



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Nuevo protocolo para el estudio de la fragilidad en un modelo de investigación básica: *Drosophila melanogaster*.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Martínez Fajardo, Cristian

Tutor/a: García Gimeno, María Adelaida

Director/a Experimental: GAMBINI BUCHON, JUAN

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

Índice

1 Introducción	5
1.1 Definición del concepto de fragilidad	5
1.2 Patogénesis de la fragilidad	6
1.3 Prevalencia de la fragilidad en la población	7
1.4 Test de fragilidad en humanos, establecimiento de un fenotipo	8
1.5 Envejecimiento y fragilidad en modelos animales	9
1.6 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelos de envejecimiento	10
2 Objetivos	12
3 Material y métodos	13
3.1 Materiales	13
3.2 Reactivos	13
3.3 Cepa, cultivo y mantenimiento	13
3.4 Selección y Obtención de individuos para experimentación	14
3.5 Determinación de la Curva de longevidad	14
3.6 Determinación de los criterios funcionales para test de fragilidad en <i>Drosophila melanogaster</i>	15
3.6.1 Actividad fototáctica	15
3.6.1.1 Método 1	15
3.6.1.1 Método 2	16
3.6.2 Actividad geotática	16
3.6.2.1 Método 1	16
3.6.2.2 Método 2	17
3.6.3 Determinación del fenotipo de fragilidad	17
3.6.4 Actividad copulatoria	18
3.7 Análisis estadístico de los resultados	18
4 Resultados	19
4.1 Curvas de longevidad	19

4.2 Comparación entre los dos métodos realizados	19
4.2.1 Comparación de la prueba de geotaxia	19
4.2.2 Comparación de la prueba de fototaxia.	21
4.3 Distribución de los diferentes grupos fenotípicos en un mismo punto de la curva de supervivencia	23
4.4 Evolución de cada grupo fenotipo a lo largo de la curva de longevidad	26
4.5 Resultados de actividad copulatoria	27
5 Discusión	29
5.1 Estudio Comparativo de las metodologías	29
5.2 Estudio de actividad geotáctica	30
5.3 Estudio de la actividad fototáctica	31
5.4 Estudio de la actividad copulatoria	31
6 Conclusiones	33
7 Referencias Bibliográficas	34

Resumen

La fragilidad según la definición aportada por Linda Fried es “un estado fisiológico caracterizado por un aumento de la vulnerabilidad a las agresiones externas, como resultado de una disminución o desregulación de las reservas fisiológicas de múltiples sistemas, lo cual origina dificultades para mantener la homeostasis”. Este estado termina afectando a la movilidad, el equilibrio, la fuerza muscular, la nutrición, al sistema cognitivo. Esta condición está íntimamente relacionada con la edad, y es un factor determinante en cuanto a nivel de calidad de vida, generando dependencia para el desarrollo de las actividades cotidianas. El empleo de modelos animales para el estudio de la fragilidad está actualmente en desarrollo en muchos proyectos. En este trabajo pretendemos desarrollar un método que nos permita estudiar la fragilidad en un modelo de investigación básica como es la mosca *Drosophila melanogaster*. Esto podría permitir estudiar tratamientos y obtener resultados a corto plazo, ya que la mosca tiene una vida media de 60 días. Para ello pretendemos correlacionar los criterios de Linda Fried con métodos de estudio relacionados con el envejecimiento de *Drosophila melanogaster*. Los parámetros estudiados en este trabajo fueron las actividades fototáctica y geotáctica y la actividad copulatoria. Entre los resultados obtenidos se observa una pérdida de la respuesta frente a los diferentes estímulos a lo largo de la vida. El estudio es verdaderamente prometedor para poder hacer diagnóstico de fragilidad en *Drosophila melanogaster*, ya que se observan diferencias fenotípicas entre individuos. Es decir unos individuos presentan un mejor envejecimiento, frente a otros que han perdido capacidad de respuesta. En trabajo se tiene una visión de la presencia de fragilidad en ciertos individuos, además de utilizar diferentes metodologías para determinar cuáles de ellos presentan un fenotipo de fragilidad.

Palabras clave: Fragilidad, envejecimiento, protocolo Linda Fried, *Drosophila melanogaster*, metodología.

Abstract

According to the definition provided by Linda Fried, frailty is "a physiological state characterized by an increased vulnerability to external aggressions, as a result of a decrease or dysregulation of the physiological reserves of multiple systems, which causes difficulties in maintaining homeostasis". This ends up affecting mobility, balance, muscle strength, nutrition, and the cognitive system. Frailty is closely related to age, and is a determining factor in terms of quality of life, generating dependency when performing daily activities. The use of animal models for the study of frailty is currently under development in many projects. In this work, we intend to develop a method that allows us to study frailty in a basic research model such as the *Drosophila melanogaster*. This could make it possible to study treatments and obtain short-term results since the fly has an average lifespan of 60 days. To do this, we correlate Linda Fried's criteria with study methods related to the aging of *Drosophila melanogaster*. The parameters studied in this work were phototactic, geotactic, and copulatory activity. Among the results obtained, a loss of response to different stimuli throughout life is observed. The study is truly promising for the diagnosis of frailty in *Drosophila melanogaster* since phenotypic differences between individuals are observed. In other words, some individuals present improved aging, compared to others who have lost the capacity to respond to external stimuli. In this work, we see the presence of frailty in certain individuals, in addition to using different methodologies to determine which of them present a frailty phenotype.

Key words: Frailty, aging, Linda Fried protocol, *Drosophila melanogaster*, methodology.

1 Introducción

1.1 Definición del concepto de fragilidad

El envejecimiento es un deterioro intrínseco y progresivo que culmina en la muerte del ser vivo. Como es sabido no todos los individuos presentan un mismo comportamiento frente al paso del tiempo, es decir unos sufren un envejecimiento más satisfactorio, frente a otros que presentan un peor estado funcional a una misma edad cronológica (Mitnitski et al., 2002).

Esto llevó a la aparición finalmente del término fragilidad en clínica, término que se empezó a utilizar alrededor de los años sesenta. La fragilidad se conoce como un estado, el cual es provocado por un deterioro funcional, que cuando tiene una progresión en el tiempo produce un aumento en la dependencia de las actividades cotidianas (Cena & Fuentes, 2010).

Como es de esperar el estado de fragilidad engloba muchos parámetros y es multifactorial, con lo que es muy complicado definir este término con una universalidad plena, bien es cierto que en los últimos años hay una creciente curiosidad por establecer una definición generalizada.

El término más empleado a día de hoy es el que aportó Linda Fried junto a otros investigadores, donde postuló la fragilidad como “un estado fisiológico que viene caracterizado por un incremento de la vulnerabilidad a los factores externos. Esta vulnerabilidad vendría provocada por una disminución de la funcionalidad sistémica, lo que en última instancia termina produciendo una mala homeostasis” (Fried et al., 2009).

Con esta determinación se hace posible tener una idea más clara del estado de un individuo, ya que como se ha mencionado antes la heterogeneidad de los grupos en cuanto a su edad cronológica es diversa.

Evidentemente numerosos autores han dado sus propias definiciones, completando así el gran mosaico que engloba toda la terminología relacionada con la fragilidad. Por ejemplo, Rockwood K. y Mitnitski A. la definieron como un estado originado por la pérdida multisistémica de la capacidad de reserva y adaptación de un organismo, manifestándose como un deterioro funcional (Rockwood & Mitnitski, 2007).

Cesari M. define la fragilidad como “un estado clínico donde se produce un aumento de la de la vulnerabilidad a desarrollar eventos negativos sobre la salud, donde se incluyen discapacidad, hospitalizaciones y muerte, cuando se expone a factores estresantes, tanto exógenos como endógenos” (Cesari et al., 2017).

Otros grupos de investigación consideran que la fragilidad aparece cuando un individuo, bajo condiciones estresantes, tiene una capacidad disminuida para llevar a cabo importantes actividades sociales practicadas en la vida diaria. Representa una forma de prediscapacidad y, como tal, debe distinguirse del deterioro funcional (Morley et al., 2006).

También se define la fragilidad conceptualmente como un estado clínicamente reconocible de los adultos ancianos con mayor vulnerabilidad. Viniendo dado como resultado de la disminución de la reserva fisiológica, así como de la función orgánica asociada a la edad, por lo

que la capacidad de respuesta frente a factores agudos se ve comprometida (Leng et al., 2014).

Todas las afirmaciones sobre fragilidad presentan una misma conclusión, definiéndola como un estadio multifactorial, dependiente de factores externos e internos, que producen deficiencias en el organismo, que en última instancia terminan provocando un incremento en el nivel de vulnerabilidad.

1.2 Patogénesis de la fragilidad

Es claro que el envejecimiento está íntimamente relacionado con la disfunción progresiva de los sistemas fisiológicos. La evolución fisiológica del organismo va a representar un papel importante en cuanto a la aparición y desarrollo de la fragilidad.

Como han mencionado algunos autores la fragilidad puede ser reconocida como un síndrome, que vendría determinado por numerosos factores como podrían ser de carácter endocrino, muscular o inmunológico (Walston et al., 2006; Clegg et al., 2013).

Se ha visto en adultos mayores una relación directa entre el padecimiento de fragilidad y los niveles circulantes elevados de interleucina (IL)-6, una citocina proinflamatoria. Esta elevación de (IL)-6 termina produciendo un aumento exacerbado de la respuesta del sistema inmunitario, así como del padecimiento del síndrome de inflamación crónica (Leng et al., 2002).

La importancia de la inflamación en la fragilidad se ve reforzada por la consistencia de los estudios realizados en diferentes modelos de fragilidad (Hubbard et al., 2008; Hubbard et al., 2009; Almeida et al., 2012; Puts et al., 2005), junto con informes sobre la importancia de la carga de la enfermedad inflamatoria crónica (Chang et al., 2009; Chang et al., 2012).

Dado que la fragilidad implica una desregulación fisiológica, es concebible que la inflamación crónica contribuya a la fragilidad a través de sus efectos perjudiciales sobre otros sistemas fisiológicos, como pueden ser el sistema musculo-esquelético y endocrino. (Fried et al., 2009).

La sarcopenia se define como la pérdida de masa y fuerza muscular, que se suele presentar después de los 50 años. Esta patología puede ser acelerada aún más por enfermedades crónicas y es un importante contribuyente a la discapacidad. Sus causas incluyen cambios relacionados con la edad en las neuronas motoras α , las fibras musculares tipo I, la atrofia muscular, la mala nutrición, la producción de la hormona del crecimiento (GH), los niveles de esteroides sexuales y la actividad física (Nascimento et al., 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, la inflamación crónica también contribuye de manera importante a la evolución de la sarcopenia. Dado que la debilidad y el rendimiento locomotor lento son características principales del síndrome de fragilidad, es probable que la sarcopenia sea un contribuyente fisiopatológico clave de la fragilidad.

También se han visto relaciones directas entre el padecimiento de osteoporosis y osteopenia con el desarrollo de la fragilidad (Sternberg et al., 2013).

En cuanto a nivel endocrino, la rápida disminución de estrógeno relacionada con la edad en mujeres posmenopáusicas y la disminución gradual de testosterona en hombres mayores conducen a una disminución de la masa muscular y por ende de la fuerza muscular (Puts et al., 2005).

Varias otras hormonas, incluidas el cortisol y la vitamina D, también se han asociado con el síndrome de fragilidad en grupos de edad avanzada. En conjunto, estos estudios sugieren el papel potencial de las desregulaciones del eje somatotropo GH-IGF-1, el eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal y otras hormonas en la aparición de la fragilidad (Shardell et al., 2009).

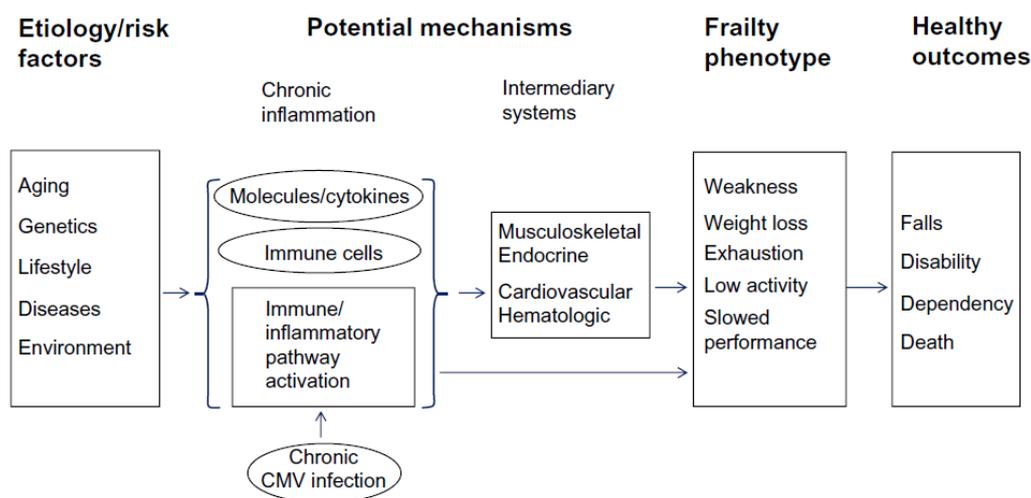


Figura 1. Patogénesis del síndrome de fragilidad: comprensión actual de los posibles mecanismos subyacentes y vías modales hipotéticas que conducen a la fragilidad. Imagen tomada de (Leng et al., 2014).

1.3 Prevalencia de la fragilidad en la población

En cuanto a la prevalencia de la fragilidad como síndrome es de esperar que esté relacionada con la edad, donde a mayor edad mayor prevalencia de fragilidad, también está influenciada por el sexo, ya que las mujeres presentan una mayor predisposición, así como que la fragilidad está íntimamente relacionada con el padecimiento de ciertas enfermedades de carácter crónico como se ha mencionado anteriormente (Carneiro et al., 2017).

La prevalencia en la población puede diferir dependiendo del método con el que se evalúe a los pacientes, teniendo en cuenta métodos más amplios podríamos hablar de una amplitud de entre el 4 y 60%, según un estudio realizado a 21 grupos experimentales (Collard et al., 2012).

Una revisión realizada por Shamliyan T. en 2013 afirma que la prevalencia aumenta con la edad como se puede observar en la siguiente tabla (Shamliyan et al., 2013).

Tabla 1. Porcentaje de prevalencia de fragilidad en la población humana.

Franja de edad (años)	Prevalencia
65 – 70	3 – 6 %
70- 80	5 – 12 %
80 – 85	16 %
Más de 85	26%

En esa misma revisión también se acentuó la prevalencia por géneros, en hombres de 65 a 70 años se observó una prevalencia en torno al 3%, mientras que en mujeres de la misma edad la prevalencia rondaba el 6%.

Respecto al origen étnico también se mostraron diferencias en cuanto a prevalencia de fragilidad se refiere, así pues en la población hispana presenta un 8 – 20 %, la caucásica un 6 – 12 % (Shamliyan et al., 2013).

1.4 Test de fragilidad en humanos, establecimiento de un fenotipo

Una vez estacionada la idea de fragilidad, otro horizonte abierto es la determinación de este estado dentro de la clínica, la necesidad de establecer un método para ser capaces de diagnosticar la presencia de fragilidad es importante. La definición de un fenotipo concreto se hace imprescindible para la categorización de los individuos.

En los trabajos realizados por Linda Fried en Estados Unidos, donde elaboraron un test funcional para determinar si los pacientes estaban dentro de un estado de fragilidad (Fried et al., 2001; Fried et al., 2009).

Entre los postulados que conforman las características que podrían definir un fenotipo de fragilidad se encuentran:

- Pérdida de peso involuntaria, en relación a al menos unos 4 kilos en el año anterior.
- Sentimiento de fatiga, agotamiento o poca resistencia ante ciertos esfuerzos, referido por el propio paciente.
- Velocidad de la marcha, cuando es un 20 % más baja que la media, este valor debe estandarizarse por sexo y altura.
- Bajo nivel de actividad física, referido al nivel de kcal por semana, cuando está un 20 % más bajo.
- Fuerza de agarre, se ajusta por sexo y el índice de masa corporal.

Empleando estas cinco características Linda Fried determinó que aquellas personas que no cumplían ninguno de estos criterios serían considerados como individuos robustos o no frágiles. Los pacientes que presentan entre 1 y 2 se les denominaron prefrágiles. Para establecer a un individuo como frágil es necesaria la presencia de al menos 3 de estos parámetros.

La facilidad de medición que aportan estos criterios es de gran importancia, ya que puedes obtener un diagnóstico en un corto periodo de tiempo, su sencillez y rapidez hacen que este test sea de los más empleados a nivel clínico y en investigación. Aun así no queda exento de crítica, ya que según algunos autores este método está muy centrado a nivel locomotor.

Como se ha mencionado la fragilidad no solo está determinada por factores musculares, hay además otros factores como cognitivos, es claro que la degradación del sistema neurológico que se produce con la edad está fuertemente relacionada con la fragilidad.

Algunos autores emplean otros métodos de diagnóstico con más pruebas, es el caso de los 70 ítems de Rockwood K., pero el propio autor ha señalado que las estimaciones de riesgo son

sólidas cuando se consideran un mínimo de 50 elementos, pero también se han explorado versiones más cortas (tan bajas como 20 elementos) (Lacas & Rockwood, 2012).

Los 70 elementos de la versión original del índice de fragilidad son demasiado laboriosos para administrarlos en el entorno clínico. Por este motivo Linda Fried acertó a la hora de desarrollar su test de fragilidad, ya que posee pocas características de evaluación. Este es un gran punto a favor porque minimiza la complejidad de obtención de resultados, además de simplificar la obtención del índice de fragilidad (Fried et al., 2001)

1.5 Envejecimiento y fragilidad en modelos animales

Todos los avances obtenidos en clínica en los últimos años en torno a la fragilidad, y con el establecimiento del modelo fenotípico de fragilidad dado por Linda Fried, así como del índice de fragilidad aportado por Rockwood K. generaron preguntas sobre cómo y porqué las personas se vuelven frágiles.

Para poder contestar a estas preguntas entran en juego los estudios en preclínica con animales como modelos de envejecimiento y fragilidad, estos modelos contribuyen en gran medida en la comprensión de la biología fisiológica del envejecimiento, y por ende de la fragilidad. Es cierto que establecer un buen modelo es de vital importancia, dependiendo de los objetivos principales del estudio y de la metodología a realizar.

Los modelos animales tienen numerosas ventajas, entre las que podemos destacar que algunos modelos son relativamente cercanos a la especie humana y el aumento del ratio de individuos de experimentación. Los modelos animales presentan por lo general un tiempo de vida mucho menor al humano, con lo que se pueden obtener diferentes parámetros de la evolución de la fragilidad con la edad.

Los estudios de la biología del envejecimiento han utilizado sistemas modelo de invertebrados para comprender las bases genéticas y moleculares del proceso de envejecimiento. Uno de los modelos más ampliamente utilizados para envejecimiento es *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Heinze-Milne et al., 2019).

Estudios realizados a *C. elegans* determinan la importancia del aparato locomotor en el envejecimiento y por ende en la aparición de la fragilidad, en esta especie es relativamente sencillo poder realizar estos estudios, además Glenn C. F. demostró que una pérdida de movimiento debida a la edad estaba relacionada con una disminución de la integridad del tejido muscular, y se sugirió que estos déficits se podrían atribuir a la fragilidad muscular (Glenn et al., 2004).

Los estudios en modelos de vertebrados se centran principalmente en mamíferos, sobretodo en ratón y rata, son muy populares por la versatilidad que tienen estas especies. Su ciclo de vida es relativamente corto, en torno a los 2 – 3 años, además de la facilidad para obtener individuos modificados genéticamente.

Aun son pocos los modelos animales de vertebrados en los que se está estudiando la fragilidad, según Heinze-Milne S. solo se han utilizado modelos animales de ratón, rata y perro para este tipo de estudios(Heinze-Milne et al., 2019).

La primera premisa a tener en cuenta cuando se pretende utilizar animales en un estudio de fragilidad es determinar el test que se empleará para diferenciar aquellos individuos frágiles de los no frágiles.

Como se ha mencionado anteriormente la sarcopenia es una afección directamente ligada a la aparición de la fragilidad, es por esta razón que el test aportado por Linda Fried es de los más utilizados para evaluar fragilidad en modelos animales.

Un estudio reciente para medir fragilidad empleando ratones como animal modelo utiliza el criterio de Linda Fried para determinar un fenotipo de fragilidad, este test fue modificado para lograr una correcta acomodación al modelo animal. El test en cuestión es denominado “test Valencia”.

Gómez-Cabrera M.C. adaptó el test de Linda Fried utilizando los mismos criterios que se tienen en cuenta en humanos (pérdida de peso no intencionada, resistencia, lentitud, debilidad y bajo nivel de actividad). Por lo tanto, se midió en ratones la pérdida de peso, el tiempo y la velocidad de carrera, la fuerza de agarre y la coordinación motora (Martinez De Toda et al., 2018).

Los resultados obtenidos fueron verdaderamente prometedores, y la utilización del test Valencia permite determinar que individuos presentan un fenotipo de fragilidad (Gomez-Cabrera et al., 2017).

Es cierto que la fragilidad en modelos animales es un tema muy novedoso porque hasta hace poco no se había considerado analizar la fragilidad en estudios de envejecimiento en animales, por lo tanto a día hoy no quedan muy claras las bases para estas intervenciones.

1.6 *Drosophila melanogaster* como modelos de envejecimiento

Drosophila melanogaster es un modelo de investigación por excelencia, fue Thomas Hunt Morgan, investigador encargado de introducir allá en 1909 el uso de *Drosophila melanogaster* en investigación genética, y desde ese momento esta especie continuó empleándose como organismo modelo en diferentes ámbitos científicos.

Entre las ventajas que ofrece su uso se destacan las siguientes:

- Su mantenimiento y cría es relativamente sencillo, además de su reducido coste.
- Presenta un ciclo de vida corto, en torno a los 60 – 80 días.
- La descendencia es numerosa, lo que permite obtener una gran cohorte en poco tiempo.
- Solo presenta cuatro pares de cromosomas.
- La posibilidad de realizar mutagénesis dirigida brinda la oportunidad de generar numerosos individuos mutantes.

Drosophila melanogaster es un insecto del orden díptera, perteneciente a la familia Drosophilidae. Su desarrollo incluye el paso por diferentes estadios larvarios, que culminarán en una fase de pupa, donde tendrá lugar una metamorfosis dando lugar a los individuos adultos. El ciclo vital se completa en unos 10 días a 25 °C y a un 60 % de humedad.

Tras la fecundación y después de un día de embriogénesis el huevo eclosiona, dando lugar a una larva de primer estadio. Transcurrido un día se produce una muda y la larva pasa a su segundo estadio, al día siguiente se generará otra muda y la larva entrará en el tercer estadio. Dos días después la larva se alejará de la fuente de alimentación y empezará a generar el pupario, entrando definitivamente en el estado de pupa.

Durante la fase de pupa tiene lugar una metamorfosis, este proceso tiene una duración entre 3 y 5 días, después de los cuales emergerá el imago. En el momento de abandonar la pupa el individuo adulto carece de la coloración característica, además de presentar las alas plegadas. Al cabo de unas 8 horas todos los individuos alcanzan la madurez sexual.

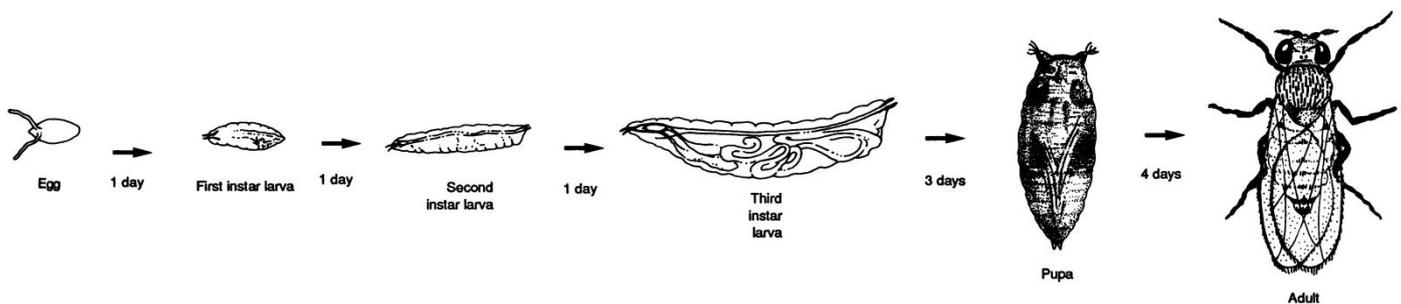


Figura 2. Diagrama del ciclo de vida de *Drosophila*. Se indica el lapso de tiempo aproximado de cada etapa de desarrollo. Imagen tomada de (Rubin, 1988).

Drosophila melanogaster se ha utilizado como organismo modelo para investigación sobre el envejecimiento durante más de 100 años. Con lo que se puede afirmar que se trata de un modelo de envejecimiento bien establecido.

Diferentes autores han centrado sus investigaciones en evaluar la evolución de diferentes parámetros del comportamiento de *Drosophila* a lo largo de la vida (Grotewiel et al., 2005).

Haciendo una revisión de las características estudiadas se pueden destacar la bajada de la habilidad de trepar por una pared, relativa a la geotaxis negativa, que empieza a ser evidente a partir de los 20 días de edad (Gargano et al., 2005).

La velocidad de reacción ante un estímulo luminoso, reconocido también como fototaxia positiva, decae también a partir de los 20 días de vida. (Le Bourg & Minois, 1999).

Estudios realizados sobre la fertilidad relacionada con el envejecimiento demuestran una bajada en las características generales, como puede ser en el caso de los machos una disminución de la cópula con la edad, además de una bajada en la fertilidad (Economos et al., 1979). En hembras también se ha estudiado la evolución de la cantidad de huevos depositados a lo largo de la vida de los individuos, así como la fertilidad, donde ambos parámetros decaen con la edad (David et al., 1975).

En el presente trabajo se estudiará la relación entre el papel que desempeña el envejecimiento en la actividad física de *Drosophila melanogaster*, así como su posible correlación que puede tener este proceso con el padecimiento de fragilidad.

2 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es crear una metodología usando como modelo la mosca *Drosophila melanogaster*, para el estudio de la fragilidad en humanos.

Los objetivos específicos son:

- Evaluar la actividad fototáctica en la mosca *Drosophila melanogaster* a lo largo de su vida, en los puntos 90, 70 y 50 % de supervivencia.
- Evaluar la actividad geotáctica en la mosca *Drosophila melanogaster* a lo largo de su vida (90, 70 y 50 % de supervivencia).
- Evaluar la actividad copulatoria en la mosca *Drosophila melanogaster* a lo largo de su vida (90, 70 y 50 % de supervivencia).
- Estudiar dos diferentes metodologías para la evaluación de la geotaxia y la fototaxia.
- Correlacionar los parámetros descritos en el test de fragilidad de Finda Fried realizado en humanos, con parámetros comportamentales de *Drosophila melanogaster*.
- Establecimiento de las características fenotípicas para diferenciar entre individuos a lo largo de su vida (frágil, prefrágil y robusto).

3 Material y métodos

3.1 Materiales

Incubador Radiber modelo AGP-570-HR; Microscopio óptico NIKON modelo SMZ-140 SERIES; Cilindros de vidrio (30 x 5 cm); Viales de experimentación de poliestireno (28,5 x 95 mm) casa genesee Scientific; Botellas cuadradas de expansión de polietileno (6 oz) casa genesee Scientific; Pincel de cerdas suaves y punta redondeada; Pinzas; Embudo; Bala de CO₂; Aparato anestésico de CO₂ casa genesee Scientific

3.2 Reactivos

Harina de maíz; Harina de trigo; Levadura Levital; Agar ash 2.0-4.5% Sigma – Aldrich; Parahidroxibenzoato de metilo (Nipagin) Sigma – Aldrich; Etanol base 96 % (v/v) Guinama; Ácido fosfórico 99 % Sigma – Aldrich; Ácido propiónico 99 % Acros Organics

3.3 Cepa, cultivo y mantenimiento

La cepa empleada para todos los experimentos es *Oregón R*, la colonia en cuestión fue donada por el Departamento de Genética de la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València.

Para el mantenimiento dentro del incubador los individuos se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con un fotoperíodo de luz/oscuridad (12/12h).

Drosophila melanogaster es una especie que en estado natural basa su alimentación en levaduras que son capaces de crecer y fermentar en frutas y hortalizas. Para mantener y proliferar la colonia dentro de un laboratorio se puede preparar una papilla a base de harinas de maíz y trigo, azúcar y levadura, utilizando el agar como agente espesante.

Para evitar la aparición de hongos que puedan deteriorar la comida de las moscas se le añade un antifúngico, normalmente nipagin, también denominado parahidroxibenzoato de metilo, así como un antibacteriano, en este caso ácido propiónico.

Para la elaboración de 1 litro de medio de cultivo seguiremos los pasos descritos a continuación:

1. Poner en un recipiente apto para cocina:

- 1000 mL de agua
- 6 g de agar
- 40 g de harina de maíz
- 40 g de harina de trigo
- 14,4 g de azúcar

2. Se homogeniza la mezcla y se lleva a ebullición durante al menos 5 minutos removiendo constantemente para evitar que la papilla se queme.

3. Añadir 46 g de levadura, para ayudar a su incorporación la diluiremos previamente en 100 ml de agua, se le añade a la mezcla anterior y se hierve durante otros 5 minutos más.

4. Una vez empieza a espesar retirar del fuego y dejar enfriar durante unos minutos, hasta que la mezcla esté a unos $50 - 60^{\circ}\text{C}$.

5. Seguidamente añadir al medio:

- 1,9 g de nipagín, para su completa disolución utilizar 15 mL de etanol.
- 5 mL de la mezcla de ácidos

Para la elaboración de un litro de la mezcla de ácidos se realiza mezclando los siguientes reactivos:

- 540,5 mL de agua
- 41,5 mL de ácido fosfórico al 85 %
- 418 mL de ácido propiónico.

6. Se mezcla todo bien para unificar todos los ingredientes. En este momento la papilla aún mantiene una fluidez que permite que pueda ser decantada en los distintos recipientes, tanto para el mantenimiento de la colonia como para los estudios de fragilidad.

3.4 Selección y obtención de individuos para experimentación

Primeramente se realiza el sexado de las moscas, *Drosophila melanogaster* es una especie dimórfica, entre las características principales que diferencian los dos sexos son que las hembras suelen presentar un tamaño mayor que los machos. La coloración del abdomen, en hembras es mayoritariamente de color claro y rayado, mientras que en machos el final del abdomen es oscuro. La presencia de cercos o peines sexuales es una característica única de los machos, son unas prolongaciones en forma de gancho que presentan en el primer par de patas, cuya principal función es agarrar a la hembra durante la cópula, las hembras carecen de este carácter fenotípico. La última diferencia sería la zona genital, los genitales externos masculinos son más grandes, y más oscuros que los genitales externos femeninos.

Para realizar el sexado se anestesian los individuos con CO₂, una vez dormidos con una lupa se observan detenidamente los caracteres descritos anteriormente y se procede a hacer la selección de los individuos deseados.

Para la obtención de nuevos individuos para el experimento, así como la expansión de la colonia se introducen 20 machos y 20 hembras en un frasco de cultivo (botella 250 mL) con papilla, se dejan durante tres días para que las hembras después de ser copuladas depositen los huevos en ella. De ahí saldrán las larvas que tras pasar por los diferentes estadios larvarios culminarán en una fase de pupa, donde tendrá lugar la metamorfosis, y finalmente se obtendrán los individuos adultos. Estos adultos recién nacidos son recogidos en un periodo de 24 horas después de la primera eclosión y tomados para el experimento de longevidad.

3.5 Determinación de la Curva de longevidad

Una vez obtenidos los individuos recién nacidos se duermen con CO₂ y se seleccionan los machos para la realización del experimento de la curva de longevidad.

Se colocaron 20 machos en botes de poliestireno transparentes (28,5 x 95 mm) especiales para la realización de curvas de longevidad y experimentación. Dependiendo de cada camada la cohorte de las curvas era más o menos numerosa, se recolectaban entre 80 y 200 individuos.

La comida fue cambiada tres veces a la semana, cada 2 ó 3 días, a la vez que se cambiaban los recipientes de comida se anotaba la cantidad de individuos muertos para cada una de las curvas.

Para la construcción de la curva, se contaron las moscas muertas cada dos días. Los datos de mortandad se introdujeron en una página “Excel”, en la cual se combinaron los porcentajes de supervivencia con los días de vida correspondientes.

3.6 Determinación de los criterios funcionales para test de fragilidad en *Drosophila melanogaster*

Para poder determinar que individuos presentan un fenotipo frágil lo primero es determinar la metodología de los test a realizar, fundamentándonos en los cinco postulados del test de fragilidad de Linda Fried se correlacionaron con diferentes comportamientos de *Drosophila melanogaster*, las correlaciones se pueden ver en la tabla 2.

Tabla 2. Correlación entre los criterios aportados por Linda Fried para el diagnóstico de la fragilidad y los criterios propuestos para la determinación de fragilidad en *Drosophila melanogaster*.

Criterios de Linda Fried	Criterios propuestos para <i>Drosophila melanogaster</i>
Velocidad de la marcha	Velocidad de movimiento
Nivel de actividad física	Fototaxia
Debilidad muscular	Geotaxia
Cansancio informado	Actividad copulatoria
Pérdida de peso involuntario	Ingesta de alimento

3.6.1 Actividad fototáctica

Drosophila melanogaster es una especie que se siente atracción por la luz, esto es traducido como un taxismo positivo. Este comportamiento ya fue descrito anteriormente por Markow T. A., donde se describió la atracción que sienten las moscas por el estímulo luminoso, y como tienden a situarse cerca del punto emisor de luz (Markow & Merriam, 1977).

Para la realización de este test se utilizaron los individuos de la curva de longevidad. La prueba se realizó en diferentes momentos a lo largo de la curva, al 90, 70 y 50 % de supervivencia, obteniendo así datos de edades diferentes.

Para favorecer el estudio se emplearon dos metodologías diferentes.

3.6.1.1 Método 1

El estudio se realizó con recipientes cilíndricos de vidrio (30 x 5 cm), donde las moscas eran depositadas, después se las sometía a un ligero golpe para bajar a todos los individuos, y dejamos el cilindro en posición horizontal, a su vez en uno de los extremos se encendía una lámpara. El cilindro fue dividido en tres horizontes, uno cada 10 cm, y trascurridos 30 segundos después del estímulo inicial se contaba la cantidad de moscas que había en cada región.

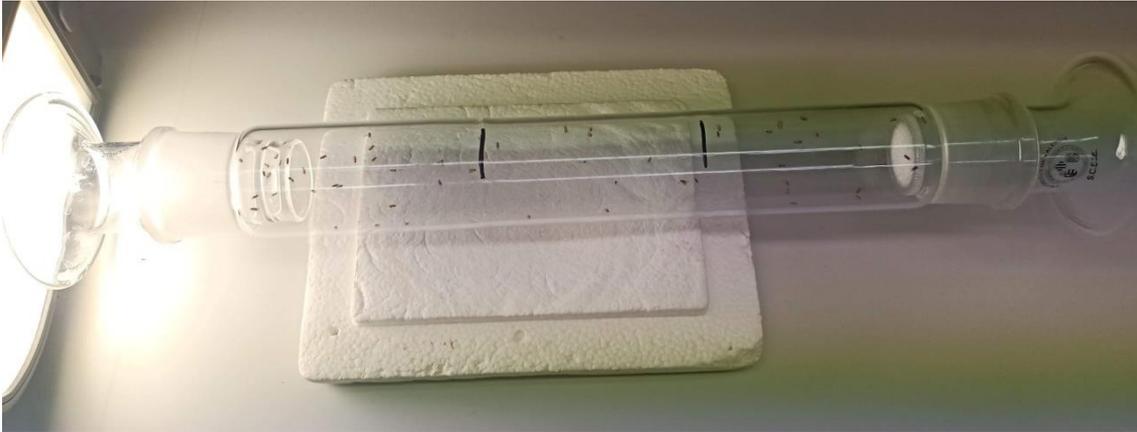


Figura 3. Prueba de fototaxia utilizando el cilindro de vidrio de 30 cm, en él se pueden apreciar las tres divisiones realizadas, así como múltiples individuos realizando la prueba, como se ha comentado este procedimiento sería conocido como método 1.

3.6.1.1 Método 2

La otra metodología empleada para realizar el test fue utilización de la misma técnica, pero utilizando botes de experimentación (28,5 x 95 mm), los mismos recipientes que se emplearon para la realización de la curva de longevidad, el criterio muy similar a la prueba anterior, diferenciamos tres regiones a lo largo de cada bote y el tiempo de duración de la prueba también era de 30 segundos, anotando después de este tiempo la cantidad de individuos en cada región.

Los resultados eran recogidos en una hoja de Excel para su posterior análisis estadístico.

3.6.2 Actividad geotática

Además de sentir atracción hacia la luz, *Drosophila melanogaster* tiene una geotaxia negativa, es decir se mueve en sentido contrario a la gravedad. Para este experimento también se utilizaron dos diferentes metodologías. Los individuos a estudiar fueron los mismos que realizaron la prueba para la actividad fototáctica.

Aplicando un método similar al descrito anteriormente por Gargano J., donde se estudiaba la geotaxia mediante la utilización de tubos y sometiendo a los individuos a un estímulo para que todos comenzaran la prueba desde un mismo punto. (Gargano et al., 2005)

Para el estudio de este comportamiento también se decidió realizar dos metodologías.

3.6.2.1 Método 1

Para este método se empleó el mismo recipiente de vidrio de 30 centímetros mencionado anteriormente en la prueba de fototaxia. En este tubo se depositaban las moscas y posteriormente se les administraba un pequeño golpe para que todas las moscas cayeran a la parte baja del cilindro. Una vez los individuos comenzaban a subir y transcurridos 30 segundos se anotaba la cantidad de moscas que había en cada una de las tres regiones u horizontes descritos para la prueba anterior.

3.6.2.2 Método 2

Siguiendo con la misma línea metodológica, el único parámetro que cambió entre el método 1 y el 2 fue el recipiente de experimentación, en este método se emplearon botes de 98 mm. La técnica de realización de la prueba fue la misma que se ha detallado anteriormente.

Los resultados obtenidos se recogieron en una hoja de Excel para su posterior estudio.

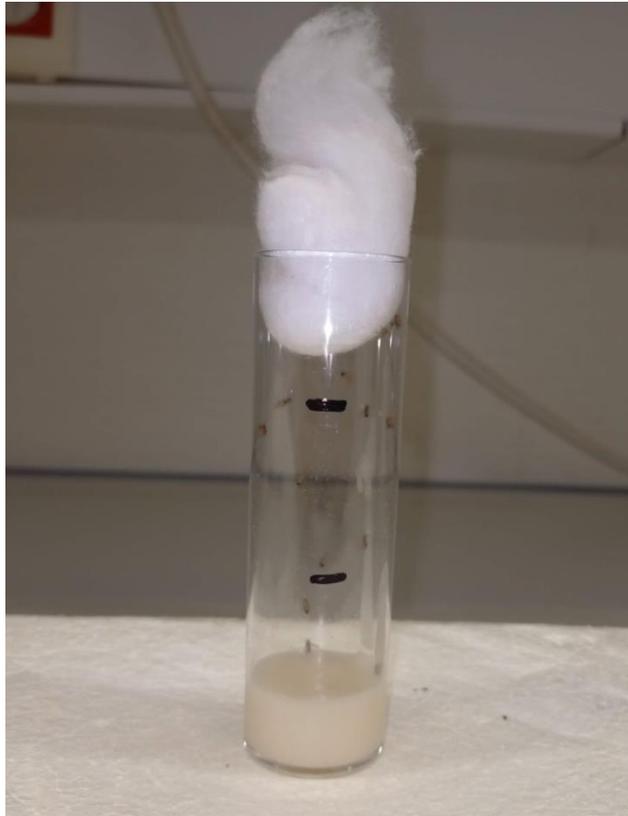


Figura 4. Prueba de geotaxia empleando tubos de experimentación de 98 mm, como se puede apreciar podemos distinguir los tres horizontes, además de ver diferentes individuos dentro del bote. Esta técnica se le asignó el nombre de método 2.

3.6.3 Determinación del fenotipo de fragilidad

Para determinar a qué grupo fenotípico pertenecía cada individuo, se le asignó un grupo a cada una de las regiones de los recipientes de experimentación, tanto en el método 1 como en el método 2.

En el caso de la geotaxia aquellos individuos que quedaron en el tercio más bajo del tubo fueron catalogados como frágiles, los individuos que se situaron en la región media se les denominó prefrágiles, y finalmente aquellos individuos que consiguieron llegar a la parte superior del tubo se le reconoció como robustos.

Siguiendo el mismo criterio para las pruebas de fototaxia, los individuos que se acercaban más a la fuente de iluminación se les denominó robustos, y los que no respondían frente a este estímulo, quedándose en la otra parte del tubo fueron llamados frágiles, en esta prueba de fototaxia también se diferenció otro grupo intermedio que serían prefrágiles.

3.6.4 Actividad copulatoria

La actividad de cópula fue contabilizada mediante el conteo del número de pupas, que fueron obtenidas después de la copulación.

Para la elaboración de este experimento se realizaron cruces con diferentes tipos de machos que podían ser diferenciados en cuanto a su estado de fragilidad. La selección de los machos se realizaba a partir de los resultados obtenidos en las pruebas de geotaxia y fototaxia. Una vez seleccionados los machos de interés se cruzaban en botes de experimentación (28,5 x 95mm) con tres hembras vírgenes.

Para obtener hembras vírgenes se hace una selección muy cuidadosa a partir de un frasco de expansión se seleccionan las hembras, éstas hembras tardan 8 horas a 25 °C en adquirir la madurez sexual, con lo que si las moscas son recogidas antes del transcurso de ese tiempo se asegura la obtención de hembras vírgenes. Esto es de vital importancia, ya que las hembras son capaces de almacenar esperma en la espermateca, y después producir huevos fecundados durante el resto de su vida fértil.

3.7 Análisis estadístico de los resultados

Para el tratamiento y análisis estadístico de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos, primeramente se obtuvo un análisis para determinar la desviación estándar de los resultados. Luego, el grupo de datos fue analizado por el test de la T de student. La hipótesis nula se aceptó para los diferentes resultados, en los cuales el valor de significancia para un p valor ≤ 0.05 . La simbología empleada en el presente trabajo es la siguiente: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

4 Resultados

4.1 Curvas de longevidad

Para determinar el tiempo de vida media de una especie se realizan curvas de longevidad, estas curvas resultan muy útiles a la hora de determinar en qué momento específico de la vida de los individuos se pueden realizar estudios o iniciar intervenciones.

En la figura 5 se puede apreciar la evolución de la población de *Drosophila melanogaster* a lo largo del tiempo, su vida media se sitúa en torno a los 57 días de vida. También se pueden observar los diferentes horizontes correspondientes al 90, 70 y 50 % de supervivencia.

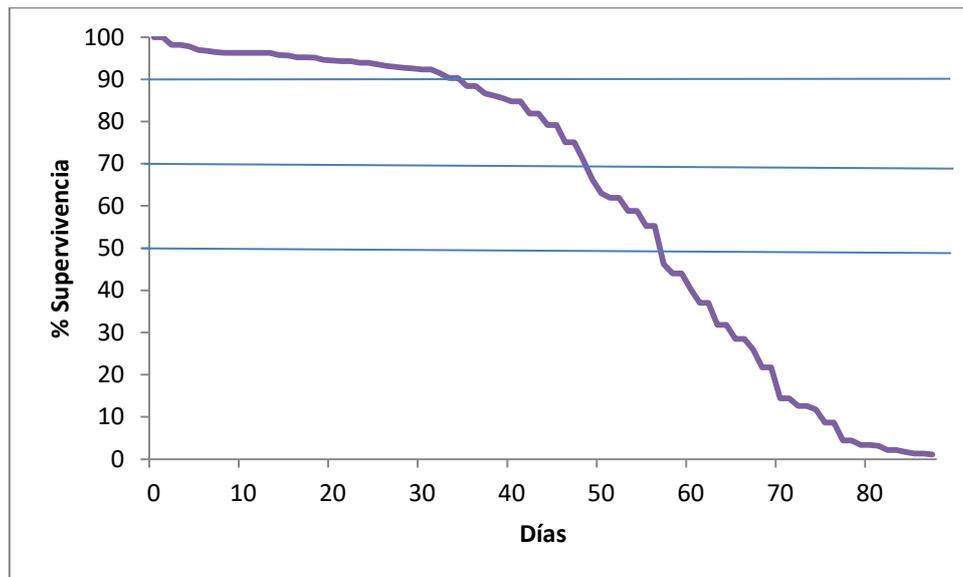


Figura 5. Curva de longevidad realizada para *Drosophila melanogaster*. La curva que se muestra es la media de 3 experimentos realizados.

4.2 Comparación entre los dos métodos realizados

En las diferentes pruebas llevadas a cabo, tanto para el test de geotaxia como para el de fototaxia, se emplearon los mismos individuos pero en diferentes puntos de la curva de longevidad. Se obtuvieron de esta manera resultados funcionales a un 90, 70 y 50 % de la curva de longevidad.

Para tener una visión más amplia se realizaron comparaciones entre los dos métodos empleados, descritos en el apartado anterior, para las diferentes pruebas comportamentales. Se realizó una prueba T student, para determinar si existían diferencias significativas entre ambos métodos.

4.2.1 Comparación de la prueba de geotaxia

Como se puede apreciar en la figura 6, el porcentaje de fragilidad a un 90 % de supervivencia, utilizando método 1 es de 9,8 %, mientras que empleando método 2 es de 2,2 %. Al 70 % de supervivencia con el método 1 se obtuvo un 76,1 % y con el otro método un 4 %. Para finalizar al 50 % de supervivencia se obtuvo un 100% de individuos frágiles con el método 1, con el otro el porcentaje de fragilidad se situó en un 33,5 %.

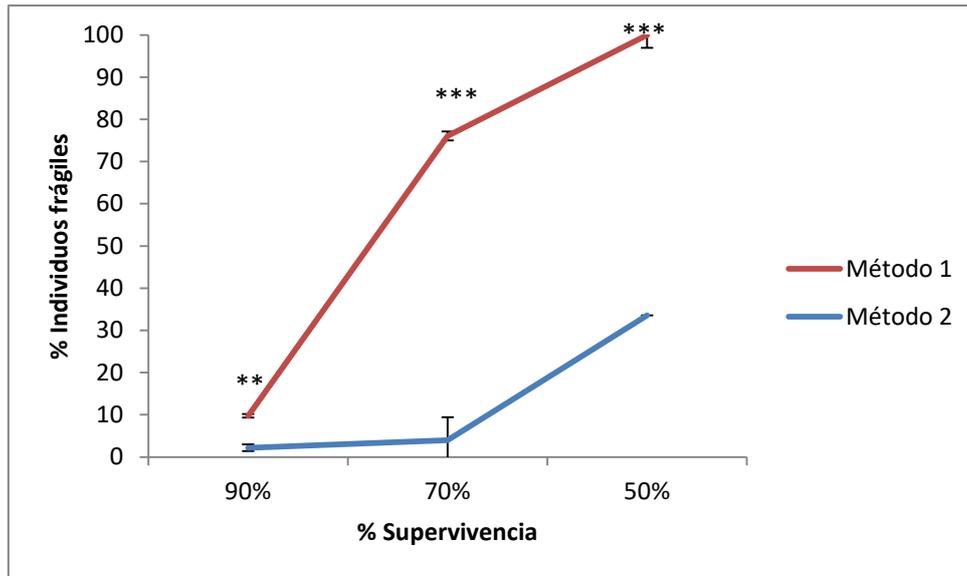


Figura 6. Comparación del porcentaje de individuos frágiles correspondiente al test de geotaxia empleando el método 1 y 2. Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística de las diferencias entre un método y otro se representa como * P-Valor<0.05; ** P-Valor<0.01 y *** P-Valor<0.001.

En la figura 7 se muestra la comparación entre los dos métodos de realización del test de geotaxia en individuos prefrágiles. Con un 90 % de supervivencia con el método 1 tenemos un 15,4 % de individuos prefrágiles, mientras que con el otro método la cifra es de 1,2 %. Al 70 % de supervivencia se obtuvieron un 15 % de individuos prefrágiles con el método 1 y un 9,1 % con el 2. Terminando con los dos últimos valores de referencia en cuando a la curva de supervivencia se obtuvieron un 0 % de individuos prefrágiles utilizando el método 1, mientras que empleando el otro método se observó un 14,3 % de individuos prefrágiles.

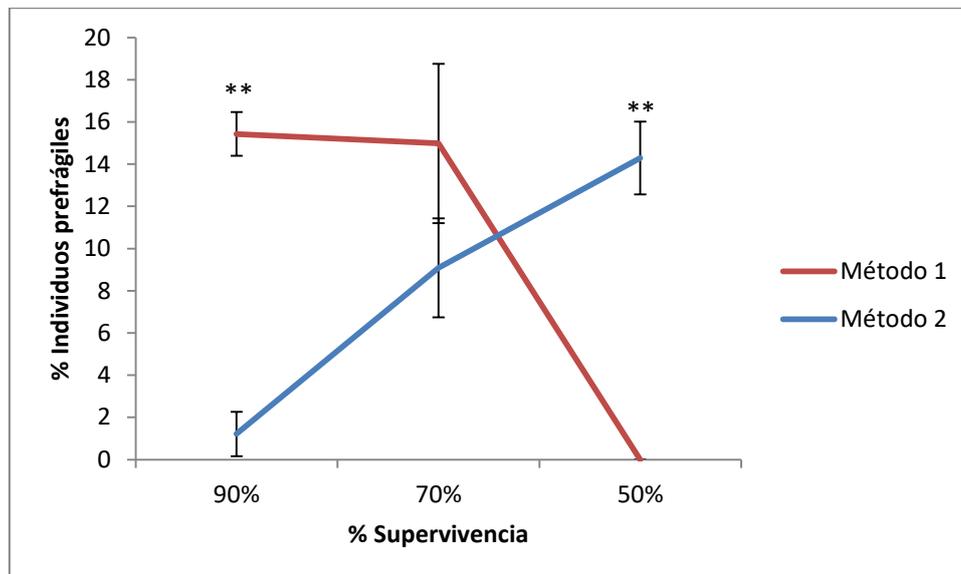


Figura 7. Comparación del porcentaje de individuos prefrágiles correspondiente al test de geotaxia empleando el método 1 y 2. Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística de las diferencias entre un método y otro se representa como * P-Valor<0.05; ** P-Valor<0.01 y *** P-Valor<0.001.

Para finalizar la comparativa de los test de geotaxia entre ambos métodos se puede observar en la figura 8 la distribución de los individuos robustos. Al 90 % con el método 1 se registró un 74 % de individuos robustos, mientras que con el otro método el porcentaje fue de 96,6. Continuando con la curva de longevidad al 70 % se obtuvieron un 9 % de individuos robustos con el método 1, el otro método el porcentaje se situó en un 86,9 %, para finalizar, al 50 % de supervivencia utilizando el método 1 no se registraron individuos robustos, por otro lado el uso del método 2 mostró un 52,2 % de individuos robustos.

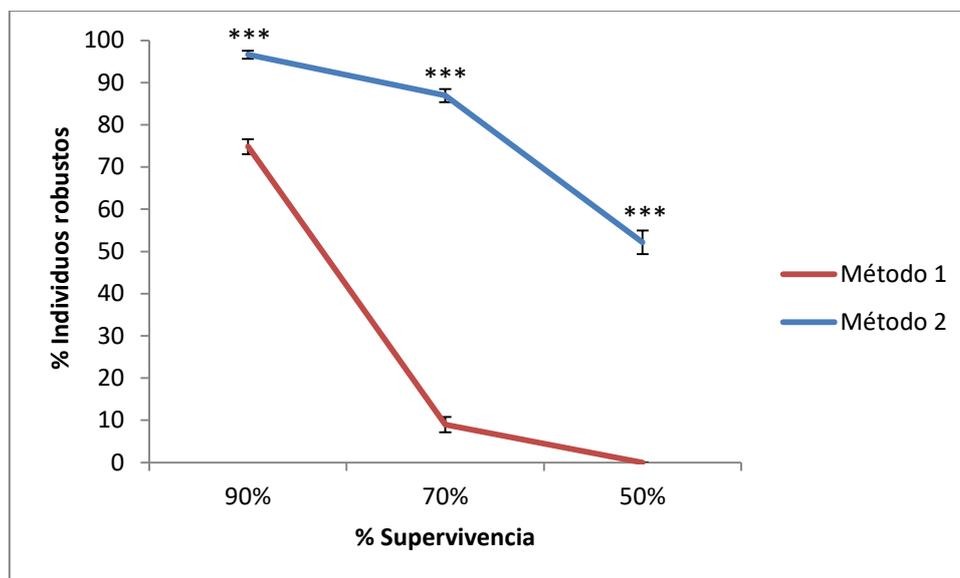


Figura 8. Comparación del porcentaje de individuos robustos correspondiente al test de geotaxia empleando el método 1 y 2. Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística de las diferencias entre un método y otro se representa como * P-Valor<0.05; ** P-Valor<0.01 y *** P-Valor<0.001.

4.2.2 Comparación de la prueba de fototaxia.

En la figura 9 se puede observar que al 90 % de supervivencia con el método 1 el porcentaje de individuos frágiles se sitúa en 11,5 %, por otro lado empleando el método 2 el porcentaje queda en 2,3 %. Con un 70 % de supervivencia el porcentaje de individuos frágiles es de 83,3 utilizando el método 1, mientras que con el otro método está en 8,9 %. Para terminar al 50 % de la curva de longevidad empleando el método 1 se obtuvieron un total del 100 % de individuos frágiles y empleando el otro método el porcentaje se situó en 33,6 %.

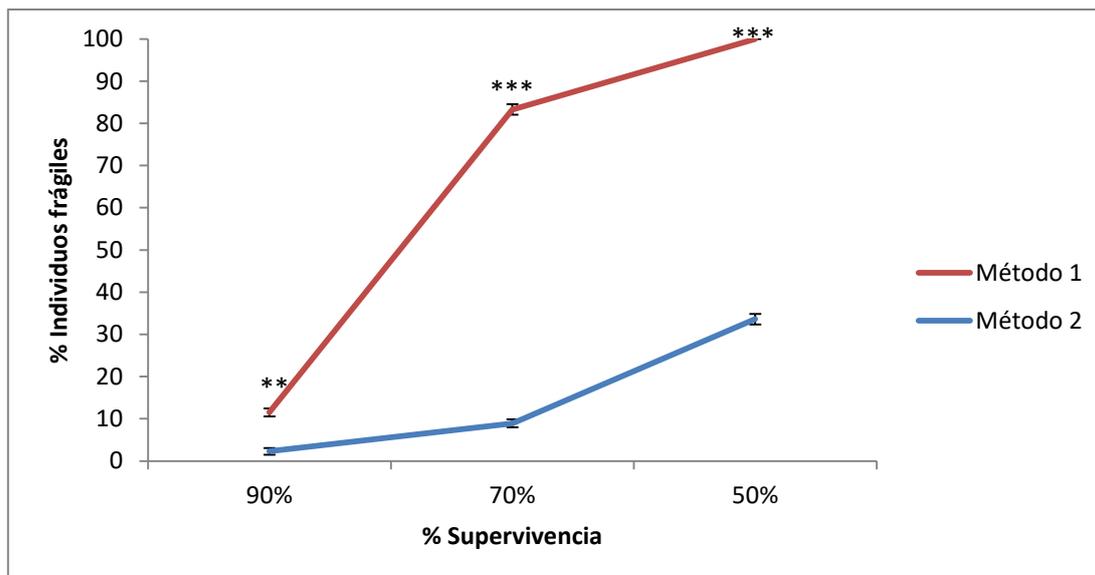


Figura 9. Comparación del porcentaje de individuos frágiles correspondiente al test de fototaxia empleando el método 1 y 2. Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística de las diferencias entre un método y otro se representa como * P-Valor<0.05; ** P-Valor<0.01 y *** P-Valor<0.001.

En cuanto a la comparación del porcentaje de individuos prefrágiles a lo largo de la curva de longevidad utilizando ambos métodos como se puede observar en la figura 10, al inicio de la curva de longevidad el porcentaje de individuos prefrágiles estaba en 13,5 %utilizando el método 1, con el otro método el valor fue del 5,9 %. Continuando con la curva al 70 % se obtuvo un 11,3 % para el método 1, mientras que el método 2 mostró un 12,2%. Para terminar al 50 % se obtuvo un 0 % de individuos con el método 1, y empleando el método 2 este porcentaje fue de 15,8.

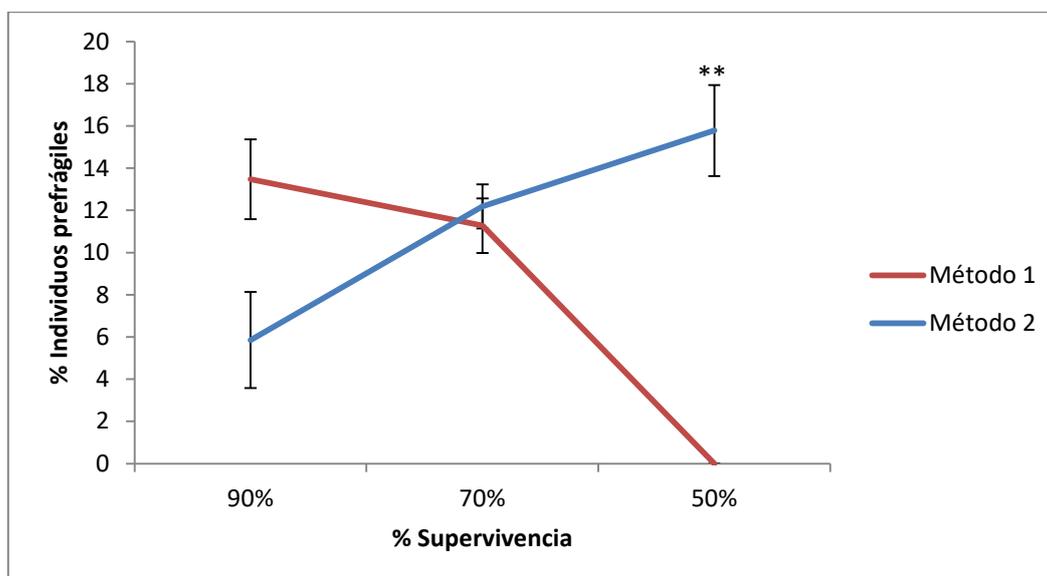


Figura 10. Comparación del porcentaje de individuos prefrágiles correspondiente al test de fototaxia empleando el método 1 y 2. Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística de las diferencias entre un método y otro se representa como * P-Valor<0.05; ** P-Valor<0.01 y *** P-Valor<0.001.

Finalizando con las comparaciones entre métodos relativas al test de fototaxia, en la figura 11 muestran la evolución del porcentaje de individuos con fenotipo robusto. Ante un 90 % de supervivencia y utilizando el método 1 había un 70 % de individuos robustos, utilizando el otro método el porcentaje se situó en 92 %. En el siguiente punto de la curva el método 1 obtuvo un 5,4 % de individuos robustos, y el método 2 un 79 %. Al 50 % de supervivencia con el método 1 no se registró ningún individuo robusto, mientras que con el otro método el porcentaje quedó en 50,6 %.

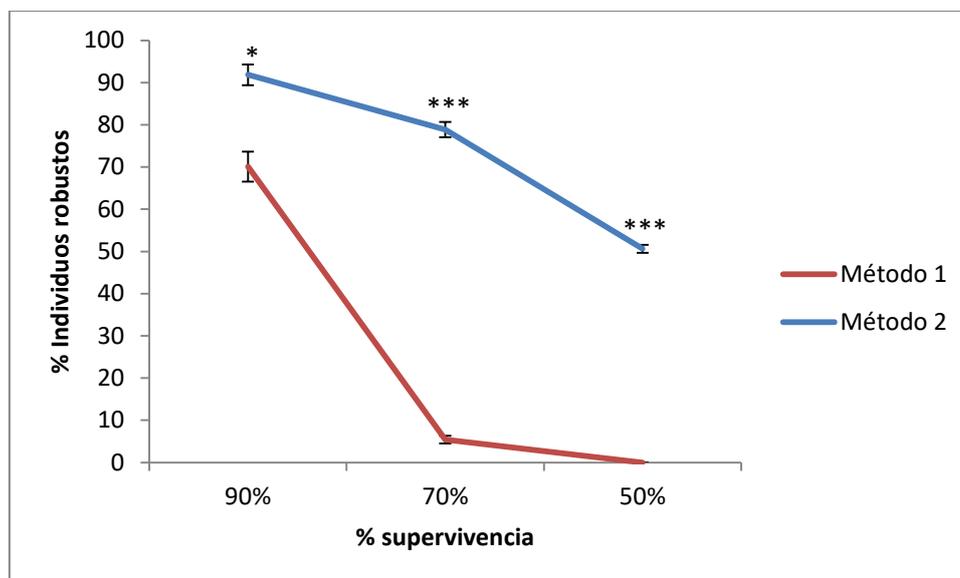


Figura 11. Comparación del porcentaje de individuos robustos correspondiente al test de fototaxia empleando el método 1 y 2. Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística de las diferencias entre un método y otro se representa como * P-Valor<0.05; ** P-Valor<0.01 y *** P-Valor<0.001.

4.3 Distribución de los diferentes grupos fenotípicos en un mismo punto de la curva de supervivencia.

Para una mejor observación global de los resultados obtenidos, se generaron gráficas para visualizar en cada prueba la distribución de cada fenotipo en un mismo punto de la curva de longevidad. También se realizó una prueba T student para demostrar diferencias entre grupos fenotípicos para un mismo punto dentro de la curva de longevidad.

Como se puede apreciar en la Figura 12 relativa a la prueba de Utilizando el método 1, a un 90 % de supervivencia encontramos un 9,8; 15,4 y 74,8 % de individuos frágiles, prefrágiles y robustos respectivamente. Al 70 % de supervivencia el porcentaje de individuos frágiles fue de 76 %, de prefrágiles un 15 % y de robustos un 9 %. Con un 50 % de supervivencia todos los individuos estudiados con este método fueron frágiles.

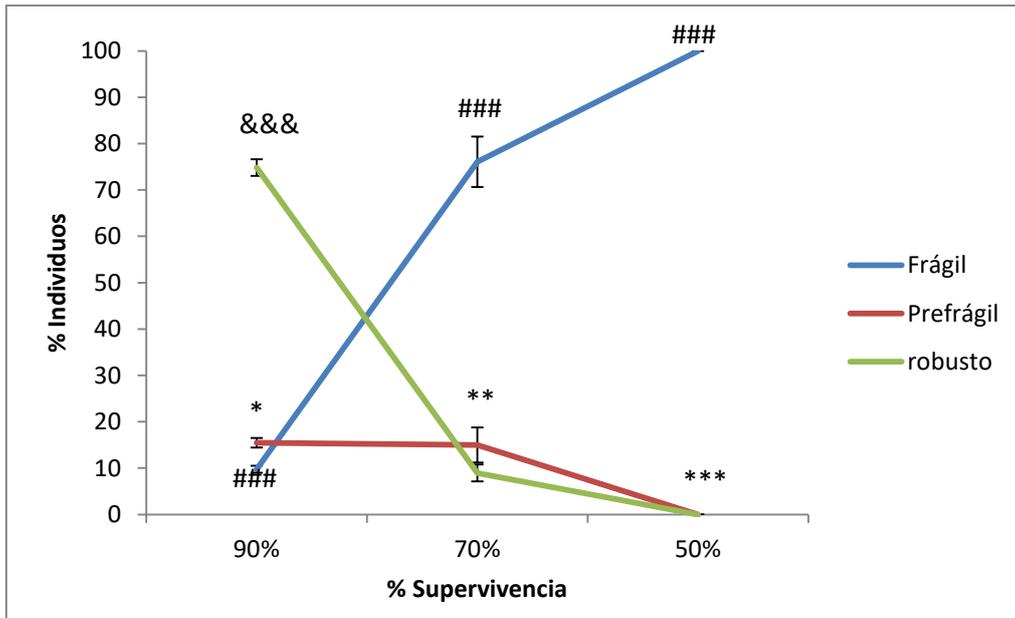


Figura 12. Distribución del porcentaje de individuos por grupo fenotípico a lo largo de la curva de longevidad, para la prueba de geotaxia realizada con el método 1. Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística se representa como * P-Valor<0.05; ** P-Valor<0.01 y *** P-Valor<0.001, para frágil vs prefrágil se empleó el símbolo *, para frágil vs robusto # y para prefrágil vs robusto &.

Para la prueba de fototaxia utilizando el método, se obtuvieron los siguientes resultados relativos a la figura 13, donde se puede observar que al inicio de la curva de longevidad los individuos frágiles tuvieron una representación del 11 %, un 14 % de prefrágiles, y finalmente un 75 % de robustos. Al 70 % de supervivencia, se detectó un 83 % de individuos frágiles, 11 % de prefrágiles y 6 % de robustos. En el último punto de la curva solo se registraron individuos frágiles.

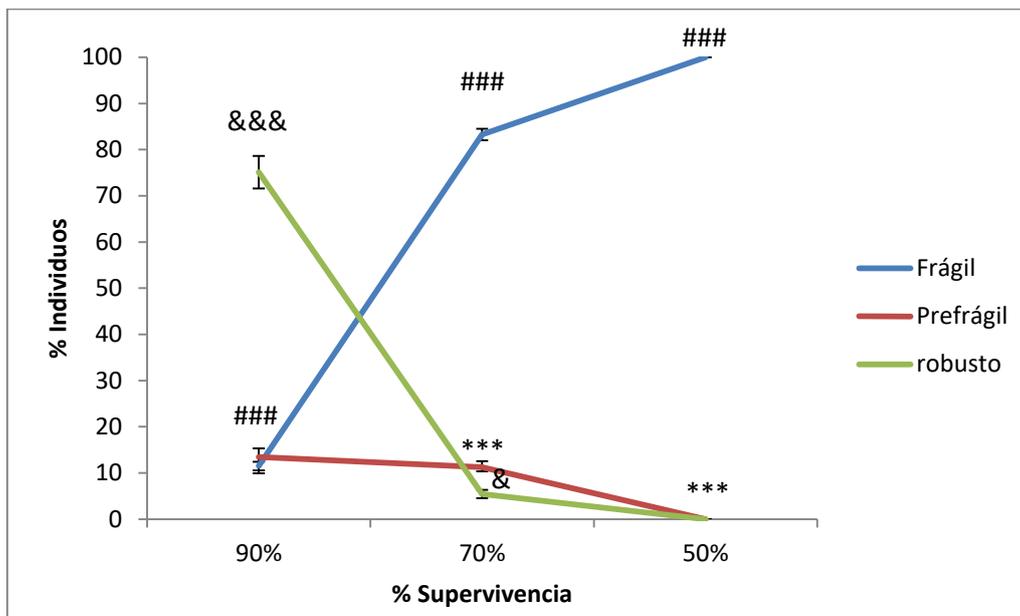


Figura 13. Distribución del porcentaje de individuos por grupo fenotípico a lo largo de la curva de longevidad, para la prueba de fototaxia realizada con el método 1. Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 3 experimentos realizados. La significación

estadística se representa como * P-Valor<0.05; ** P-Valor<0.01 y *** P-Valor<0.001, para frágil vs prefágil se empleó el símbolo *, para frágil vs robusto # y para prefágil vs robusto &.

En cuanto a la distribución que se obtuvo para la prueba de geotaxia empleando el método 2, en la figura 14 se puede observar que al 90 % de supervivencia el porcentaje de robustos es de 96,6 %, prefrágiles de 1,2 % y frágiles 2,2 %. A un 70 % de supervivencia se aprecia un 87 % de individuos robustos, 9 % de prefrágiles y en último lugar un 4 % de frágiles. Con respecto al último punto de la curva la distribución fue de 52,2 % de robustos, 33,5 de frágiles y 14,3 % de individuos prefrágiles.

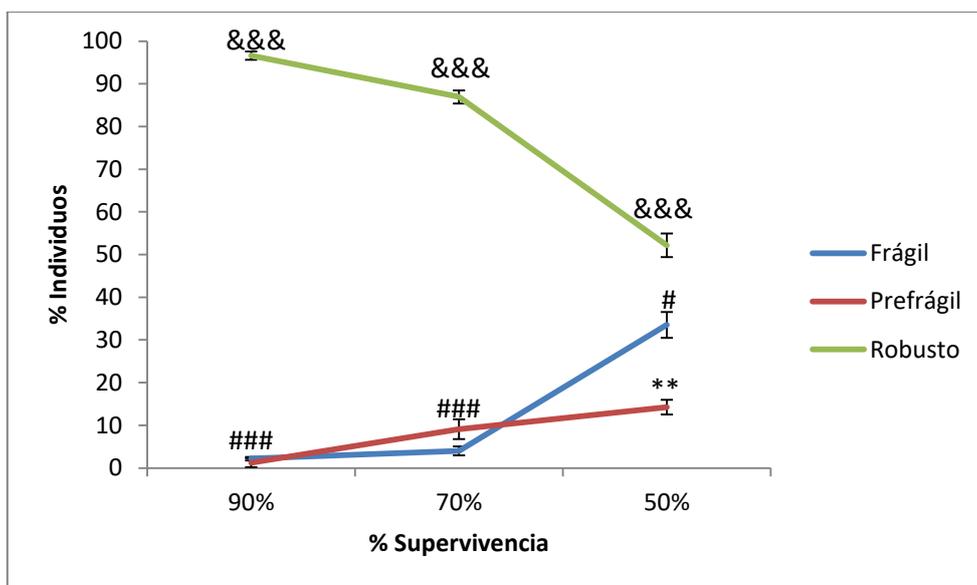


Figura 14. Distribución del porcentaje de individuos por grupo fenotípico a lo largo de la curva de longevidad, para la prueba de geotaxia realizada con el método 2. Los valores de los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística se representa como * P-Valor<0.05; ** P-Valor<0.01 y *** P-Valor<0.001, para frágil vs prefágil se empleó el símbolo *, para frágil vs robusto # y para prefágil vs robusto &.

Finalizando con los test funcionales la distribución obtenida para la prueba de fototaxia empleando el método 2 se puede ver en la figura 15, donde al 90 % de supervivencia tenemos un 92 % de individuos robustos, 6 % de prefrágiles y un 2 % de frágiles. Al 70 % se observan un 79, 12 y 9 % de individuos robustos, prefrágiles y frágiles respectivamente. Para terminar al 50 % de supervivencia se obtuvo un 50,6 % de individuos robustos, un 15,8 de prefrágiles y 33,6 % de frágiles.

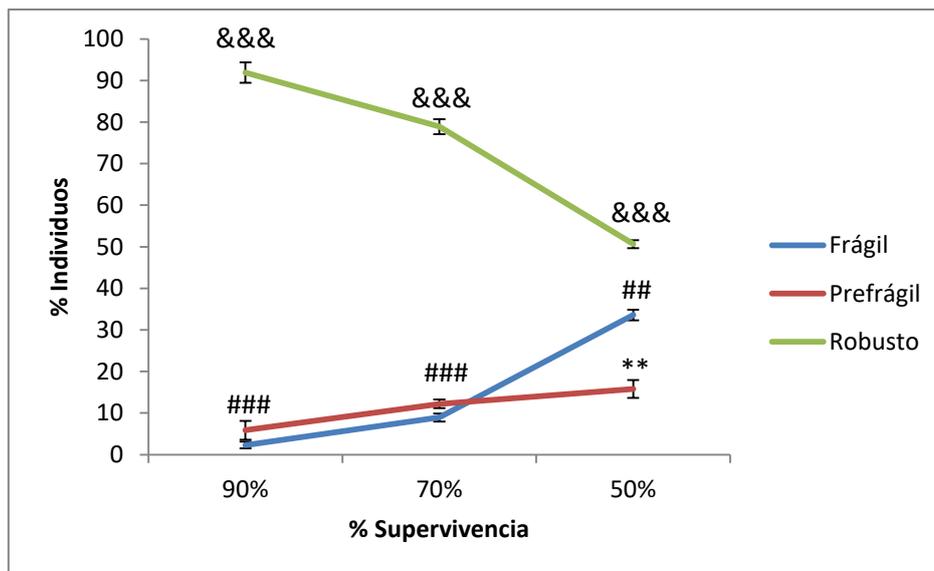


Figura 15. Distribución del porcentaje de individuos por grupo fenotípico a lo largo de la curva de longevidad, para la prueba de fototaxia realizada con el método 2. Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística se representa como * P-Valor<0.05; ** P-Valor<0.01 y *** P-Valor<0.001, para frágil vs prefágil se empleó el símbolo *, para frágil vs robusto # y para prefágil vs robusto &.

4.4 Evolución de cada grupo fenotipo a lo largo de la curva de longevidad

Para comprobar si había diferencias en la evolución de los diferentes grupos fenotípicos a lo largo de la curva de longevidad se realizaron pruebas T student.

Como se puede ver en la tabla 3, referente a la prueba de geotaxia, utilizando el método 1 el aumento de individuos frágiles mostró variaciones significativas. Los individuos robustos y prefraqueles también mostraron diferencias significativas, pero en este caso había una disminución poblacional de estos grupos fenotípicos.

Tabla 3. Resultados obtenidos en la prueba de geotaxia empleando el método 1. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. A su vez se señala la significación estadística de la prueba T para las diferencias entre el mismo grupo fenotípicos a diferentes tiempos de la curva, se representa como * P-Valor<0.05; ** como P-Valor<0.01 y *** como P-Valor<0.001.

Grupo fenotípico	90 %	SD	70 %	SD	50 %	SD	Prueba T 90-70 %	Prueba T 90 -50 %	Prueba T 70-50 %
Frágil	9,8 %	$\pm 0,7$	76,1 %	$\pm 5,4$	100,0 %	$\pm 0,0$	4,8E-04***	6,0E-08***	1,9E-02*
Prefrágil	15,4 %	$\pm 1,0$	15,0 %	$\pm 3,7$	0,0 %	$\pm 0,0$	9,3E-01	2,1E-04***	2,6E-02*
robusto	74,8 %	$\pm 1,7$	9,0 %	$\pm 1,8$	0,0 %	$\pm 0,0$	2,4E-05***	3,5E-06***	1,3E-02*

Para la prueba de fototaxia utilizando el método 1, también se observaron diferencias significativas en la evolución de cada grupo a lo largo de la duración de la curva de longevidad. En la tabla 4 se puede apreciar un aumento, que es significativo, de la cantidad de individuos frágiles. También se ve una disminución poblacional en los grupos de prefraqueles y robustos, donde el análisis estadístico confirma que la variación del número de individuos en ambos casos es significativa.

Tabla 4. Resultados obtenidos en la prueba de fototaxia empleando el método 1. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. A su vez se señala la significación estadística de la prueba T para las diferencias entre el mismo grupo fenotípicos a diferentes tiempos de la curva, se representa como * P-Valor<0.05; ** como P-Valor<0.01 y *** como P-Valor<0.001.

Grupo fenotípico	90 %	SD	70 %	SD	50 %	SD	Prueba T 90-70 %	Prueba T 90 -50 %	Prueba T 70-50 %
Frágil	11,5 %	$\pm 1,8$	83,3 %	$\pm 2,4$	100,0 %	$\pm 0,0$	2,3E-06***	1,4E-07***	2,9E-04***
Prefrágil	13,5 %	$\pm 3,7$	11,3 %	$\pm 2,5$	0,0 %	$\pm 0,0$	4,5E-01	3,9E-03**	2,0E-03**
robusto	75,1 %	$\pm 7,0$	5,4 %	$\pm 1,8$	0,0 %	$\pm 0,0$	1,0E-04***	7,0E-05***	9,6E-03**

En el caso de la evolución de la geotaxia con el método 2, como se puede ver en la tabla 5, entre el 90 y 70 % de supervivencia solo se detectaron variaciones significativas en el grupo de robustos. Entre los puntos 70 y 50 % el único grupo que no mostró variaciones significativas fue el de los individuos prefrágiles. Todos los grupos presentaron variaciones significativas entre el 90 y 50 % de supervivencia.

Tabla 5. Resultados obtenidos en la prueba de geotaxia empleando el método 2. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. A su vez se señala la significación estadística de la prueba T para las diferencias entre el mismo grupo fenotípicos a diferentes tiempos de la curva, se representa como * P-Valor<0.05; ** como P-Valor<0.01 y *** como P-Valor<0.001.

Grupo fenotípico	90 %	SD	70 %	SD	50 %	SD	Prueba T 90-70 %	Prueba T 90 -50 %	Prueba T 70-50 %
Frágil	2,2 %	$\pm 0,8$	4,0 %	$\pm 2,1$	33,5 %	$\pm 6,0$	2,4E-01	8,8E-04***	1,3E-03**
Prefrágil	1,2 %	$\pm 2,0$	9,1 %	$\pm 4,6$	14,3 %	$\pm 3,4$	5,6E-02	5,0E-03**	2,0E-01
Robusto	96,6 %	$\pm 1,9$	86,9 %	$\pm 3,1$	52,2 %	$\pm 5,5$	1,0E-02*	2,0E-04***	7,1E-04***

La prueba de fototaxia realizada con el método 2 demostró, como se aprecia en la tabla 6, que las variaciones en el número de individuos, tanto para el grupo de frágiles como el de robustas en todos los puntos de la curva de longevidad fueron significativas. En cambio no se mostraron diferencias significativas a lo largo de la curva con el número de individuos prefrágiles.

Tabla 6. Resultados obtenidos en la prueba de fototaxia empleando el método 2. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. A su vez se señala la significación estadística de la prueba T para las diferencias entre el mismo grupo fenotípicos a diferentes tiempos de la curva, se representa como * P-Valor<0.05; ** como P-Valor<0.01 y *** como P-Valor<0.001.

Grupo fenotípico	90 %	SD	70 %	SD	50 %	SD	Prueba T 90-70 %	Prueba T 90 -50 %	Prueba T 70-50 %
Frágil	2,3 %	$\pm 1,6$	8,9 %	$\pm 1,9$	33,6 %	$\pm 2,5$	2,0E-02*	1,2E-04***	3,8E-04***
Prefrágil	5,9 %	$\pm 4,5$	12,2 %	$\pm 2,0$	15,8 %	$\pm 4,3$	1,5E-01	8,9E-02	3,5E-01
Robusto	91,9 %	$\pm 4,9$	78,9 %	$\pm 3,6$	50,6 %	$\pm 1,9$	4,0E-02*	3,8E-04***	6,3E-04***

4.5 Resultados de actividad copulatoria

La evolución de la actividad copulatoria a lo largo de la vida fue otro parámetro que se estudió en este trabajo. Como con los test realizados con anterioridad se seleccionaron individuos de los tres puntos de la curva de longevidad.

En el momento en que los individuos se encontraban a un 90 % de supervivencia se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 16. Se puede observar que el número medio de pupas conseguidos de individuos frágiles es de 20, este número sube hasta 27 en el caso de los individuos prefrágiles y por último los individuos robustos quedaron con una media de 37

pupas por bote, como se aprecia en la figura 16 las diferencias, entre el número de pupas de individuos frágiles y robustos, fueron significativas.

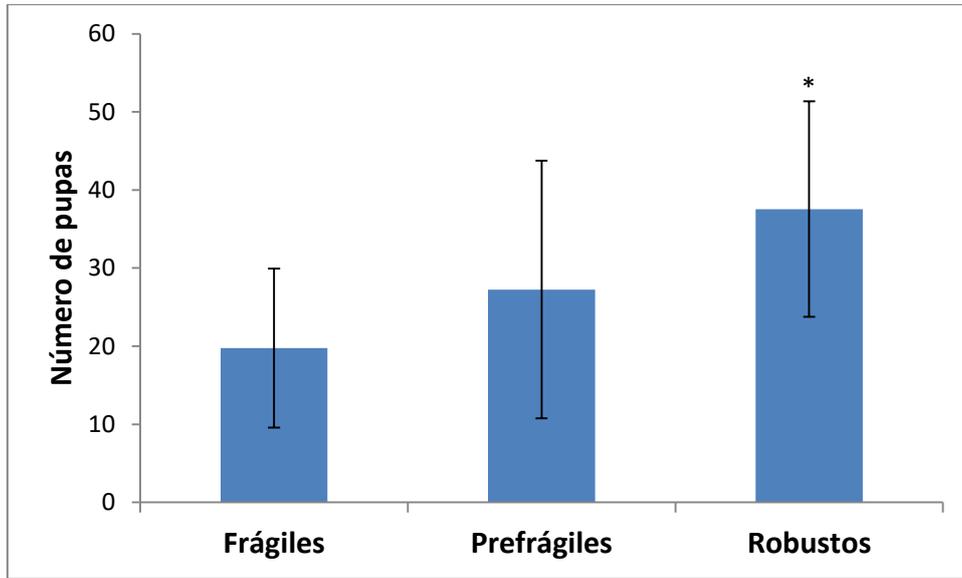


Figura 16. Media del número de pupas obtenido por bote, para un total de 8 experimentos por grupo fenotípico. Los valores de los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar. . La significación estadística se representa como * P-Valor<0.05, comparación frágiles vs robustos

Se realizaron el mismo número de experimentos para cada uno de los grupos fenotípicos para los diferentes puntos de la curva de longevidad, 70 y 50 %, a la hora de realizar el recuento de pupas en todos los viales de experimentación se observó que en ninguno de estos cruces se había obtenido descendencia, con lo que el número de pupas sería igual a cero.

5 Discusión

Los resultados que se presentan en este trabajo muestran el deterioro físico que sufre *Drosophila melanogaster* y la relación que tiene con la senescencia y su posible implicación con la aparición de la fragilidad.

Para poder controlar mejor la evolución del deterioro a lo largo de la vida, es imprescindible conocer la vida media de los individuos. En este trabajo se realizó una curva de longevidad (ver figura 5), para determinar el tiempo de vida medio de la especie *Drosophila melanogaster*, en nuestro caso este tiempo fue de unos 60 días de vida media aproximadamente. Comparando con otros autores que utilizaron la misma cepa *Oregon R* se puede observar que la tendencia de la curva presenta unos valores similares, como por ejemplo en el trabajo de longevidad realizado por Gambini J., donde empleaban esta cepa en concreto para estudiar longevidad y el alargamiento de la esperanza de vida en humanos y moscas (Gambini et al., 2021).

5.1 Estudio Comparativo de las metodologías

Las diferencias entre los métodos empleados se hacen verdaderamente notables, sobretodo en el momento final de la curva cuando la supervivencia se sitúa en torno al 50 %. Con el método 1, donde se empleó el tubo de vidrio de 30 cm se puede observar que las moscas que ya presentaban una cierta edad no eran capaces de completar satisfactoriamente este recorrido. No podíamos discernir entonces entre diferencias fenotípicas empleando este método, ya que todos los individuos que realizaban ambas pruebas, tanto la prueba de fototaxia como la de geotaxia eran catalogados como individuos frágiles.

Al no poder diferenciar a una cierta edad individuos por su estado físico se decidió cambiar de método, empleando la metodología de otros autores. Por ejemplo Gargano J. realizó un estudio sobre la evolución de la geotaxia negativa a lo largo del envejecimiento en *Drosophila melanogaster*. Este autor empleaba en sus experimentos botes de 9,5 cm, también Nichols C. D. estudió el comportamiento geotáctico de esta especie y emplearon tubos de un tamaño similar, 10 cm de altura (Gargano et al., 2005; Nichols et al., 2012).

Replanteando entonces el método se decidió realizar otra metodología y se emplearon tubos de 9,8 cm, como se puede ver en las diferentes figuras donde se comparan los dos métodos, la distribución de cada grupo fenotípico muestras diferencias significativas entre ambos métodos para ambas pruebas, se aprecian diferencias prácticamente en cualquier punto de la curva de supervivencia.

Sobre todo las diferencias son más acusadas cuando hablamos de los individuos que se encuentran a un 50 % de supervivencia. Cuando estas moscas son sometidas a estas pruebas, como hemos comentado con anterioridad empleando el método 1 todas ellas en este punto de la curva eran catalogadas como frágiles, pero al realizar el mismo estudio empleando el método 2 sí que se podían ver diferencias entre grupos fenotípicos. Por ejemplo, si nos fijamos en las figuras 6 y 9 en el método 2 los porcentajes de individuos frágiles en el caso de la actividad geotáctica se situaba en 33,5 %, y 33,6 % para la prueba de fototaxia. Solo con el cambio de método ya se visualiza una bajada de dos tercios en el porcentaje de individuos frágiles.

No solo se detectaron variaciones en el número de individuos que presentaban un fenotipo de fragilidad, si nos ceñimos a las características del método 2 el porcentaje de robustez se veía claramente favorecido. Como se puede ver en las figuras 8 y 11, con la utilización del método 1 no se apreciaban individuos robustos, en cambio con método dos se observó un 52 % de robustez en la prueba de geotaxia, y un 50,6 % de robustos en la prueba de fototaxia.

Empleando el método 2 el porcentaje de fragilidad se acerca mucho más a los datos de prevalencia en humanos, como se ha venido comentando anteriormente el ser humano a los 85 años de edad presenta una prevalencia de fragilidad del 26 % (Shamliyan et al., 2013), según este trabajo el porcentaje de fragilidad en *Drosophila* es mucho más elevado, puesto que hablamos de prácticamente el doble de prevalencia.

Por este motivo se puede determinar que la importancia de emplear un buen método es esencial para obtener unos resultados fiables. El primer método no era objetivo en etapas avanzadas de la vida de los individuos, ya que el esfuerzo requerido la superación de la prueba era excesivo. A causa de esto ninguno de los individuos conseguía completar el recorrido satisfactoriamente.

Por otro lado la utilización del 1º método es mejor en los primeros momentos de la curva de longevidad, ya que este método es capaz de realizar una mejor discriminación entre los diferentes grupos fenotípicos (frágiles, prefrágiles y robustos).

5.2 Estudio de actividad geotáctica

Intentando establecer similitudes con la especie humana también es remarcable que la gente que presenta una determinada edad no puedan ser capaces de realizar determinadas actividades, aquí radica la importancia de utilizar un buen método para el diagnóstico en este caso de la fragilidad.

En el caso de la especie humana es clara la pérdida de vigorosidad con la edad, como ya hemos mencionado la fragilidad se hace presente a medida que aumenta el envejecimiento. En *Drosophila* el envejecimiento y la pérdida de capacidades físicas es algo que está muy bien documentado, haciendo esta especie un buen modelo de senescencia.

En este trabajo se ha estudiado la evolución física de cada uno de los grupos fenotípicos a lo largo de la curva de longevidad. Como se pueden apreciar en la tabla 5, el porcentaje de individuos frágiles ante la prueba de geotaxia realizada con el método 2 sufre un aumento a lo largo del tiempo, pasa de 2,2 a un 33,5 %, como también se puede observar en la tabla esta variación resultaba significativa. En esta misma tabla también se puede apreciar el aumento de individuos catalogados como prefrágiles, pasando de 1,4 a 14,3 %. Continuando con la evolución de los individuos robustos se aprecia un descenso significativo del 96,6 a 52,2 %.

En el caso de la prueba de geotaxia utilizando el método 2 se aprecia una tendencia similar para los diferentes grupos. En el caso del porcentaje de fragilidad aumenta significativamente de un 2,3 a un 33,6 %. Ocurre lo mismo con los individuos prefrágiles, que aumentan su número de un 5,9 hasta un 15,8 %, cabe destacar que aunque se produce este aumento los estadísticos no mostraron evidencias de variaciones significativas. Para finalizar la evolución de los individuos robusto mostraba el efecto contrario, con el paso del tiempo disminuía en

número de especímenes robustos, bajando de 91,9 a 50,6 %, esta bajada de robustez sí que resultó significativa.

Como se viene comentando, el descenso en las actividades funcionales es un hecho contrastado, no solo en este trabajo sino también por numerosos autores que han estudiado diferentes comportamientos de *Drosophila melanogaster*.

En cuanto a estudios relativos a la actividad geotáctica, Miquel J. ya reseñó que a partir de los 20 días de vida los individuos comienzan a aumentar el tiempo en completar las pruebas referentes a geotaxia (Miquel et al., 1976). Por otro lado Gargano J. también estudió este comportamiento, en su estudio se afirma que a después de tres semanas de vida la mosca presenta una disminución en la capacidad de escalada (Gargano et al., 2005).

5.3 Estudio de la actividad fototáctica

Ya se comentó que la actividad fototáctica que presenta *Drosophila melanogaster* es otra de sus características principales y por esa razón se incluyeron pruebas referentes a este taxismo en este trabajo. Como es de esperar la respuesta que ofrece esta especie ante los estímulos luminosos también fue estudiada por diferentes investigadores. Destacamos el trabajo realizado por Leffelaar D. y Grigliatti T., donde afirmaron que a partir del día 35 se observa una disminución de la atracción por el estímulo lumínico (Leffelaar & Grigliatti, 1983).

En este trabajo se aprecian bajadas en la actividad fototáctica a lo largo de la vida, como se aprecia en la tabla 6 e l porcentaje de individuos frágiles aumenta considerablemente, sobre todo en el último periodo de la curva de longevidad. Una vez los individuos se encuentran al 50 % de supervivencia el valor de individuos frágiles aumenta hasta un 33,6 %, siendo este aumento significativo.

Como se ha mencionado anteriormente son numerosos los autores que han estudiado la evolución de los diferentes comportamientos de *Drosophila melanogaster*, como es el caso de Simon A. F., donde observo una disminución de la respuesta frente a la luz, además de la menor velocidad a la que reaccionan ante este estímulo (Simon et al., 2006).

5.4 Estudio de la actividad copulatoria

En este trabajo también se realizó un estudio referente a la actividad copulatoria, los resultados obtenidos referentes a estos experimentos quedan reflejados en la figura 16, donde se puede apreciar que el número medio de pupas obtenido de los cruces con machos frágiles era de 20. Para los cruces realizados con machos prefrágiles se obtuvieron una media de 27 pupas por frasco, mientras que con individuos robustos esta media subía hasta 37 pupas. Todos estos resultados mencionados fueron obtenidos de especímenes que se encontraban al 90 % de supervivencia dentro de la curva de longevidad.

En cuanto a los resultados obtenidos a los tiempos del 70 y 50 % de supervivencia, el estudio por esta parte quedó sesgado, ya que aun realizándose los cruces pertinentes no se obtuvo descendencia en ninguno de ellos. Por este hecho podríamos determinar que nuestra cepa de *Drosophila* pierde su fertilidad antes de situarse al 70 % de la curva, o a unos 50 días de vida.

Después de los correspondientes análisis estadísticos se puede confirmar, que existen diferencias significativas entre el número de pupas obtenido de cruces con machos frágiles y de los cruces realizados con machos robustos.

Así como los comportamientos y los estados referentes a la reproducción también fueron centro de estudio de diferentes autores. Entre ellos destacamos a Miquel J., en sus investigaciones remarcó un descenso en la copulación exitosa a lo largo de la vida de los individuos, teniendo este descenso el máximo efecto a los 100 días de vida (Miquel et al., 1976).

Otros autores como Economos A. C. centró sus estudios en el decrecimiento de la fertilidad en machos de *Drosophila*, llegando a visualizar que su máximo efecto podría en algunos individuos en los 90 días de vida, pero en este mismo estudio la fertilidad media se pierde alrededor de las 6 semanas (Economos et al., 1979). Si lo comparamos con los resultados obtenidos en este trabajo sería de esperar que no se obtenga descendencia en los cruces realizados para los individuos situados a un 70 y 50 % de supervivencia.

6 Conclusiones

La mosca *Drosophila melanogaster* podría ser utilizada como un modelo de investigación básica en el estudio de la fragilidad.

- La metodología 1 ha resultado satisfactoria para la selección de los individuos frágiles, prefrágiles y robustos a temprana edad. Sin embargo no fue óptima para su discriminación a partir del 70 % de supervivencia.
- La metodología 2 no fue óptima para la selección de individuos frágiles, prefrágiles y robustos hasta el 70 % de supervivencia. Sin embargo esta metodología fue más sensible para la diferenciación de individuos de edad avanzada.
- El deterioro asociado al envejecimiento que ocurre en *Drosophila melanogaster* se podría correlacionar con parámetros asociados a la fragilidad en humanos descritos por Linda Fried.

7 Referencias Bibliográficas

- Almeida, O. P., Norman, P. E., van Bockxmeer, F. M., Hankey, G. J., & Flicker, L. (2012). CRP polymorphism increases risk of frailty. *Maturitas*, 71(3), 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.11.022>
- Carneiro, J. A., Cardoso, R. R., Durães, M. S., Guedes, M. C. A., Santos, F. L., Costa, F. M. D., & Caldeira, A. P. (2017). Frailty in the elderly: prevalence and associated factors. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 70(4), 747–752. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2016-0633>
- Cena, D. P., & Fuentes, P. S. (2010). Limitación funcional en las personas mayores / Functional limitation in older people: Intervención Multidisciplinaria / Multidisciplinary Intervention. Editorial Dykinson, S.L.
- Cesari, M., Calvani, R., & Marzetti, E. (2017). Frailty in Older Persons. *Clinics in Geriatric Medicine*, 33(3), 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2017.02.002>
- Chang, S. S., Weiss, C. O., Xue, Q. L., & Fried, L. P. (2009). Patterns of Comorbid Inflammatory Diseases in Frail Older Women: The Women's Health and Aging Studies I and II. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 65A(4), 407–413. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp181>
- Chang, S. S., Weiss, C. O., Xue, Q. L., & Fried, L. P. (2012). Association between inflammatory-related disease burden and frailty: Results from the Women's Health and Aging Studies (WHAS) I and II. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 54(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2011.05.020>
- Clegg, A., Young, J., Iliffe, S., Rikkert, M. O., & Rockwood, K. (2013). Frailty in elderly people. *The Lancet*, 381(9868), 752–762. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)62167-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)62167-9)
- Collard, R. M., Boter, H., Schoevers, R. A., & Oude Voshaar, R. C. (2012). Prevalence of Frailty in Community-Dwelling Older Persons: A Systematic Review. *Journal of the American Geriatrics Society*, 60(8), 1487–1492. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2012.04054.x>
- Collerton, J., Martin-Ruiz, C., Davies, K., Hilkens, C. M., Isaacs, J., Kolenda, C., Parker, C., Dunn, M., Catt, M., Jagger, C., von Zglinicki, T., & Kirkwood, T. B. (2012). Frailty and the role of inflammation, immunosenescence and cellular ageing in the very old: Cross-sectional findings from the Newcastle 85+ Study. *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(6), 456–466. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.05.005>
- Economos, A. C., Miquel, J., Binnard, R., & Kessler, S. (1979). Quantitative analysis of mating behavior in aging male *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 10(3–4), 233–240. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(79\)90037-x](https://doi.org/10.1016/0047-6374(79)90037-x)
- Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., Newman, A. B., Hirsch, C., Gottdiener, J., Seeman, T., Tracy, R., Kop, W. J., Burke, G., & McBurnie, M. A. (2001). Frailty in Older Adults: Evidence for a Phenotype. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(3), M146–M157. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.3.m146>

- Fried, L. P., Xue, Q. L., Cappola, A. R., Ferrucci, L., Chaves, P., Varadhan, R., Guralnik, J. M., Leng, S. X., Semba, R. D., Walston, J. D., Blaum, C. S., & Bandeen-Roche, K. (2009). Nonlinear Multisystem Physiological Dysregulation Associated With Frailty in Older Women: Implications for Etiology and Treatment. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 64A(10), 1049–1057. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp076>
- Gambini, J., Gimeno-Mallench, L., Olaso-Gonzalez, G., Mastaloudis, A., Traber, M. G., Monleón, D., Borrás, C., & Viña, J. (2021). Moderate Red Wine Consumption Increases the Expression of Longevity-Associated Genes in Controlled Human Populations and Extends Lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Antioxidants*, 10(2), 301. <https://doi.org/10.3390/antiox10020301>
- Gargano, J., Martin, I., Bhandari, P., & Grotewiel, M. (2005). Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in. *Experimental Gerontology*, 40(5), 386–395. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.02.005>
- Glenn, C. F., Chow, D. K., David, L., Cooke, C. A., Gami, M. S., Iser, W. B., Hanselman, K. B., Goldberg, I. G., & Wolkow, C. A. (2004). Behavioral Deficits During Early Stages of Aging in *Caenorhabditis elegans* Result From Locomotory Deficits Possibly Linked to Muscle Frailty. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 59(12), 1251–1260. <https://doi.org/10.1093/gerona/59.12.1251>
- Gomez-Cabrera, M. C., Garcia-Valles, R., Rodriguez-Mañas, L., Garcia-Garcia, F. J., Olaso-Gonzalez, G., Salvador-Pascual, A., Tarazona-Santabalbina, F. J., & Viña, J. (2017). A New Frailty Score for Experimental Animals Based on the Clinical Phenotype: Inactivity as a Model of Frailty. *The Journals of Gerontology: Series A*, 72(7), 885–891. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw337>
- Grotewiel, M. S., Martin, I., Bhandari, P., & Cook-Wiens, E. (2005). Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. *Ageing Research Reviews*, 4(3), 372–397. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.04.001>
- Heinze-Milne, S., Banga, S., & Howlett, S. (2019). Frailty Assessment in Animal Models. *Gerontology*, 65(6), 610–619. <https://doi.org/10.1159/000501333>
- Hubbard, R. E., O'Mahony, M. S., Calver, B. L., & Woodhouse, K. W. (2008). Plasma esterases and inflammation in ageing and frailty. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 64(9), 895–900. <https://doi.org/10.1007/s00228-008-0499-1>
- Hubbard, R. E., O'Mahony, M. S., Savva, G. M., Calver, B. L., & Woodhouse, K. W. (2009). Inflammation and frailty measures in older people. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9b), 3103–3109. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00733.x>
- Lacas, A., & Rockwood, K. (2012). Frailty in primary care: a review of its conceptualization and implications for practice. *BMC Medicine*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-4>
- Le Bourg, R., & Minois, N. (1999). A mild stress, hypergravity exposure, postpones behavioral aging in *Drosophila melanogaster*¹¹This article is dedicated to Frédéric A. Lints, who died in

January 1999. *Experimental Gerontology*, 34(2), 157–172. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(98\)00077-1](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(98)00077-1)

Leffelaar, D., & Grigliatti, T. (1983). Age-dependent behavior loss in adult *Drosophila melanogaster*. *Developmental Genetics*, 4(3), 211–227. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020040307>

Leng, S., Chaves, P., Koenig, K., & Walston, J. (2002). Serum Interleukin-6 and Hemoglobin as Physiological Correlates in the Geriatric Syndrome of Frailty: A Pilot Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 50(7), 1268–1271. <https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.2002.50315.x>

Leng, S., Chen, X., & Mao, G. (2014). Frailty syndrome: an overview. *Clinical Interventions in Aging*, 433. <https://doi.org/10.2147/cia.s45300>

Markow, T. A., & Merriam, J. (1977). Phototactic and geotactic behavior of countercurrent defective mutants of *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics*, 7(6), 447–455. <https://doi.org/10.1007/bf01066780>

Martinez De Toda, I., Garrido, A., Vida, C., Gomez-Cabrera, M. C., Viña, J., & de la Fuente, M. (2018). Frailty Quantified by the “Valencia Score” as a Potential Predictor of Lifespan in Mice. *The Journals of Gerontology: Series A*, 73(10), 1323–1329. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly064>

Miquel, J., Lundgren, P. R., Bensch, K. G., & Atlan, H. (1976). Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 5, 347–370. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(76\)90034-8](https://doi.org/10.1016/0047-6374(76)90034-8)

Mitnitski, A. B., Graham, J. E., Mogilner, A. J., & Rockwood, K. (2002). Frailty, fitness and late-life mortality in relation to chronological and biological age. *BMC Geriatrics*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2318-2-1>

Morley, J. E., Haren, M. T., Rolland, Y., & Kim, M. J. (2006). Frailty. *Medical Clinics of North America*, 90(5), 837–847. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2006.05.019>

Nascimento, C., Ingles, M., Salvador-Pascual, A., Cominetti, M., Gomez-Cabrera, M., & Viña, J. (2019). Sarcopenia, frailty and their prevention by exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 132, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.035>

Nichols, C. D., Becnel, J., & Pandey, U. B. (2012). Methods to Assay *Drosophila* Behavior. *Journal of Visualized Experiments*, 61. <https://doi.org/10.3791/3795>

Puts, M. T. E., Visser, M., Twisk, J. W. R., Deeg, D. J. H., & Lips, P. (2005). Endocrine and inflammatory markers as predictors of frailty. *Clinical Endocrinology*, 63(4), 403–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2005.02355.x>

- Rockwood, K., & Mitnitski, A. (2007). Frailty in Relation to the Accumulation of Deficits. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(7), 722–727. <https://doi.org/10.1093/gerona/62.7.722>
- Rubin, G. M. (1988). *Drosophila melanogaster* as an Experimental Organism. *Science*, 240(4858), 1453–1459. <https://doi.org/10.1126/science.3131880>
- Shamliyan, T., Talley, K. M., Ramakrishnan, R., & Kane, R. L. (2013). Association of frailty with survival: A systematic literature review. *Ageing Research Reviews*, 12(2), 719–736. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.001>
- Shardell, M., Hicks, G. E., Miller, R. R., Kritchevsky, S., Andersen, D., Bandinelli, S., Cherubini, A., & Ferrucci, L. (2009). Association of Low Vitamin D Levels With the Frailty Syndrome in Men and Women. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 64A(1), 69–75. <https://doi.org/10.1093/gerona/gln007>
- Simon, A. F., Liang, D. T., & Krantz, D. E. (2006). Differential decline in behavioral performance of *Drosophila melanogaster* with age. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(7), 647–651. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.02.006>
- Snoke, M. S., & Promislow, D. E. L. (2003). Quantitative genetic tests of recent senescence theory: age-specific mortality and male fertility in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 91(6), 546–556. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800353>
- Sternberg, S., Levin, R., Dkaidek, S., Edelman, S., Resnick, T., & Mencil, J. (2013). Frailty and osteoporosis in older women—a prospective study. *Osteoporosis International*, 25(2), 763–768. <https://doi.org/10.1007/s00198-013-2471-x>
- Walston, J., Hadley, E. C., Ferrucci, L., Guralnik, J. M., Newman, A. B., Studenski, S. A., Ershler, W. B., Harris, T., & Fried, L. P. (2006). Research Agenda for Frailty in Older Adults: Toward a Better Understanding of Physiology and Etiology: Summary from the American Geriatrics Society/National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, 54(6), 991–1001. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2006.00745.x>