-Dcr	Generada en el laboratorio	Mch-Gal4/ Cyo; UAS-Dcr/ TM6B
Act5C;UAS-Dcr	Generada en el laboratorio	Act-Gal4/ Cyo; UAS-Dcr/ UAS-Dcr

Para realizar un cribado de los individuos de interés y mantener las cepas constantes, se utilizan equilibradores cromosómicos. Se trata de cromosomas modificados que poseen al menos una mutación, es una gran herramienta para evitar la recombinación genética entre cromosomas homólogos durante la meiosis gracias a múltiples inversiones que la limitan. Son letales en homocigosis ya que tienen alguna mutación letal recesiva.

Los equilibradores utilizados en este trabajo fueron:

- *Curly oyster (CyO)*; se encuentra en el 2º cromosoma, y tiene como marcador visible *Cy: Curly*, alas curvadas.
- *Third multiple 6b (Tm6b)*; se encuentra en el 3º cromosoma y tiene como marcador visible *Hu: Humeral*, quetas humerles extra y *Tb: Tubby*, larvas y pupas cortas.

La manipulación de las cepas de *D. melanogaster* se realizó mediante anestesia con sistema de conducción de CO<sub>2</sub> pudiendo trabajar fácilmente. Las moscas se cultivan con 10 ml de comida en tubos abiertos y cubiertos por la parte superior con tapones de algodón antiácaros para evitar la pérdida de moscas. Estos tubos se cambian de 2 a 3 veces por semana en las moscas experimentales y se conservan a 25°C. Las cepas del stock se conservan a 18°C.

El protocolo para la preparación de 2l de medio de cultivo es el siguiente:

1. Preparar 260g de mezcla, con los siguientes componentes y cantidades:
  - 120g de harina de maíz
  - 100g de azúcar
  - 20g de agar
  - 20g de soja
2. Calentar 1,2l de agua destilada en el microondas durante 5 min a 800W.
3. Pesar 60g de levadura en fresco.
4. Añadir la mezcla preparada en el paso 1 y la levadura pesada en el paso 2, al agua calentada previamente y homogenizar con ayuda de la batidora.
5. Autoclavar la comida.
6. Calentar 800ml de agua destilada en el microondas 5 min a 800W.
7. Añadir el agua calentada en el paso previo a la mezcla autoclavada.
8. Añadir 6g de Nipagin (metil 4-hidroxibenzoato, antibacteriano) disuelto en 20ml de etanol 96° y 10 ml ácido propiónico (antifúngico). Homogenizar toda la mezcla con la batidora.
9. Dispensar 10ml de medio de cultivo en cada tubo, con la máquina DOSE IT P910 (INTEGRA biosciences AG, manufacturada en Switzerland).
10. Tapar los tubos con una sábana y dejar reposar durante toda una noche.
11. Tapar los tubos con tapones de algodón antiácaros.
12. Conservar a 4°C.

### 3.2 Sistema UAS-Gal4

El sistema UAS-Gal4 es una importante herramienta para expresar genes diana. Se basa en las propiedades del factor de transcripción Gal4 de las levaduras que activa la transcripción de genes diana. Gal4 se une a las secuencia UAS (Upstream activator sequence), activando el gen ubicado hacia la dirección 3' de dicha secuencia.

En *Drosophila* estos dos componentes se encuentran en cepas separadas existiendo así múltiples combinaciones posibles. Por una parte, tendremos una cepa que va promover la expresión específica de tejido de Gal4 y por otro lado, otra cepa que contenga el gen de interés controlado por UAS. Al cruzar estas cepas obtendremos descendencia que sobreexpresen o silencien un determinado gen en un determinado tejido. En este trabajo Gal4 se combinó con el driver de misiona (Mch-Gal4) consiguiendo una expresión específica en músculo y cruzándolas con moscas que tenga la construcción ARNi (ARN de interferencia) seguida por *Opa1* o *Mfn2* consiguiendo así el silenciamiento de estos genes. Se realizó, por otra parte, el mismo ensayo con el driver de Actina (Act-Gal4) siendo la expresión en este caso ubicua, pero resultó letal el cruce con ARNi *Opa1*, por lo que no se pudo seguir con esta parte del experimento.

### 3.3 Métodos moleculares

Todos los experimentos se realizaron en moscas macho a 30 días de vida. Se realizaron 3 repeticiones por genotipo. Se analizaron en total 30 moscas por cada genotipo y repetición.

#### 3.3.1 Extracción de ARN

El protocolo empleado para la extracción de ARN para cada tejido (cabeza, tórax y abdomen) es el siguiente:

1. Colocar el tejido en un tubo de microcentrifuga y añadir 800µl (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU).
2. Homogenizar la mezcla con un mortero.
3. Dejar reposar 5 min a temperatura ambiente.
4. Una vez transcurrido 5 min añadir 160µl de cloroformo, mezclar adecuadamente y dejar reposar 3 min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar durante 15min a 4°C a 12.000rcf.
6. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrifuga y precipitar el ARN añadiendo 400µl de isopropanol. Dejar 10 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 12.000rcf 15min a 4°C.
8. Eliminar el sobrenadante.
9. Añadir 500µl de etanol al 75% al precipitado y centrifugar 5min a 12.000rcf.
10. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado al aire 25min. Cuando se haya evaporado el etanol resuspender el precipitado en 8µl de agua libre de nucleasas.
11. Incubar durante 10min a 55°C.
12. Eliminar el ADN con DNasa I – *Amplification Grade* (Sigma-Aldrich; Saint Louis, Misuri, EEUU):
  - Añadir 1µl de tampón de reacción 10x, 1µL de DNasa I e incubar 30min a 37°C.
  - Añadir 1µl de *Stop solution* e incubar durante 15' a 70°C.
13. Para mejorar la conservación, mantener las muestras a -80°C.

Al terminar se cuantificó y se evaluó la pureza del ARN mediante el NanoDrop Spectrophotometer ND1000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU).

#### 3.3.2 RT-PCR (PCR con transcriptasa reversa)

La transformación del ARN extraído a cDNA se realizó mediante el kit qScript cDNA SuperMix (Quantabio; Beverly, Massachusetts, EEUU), en el cual se indicaba las cantidades de reactivos para llevar a cabo la reacción que aparecen detallados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Reactivos realización RT-PCR.

Componentes	Volumen(µl)	Concentración final
qScript cDNA SuperMix 5X	4µl	1X
ARN molde	variable	1µg
Agua libre de nucleasas	variable	
Volumen total (µl)	20µl	

Condiciones de reacción del termociclador (Applied Biosystems; Foster City, California, EEUU):

5min a 25°C

30min a 42°C

5min a 85°C

∞ a 4°C

### 3.3.3 PCR convencional (Reacción en cadena de la polimerasa)

El primer paso fue diseñar los cebadores que aparecen en la Tabla 3 para amplificar los genes de interés. Se diseñaron con la herramienta de Roche *Universal Probe Library Assay Design Center* ([https://lifescience.roche.com/en\\_es/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center](https://lifescience.roche.com/en_es/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center))

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para la PCRc. Temperatura de fusión, estructura secundaria, dimerización y porcentaje de CGs de los mismos.

Gen	Secuencia	T <sup>a</sup> fusión(°C)	Formaci ón dímeros	Estructura secundaria	GCs (%)
<b>InR</b>	5'-CCGGGATTACTGTACTGAACCT-3'	62.90	NO	Ninguna	50.00
	5'-CGCCTGCTAAAGGATCTGA-3'	63.10	NO	Débil	52.63
<b>4ebp</b>	5'-CCAGATGCCCCGAGGTGTA-3'	64.90	NO	Ninguna	61.11
	5'-AGCCCGCTCGTAGATAAGTTT-3'	62.90	NO	Ninguna	47.62
<b>Rp49</b>	5'-CGTTTACTGCGGCGAGAT-3'	64.00	NO	Moderada	50.00
	5'-GCGCTCGACAATCTCCTT-3'	63.20	NO	Ninguna	55.56
<b>Opa1</b>	5'-CATGGCACACTACTTTTCCTGA-3'	63.90	NO	Ninguna	45.45
	5-TGCTACTAGCCGAGGAGCTAAT-3'	63.10	NO	Moderada	50.00
<b>Mfn2</b>	5'-CGCCAGTTGTTTGATGTTCA-3'	64.70	NO	Muy débil	45.00
	5'-ATTGGGCACACCACGAAT-3'	64.00	NO	Débil	50.00
<b>Dilp2</b>	5'-ATCCCGTGATTCCACACAAG-3'	64.80	NO	Débil	50.00
	5'-GCGGTTCCGATATCGAGTTA-3'	63.80	NO	Ninguna	50.01
<b>Dilp6</b>	5'-CCCTTGCGATGTATTTC-3'	64.10	NO	Ninguna	52.63
	5'-CAGTACTGCAAGAGCTCCCTGT-3'	64.70	NO	Débil	54.55

Esta PCR se realizó con el fin de asegurar que los cebadores diseñados amplificaban los genes de interés sin aparición de inespecificidad. Después de poner el ensayo a punto con PCR convencional con gradiente se corrió un gel al 8% de agarosa.

En la Tabla 4 se muestran el volumen y los reactivos empleados en la PCR convencional.

**Tabla 4.** Volúmenes y reactivos PCR convencional.

<b>Molde DNA genómico control</b>	<b>Volumen ( 25µL)</b>
Cebadores	0,4F + 0,4 R =0,8µl
dNTPs	0,5
Tampón	2,5
Taq-polimerasa	0,5
Agua destilada	20,7

El programa aplicado en el termociclador (Applied Biosystems; Foster City, California, EEUU) fue el siguiente:

- 5 min a 95°C
- 30 min a 95 °C
- 30 segundos a 63°C (35 ciclos )
- 30 segundo a 72°C
- 7 minutos a 72°C
- ∞ a 4°C

### 3.3.4 PCRc (cuantitativa)

Se empleó SYBR Green Master Mix (FastStart Essential DNA Green Master. Roche diagnostics. INdianapolis, IN, USA). Los volúmenes de reacción utilizados se pueden observar en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Volúmenes y reactivos empleados en las PCRs cuantitativas.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen ( µl)</b>
Cebadores (F y R) a 10 µM	0,5 F + 0,5 R =1 µl
ADNc (dilución 1:10 del producto de la RT-PCR)	2
SYBR Green Master Mix	5
Agua MiliQ	2
Volumen total (µl)	10

Como sistema de detección de fluorescencia se empleó LightCycler 480 (Roche; Basilea, Suiza). El programa utilizado consta de una pre-incubación durante 5 min a 95°C. A continuación 40 ciclos de amplificación que consta de 3 etapas:

- 1) 10 s a 95°C
- 2) 10s a 58°C
- 3) 10s a 72°C
- 4) Obtención curva de fusión:
  - 5s a 95°C
  - 1min a 65°C

Para cada una de las muestras se realizaron tres replicas y una vez finalizado el programa, se normalizaron respecto al valor de *Rp49* (proteína ribosomal49), gen que codifica para una proteína ribosomal y en este trabajo fue utilizado como referencia ya que es un gen constitutivo. Los cálculos para evaluar y los niveles de expresión génica relativa se realizaron mediante el método 2DDCt.

### 3.4 Métodos histológicos

El tejido a tratar con el siguiente procedimiento fue el tórax, que se obtuvo mediante la disección de 5 mocos de cada genotipo (orR, ARNi *Mfn2*, ARNi *Opal*):

1. Para la fijación de las muestras se emplea el tampón de fijación (tampón fosfato con 2% de paraformaldehído y 2% de glutaraldehído). Las muestras en esa solución deben permanecer toda la noche a 4°C.
2. Continuar la post-fijación sumergiendo las muestras en dilución 1:1 tampón de fijación:tetraóxido de osmio 20 min en hielo.
3. Introducir la muestras en tetraóxido de osmio 2h en hielo para continuar la post-fijación.
4. Con el fin de deshidratar las muestras se sumergen en etanol al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% en hielo, y por último al 100% a temperatura ambiente dejando transcurrir de 5 a 10 min en cada disolución.
5. Realizar dos lavados con óxido de propileno a temperatura ambiente durante 10 min.
6. Sumergir las muestras en una dilución 1:1 óxido de propileno:resina epoxi a temperatura ambiente durante de 2-4 horas.
7. Una vez las muestras están embebidas en la resina epoxi montar en los pocillos para la histología.

Al finalizar el procedimiento se realizaron cortes transversales, con el fin de observar los paquetes musculares, de 80 nm de grosor, 5 cortes por cada muestra. Más tarde se tiñeron con acetato de uranilo y se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión (Tecnai G<sup>2</sup> 20, FEI Company; Hillsboro, Oregon, EEUU).

Más tarde para la cuantificación de los paquetes musculares se empleó ImageJ (versión 1.50i, Java, National Institutes of Health).

### 3.5 Métodos estadísticos y representaciones gráficas empleados

Los datos empleados para realizar las gráficas, así como los test estadísticos se obtuvieron mediante la utilización del programa Excel 2011 (Microsoft; Albuquerque, Nuevo México, EEUU). La prueba T de Student fue el método estadístico empleado para comprobar la significancia de los datos obtenidos en las PCRs cuantitativas.

Por otra parte, la representación de las gráficas se realizó mediante el programa GraphPad Prism7 (GraphPad Software; La Jolla, California, EEUU)

## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

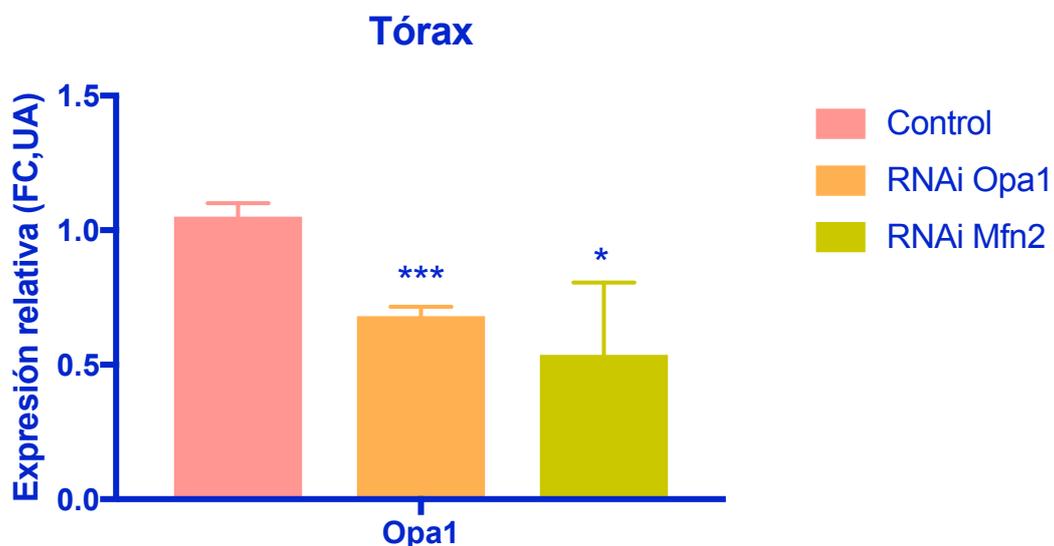
Los genotipos de silenciamiento ARNi *Opa1* y ARNi *Mfn2* se generaron en el laboratorio gracias al sistema UAS-Gal4. En muchos de los experimentos realizados la expresión de ciertos genes se midió mediante PCR. Para el estudio de los datos obtenidos con esta técnica se requiere un análisis comparativo respecto a un gen cuya expresión no varíe en las condiciones de estudio (*RP49*). Los valores representados en las siguientes gráficas están referenciados al control (orR), es decir, un valor de 1 indica que no hay variaciones con respecto al control.

### 4.1 Validación silenciamiento

En primer lugar se validó el silenciamiento, para comprobar que el sistema UAS-Gal4 funcionaba correctamente. Para la validación se realizaron PCRs cuantitativas. El driver empleado para generar los genotipos experimentales con el sistema, UAS-Gal4, fue miosina (*Mch-Gal4*). Por tanto la validación se realizó en tórax debido a que es el tejido más rico en músculo de los 3 analizados.

#### 4.1.1 Validación silenciamiento *Opa1*

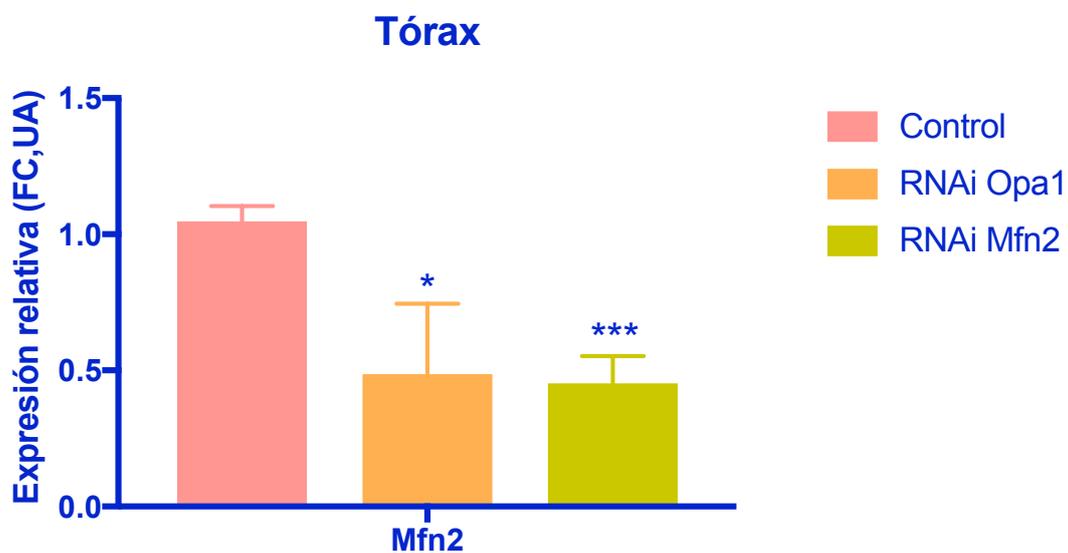
En la Figura 3 se muestra la expresión del gen *Opa1* en los diferentes genotipos. Para ambos genotipos experimentales el silenciamiento es significativo y cercano al 50% presentando el genotipo ARNi *Opa1* un valor  $p < 0,001$  y el genotipo ARNi *Mfn2* un valor  $p < 0,05$ . Esto confirmaría la estrecha relación entre ambas proteínas (Dorn, et al., 2015).



**Figura 3.** Validación del silenciamiento de *Opa1* en tórax, midiendo la expresión relativa (Fold change en unidades arbitrarias) respecto al control mediante la técnica PCR. El método empleado para el cálculo de la expresión fue 2DDCt. El análisis estadístico se realizó aplicando la prueba T de Student (\* valor  $p < 0,05$ , \*\* valor  $p < 0,01$ , \*\*\* valor  $p < 0,001$ ). N=3 (30 moscas por cada N). Se representa la media de los niveles de transcrito con su respectivo error estándar.

#### 4.1.2 Validación silenciamiento *Mfn2*

En la Figura 4 se muestra el nivel de expresión de *Mfn2* en los distintos genotipos. Se observan diferencias significativas entre los genotipos silenciados y el control. En ambos genotipos experimentales en el gen *Mfn2* existe un silenciamiento cercano al 50%, siendo esta disminución de la expresión más significativa (silenciamiento del 55%) en el genotipo ARNi *Mfn2* ( $p < 0,001$ ), frente a ARNi *Opa1* ( $p < 0,05$ ). Todo esto apoya la teoría de la relación entre ambas proteínas, teoría ya confirmada al medir los niveles de expresión de *Opa1* en ambos genotipos.



**Figura 4.** Validación del silenciamiento de *Mfn2* en tórax, midiendo la expresión relativa (Fold change en unidades arbitrarias) respecto al control mediante la técnica PCRc. El método empleado para el cálculo de la expresión fue 2DDCt. El estudio estadístico se desarrolló aplicando la prueba T de Student (\* valor  $p < 0,05$ , \*\* valor  $p < 0,01$ , \*\*\* valor  $p < 0,001$ ). N=3 (30 moscas por cada N). Se representa la media de los niveles de transcrito con su respectivo error estándar.

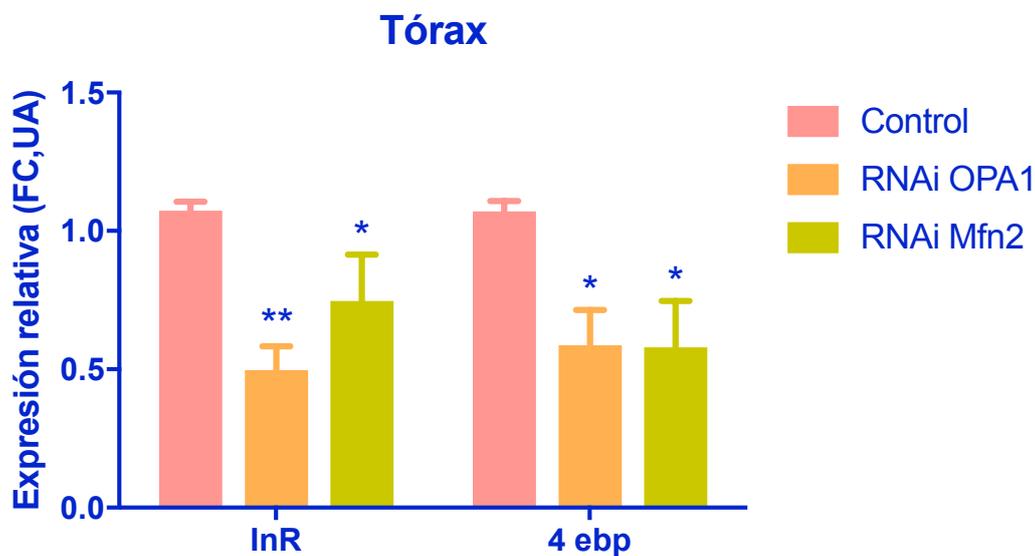
#### 4.2 Alteraciones de la ruta de la insulina en los genotipos experimentales

Después de comprobar que el silenciamiento se había realizado correctamente, se midió el nivel de expresión de ciertos genes implicados en la ruta de la insulina, como son *InR* y *4ebp*. La medida de la expresión de estos dos genes (dianas del factor de transcripción FoXO) permitirá corroborar si la señalización de la ruta de insulina se encuentra aumentada o reprimida. Si está reprimida, el nivel de expresión del *InR* y *4ebp* será mayor, sin embargo, si la señalización se encuentra aumentada el nivel de expresión de estos genes disminuirá, por lo que se les puede considerar como marcadores del estado de la IIS. Esta medida se realizó en los 3 tejidos (cabeza, tórax y abdomen).

#### 4.2.1 Tórax

El primer tejido estudiado fue el tórax, tejido en el cual se había validado el silenciamiento. En la Figura 5 se muestra el nivel de expresión del *InR* y *4ebp* en tórax para los distintos genotipos. Tanto el *InR* como el *4ebp*, en ambos genotipos experimentales se encuentran silenciados de manera significativa. Por una parte el genotipo ARNi *Opa1* tiene un 50% de nivel de expresión del *InR* ( $p < 0,01$ ) y un 59% de expresión del *4ebp*, con un valor  $p < 0,05$ , con respecto al control. Por otra parte el genotipo que presenta *Mfn2* silenciada, tiene una expresión del 75% del *InR* y un 58% del *4ebp* en referencia al control, teniendo un valor  $p$  inferior al 0,05 en ambos casos.

Este silenciamiento de los genes, por parte de ambos genotipos, en tórax podría relacionarse con un aumento de la actividad de la ruta de la insulina.



**Figura 5.** Expresión, en tórax, de los genes *InR* y *4ebp* relacionados con la ruta de la insulina. La medida de la expresión relativa (Fold change en unidades arbitrarias) respecto al control de los genes *InR* y *4ebp* se realizó mediante la técnica PCRc. El método empleado para el cálculo de la expresión fue 2DDCt. El estudio estadístico se desarrolló aplicando la prueba T de Student (\* valor  $p < 0,05$ , \*\* valor  $p < 0,01$ , \*\*\* valor  $p < 0,001$ ). N=3 (30 moscas por cada N). Se representa la media de los niveles de transcrito con su respectivo error estándar

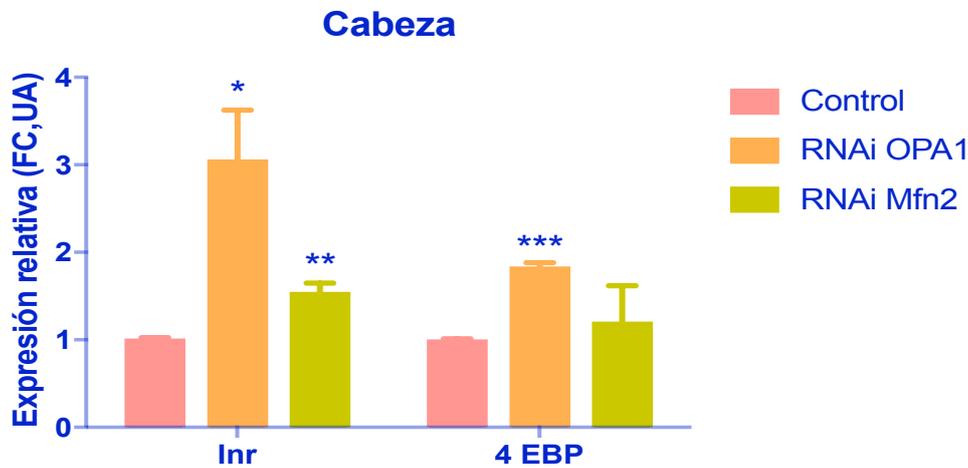
#### 4.2.2 Cabeza

Para comprobar el efecto que tenía en los demás tejidos este silenciamiento y examinar así la posible existencia de comunicación intertisular, se analizaron los tejidos restantes (cabeza y abdomen). La cabeza es rica, principalmente, en sistema nervioso y el abdomen en tracto digestivo y tejido adiposo, aunque ambos presentan una proporción de tejido muscular.

En la Figura 6 se muestra el nivel de expresión de *InR* y *4ebp* en cabeza para los distintos genotipos. Los dos genotipos se encuentran sobreexpresados tanto en el caso del *InR* como en el de *4ebp*. En el caso del genotipo ARNi *Opa1* el gen que codifica para *InR* se encuentra sobreexpresado más del triple y el *4ebp* se expresa un 84% más, respecto al control. Ambos resultados del genotipo ARNi *Opa1* presentan significancia estadística siendo los valores de  $p < 0,05$  y  $p < 0,001$  respectivamente. En el caso del genotipo ARNi *Mfn2* el gen que codifica para

*InR* se encuentra ligeramente sobreexpresado (21%) de manera significativa ( $p < 0,01$ ), mientras que el *4ebp* parece presentar tendencia a sobreexpresarse.

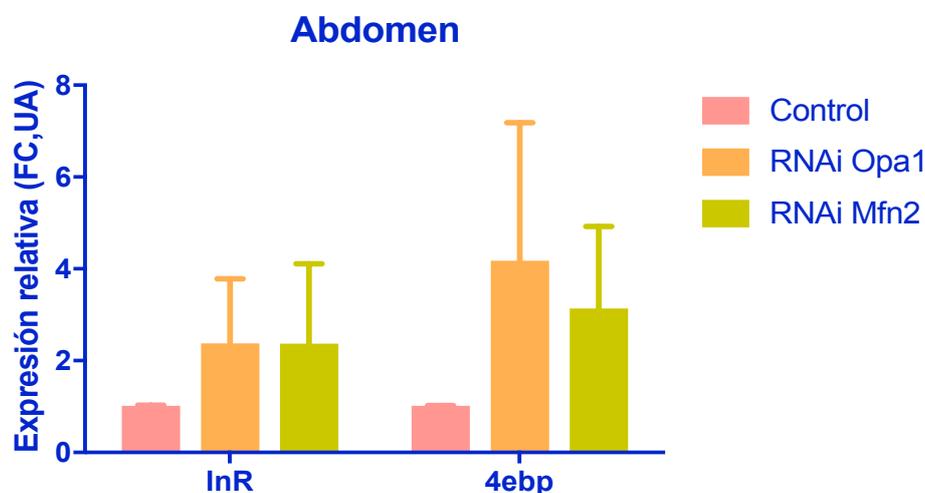
La sobreexpresión de estos genes, por parte de ambos genotipos, en cabeza podría relacionarse con una represión de la actividad de la ruta de la insulina.



**Figura 6.** Expresión, en cabeza, de los genes *InR* y *4ebp* relacionados con la ruta de la insulina. La medida de la expresión relativa (Fold change en unidades arbitrarias) respecto al control de los genes *InR* y *4ebp* se realizó mediante la técnica PCRc. El método empleado para el cálculo de la expresión fue 2DDCt. Para el estudio estadístico se aplicó la prueba T de Student (\* valor  $p < 0,05$ , \*\* valor  $p < 0,01$ , \*\*\* valor  $p < 0,001$ ). N=3 (30 moscas por cada N). Se representa la media de los niveles de transcrito con su respectivo error estándar.

#### 4.2.3 Abdomen

En la Figura 7 se muestra el nivel de expresión del *InR* y *4ebp*, en abdomen, para los distintos genotipos. Existe una tendencia por parte de los dos genotipos experimentales a aumentar la expresión de estos genes. En el caso del *4ebp*, en ambos genotipos silenciados, la tendencia hacia la sobreexpresión parece ser más acusada. Se puede observar que en este tejido los resultados presentan una gran variabilidad, quizá debida a la gran diversidad de sistemas que se encuentran en este tejido.

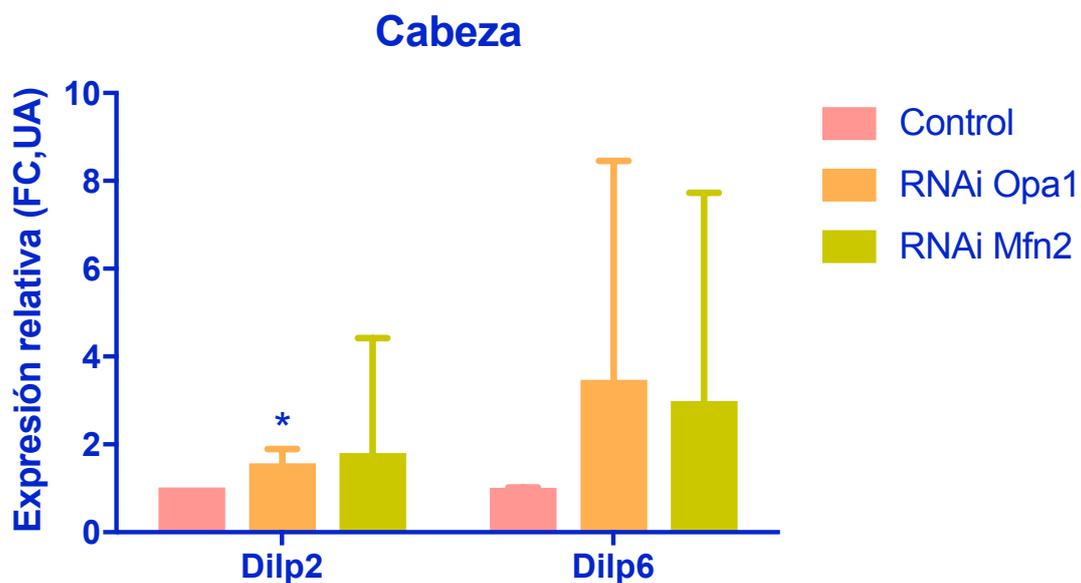


**Figura 7.** Expresión, en abdomen, de los genes *InR* y *4ebp* relacionados con la ruta de la insulina. La medida de la expresión relativa (Fold change en unidades arbitrarias) respecto al control de los genes *InR* y *4ebp* se realizó mediante la técnica PCRc. El método empleado para el cálculo de la expresión fue 2DDCt. Para la obtención del estudio estadístico se aplicó la prueba T de Student. N=3 (30 moscas por cada N). Se representa la media de los niveles de transcrito con su respectivo error estándar.

### 4.3 Expresión *Dilp2* y *Dilp6*

En la Figura 8 se muestra los resultados obtenidos al medir los niveles de expresión de los péptidos insulínicos (*Drosophila* insulin-like peptide) *Dilp2* y *Dilp6*, los cuales destacan por haberse relacionado con el envejecimiento. Se puede observar como el genotipo ARNi *Opa1* expresa, de manera significativa ( $p < 0,05$ ), el gen *Dilp2* un 57% más que el control. Además parece presentar cierta tendencia a aumentar la expresión de *Dilp6*. En el genotipo ARNi *Mfn2* se observan tendencias de sobreexpresión para ambos genes.

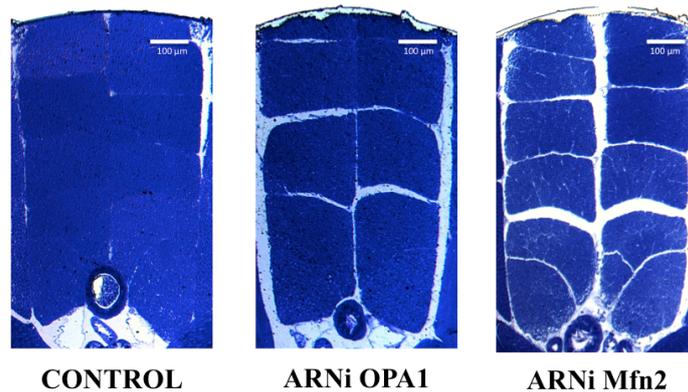
Por último hay que destacar la gran variabilidad observada entre los replicados experimentales quizá debida a la diversidad de sistemas existentes en este tejido.



**Figura 8.** Indicios de posibles alteraciones en la expresión de *Dilp2* y *Dilp6*. Análisis de la expresión relativa (Fold change en unidades arbitrarias) respecto al control de los genes *Dilp2* y *Dilp6* mediante la técnica PCRc. El método empleado para el cálculo de la expresión fue 2DDCt. Para el estudio estadístico se aplicó la prueba T de Student (\* valor  $p < 0,05$ , \*\* valor  $p < 0,01$ , \*\*\* valor  $p < 0,001$ ). N=3 (30 moscas por cada N). Se representa la media de los niveles de transcrito con su respectivo error estándar.

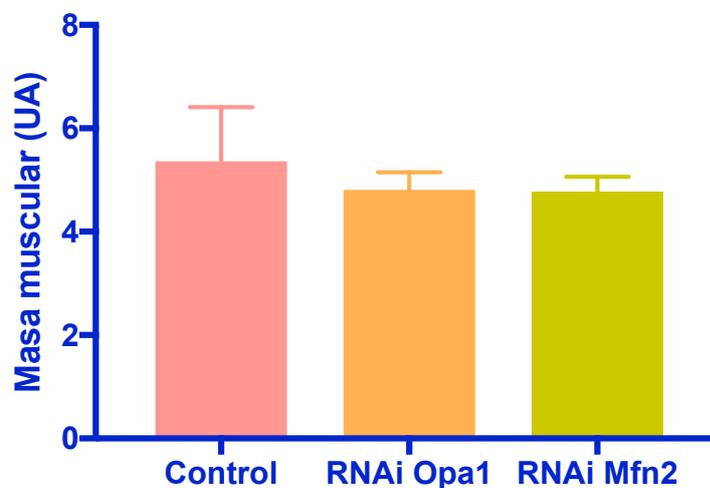
### 4.4 Estudios histológicos.

En la Figura 9, se muestran los resultados obtenidos en los estudios histológicos realizados en tórax. Este estudio se realizó en este tejido puesto que el silenciamiento se realizó en músculo. El tórax es el tejido más rico en músculo de los examinados por lo que se realizaron cortes transversales con el fin de observar los paquetes musculares en este tejido. Como se puede observar no hay grandes diferencias entre los tres genotipo, sin embargo se pudo apreciar una ligera reducción aparente del músculo en los tejidos experimentales. El genotipo control presenta paquetes musculares más engrosados, existiendo así menos espacio entre ellos. Los genotipos silenciados muestran paquetes musculares más reducidos y por tanto más separación entre ellos, siendo estas características más notables en el genotipo ARNi *Mfn2*.



**Figura 9.** Estudios histológicos de los tres genotipos experimentales. Fotografías tomadas con microscopía electrónica de transmisión (Tecnai G<sup>2</sup> 20, FEI Company; Hillsboro, Oregon, EEUU) de los cortes transversales de tórax. Barra de escala: 100µm.

Para comprobar las diferencias entre los genotipos de una manera más exacta se cuantificaron los paquetes musculares. En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de los paquetes musculares en tórax. Como se puede observar no hay diferencias significativas en la masa muscular aunque sí cierta tendencia, por parte de los genotipos experimentales, a reducirse.



**Figura 10.** Cuantificación de los estudios histológicos de los genotipos experimentales. El programa empleado para la cuantificación de los paquetes musculares fue ImageJ obteniendo como resultado la masa muscular de cada genotipo (UA: unidades arbitrarias). El estudio estadístico se desarrolló aplicando la prueba T de Student. Se representa la media de los niveles de transcrito con su respectivo error estándar.

## **5. DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha demostrado que la alteración de los niveles de expresión de *Mfn2* y *Opal* podría afectar a la ruta de la insulina. Además se ha verificado que mediante el sistema UAS-Gal4 el silenciamiento de los genes reguladores de la fusión mitocondrial en tejido muscular, ha resultado satisfactorio tal y como se muestra en los resultados obtenidos por medio de PCRc. Se observó que tanto el genotipo ARNi *Opal* como el genotipo ARNi *Mfn2*, tenían ambos genes silenciados, por lo que existe una gran dependencia de estas dos proteínas.

El silenciamiento se realizó en tejido muscular puesto que se ha visto estrechamente relacionado con el envejecimiento (Herndon et al., 2002). El músculo influye de manera acusada en la homeostasis del organismo, así como en la locomoción (González, 2015). Además se trata de un reservorio de aminoácidos que sostiene la síntesis de proteínas en otros tejidos (Beramendi et al., 2007). Los genotipos con el silenciamiento de estas proteínas en músculo, mostraron resultados diferentes según el tejido estudiado (cabeza, tórax y abdomen) al analizar el nivel de expresión de ciertos genes involucrados en la ruta de señalización de la insulina. En los resultados obtenidos en tórax se observa un silenciamiento por parte de los genotipos experimentales de los genes *4ebp* e *InR* (implicados en la IIS), lo que se traduciría como un aumento de la actividad de la IIS. Sin embargo, el nivel de expresión de estos genes tanto en cabeza como en abdomen, se muestran, por parte de los genotipos experimentales, sobreexpresados lo que se interpreta como una represión de la IIS. En cuanto a los *Dilps*, se midieron en cabeza ya que *Drosophila* posee células neuroendocrinas que secretan estos péptidos. Tanto *Dilp6* como *Dilp2* parecen estar sobreexpresados en un intento de contrarrestar los efectos de la represión de la ruta.

Los genes silenciados participan en la dinámica mitocondrial, cuyo papel en la integridad celular es fundamental. La disrupción de la función mitocondrial desencadena en la desregulación de muchas cascadas de señalización que afectan tanto al metabolismo como a la bioenergética (Liu and Butow, 2006). Todo esto se ha relacionado estrechamente con el envejecimiento, ya que, la mitocondria es el orgánulo encargado de llevar a cabo la respiración celular y se ha observado como a edades avanzadas se produce desacoplamiento en la cadena de electrones, reduciéndose la producción de ATP, y por tanto ROS (Green et al., 2011). Además durante el envejecimiento tanto la biogénesis como la degradación de estos orgánulos es ineficiente. Numerosos estudios destacan la relación entre la dinámica mitocondrial y la IIS, afirmando que la reducción de la IIS resulta en un aumento de la esperanza de vida en ciertos modelos animales (Van Heemst, 2010; Owusu-Ansah et al., 2013; Bartke, 2008). Investigaciones anteriores han corroborado que el silenciamiento de *Opal* y *Mfn2* da lugar a una aumento de la esperanza de vida con respecto al genotipo control (González, 2015). Todo esto concuerda con los resultados obtenidos en cabeza y abdomen, y diverge de los obtenidos en tórax.

Se puede establecer una hipótesis en base a que el aumento de la vida media se deba a que el silenciamiento de *Opal* y *Mfn2* tenga un efecto similar a la mitohormesis dando lugar como respuesta compensatoria beneficiosa una deficiencia respiratoria (Haigis y Ankner, 2010). Esta disminución de la respiración resultaría en un descenso de ROS, puesto que la mayor parte de ROS se produce durante la respiración, (Cid-Castro et al., 2018; Murphy, 2009). Además se produce una bajada en la actividad de la IIS y por tanto una actividad óptima de la autofagia y

las sirtuinas (Dröge y Scypper, 2007). La autofagia juega un papel crucial en el mantenimiento de la integridad celular. Asimismo esa actividad óptima de las sirtuinas puede ser beneficiosa puesto que resulta en la deacetilación de PGC-1 $\alpha$  el cual desemboca en respuestas importantes como la producción de defensas antioxidantes mejoradas, mejora de la oxidación de ácidos grasos y biogénesis mitocondrial. Existen estudios que afirman que la sobreexpresión de PGC-1 $\alpha$  es suficiente para extender la esperanza de vida de *Drosophila* en asociación con la actividad mitocondrial mejorada (Rera et al., 2011).

Por otra parte la represión de la IIS resultaría en un aumento de la expresión de esos genes “protectores” debido a que la disminución de esta señalización frenaría la actividad de múltiples quinasas hasta llegar a AKT1, la cual no fosforilaría a FoXO y permanecería en el núcleo transcribiendo estos genes metabólicos de respuesta al estrés, genes relacionados con el metabolismo y que codifican péptidos antimicrobianos.

Se ha de destacar que la cabeza es rica principalmente en tejido nervioso y el abdomen en tejido adiposo y tracto digestivo. Quizá la gran variabilidad observada en abdomen se deba a los diferentes tejidos que alberga. Se puede teorizar con una posible comunicación intertisular ya que silenciando en un solo tejido se aprecian diferencias en otros. El tejido muscular manda señales, sobre la necesidad de reprimir la ruta de la insulina a los demás tejidos y por eso, tanto en cabeza como en abdomen sobreexpresan genes relacionados con la ruta de la insulina.

Los resultados obtenidos en los estudios histológicos muestran que no hay grandes cambios en la masa muscular de los genotipos experimentales con respecto al control, aunque sí es cierto que los genotipos con silenciamiento muestran un ligero estrechamiento de los paquetes musculares. A pesar de ser necesario mantener tanto la masa muscular como la fuerza para un rendimiento óptimo, (Goodpaster et al., 2006; Metter et al., 1999), en *Drosophila* el envejecimiento se refleja de manera más agresiva en la fuerza muscular (calidad muscular) que en la masa muscular (cantidad muscular). Lo que sugiere que masa muscular y fuerza se regulan independientemente. Estudios anteriores demuestran como los genotipos experimentales presentan capacidades locomotoras aumentadas. A lo largo del tiempo se observó como el genotipo control va disminuyendo la capacidad locomotora mientras que los genotipos experimentales a 60 días siguen manteniéndola de manera significativa (González, 2015). Por lo que esa pequeña disminución en la masa muscular no nos permite asegurar nada, si no solo corroborar la importancia de la fuerza muscular (González y Delbono, 2010).

La importancia de continuar investigando esta posible alteración en la ruta del insulina al silenciar determinados genes en músculo, así como relación con el envejecimiento y la comunicación intertisular existentes, es evidente. Sería necesario, por tanto, analizar más diversidad de genes implicados en la ruta de la insulina así como realizar medidas comparativas de ROS para observar si existen diferencias entre los genotipos experimentales y control.

## **6. CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer son las siguientes:

- Se ha podido validar el silenciamiento mediante PCRc en músculo de ambos genotipos experimentales obtenidos mediante el sistema UAS-Gal4.
- Queda demostrado mediante los resultados obtenidos por PCRc que el silenciamiento de los genes *Opal* y *Mfn2* produce alteraciones en la ruta de la insulina, siendo los cambios diferentes en los 3 tejidos:
  - En tórax existe un silenciamiento de los genes *InR* y *4ebp* para ambos genotipos experimentales.
  - En cabeza se ha determinado la existencia de sobreexpresión de los genes *InR* y *4ebp* para los genotipos experimentales.
  - En abdomen, sin embargo, se ha observado por parte de ambos genotipos experimentales una tendencia a la sobreexpresión de *InR* y *4ebp*.
  - Los *Dilps* medidos en cabeza presentan una tendencia a la sobreexpresión por parte de ambos genotipos.
- Los resultados obtenidos en la cuantificación y observación de los cortes histológicos de los paquetes musculares, en tórax, no manifiestan variaciones significativas al comparar los diferentes genotipos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

BAI, H., KANG, P. AND TATAR, M., 2012. Drosophila insulin-like peptide-6 (dilp6) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of Drosophila insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging cell*, 11(6), pp.978-985.

BARTKE, A., 2008. Insulin and aging. *Cell Cycle*, 7(21), pp.3338-3343.

BARZILAI, N., HUFFMAN, D.M., MUZUMDAR, R.H. AND BARTKE, A., 2012. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes*, 61(6), pp.1315-1322.

BERAMENDI, A., PERON, S., CASANOVA, G., REGGIANI, C. AND CANTERA, R., 2007. Neuromuscular junction in abdominal muscles of Drosophila melanogaster during adulthood and aging. *Journal of Comparative Neurology*, 501(4), pp.498-508.

BONIFERT, T., KARLE, K.N., TONAGEL, F., BATRA, M., WILHELM, C., THEURER, Y., SCHOENFELD, C., KLUBA, T., KAMENISCH, Y., CARELLI, V. AND WOLF, J., 2014. Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier. *Brain*, 137(8), pp.2164-2177.

BUCCI, C., BAKKE, O. AND PROGIDA, C., 2012. Charcot–Marie–Tooth disease and intracellular traffic. *Progress in neurobiology*, 99(3), pp.191-225.

CABREIRO, F., AU, C., LEUNG, K.Y., VERGARA-IRIGARAY, N., COCHEMÉ, H.M., NOORI, T., WEINKOVE, D., SCHUSTER, E., GREENE, N.D. AND GEMS, D., 2013. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell*, 153(1), pp.228-239.

CIARLO, L., VONA, R., MANGANELLI, V., GAMBARDELLA, L., RAGGI, C., MARCONI, M., MALORNI, W., SORICE, M., GAROFALO, T. AND MATARRESE, P., 2018. Recruitment of mitofusin 2 into “lipid rafts” drives mitochondria fusion induced by Mdivi-1. *Oncotarget*, 9(27), p.18869.

CID-CASTRO, C., HERNÁNDEZ-ESPINOSA, D.R. AND MORÁN, J., 2018. ROS as Regulators of Mitochondrial Dynamics in Neurons. *Cellular and molecular neurobiology*, pp.1-13.

CIPOLAT, S., DE BRITO, O.M., DAL ZILIO, B. AND SCORRANO, L., 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), pp.15927-15932.

DALMASSO, G., ZAPATA, P.A.M., BRADY, N.R. AND HAMACHER-BRADY, A., 2017. Agent-based modeling of mitochondria links sub-cellular dynamics to cellular homeostasis and heterogeneity. *PloS one*, 12(1), p.e0168198.

DEMONTIS, F. AND PERRIMON, N., 2010. FOXO/4E-BP signaling in Drosophila muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell*, 143(5), pp.813-825.

DEMONTIS, F., PICCIRILLO, R., GOLDBERG, A.L. AND PERRIMON, N., 2013. The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan. *Aging cell*, 12(6), pp.943-949.

DEMONTIS, F., PICCIRILLO, R., GOLDBERG, A.L. AND PERRIMON, N., 2013. Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. *Disease models & mechanisms*, 6(6), pp.1339-1352.

DOONAN, R., MCELWEE, J.J., MATTHIJSENS, F., WALKER, G.A., HOUTHOOFD, K., BACK, P., MATSCHESKI, A., VANFLETEREN, J.R. AND GEMS, D., 2008. Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development*, 22(23), pp.3236-3241.

DORN, G.W., 2015. Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. *EMBO molecular medicine*, 7(7), pp.865-877.

DRÖGE, W. AND SCHIPPER, H.M., 2007. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging cell*, 6(3), pp.361-370.

DURIEUX, J., WOLFF, S. AND DILLIN, A., 2011. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell*, 144(1), pp.79-91.

ELMADHUN, N.Y., LASSALETTA, A.D., BURGESS, T., SABE, A.A. AND SELLKE, F.W., 2013. Alcohol consumption improves insulin signaling in the myocardium. *Surgery*, 154(2), pp.320-327.

FONTANA, L., PARTRIDGE, L. AND LONGO, V.D., 2010. Extending healthy life span—from yeast to humans. *science*, 328(5976), pp.321-326.

GARINIS, G.A., VAN DER HORST, G.T., VIJG, J. AND HOEIJMAKERS, J.H., 2008. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nature cell biology*, 10(11), p.1241.

GONZÁLEZ, E. AND DELBONO, O., 2001. Age-dependent fatigue in single intact fast-and slow fibers from mouse EDL and soleus skeletal muscles. *Mechanisms of ageing and development*, 122(10), pp.1019-1032.

GONZÁLEZ, A.T., 2015. Importancia de la dinámica mitocondrial en la degeneración neuromuscular: *drosophila melanogaster* como organismo modelo. (Doctoral dissertation). Universidad de Valencia, Valencia.

GOODPASTER, B.H., PARK, S.W., HARRIS, T.B., KRITCHEVSKY, S.B., NEVITT, M., SCHWARTZ, A.V., SIMONSICK, E.M., TYLAVSKY, F.A., VISSER, M. AND NEWMAN, A.B., 2006. The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 61(10), pp.1059-1064.

GREEN, D.R., GALLUZZI, L. AND KROEMER, G., 2011. Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), pp.1109-1112.

- HAIGIS, M.C. Y YANKNER, B.A., 2010. The aging stress response. *Molecular cell*, 40(2), pp.333-344.
- HALLIWELL, B. AND WHITEMAN, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, 142(2), pp.231-255.
- HARMAN, D., 1965. The free radical theory of aging: effect of age on serum copper levels. *Journal of gerontology*, 20(2), pp.151-153.
- HAWLEY, S.A., ROSS, F.A., CHEVTZOFF, C., GREEN, K.A., EVANS, A., FOGARTY, S., TOWLER, M.C., BROWN, L.J., OGUNBAYO, O.A., EVANS, A.M. AND HARDIE, D.G., 2010. Use of cells expressing  $\gamma$  subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell metabolism*, 11(6), pp.554-565.
- HEKIMI, S., LAPOINTE, J. AND WEN, Y., 2011. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in cell biology*, 21(10), pp.569-576.
- HERNDON, L.A., SCHMEISSNER, P.J., DUDARONEK, J.M., BROWN, P.A., LISTNER, K.M., SAKANO, Y., PAUPARD, M.C., HALL, D.H. AND DRISCOLL, M., 2002. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature*, 419(6909), p.808.
- HOM, J. AND SHEU, S.S., 2009. Morphological dynamics of mitochondria—a special emphasis on cardiac muscle cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46(6), pp.811-820.
- HOUTKOOPE, R.H., WILLIAMS, R.W. AND AUWERX, J., 2010. Metabolic networks of longevity. *Cell*, 142(1), pp.9-14.
- ITOH, K., NAKAMURA, K., IJIMA, M. AND SESAKI, H., 2013. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in cell biology*, 23(2), pp.64-71.
- JOHNSON, S.C., RABINOVITCH, P.S. AND KAEBERLEIN, M., 2013. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*, 493(7432), p.338.
- JORNAYVAZ, F.R. AND SHULMAN, G.I., 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in biochemistry*, 47, pp.69-84.
- KENYON, C., CHANG, J., GENSCH, E., RUDNER, A. AND TABTIANG, R., 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454), p.461.
- KENYON, C.J., 2010. The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), p.504.
- KLASS, M.R., 1983. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mechanisms of ageing and development*, 22(3-4), pp.279-286.
- LIU, Z. Y BUTOW, R.A., 2006. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu. Rev. Genet.*, 40, pp.159-185

LÓPEZ-OTÍN, C., BLASCO, M.A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M. AND KROEMER, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), pp.1194-1217.

MELÉNDEZ, A., TALLÓCZY, Z., SEAMAN, M., ESKELINEN, E.L., HALL, D.H. AND LEVINE, B., 2003. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*, 301(5638), pp.1387-1391.

METTER, E.J., LYNCH, N., CONWIT, R., LINDLE, R., TOBIN, J. AND HURLEY, B., 1999. Muscle quality and age: cross-sectional and longitudinal comparisons. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 54(5), pp.B207-B218.

MURPHY, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), pp.1-13.

OWUSU-ANSAH, E., SONG, W. AND PERRIMON, N., 2013. Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. *Cell*, 155(3), pp.699-712.

PRICE, N.L., GOMES, A.P., LING, A.J., DUARTE, F.V., MARTIN-MONTALVO, A., NORTH, B.J., AGARWAL, B., YE, L., RAMADORI, G., TEODORO, J.S. AND HUBBARD, B.P., 2012. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell metabolism*, 15(5), pp.675-690

RERA, M., BAHADORANI, S., CHO, J., KOEHLER, C.L., ULGHERAIT, M., HUR, J.H., ANSARI, W.S., LO JR, T., JONES, D.L. AND WALKER, D.W., 2011. Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell metabolism*, 14(5), pp.623-634.

TERMAN, A., KURZ, T., NAVRATIL, M., ARRIAGA, E.A. AND BRUNK, U.T., 2010. Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxidants & redox signaling*, 12(4), pp.503-535.

VAN HEEMST, D., 2010. Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging and disease*, 1(2), p.147.

VAN LAAR, V.S. AND BERMAN, S.B., 2009. Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 218(2), pp.247-256.

VAN REMMEN, H., IKENO, Y., HAMILTON, M., PAHLAVANI, M., WOLF, N., THORPE, S.R., ALDERSON, N.L., BAYNES, J.W., EPSTEIN, C.J., HUANG, T.T. AND NELSON, J., 2003. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiological genomics*, 16(1), pp.29-37.

WANG, K. Y KLIONSKY, D.J., 2011. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy*, 7(3), pp.297-300

YUN, J. AND FINKEL, T., 2014. Mitohormesis. *Cell metabolism*, 19(5), pp.757-766.

ZHAN, M., BROOKS, C., LIU, F., SUN, L. AND DONG, Z., 2013. Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. *Kidney international*, 83(4), pp.568-581.