

Tesis Doctoral

# Base genética de la respuesta a diferentes agentes de estrés ambiental y de la longevidad en el organismo modelo *Drosophila*

Defays, Raquel

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Defays, Raquel. (2011). Base genética de la respuesta a diferentes agentes de estrés ambiental y de la longevidad en el organismo modelo *Drosophila*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Defays, Raquel. "Base genética de la respuesta a diferentes agentes de estrés ambiental y de la longevidad en el organismo modelo *Drosophila*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Ecología, Genética y Evolución**

# **Base genética de la respuesta a diferentes agentes de estrés ambiental y de la longevidad en el organismo modelo *Drosophila***

**Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad  
de Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Raquel Defays**

Director de Tesis: Dr. Fabián M. Norry  
Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano

Buenos Aires, 2011

## Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	6
<b>Capítulo 1: Introducción general.....</b>	<b>10</b>
1.1: Lineamientos generales.....	11
1.2: Genética cuantitativa.....	12
1.3: Teorías evolutivas del envejecimiento – ¿Por que envejecemos?.....	16
1.4: Mecanismos del envejecimiento– ¿Cómo envejecemos?.....	26
1.5: Estrés y proteínas de la respuesta al estrés por calor.....	31
1.6: La longevidad y la sensibilidad térmica.....	35
1.7: La longevidad y la resistencia a la inanición.....	41
1.8: El modelo de estudio .....	47
1.9: Objetivo general.....	49
<b>Capítulo 2: Mapeo de QTL.....</b>	<b>50</b>
2.1: Introducción a RIL y mapeo de QTL.....	51
2.1.1: Los caracteres mapeados.....	51
2.1.2: Mapeo de loci de caracteres cuantitativos-Fundamentos.....	54
2.1.3: Mapeo de loci de caracteres cuantitativos-Diseños y análisis.....	57
2.1.4: Objetivos.....	60
2.1.5: Hipótesis.....	61
2.2: Materiales y Métodos.....	64
2.2.1: Origen de las líneas.....	65
2.2.2: Construcción de las líneas recombinantes endocriadas (RIL) .....	65
2.2.3: Marcadores moleculares y genotipado.....	67
2.2.4 Medición y análisis de la longevidad.....	70
2.2.5 Medición y análisis de la resistencia al hambre.....	72
2.2.6 Mapeo y análisis de QTL.....	75
2.2.7 Los genes candidatos.....	77
2.3: Resultados y Conclusiones Mapeo de QTL para la longevidad y la sensibilidad térmica sobre la longevidad en <i>D. melanogaster</i> .....	79
2.4: Resultados y Conclusiones Mapeo de QTL para resistencia al hambre en moscas adultas y larvas de <i>D. melanogaster</i> .....	100
2.5: Resultados y Conclusiones Longevidad y Resistencia al hambre.....	115
<b>Capítulo 3: Isolíneas.....</b>	<b>124</b>
3.1: Introducción isolíneas.....	125
3.2: Materiales y Métodos.....	136
3.3: Resultados.....	142
3.4: Conclusión.....	151
<b>Capítulo 4: Conclusiones generales.....</b>	<b>155</b>
Referencias.....	165

# **Base genética de la respuesta a diferentes agentes de estrés ambiental y de la longevidad en el organismo modelo *Drosophila***

## **Resumen**

La expectativa de vida de una especie puede evolucionar a través de los genes que están involucrados en la reparación del soma, tales como los sistemas de la respuesta al estrés, según lo propone la teoría del soma desechable o genes con mutaciones perjudiciales o deletéreas de efecto tardío. En los ambientes naturales, los organismos frecuentemente soportan condiciones de estrés por falta de alimento y por baja temperatura. Como la energía ocupa un rol central en la vida de los organismos, mejorar la resistencia al estrés involucra cambios fenotípicos a diferentes niveles, desde señalización intracelular hasta caracteres de historia de vida. La resistencia al hambre severo se define como el tiempo de sobrevivencia a la privación total de alimento y sus valores fenotípicos rondan entre 20 a 200 horas en esa condición. La resistencia al estrés por baja temperatura es un carácter ecológicamente relevante que puede regular el nivel de actividad bajo condiciones de frío en la naturaleza. Este carácter adaptativo puede tener múltiples correlatos a nivel de otros caracteres de historia de vida. En la presente tesis con el objetivo general de elucidar la base genética y molecular que relaciona el proceso de envejecimiento, y los mecanismos de la respuesta al estrés ambiental, se estudiaron caracteres de historia de vida como la longevidad, la resistencia a la falta de alimento y al frío y la relación entre ellos mediante dos metodologías: mapeo de QTL y utilización de aislóneas en los organismos modelo *Drosophila melanogaster* y *D. buzzatii*, respectivamente.

Se estudió la longevidad a 25°C en condiciones de control como así también luego de un pre-tratamiento de estrés por calor en líneas recombinantes endogámicas

(RIL) de *D. melanogaster*. También se estudió la resistencia a la inanición o al hambre (RH) en adultos y pre-adultos mediante un mapeo por intervalo compuesto sobre líneas RIL de *D. melanogaster*. Todos estos caracteres resultaron variables en las RIL analizadas. Se identificaron varios QTL que mapean sobre los tres cromosomas mayores de *Drosophila melanogaster* que explican gran parte de la variabilidad en la longevidad. El tratamiento de calor redujo el número de QTL significativos, encontrando solo dos QTL para la longevidad (rangos 3C1-4F2 y 38E1-42A) en esta condición. Estos QTL, serían QTL generales de la longevidad más bien que QTL específicos de una condición. Con respecto a la resistencia al hambre, encontramos QTL que explican la variabilidad de la RH tanto en adultos como en pre-adultos. Una región de QTL, 16F3-19F6, resultó significativa tanto en machos como en hembras adultas y en el estadio pre-adulto. Se observó una correlación positiva en machos entre la longevidad de moscas tratadas y la RH de adultos, en uno de los paneles de RIL. A su vez, las regiones 16F3-19F6, 42A-49C y 67A-86E3 corresponden a QTL que colocalización entre el estudio de mapeo de la longevidad y de la RH. Esta colocalización entre caracteres está en concordancia con la teoría del soma desechable.

Con un abordaje diferente, la utilización de isolíneas de *D. buzzatii* se estudió la variabilidad de caracteres de historia de vida y sus posibles correlaciones, se continuó con el estudio de la base genética de la respuesta al estrés y la senescencia. Para ello se midió la longevidad a 25°C, la resistencia al hambre (RH), la resistencia a la desecación (RD) y dos caracteres de resistencia al frío (RF). Todos los caracteres resultaron variables en las isolíneas de *D. buzzatii*, con una varianza entre líneas varía desde un 14% hasta un 38 a través de los diferentes caracteres medidos. Se encontró una correlación positiva entre la RH y la RF, sin embargo no comprobamos una correlación entre la RH y la longevidad o la RD. Las isolíneas mostraron una clara correlación

positiva entre estos dos caracteres (RH y RF), en contraposición a la hipótesis del trade-off planteada por Hoffmann et al (2005). También encontramos una correlación positiva entre la longevidad y RD y RF. Las correlaciones positivas entre los diferentes tipos de caracteres estudiados y también con la longevidad están en concordancia con la teoría del soma desechable, que propone justamente que las respuestas a los diversos tipos de estresores y la longevidad pueden evolucionar a través de los mismos genes. De acuerdo a esta teoría, los individuos que soporten mejor el estrés ambiental serán a la vez los más longevos.

**Palabras clave:** *Drosophila*, estrés ambiental, QTL, isolíneas, longevidad, resistencia a la falta de alimento, resistencia al frío, resistencia a la desecación.

# **Genetic base of the response to different environmental stressors and longevity in the model organism *Drosophila***

## Abstract

Life span of different species can evolve through genes that are involved in soma repair, such as stress response systems as proposed by the disposable soma theory and also through genes with harmful or deleterious late effect mutations. In nature organisms often support stress condition as lack of food and low temperature. Energy plays a central role in organisms life, increased resistance to stress involves phenotypic changes at different levels, from intracellular signaling to life history characters. Starvation resistance is defined as the survival time in conditions of total food deprivation and its phenotypic values are between 20 to 200 hours in that condition. The resistance to low temperature is an ecologically relevant character that can regulate the insect activity level under cold conditions in nature. Adaptive characters are expected to be correlated to other life history characters. The aim of my thesis is to investigate the genetic basis that links aging with mechanisms of response to environmental stress. For this purpose we studied life history characters such as longevity, starvation and cold resistance and the relationship between characters following two different methodologies: QTL mapping and isofemales lines in the model organisms *D. melanogaster* and *D. buzzatii*, respectively.

Longevity was measured at 25 °C under controlled conditions and also after a pre-treatment of heat stress on a set recombinant inbred lines (RIL) of *D. melanogaster*. The starvation resistance (SR) phenotypes of pre-adults and adults were used in a composite interval mapping of RIL lines of *D. melanogaster*. We identified several QTL that map on the three major chromosomes of *Drosophila melanogaster* that

explain part of the variance in longevity. The heat treatment reduced the number of significant QTL, finding only two QTL for longevity (3C1-4F2 and 38E1-42A ranges) for this condition. These QTL, would be general longevity-QTL rather than specific of a condition. We found QTL that explain the variance of RH both in pre-adults and adults individuals. The QTL region, 16F3-19F6, was significant in both adult (males and females) and in the pre-adult stage of the life cycle. There was a positive correlation between longevity in treated male flies and adults-SR, in a RIL panels. In turn, 16F3-19F6, 42A-49C and 67A-86E3 regions correspond to QTL that colocalized between both characters mapped, longevity and SR. This colocalization between characters is consistent with the disposable soma theory.

With a different approach, using isofemales lines of *D. buzzatii*, we continued studying the genetic basis of stress response and senescence. In this way, we analyzed the variability of life history characters and their putative correlations, measuring longevity at 25 °C, starvation resistance (SR), desiccation resistance (DR) and two cold-resistance traits (RF). All characters were variable in the isofemales lines of *D. buzzatii*, with a variance component between lines from 14% to 38 through the different characters measured. We found a positive correlation between SR and RF, but we found no correlation between SR and longevity or DR. The isofemales lines show a clear positive correlation between these two characters, as opposed to the trade-off hypothesis proposed by Hoffmann et al 2005. We also found a positive correlation between longevity and RD and also between longevity and RF. The positive correlations between the different characters studied and longevity are also consistent with the disposable soma theory, which proposes that the response to different kind of stressors and longevity could evolve through the same genes. According to this theory, individuals with enhanced environmental stress-resistance will be also the longer-lived.



## Keywords

*Drosophila*, environmental stress, QTL, isofemale lines, longevity, starvation resistance, cold resistance, desiccation resistance.

## Financiamiento

Este trabajo fue realizado a partir de los subsidios UBACYT (X475) y ANPCyT (PICT 611) de los cuales fui miembro tesista y colaborador, respectivamente. También se agradece un soporte financiero desde The Danish Natural Sciences Research Council (9701412) por medio del Dr. Volker Loeschcke que junto con previos subsidios del CONICET, ANPCyT y UBACyT a Fabian Norry participaron financieramente en la construcción de las líneas RIL antes del inicio de la presente tesis.

Y también gracias a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, por brindarme el lugar de trabajo y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por hacer posible este trabajo mediante el otorgamiento de una beca de Doctorado

# Capítulo 1: Introducción general

# 1. Introducción general

---

## 1.1 Lineamientos generales

El plan de la presente tesis versó sobre la genética cuantitativa de los mecanismos de la respuesta a diferentes agentes de estrés ambiental y del proceso de senescencia. *Drosophila* fue utilizada como un organismo modelo, la falta de alimento y la baja y alta temperatura como modelos de estrés. Para ello abordamos la investigación mediante un estudio de isóneas y el mapeo de loci de carácter cuantitativo (QTL) en líneas recombinantes endogámicas (RIL).

La realización de esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de genética evolutiva de la resistencia al estrés y senescencia (GERES), Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Como director de tesis y de beca de doctorado el Dr. Fabián Norry y como consejero de estudios el Dr. Arturo Romano.

El Capítulo 1 consta de una introducción general a la genética cuantitativa, al concepto de estrés, a los caracteres cuantitativos estudiados como longevidad, estrés térmico y por falta de alimento, abarcando los mecanismos que los explican y las relaciones entre ellos. Se abordará el modelo de estudio y también los objetivos generales. De esta manera daremos un pantallazo general a los conceptos y teorías de las cuales partimos para avanzar en la investigación de los objetivos planteados.

El Capítulo 2 está orientado a las investigaciones realizadas mediante uno de los abordajes planteados: el Mapeo de QTL. Primero haremos una pequeña introducción a

los conceptos y metodologías de mapeo, y al diseño utilizado, en este caso el de RIL. Plantearemos los objetivos e hipótesis específicas. Detallaremos los Materiales y Métodos utilizados. Luego mostraremos los resultados obtenidos del Mapeo de QTL para la longevidad y la sensibilidad térmica sobre la longevidad en *D. melanogaster* y plantearemos las conclusiones pertinentes. De la misma manera abarcaremos los resultados y conclusiones del mapeo de QTL para resistencia al hambre en moscas adultas y larvas de *D. melanogaster*. Para culminar el capítulo con un análisis de la relación de los dos caracteres analizados en este capítulo.

El Capítulo 3 está orientado a las investigaciones realizadas mediante el otro abordaje planteado: La utilización de isolíneas. En este capítulo utilizamos isolíneas de *D. buzzatii* generadas a partir de una población natural de Chumbicha, Sur de la provincia de Catamarca, Argentina. Medimos y analizamos los valores fenotípicos de varios caracteres en las isolíneas: la longevidad, la resistencia al hambre (RH), a la desecación (RD), la sobrevivencia al frío (SF) y la recuperación del coma por enfriamiento (RCE). Este capítulo consta de una introducción específica a la metodología, materiales y métodos utilizados, resultados obtenidos y conclusiones arribadas

Luego, en el Capítulo 4, mencionamos los principales aportes y conclusiones a los que arribamos aportando al conocimiento sobre la base de las respuestas a diferentes agentes de estrés ambiental y del proceso de senescencia en *Drosophila*.

---

## **1.2 Genética cuantitativa**

La genética cuantitativa es una rama muy importante de la genética y tiene por objeto el estudio de la herencia de las diferencias fenotípicas entre los individuos de una

población o entre poblaciones. A la variación que se muestra como una distribución cuasi-continua o continua se la llama variación cuantitativa y a los caracteres que exhiben esta forma de variación se los llama caracteres cuantitativos. El análisis de la herencia de estas diferencias es de fundamental importancia para el estudio de la evolución fenotípica dentro y entre poblaciones. La variación continua se da básicamente por dos razones: primero por la segregación simultánea de muchos genes con algún efecto sobre el carácter en estudio y segundo por la superposición de una variación realmente continua producida por causas no genéticas (Falconer y Mackay, 1996). De esta manera, la principal diferencia entre los caracteres que se comportan de manera mendeliana y los que lo hacen de manera cuantitativa reside en el número de genes que afectan al carácter y la magnitud de los efectos de dichos genes sobre la variación fenotípica relativos a otras fuentes de variación. Un carácter determinado por un gen efecto lo suficientemente grande para causar una discontinuidad apreciable, aún en la presencia de otros loci segregando y de la variación de origen no genético, en ese caso se habla de caracteres con herencia mendeliana (más que cuantitativa) y puede estudiarse por métodos mendelianos. De manera contraria, un gen con cuyo efecto no es suficiente para marcar una discontinuidad, no puede ser evaluado individualmente.

Las observaciones en una población en relación con los caracteres cuantitativos se cuantifican en términos de medias, las varianzas y las covarianzas, por ejemplo. Todas estas observaciones deben estar basadas en medidas de los valores fenotípicos. La primera división del valor fenotípico (P) es en componentes atribuibles a la influencia del genotipo (G) y del ambiente (E), simbólicamente:  $P = G + E$  (Falconer y Mackay, 1996). El genotipo es el conjunto particular de los alelos que porta un individuo en cada gen que posee, mientras que el ambiente son todas las circunstancias no genéticas que influyen al valor fenotípico. La desviación ambiental media de la

población toma un valor de cero, de esta forma, el valor fenotípico medio es un buen estimador del valor genotípico. La variación total observada para un carácter, expresada como la varianza fenotípica del mismo ( $V_P$ ), resulta de la varianza genética ( $V_G$ ) y de la varianza ambiental ( $V_E$ ) de dicho carácter, tal como se expresa a continuación:  $V_P = V_G + V_E$

La  $V_G$  de un carácter es la fracción de la varianza fenotípica atribuible a la acción combinada de los genes que afectan a la distribución de ese carácter en la población. A su vez, el efecto genotípico que ejercen los genes sobre el fenotipo puede variar entre los distintos loci, de manera que dentro de la  $V_G$  se distinguen tres componentes principales denominados varianza aditiva ( $V_A$ ), varianza de dominancia ( $V_D$ ) y varianza de interacción epistática ( $V_I$ ). La  $V_A$  representa la fracción de  $V_G$  atribuible a los efectos aditivos de los alelos dentro y entre loci. Dicha varianza es la principal determinante de las propiedades genéticas observables de una población y de la respuesta a la selección. Para entender que es la  $V_A$ , debemos entender primero que es el efecto medio de un gen, el valor mejorante del individuo que los porta. Los conceptos de efecto medio y valor mejorante surgen de que en realidad lo que un individuo transmite a su descendencia no es su genotipo, sino sus genes. El efecto medio de un gen (alelo) podría definirse como la desviación, con respecto a la media de la población, de la media de los individuos que recibieron dicho alelo de uno sus padres, mientras que el otro alelo recibido del otro padre fue tomado al azar de la población. Explicado de otro modo: si un cierto número de gametas que llevan el alelo  $A_1$  se unen al azar con gametas de la población, la media de los genotipos resultantes se desvía de la media de la población en una cantidad que es igual al efecto medio del alelo  $A_1$  (Falconer y Mackay, 1996). Al valor medio de un individuo juzgado por el valor medio de sus hijos, se lo llama valor mejorante. La  $V_A$  es entonces, la varianza de los valores mejorantes.

Este es el componente genético más importante ya que es el principal responsable del parecido entre parientes, y por consiguiente el principal determinante de las propiedades genéticas observables en una población. La  $V_D$  es la fracción de  $V_G$  debida a las desviaciones de dominancia dadas por interacciones entre alelos o intra-locus. La desviación por dominancia surge de la propiedad de dominancia entre los alelos de un gen, en ausencia de dominancia el valor genotípico y el mejorante coinciden. La  $V_I$  representa la varianza debida a las interacciones epistáticas entre los distintos genes, o dicho de otra forma, debida a la combinación no aditiva entre loci.

Como se dijo anteriormente, la genética de un carácter cuantitativo gira en torno a su variación. La partición de la varianza en componentes permite estimar la importancia de los distintos determinantes del fenotipo. La importancia relativa de una fuente de variación es la varianza debida a ésta como proporción de la varianza fenotípica total. A esta importancia relativa de la herencia en la determinación de los valores fenotípicos se la llama heredabilidad del carácter ( $h^2$ ) y representa la fracción heredable de la variación total del carácter en la población. Cuando un carácter esta sujeto a selección natural o artificial, como resultado de tal selección, de los tres componentes de  $V_G$ , solo  $V_A$  será el responsable de los cambios genéticos del carácter en la población. Esto se debe a que  $V_A$  es el único componente de  $V_G$  que determina la cantidad en la cual los fenotipos serán afectados por los genes transmitidos de una generación a la siguiente. Debe tenerse en cuenta que la heredabilidad de un carácter cuantitativo no sólo constituye una propiedad del carácter sino también de la población, así como de las condiciones ambientales en las que los individuos se desarrollan y de la forma en que se evalúa el fenotipo. El valor de la heredabilidad depende de la magnitud de todos los componentes de la varianza y, por tanto, se verá afectada por los cambios que experimente cualquiera de ellos. Dado que todos los componentes genéticos son



función de las frecuencias génicas, éstos pueden diferir de una población a otra debido a razones históricas. La varianza ambiental, por su parte, depende de las condiciones de cultivo o de manejo y por lo tanto la heredabilidad disminuye en condiciones más variables y aumenta cuando éstas son más uniformes. Por lo tanto, el valor de la heredabilidad de un carácter determinado se refiere a una población y unas condiciones ambientales concretas y que los valores que pudieran calcularse en otras poblaciones o circunstancias serán más o menos similares dependiendo del grado de semejanza de la estructura poblacional y de las características del medio. Ejemplo de esto es el amplio rango de variación en las estimas de heredabilidad obtenidas para un mismo carácter y organismo, reflejando diferencias entre las poblaciones consideradas o entre las condiciones ambientales en las que éstas se han estudiado (ver Falconer y Mackay, 1996). Sin embargo, las diferencias en la heredabilidad entre caracteres suelen ser aún mayores y se ha sugerido que la magnitud de la heredabilidad depende de la naturaleza del carácter, siendo los caracteres más estrechamente ligados a la aptitud, aquellos con menores valores de heredabilidad. Esta relación ha sido evidenciada en amplias recopilaciones de heredabilidades de diferentes caracteres en *Drosophila* (Roff y Mousseau, 1987) y en otros organismos (Mousseau y Roff, 1987).

---

### **1.3 Teorías evolutivas del envejecimiento – ¿Por que envejecemos?**

Bajo la teoría de selección natural, los individuos con mayor fitness dentro de una población dejarán mayor descendencia que los individuos con menor fitness y su contribución a la siguiente generación será mayor. La selección natural siempre actuará para maximizar la aptitud (o "*fitness*") media de la población. Dos componentes

fundamentales del fitness son la reproducción y la supervivencia. En organismos de reproducción sexual, (más estrictamente hablando en los organismos en los que existe una sub-división en células somáticas y células germinales), tanto la reproducción como la supervivencia disminuyen con la edad (Rose, 1991). La senescencia o envejecimiento puede definirse como el aumento de la tasa de mortalidad intrínseca y disminución de la fertilidad con la edad, lo que surge como consecuencia del progresivo deterioro fisiológico en los organismos de reproducción sexual para revisiones ver Rose, 1991. Este proceso es evidentemente detrimental para el individuo bajo la teoría de la selección natural, ya que justamente disminuye los dos componentes fundamentales del fitness. Entonces cabe preguntarse: ¿por qué envejecemos?, ¿Cuál es el origen evolutivo del envejecimiento?, ¿por qué este proceso natural parece haber limitado que la supervivencia y reproducción aumenten indefinidamente?

Estos atributos (la reproducción y la supervivencia) deberían diseminarse rápidamente a través de las distintas especies debido a su alta tasa de transmisión. La validez de esta idea fue sustentada matemáticamente, demostrándose que la selección natural generalmente actúa de manera tal de maximizar la aptitud media de una población (Nagylaki, 1977; Ewens, 1979). Sin embargo, la gran cantidad de variación cuantitativa entre las especies en sus tasas de senescencia indica claramente que la senescencia puede evolucionar (Comfort, 1979; Finch, 1990; Rose, 1991; Wachter y Finch, 1997) a pesar de que el envejecimiento no parece ser en si mismo adaptativo ni mucho menos un proceso programado, ya que no existe gen alguno que haya evolucionado para producir una disminución en las tasas de supervivencia y reproducción con la edad. Los primeros intentos por dar una explicación adaptativa a la senescencia fueron hechos por Alfred Russel Wallace, quien arribó a la teoría de la selección natural de manera paralela e independiente a Darwin. Wallace, en una breve

nota escrita entre 1865 y 1870 (citada en Weismann, 1889) introduce la idea del sacrificio de la “inmortalidad” en favor del incremento de la reproducción a nivel individual. Posteriormente, esta idea fue retomada y profundizada por el biólogo alemán August Weismann en su trabajo “The Duration of Life” (1889). En este trabajo, Weismann introduce el concepto de la influencia de la adaptación al ambiente externo sobre la extensión de la vida, y propone que la duración de la vida no depende solamente de consideraciones fisiológicas sino que se ve determinada también por la adaptación al ambiente y las necesidades de cada especie (Weismann, 1889). Esta idea, que sería fundamental para el posterior desarrollo de las teorías evolutivas del envejecimiento, fue retomada luego de varias décadas por Medawar (1946, 1952) y, con mayor énfasis, por Williams en el año 1957 (Rose et al 2008).

Existen varias teorías evolutivas de la senescencia que intentan responder preguntas tales como las mencionadas arriba para poder explicar el origen evolutivo del proceso de senescencia o envejecimiento. Estas teorías proponen que la causa última de la senescencia es la disminución en la fuerza de la selección natural con la edad (Figura 1.1). La fuerza de la selección disminuye con la edad debido a que en condiciones naturales la mayoría de los individuos viven solo una pequeña fracción del tiempo que podrían potencialmente llegar a vivir, ya que en cambio mueren en edades relativamente tempranas como consecuencia de factores extrínsecos (por ejemplo: predación, hambre, frío, calor extremo o infección). En las poblaciones naturales sólo una pequeña proporción de los individuos salvajes muestra envejecimiento, y el proceso de senescencia se puede visualizar en ambientes protegidos en los cuales las causas de mortalidad extrínseca son eliminadas o reducidas sustancialmente. Bajo tales circunstancias (ambientes protegidos) se verifica el proceso de senescencia como un aumento progresivo de la tasa de mortalidad con la edad (Partridge and Mangel, 1999).

Ahora mencionaremos y explicaremos las tres **teorías sobre la evolución de la senescencia** mejor demostradas. Todas ellas están basadas en la existencia de genes con efectos específicos de la edad (Charlesworth, 1994). Dichas teorías establecen diferentes mecanismos genéticos que pudieron estar involucrados en la evolución del envejecimiento. La primera de ellas es la teoría de la acumulación de mutaciones (Medawar, 1952), y propone que en edades avanzadas la fuerza de la selección es demasiado débil como para impedir la acumulación de mutaciones con efectos deletéreos de expresión tardía (Medawar, 1952; Patridge y Barton, 1993). Como se explicó en el párrafo anterior, esta disminución de la fuerza de la selección natural con la edad, se da ya que los organismos en la naturaleza no viven más de cierto tiempo ya que mueren por causas extrínsecas (Figura 1.1). Estos alelos perjudiciales se van acumulando durante las generaciones debido a que no serían “vistos” por la selección natural, ya que los individuos en estado salvaje mueren por causas extrínsecas en edades relativamente tempranas (disminución de la selección natural con la edad). Por lo tanto según esta teoría, la acumulación de mutaciones perjudiciales que actúan tardíamente en la vida es lo que condujo al origen y evolución de la senescencia.

Una segunda teoría fue propuesta por Williams en 1957. Se conoce como la teoría de pleiotropía antagonista y sugiere la segregación de genes pleiotrópicos con alelos beneficiosos en edades tempranas pero perjudiciales en edades avanzadas (Williams, 1957; Rose, 1991; Patridge y Barton, 1993). En otras palabras, dado que la selección es débil en edades avanzadas pero fuerte en edades tempranas, la selección natural favorecerá a los alelos que confieren una ventaja reproductiva en edades jóvenes a pesar de que algunos de ellos sean perjudiciales en edades avanzadas, por lo que tales alelos segregarán en las poblaciones. De acuerdo a esta teoría, la senescencia habría evolucionado como un subproducto de la selección natural (Zwaan, 1999). Esta teoría

introduce el relevante concepto de compromiso evolutivo o “trade off” entre los distintos caracteres de historia de vida. Dicho concepto es también central en una tercera teoría evolutiva de la senescencia y la longevidad. Esta última y tercera teoría se conoce como la teoría del soma desechable y propone que todo organismo vivo experimenta inevitablemente un daño somático que es acumulativo y progresivo con la edad. La reparación de dicho daño involucra demandas energéticas que compiten con muchas otras funciones, especialmente con la reproducción. De acuerdo a esta teoría, la expectativa de vida de una especie puede evolucionar a través de genes que están involucrados en la reparación del soma, tales como los sistemas de la respuesta al estrés (Lithgow y Kirkwood, 1996; Kirkwood y Austad, 2000). Es así como esta teoría predice una correlación generalmente positiva entre la resistencia al estrés y la longevidad.

La teoría del soma desechable tiene su fundamento en la idea de que el mantenimiento celular es costoso y que la energía disponible en un individuo es finita. Esta teoría propone que el daño molecular, celular y tisular originado por los sub-productos metabólicos, por el estrés impuesto por la reproducción y por otras funciones, se acumula con la edad (Westendorp y Kirkwood, 1998; Sgrò y Partridge, 1999). Kirkwood enfatizó que la tasa de acumulación de dicho daño es modulada por varios mecanismos bioquímicos que previenen o reparan el daño, como la producción de antioxidantes y la reparación del ADN. Estos mecanismos de reparación acarrear costos para el organismo en términos de reducción de recursos que de otra manera podrían haber sido usados para la reproducción o para superar la mortalidad en situaciones de estrés. La alta tasa de mortalidad extrínseca en ambientes naturales hace que carezca de cualquier sentido adaptativo la utilización de recursos energéticos metabólicos en la reparación somática más allá de un determinado tiempo. Dicho de otra forma, en la naturaleza, la reparación del daño somático que sufren inevitablemente los organismos,

es beneficioso repararlo hasta cierto punto de la vida de los mismos, ya que ,estos mueren jóvenes por causas extrínsecas. Es mucho más beneficioso evolutivamente, en cambio, utilizar esa energía en pos de aumentar la capacidad reproductiva en edades tempranas, porque ello permite aumentar demográficamente el número de progeñe en las sucesivas generaciones, es decir, su fitness. Por ende, según la teoría del soma desechable, los organismos evolucionan de manera tal que la relación costo-beneficio sea óptima entre la reparación del soma y la reproducción. Vale recordar lo mencionado anteriormente: que esto se aplica a organismos en los que existe una sub-división en células somáticas y células germinales.

Mientras más alta sea la tasa de mortalidad extrínseca, se espera que menos energía se adjudique al rol del mantenimiento del soma y que mayor sea la inversión en la actividad reproductiva. La alta tasa de mortalidad extrínseca se da ya que en ambientes naturales, no protegidos, los individuos se mueren por causas externas como la predación, frío, hambre, etc y no por envejecimiento. Que los individuos se mueran a edades tempranas, antes de llegar a “viejos”, hace que carezca de sentido evolutivo utilizar la energía en la reparación del daño somático que sufren inevitablemente los organismos y por lo contrario utilizarla en, por ejemplo, aumentar la capacidad reproductiva en edades tempranas. Las teorías de pleiotropía antagonista y del soma desechable se basan en principios similares. La diferencia radica en que la última se enfoca principalmente en los mecanismos, particularmente en el rol del mantenimiento y la reparación del soma; mientras que la teoría de pleiotropía antagonista está formulada en términos más generales de acción génica que pueden involucrar genes pleiotrópicos de varios tipos (Kirkwood y Austand, 2000).

Las tres teorías evolutivas del envejecimiento mencionadas arriba explican en forma complementaria la evolución de la senescencia. Más aun, todos los mecanismos

genéticos anteriormente explicados pueden actuar sinérgicamente en una población en un mismo tiempo. Cada una de las teorías cuenta con un vasto soporte empírico a partir de estudios poblacionales realizados con organismos modelos incluyendo a *Drosophila* (ver Kirkwood y Austad, 2000 para una revisión). El principal determinante en la evolución de la longevidad sería el nivel de mortalidad extrínseca experimentado en condiciones naturales (Kirkwood y Austad, 2000). Si el nivel de mortalidad extrínseca es alto, entonces se espera: i- que la expectativa de vida en la naturaleza sea baja siendo la tasa de senescencia más alta en cada generación, ii- que la fuerza de la selección natural se atenúe rápidamente con la edad, permitiendo no sólo la acumulación de mutaciones deletéreas en edades tardías sino también que la demanda de recursos energéticos destinados para el mantenimiento y reparación somática disminuya evolutivamente con la edad. Contrariamente, si el nivel de mortalidad extrínseca es bajo o nulo, las diferentes teorías evolutivas de la senescencia predicen que la selección natural será fuerte incluso en edades avanzadas, purgando en la población en cuestión todo tipo de alelos que aceleren el envejecimiento.

Respecto a las evidencias a favor de la teoría de la acumulación de mutaciones, la mayor parte de los experimentos se han concentrado en la medición de la varianza genética aditiva ( $V_A$ ) y la varianza de dominancia ( $V_D$ ) específica de la edad en caracteres relacionados con la aptitud, debido a que esta teoría predice un aumento en dichos parámetros con la edad (Hughes y Charlesworth, 1996). Por ejemplo, para la mortalidad en *Drosophila* se verificó un aumento significativo en la  $V_A$  y la  $V_D$  con la edad (Charlesworth y Hughes, 1996). También se observan incrementos en estos parámetros para la mortalidad y la fecundidad con la edad (Promislow et al., 1996; Tatar et al., 1996; Hughes et al., 2002). Los resultados de dichas investigaciones evidenciaron

tanto incrementos significativos en la varianza genética específica de edad en la mortalidad y en la fecundidad temprana (Charlesworth y Hughes, 1994; Promislow et al., 1996; Tatar et al., 1996; Hughes et al., 2002), como mutaciones deletéreas con efectos específicos de edad sobre la mortalidad en líneas de *Drosophila* (Pletcher et al., 1998).

Con respecto a la teoría pleiotropía antagonista, Rose y Charlesworth (1981a) fueron unos de los primeros en demostrar correlaciones genéticas negativas entre la fecundidad temprana y la longevidad en el modelo *Drosophila*. Asimismo, en una serie de experimentos con el mutante *age-1* de *Caenorhabditis elegans*, Friedman y Johnson (1988) evidenciaron que dicha mutación confiere una expectativa de vida extendida en asociación con una considerable reducción de la fecundidad. En *Poa annua* se verificó que una alta fecundidad temprana estaba correlacionada con una reducción en la supervivencia y la fecundidad tardía (Law, 1977). Otras evidencias fueron aportadas basándose en la selección artificial como modelo de evolución experimental. Por ejemplo, en poblaciones de laboratorio de *Drosophila subobscura* se observó un reducido éxito reproductivo en edades tempranas como consecuencia de la selección artificial para extender la longevidad (Wattiaux, 1968a). En otro estudio se observó una reducción de la fecundidad temprana en hembras de *D. melanogaster* luego de ser exitosamente seleccionadas para incrementar la expectativa de vida (Rose y Charlesworth, 1980; Luckinbill et al., 1984, 1987; Rose, 1984b; Hutchinson y Rose, 1990). Resultados similares se obtuvieron en *Poa annua* y en el anfípodo *Gammarus lawrencianus* (Doyle y Hunte, 1981; Law, Bradshaw y Putwain, 1977). También se han obtenido evidencias sobre patrones clinales y de diferenciación interespecífica para la longevidad y la fecundidad que son consistentes con las teorías del envejecimiento en *Drosophila* (Sambucetti et al., 2005; Norry et al., 2006). Por otro lado, Westendorp y



Kirkwood (1998) encontraron una relación negativa entre la longevidad y la reproducción en *Homo sapiens* usando registros históricos para la aristocracia británica.

La teoría del soma desechable predice que el esfuerzo metabólico destinado a procesos de mantenimiento y reparación celular varían según la expectativa de vida de la población en cuestión (Kirkwood y Austand, 2000). Varios estudios moleculares y celulares confirmaron esta idea. Comparando especies cercanamente emparentadas se pueden obtener evidencias que apoyen a esta teoría. Por ejemplo, la especie de roedores *Peromyscus leucopus* exhibe una alta longevidad y menor generación de especies enzimáticas reactivas al oxígeno (las cuales son consideradas importantes factores que causan envejecimiento, como se verá en la sección 1.4). En cambio cuando se compara con su especie hermana, filogenéticamente cercana pero poco longeva, *Mus musculus* esta tiene mayor concentración de enzimas antioxidantes y menores niveles de daño oxidativo (Sohal et al., 1993). Asimismo, en numerosos estudios comparativos realizados en mamíferos se observó que la capacidad de reparación del ADN está correlacionada positivamente con la longevidad (Kirkwood, 1989). Experimentos realizados en ungulados (Carranza et al., 2004) también brindaron soporte empírico a la teoría del soma desechable.

Según la evidencia mencionada arriba, las tres teorías evolutivas de la senescencia parecen plantear mecanismos genéticos ciertamente involucrados en la evolución de la longevidad y del envejecimiento. El hecho de que animales que presentan adaptaciones que resultan en un incremento de la protección contra la mortalidad extrínseca (por ejemplo, las alas, conchas de protección o en el cerebro de gran tamaño) posean mayor longevidad (de los murciélagos, aves, tortugas y humanos) es una evidencia a favor de la teoría del soma desechable. Entre estas adaptaciones, se encuentran las que otorgan mayor tolerancia a los factores ambientales que tienen

influencia sobre los individuos en la naturaleza. Un ejemplo de estas adaptaciones es la resistencia a las altas y bajas temperaturas y al estrés por inanición (Hoffman et al 2003). Al comparar una población continental de zarigüeyas que está sometida a una depredación significativa por los mamíferos, con una población de una isla que no está sujeta a la depredación de los mamíferos se encontró, como es esperado, un envejecimiento más lento en la población de la isla (Austad 1993). Entre las especies de insectos sociales, los que tienen la mayoría de los nidos protegidos contienen las hembras reproductoras, con mucho, los lapsos de vida más larga (Keller y Genoud, 1997). Un análisis comparativo de los patrones de mortalidad entre las aves encontró que la tasa de aumento de la mortalidad con la edad se correlaciona directamente con la magnitud de la mortalidad extrínseca (Ricklefs 1998).

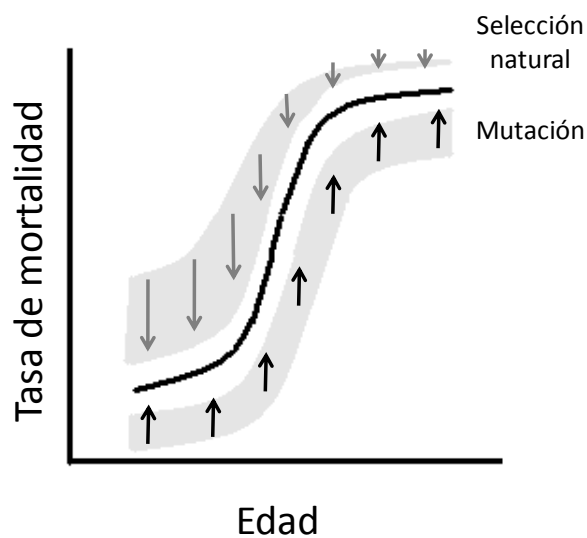


Figura 1.1. La tasa de mutación se mantiene constante a lo largo de la vida. La selección natural se opone a estas mutaciones, purgando a la población de mutaciones con efectos perjudiciales tempranos, manteniendo las tasas de mortalidad bajas. La fuerza de la selección natural disminuye con la edad. En edades muy avanzadas, la fuerza de selección natural es muy baja. Esto conduce a un deterioro de la balanza entre la selección y otras fuerzas evolutivas, en particular la mutación. De esta manera se acumulan a lo largo de las generaciones mutaciones, perjudiciales o deletéreas con efectos tardíos.

#### **1.4 Mecanismos del envejecimiento– ¿Cómo envejecemos?**

Existen varios mecanismos que explican o mantienen una estrecha relación con el proceso del envejecimiento y la expectativa de vida de un organismo, aquí mencionaremos tres, la teoría de radicales libres, las heat shock proteins (hsp) y por último, la regulación de la longevidad a través del camino de las hormonas.

Uno de los procesos ampliamente reconocidos que juegan un rol importante como causante del envejecimiento es la acumulación de daño oxidativo, conocida como la **teoría de los radicales libres** (Harman 1956; Beckman y Ames 1998; Finkel y Holbrook 2000; Nemoto et al. 2004, Monaghan et al 2008). La producción normal de ATP por la mitocondria produce como subproducto varias especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden oxidar una gran variedad de macromoléculas incluyendo a los lípidos, proteínas y DNA e interferir con la función celular y tisular (Finkel y Holbrook 2000; Barja 2004). Dicho daño oxidativo es un fuerte candidato para explicar, por lo menos en parte, los cambios de los individuos relacionados con la senescencia (Stadtman 1992; Hamilton et al 2001; Kujoth et al. 2007). La producción de ROS en las mitocondrias puede reducirse cambiando el gradiente de protones de la membrana (Brand 2000; Balaban, Nemoto y Finkel 2005), pero esto resultaría en una reducción en la eficiencia de la producción de ATP (Serra et al. 2003; Speakman et al. 2004; Humphries et al. 2005). La producción de ROS y el daño concomitante, pueden ser apaciguados por la producción de enzimas antioxidantes y otros antioxidantes (Sohal, Mockett y Orr 2002). Sin embargo, este mecanismo requiere energía y una redistribución de los recursos y potencialmente interfiere con las funciones de la señalización de ROS y en la defensa contra patógenos. Un balance entre la producción

de radicales libres y la defensa contra el estrés oxidativo es un claro trade-off como plantea la teoría de soma desechable y afecta a diversos caracteres de historia de vida.

Las **Heat shock proteins (Hsp)** actúan como defensas de emergencia y cumplen funciones de reparación que intervienen en la regulación de la expectativa de vida. Son candidatas para explicar un mecanismo general del estrés y serán tratadas en el apartado siguiente (1.4). Brevemente, estas proteínas se expresan como respuesta a una amplia gama de formas de estrés y pueden tener efectos beneficiosos sobre la longevidad, por ejemplo muchas enfermedades son consecuencia de la agregación de proteínas (Alzheimer en humanos). En líneas de selección artificial para aumentar la longevidad, la selección trajo aparejado un incremento en la expresión de hsp22 y hsp23 (Kurapati et al., 2000). Sin embargo, la selección para mayor longevidad produce una disminución en la expresión de la proteína inducible por estrés Hsp70, sugiriendo que existen otros mecanismos más importantes, como la estabilidad de las proteínas o el nivel constitutivo de protección (Norry y Loeschcke, 2003). Wang et al. (2004) informó que en un screening, 13 de los transcritos que son sobre-expresados en condiciones de múltiple estrés en adultos de *Drosophila*, se encuentran las hsp26 y hsp27. Posteriormente se demostró que estas dos proteínas, hsp26 y hsp27, son responsables de aumentar la esperanza de vida de adultos. La sobre-expresión de Hsp ha demostrado tener efectos beneficiosos sobre la longevidad, la supervivencia específica de la edad y la resistencia al estrés (Morrow et al., 2004; Tatar et al., 1997), pero también se han observado efectos perjudiciales sobre estos mismos caracteres (por ejemplo, Bhole et al., 2004). Presumiblemente, estas discrepancias surgen porque las Hsp tienen funciones específicas que son sensibles al momento y el lugar de expresión. La expresión ectópica puede fácilmente dar lugar a efectos perjudiciales, como la expresión de Hsp puede

causar un alto costo en términos de crecimiento, tasa de desarrollo y la fertilidad (revisado en Sørensen et al., 2003).

Uno de los principales y más reconocidos mecanismos metabólicos que determina la expectativa de vida de un organismo es la regulación de longevidad a través del **camino de las hormonas**. Los genomas de *D. melanogaster* y *C. elegans* contienen un locus que codifica para un receptor del factor de crecimiento de tipo insulina insulín/IGF-like (InR o daf-2) y muchos loci que codifican ligandos insulín-like. Existen siete ligandos en el genoma de *D. melanogaster* (Brogiolo et al., 2001), mientras que el genoma de *C. elegans* contiene 37 genes insulín-like (Pierce et al., 2001); estos genes se encuentran generalmente agrupados en clusters, sugiriendo a la duplicación génica como el origen evolutivo más probable. Un impresionante número de fenotipos están regulados a través del receptor insulina/IGF de la mosca y del gusano, incluyendo el crecimiento, el metabolismo de nutrientes, la diapausa o Dauer, la reproducción y el envejecimiento (Partridge 2010).

El aumento en la longevidad como consecuencia de una reducción del camino de señalización del factor de crecimiento de tipo insulina insulín/IGF-like (IIS) fue descubierto en el gusano *Caenorhabditis elegans*, de manera directa a través de un screening de mutaciones que aumentaban la longevidad (Kenyon, 2010; Partridge, 2010). Una reducción en la ruta metabólica de TOR, que está íntimamente relacionado con el IIS, también muestra un aumento significativo en las longevidades de *C. elegans* (Vellai et al., 2003), luego demostrado en *Drosophila* (Kapahi et al., 2004) y luego en levaduras (revisado en Kenyon, 2010). También, una reducción de estas dos rutas metabólicas, a través de manipulación genética o inhibición química, puede extender la expectativa de vida en ratones (Fontana et al., 2010; Kenyon, 2010). Existen varios estudios de genética de poblaciones en humanos donde encuentran una asociación entre

la longevidad y Foxo3a, un gen ortólogo del factor de transcripción forkhead DAF-16 de *C. elegans* involucrado en IIS (Kenyon, 2010). Mutaciones que reducen la actividad del receptor DAF-2 (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997) o Age-1 (Friedman and Johnson, 1988; Morris et al., 1996) extienden la longevidad de los gusanos adultos más de un 100%. El receptor de la insulina vía la regulación del camino de señalización PI3K-AKT/SGK, el cual culmina en una regulación negativa del factor de transcripción Forkhead Foxo/Daf-16 (Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999; Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997).

La regulación de la senescencia mediante el camino de señalización de la insulina esta ampliamente conservado desde los gusanos hasta los mamíferos (Cuadro 1). En *Drosophila melanogaster*, las mutaciones en el receptor extienden la longevidad de las hembras en un 85% aproximadamente y una mutación en el sustrato del receptor de la insulina (IRS) Chico causa un aumento del 45% (Clancy et al., 2001; Tatar et al., 2001). La sobreexpresión de foxo en *Drosophila* extiende la expectativa de vida en un 15-52% (Giannakou et al., 2004; Hwangbo et al., 2004). También alguna mutaciones en Lnk (Slack et al., 2010) extienden la longevidad, así como el incremento de la expresión de PTEN (regulador negativo de la vía) (Hwangbo et al., 2004). En *C. elegans*, el factor de transcripción forkhead Daf-16 esta negativamente regulado por IIS y es esencial para la extensión de la longevidad mediante la reducción de IIS. Todavía no está claro el rol del ortólogo de *Drosophila* dFoxo en la extensión de la longevidad por IIS, pero la sobreexpresión de dFoxo en sí misma extiende la longevidad (Giannakou et al., 2004; Hwangbo et al., 2004). Una reducción en la actividad de la vía de TOR a través de la modulación de varios genes como dTsc1, dTsc2, dTOR y dS6K también extiende la longevidad (Kapahi et al., 2004), así como la inhibición de TORC1 por rapamycin (Bjedov et al., 2010). En ratones, la falta de un alelo del receptor del factor de

crecimiento insulin-like 1 (IGF1) muestra un incremento de un 26% en la longevidad media (Holzenberger et al., 2003). El camino de señalización de la insulina es importante en una amplia variedad de tejidos para extender la expectativa de vida. Una mutación en el tejido adiposo de ratón incrementa la longevidad en un 18% (Bluher et al., 2003), mientras que un knock-out cerebro-específico la incrementa en un 18% (Taguchi et al., 2007).

El sistema nervioso y el tejido graso son los dos principales tejidos implicados en la extensión de la longevidad por la reducción de la vía insulin/TOR. En los adultos de *Drosophila* *dilps* 2, 3 y 5 son producidos en el cerebro (Revisado en Partridge et al 2010, Gronke et al., 2010). *jun*-N-terminal quinasa (JNK) se activa en respuesta a una variedad de estreses y las moscas modificadas genéticamente para aumentar la actividad de JNK muestran una longevidad extendida (Wang et al., 2003). Del mismo modo, la expresión de una forma dominante-negativa de la *Dmp53* supresora de tumores en estas células, extiende la vida útil y reduce el nivel de transcripción de *dilp2* (Bauer et al., 2007), y al eliminarlos se extiende la longevidad (Gronke et al., 2010). La restricción dietaria (DR) en *Drosophila*, que extiende generalmente la expectativa de vida, resulta en niveles reducidos transcripcionales de *dilp5* en el MNC (Min et al., 2008), a pesar de la supresión del gen *dilp5* por sí sola no altera la respuesta a RD, posiblemente a causa de incremento en la expresión compensatoria de *dilps* 3 (Gronke et al., 2010). Tanto la vía de IIS, que responde a las señales nutricionales y *jun*-N-terminal quinasa (JNK) que responde frente al estrés, convergen en la vía FOXO, lo que convierte a este último en un integrador central de control de adaptaciones celulares y de organismos, incluyendo la resistencia al estrés y la longevidad (Wang et al., 2005). La actividad de FOXO también puede ser modulada traduccionalmente por la interacción con TOR, que

responde a cambios en factores de crecimiento, aminoácidos, la tensión de oxígeno y el estado de la energía (Luong et al., 2006) (Cuadro 1).

**Cuadro 1. El camino de señalización del factor de crecimiento de tipo insulina  
insulin/IGF-like (IIS)**

La señalización se inicia con la unión de un ligando con un receptor adecuado que induce la dimerización del receptor y autofosforilación del dominio citoplasmático. Los ratones y otros mamíferos tienen tres ligandos (insulina, IGF-1 e IGF-2), mientras que los gusanos y las moscas tienen no menos de 38 y 7 ligandos respectivamente. Los gusanos y las moscas tienen un receptor, mientras que los ratones tienen tres que, además, pueden formar heterodímeros. La señal es transducida ya sea directamente desde el receptor (en gusanos y moscas) o indirectamente a través del sustrato del receptor de la insulina (IRS) a PI3K (o AGE-1 en gusanos). Los gusanos y las moscas tienen un único IRS, mientras que los ratones codifican cuatro (IRS-1-IRS-4). PI3K convierte [fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato] a PIP2 en segundo mensajero PIP3 [fosfatidilinositol (1,4,5)-trifosfato], y esta actividad es antagonizado por la fosfatasa PTEN (DAF-18 en los gusanos). Los niveles elevados de PIP3 resultado de la activación de PKB y PDK, y PDK luego fosforila a PKB, activándolo. Las moscas tienen un único PKB, mientras que los gusanos tienen Akt 1, Akt 2 y SGK-1, y los ratones tienen Akt 1, Akt 2 y Akt 3. El PKB activado fosforila el factor de transcripción forkhead (Forkhead TF) de manera que se excluye del núcleo y se inactiva. Los gusanos y las moscas contienen un factor de transcripción forkhead único (DAF-16 y FOXO respectivamente), mientras que los ratones tienen tres [FKHR (Forkhead homólogo 1), FKHL1 (FKHR tipo 1) y AFX (FOXO 4)].

---

### **1.5 Estrés y proteínas de la respuesta al estrés por calor**

Todos los organismos en la naturaleza experimentan cierto grado de estrés ambiental. Severos niveles de estrés ambiental frecuentemente impactan sobre la supervivencia y la reproducción de los individuos en ambientes extremos (Hoffmann y Parsons, 1991). En estas situaciones, la fuerza neta de la selección natural se intensifica y los cambios evolutivos pueden ocurrir con mayor rapidez pero aumentando al mismo



tiempo el riesgo de extinción (Hoffman y Parsons, 1991). En general, el **estrés** se define como una condición que perturba el normal funcionamiento de los sistemas biológicos o, en un sentido más amplio, como una condición que puede disminuir la aptitud o fitness (Hoffmann y Parsons, 1991; Bijlsma y Loeschcke, 1997).

Frente al estrés causado por factores ambientales los organismos pueden responder de dos maneras. Puede existir una respuesta de tipo comportamental, es decir, que el individuo evite estar sometido directamente al estrés ambiental. Si no existe una respuesta de tipo comportamental suficientemente exitosa, se puede dar el otro tipo de respuesta que involucra cambios metabólicos mediados por hormonas. Este último tipo de respuesta se caracteriza por la inducción de la expresión de las **“heat-shock proteins”**. Las Hsp, mencionadas en el apartado anterior, son proteínas, muchas de las cuales son chaperonas moleculares que juegan un importante rol en la respuesta celular frente a un amplio rango de formas de estrés, incluyendo el estrés por alta temperatura, de ahí su nombre (Lindquist, 1986; Sørensen et al., 2003). Estas Hsp están involucradas en funciones que garantizan la síntesis de proteínas funcionales, tales como el transporte, plegamiento, desplegamiento, ensamblaje y desensamblaje de los péptidos, también participan en la degradación de proteínas agregadas o mal plegadas. El significado evolutivo y ecológico de las Hsp ha sido una materia de gran interés en los años recientes, ya que estas chaperonas moleculares pueden estar directamente relacionados con la adaptación al estrés térmico y otras formas de estrés (revisado en Sørensen et al., 2003). Los genes de las Hsp están presentes en prácticamente todos los organismos conocidos, incluyendo bacterias, plantas y animales. Los genes que codifican para las diversas Hsp son altamente conservados en el reino animal, con bajo nivel de variación entre especies en las regiones codificantes. Esto sugiere que las Hsp tienen una gran importancia funcional en la protección de la célula y del organismo

durante y/o después de la exposición al estrés, pues son relevantes en la recuperación y supervivencia luego de la exposición a diversas formas de estrés (Lindquist, 1986; Sørensen et al., 2003).

Un gran número de experimentos demuestran que las Hsp son componentes claves de la termotolerancia (Lindquist, 1986). Asimismo, muchas Hsp no son específicas de la respuesta al estrés por calor sino que se inducen por otras formas de estrés, incluyendo la exposición a metales pesados, a etanol, a análogos de aminoácidos, infecciones virales, hipoxia e incluso envejecimiento (Schlesinger et al., 1982; Marx 1983; Sørensen et al., 2003). Tanto las altas como las bajas temperaturas pueden inducir la expresión de Hsp, aunque esta inducción está sujeta fuertemente al nicho ecológico del organismo en cuestión (Feder y Hoffmann, 1999).

En estudios de laboratorio se ha visto que pequeños aumentos en el nivel de Hsp pueden tener efectos sobre múltiples caracteres de historia de vida tales como la tasa de desarrollo, la resistencia al estrés, la longevidad y la fecundidad (Rutherford y Lindquist, 1998; Sørensen y Loeschcke, 2001; Queitsch et al., 2002; Rutherford, 2003; Sørensen et al., 2003). Algunas Hsp parecen estar muy involucradas también en el mantenimiento y reparación del soma durante el proceso de senescencia (Feder y Hoffmann, 1999; Tower 2009). Actualmente hay un gran soporte empírico no sólo del crucial rol de las heat shock proteins como un sistema de defensa fisiológica sino también como un sistema cuyo nivel de expresión inducida evoluciona adaptativamente frente al estrés ambiental. Los genes de hsp70 y hsr-omega parecen tener un gran efecto en la respuesta adaptativa al calor extremo en *D. melanogaster* (ej., Weeks et al., 2002; Sørensen et al., 2005a).

Los genes que codifican las Hsp se encuentran agrupados en familias formadas por varios genes relacionados, con diferentes funciones. En particular, la familia de la

Hsp70 está formada por varios genes que codifican para distintas proteínas de un peso molecular de alrededor de los 70 KD. La mayoría de estos genes son expresados de manera constitutiva y son sobre-regulados luego de la exposición al estrés (Velásquez et al., 1983; Sorensen et al 1995). Sin embargo, el gen de la hsp70 se expresa únicamente luego de la exposición al estrés (Velásquez et al., 1983). La proteína codificada por dicho gen, Hsp70, parece ser parcialmente responsable del aumento de la resistencia al calor luego del estrés (Solomon et al., 1991; Feder y Krebs, 1997) y participar en la regulación de otros productos inducibles por alta temperatura. Más aún, estudios de mapeo de QTL para la resistencia a altas temperaturas en *D. melanogaster* detectaron un QTL ubicado en la misma región en donde se encuentra el gen hsp70 y uno de los cognatos hsc70 entre otros (Norry et al., 2004; Morgan y Mackay, 2006). Según lo indica un estudio en *D. melanogaster* (Sørensen et al., 2007), la Hsp70 parece no tener un rol principal en la resistencia al coma por alta temperatura. A través de un análisis de expresión del genoma completo realizado sobre líneas de selección artificial para la resistencia al coma por alta temperatura, Sørensen et al. (2007) detectaron que los patrones de expresión de las Hsp, en particular Hsp70, no se modifican como consecuencia de la selección aplicada (Sørensen et al., 2007). Sin embargo, otro estudio, también basado un estudio de expresión, detectó un efecto significativo de Hsp70 sobre la resistencia al coma por alta temperatura (Takahashi et al 2011).

La exposición a niveles sub-letales de estrés puede desencadenar un tipo de respuesta adaptativa en el cual los organismos logren contrarrestar los efectos perjudiciales del estrés y mostrar una recuperación completa luego del mismo. El fenómeno mediante el cual los organismos logran restablecer su homeostasis interna y adquirir una mayor tolerancia frente a una nueva situación de estrés se conoce como aclimatación. En inglés se distinguen dos terminologías que no existen en castellano,

utilizando aclimatation para el proceso de adquirir mayor tolerancia luego de periodos largos de exposición al estrés y heat-hardening para periodos breves de exposición al estrés. El fenómeno de aclimatación es un ejemplo de plasticidad fenotípica, es decir, la expresión fenotípica variable que puede tener un carácter por parte de un mismo genoma bajo diferentes condiciones ambientales (Stearns, 1989). En *Drosophila* y en muchos otros organismos modelos, la aclimatación induce cambios fisiológicos y modificaciones en los niveles de expresión de ciertos genes. Por ejemplo, el nivel de expresión inducida del gen *hsp70* aumenta significativamente como consecuencia de la aclimatación a altas temperaturas. Se han documentado los efectos beneficiosos de la sobre-expresión de *Hsp70* en *Drosophila*, tales como aumentos en la resistencia al estrés térmico y en la longevidad (e.g. Tatar, 1999) y otro trabajo mostró que las líneas más resistentes a un estrés potencialmente letal de calor expresan más *Hsp70* y que la selección para mayor longevidad disminuye la expresión inducible de *Hsp70* (Norry y Loeschcke, 2003), existen costos asociados a altos niveles de expresión de dicha proteína tanto a nivel celular (e.g., disminución en el crecimiento y división celular en los trabajos de Feder et al., 1992; Krebs y Feder, 1997) como a nivel orgánico (e.g., disminución en la reproducción en Krebs y Loeschcke, 1994; Silbermann y Tatar, 2000).

---

## **1.6 La longevidad y la sensibilidad térmica**

El estrés térmico constituye una de las formas de estrés más comunes en ambientes terrestres contemporáneos. La temperatura ambiental puede provocar profundos efectos sobre la morfología, fisiología y el comportamiento de los

organismos (e.g. Hochachka y Somero, 1984; Huey y Bennett, 1987). Más aún, la exposición breve o periódica de los organismos a temperaturas extremas es un importante factor que afecta la dinámica y evolución de las poblaciones naturales (Hoffmann y Parson, 1991; Kaveira et al., 1993; Johnston y Bennett, 1996). Si bien las temperaturas mayores que un umbral máximo causan típicamente una muerte rápida, la exposición a temperaturas elevadas pero sub-letales resulta ser una característica de gran relevancia ecológica en poblaciones de insectos pequeños como *Drosophila*. Generalmente, la exposición a altas pero sub-letales temperaturas puede conducir a un “coma” reversible en insectos y otros organismos. De esta manera, el estrés térmico puede regular de manera rutinaria a los niveles de actividad de los insectos bajo condiciones de calor en la naturaleza. La capacidad para resistir a dicho coma inducido por el calor es adaptativa. Esto se debe a que los individuos que logran permanecer activos y por lo tanto pueden tener acceso a la reproducción, tendrán una ventaja demográfica respecto a otros individuos que permanecen en estado de coma durante condiciones de calor extremo en poblaciones naturales (Huey et al., 1992; Loeschcke y Hoffmann, 2007).

La termo-resistencia es una característica fenotípica que limita la distribución y abundancia de las especies, y algunas especies modelo como *D. melanogaster* pueden sobrevivir y reproducirse en zonas climáticas que abarcan un amplio espectro térmico, desde zonas tropicales hasta regiones relativamente frías (Hoffmann et al., 2003). La adaptación a temperaturas extremas es un tópico de gran interés en la biología evolutiva contemporánea, particularmente en la perspectiva de un creciente calentamiento global inducido en gran medida por la actividad humana (Hoffmann y Parsons, 1997; Hoffmann y Merila, 1999; Dahlgaard et al., 2000; Hoffmann y Hercus, 2000; Norry et al., 2004; Sørensen et al., 2005a; Hoffmann y Weeks, 2007; Hoffmann y Daborn, 2007).

Además el estrés ambiental también tiene implicancias en los mecanismos y evolución del proceso de senescencia. Muchos trabajos han descubierto una alta correlación entre la resistencia al estrés y la expectativa de vida a temperaturas normales, por lo que resulta interesante pensar a los genes candidatos para longevidad como los mismos genes candidatos para la tolerancia al calor (Kirkwood y Austad, 2000; Minois, 2000; Hoffmann et al., 2002a; Norry y Loeschcke, 2003; Sørensen et al., 2003, Vermeulen y Loeschcke 2007). La relación entre la tolerancia al calor y la expectativa de vida a temperaturas normales fue también sugerida por la observación de que mutaciones genéticas que extienden la longevidad, aumentan también la capacidad para resistir temperaturas que son extremas para el organismo (Lithgow et al., 1994, 1995). Experimentos realizados en *Drosophila* también evidenciaron una correlación genética entre los dos caracteres mencionados (Norry y Loeschcke, 2002a,b, 2003).

De esta manera, el estrés puede actuar como una potente fuerza evolutiva y conducir a respuestas adaptativas que pueden a su vez impactar sobre los mecanismos y evolución del proceso de envejecimiento. En particular, la teoría del soma desechable mencionada en el apartado 1.2 brinda el marco teórico conceptual para investigar las relaciones causales entre la tolerancia y respuesta al estrés ambiental y los mecanismos y evolución de la senescencia y la longevidad (Lithgow y Kirkwood, 1996; Luckinbill, 1998). En particular, el estrés térmico altera la expresión de cientos o incluso miles de genes en organismos modelos como *Drosophila* (Sørensen et al., 2005b), algunos de los cuales incluyen los genes que codifican para las “heat-shock proteins” (Hsps), que pueden tener importantes efectos sobre la longevidad y la fecundidad (ej., Tatar et al., 1997; Silbermann y Tatar, 2000). De la misma manera, la expresión de muchos genes se ve alterada en estudios donde se comparan los niveles de transcritos en todos (o casi

todos) los genes del genoma entre condiciones control y condiciones de inanición (starvation) (Harbison et al 2005).

Muchas investigaciones se han realizado en poblaciones experimentales de diferentes especies con el objetivo de estudiar la relación entre la resistencia al estrés y la longevidad. Los experimentos de selección artificial han constituido una buena aproximación para evaluar la posible correlación genética entre estos caracteres (ver sección hormesis y longevidad). Los resultados generales de dichos experimentos realizados en *D. melanogaster* indican que la longevidad y la resistencia al estrés se encuentran positiva y genéticamente correlacionadas, ya que la selección para aumentar la longevidad incrementa también la resistencia a diversas formas de estrés (Service et al., 1985; Force et al., 1995; Zwaan et al., 1995; Mockett et al., 2001; Bublly y Loeschcke, 2005a). Durante las últimas décadas, se ha implementado un segundo tipo de aproximación para evaluar si los mecanismos de respuesta al estrés también están involucrados en la modulación de la longevidad. La estrategia implementada se basa en someter a individuos de poblaciones experimentales a situaciones de estrés no letal (generalmente estrés por alta temperatura) y evaluar el efecto que posee la exposición al estrés sobre la longevidad (ver efectos horméticos del estrés en el párrafo siguiente). Los resultados generales de esta aproximación indican que breves exposiciones a niveles sub-letales de calor incrementan el tiempo de vida en *Drosophila*, *C. elegans* y otros organismos modelo (ver Rattan, 2008 para una revisión). En todos los casos nombrados, la extensión de la longevidad estaría explicada por un aumento en el mantenimiento y reparación somática en respuesta al estrés aplicado (Gems y Partridge, 2008), tal como lo indica la teoría del soma desechable.

Al fenómeno en el cual aumenta algún componente de la aptitud como resultado de la exposición a niveles moderados de estrés, se lo conoce con el nombre de hormesis,

particularmente dentro del campo de la gerontología. Según el modelo hormético, la aptitud máxima de un componente del fitness que esta sujeto a hormesis (ej., longevidad) ocurre a bajos o moderados niveles de estrés, mientras que a severas exposiciones la aptitud disminuye a causa de los efectos deletéreos del mismo factor de estrés (Figura 1.2). La hormesis se considera entonces como un efecto beneficioso en respuesta a simples o múltiples formas de estrés ambiental (Parsons, 2002a). Más generalmente, la hormesis puede ser vista como el resultado de la selección sobre la eficiencia metabólica en respuesta a perturbaciones ambientales (Parsons, 2002a). Todas las formas o agentes de estrés pueden potencialmente producir hormesis. Las medidas comúnmente usadas para evaluar la hormesis son componentes interesantes del fitness tales como el crecimiento y la longevidad.

La exposición a niveles sub-letales o moderados de estrés por un periodo de tiempo puede alterar la expresión de muchos genes en *Drosophila* (Sørensen et al. 2005; Kristensen et al. 2006), afectando de manera drástica algunos caracteres de historia de vida como la longevidad (e.g., Parsons 2002; Khazaeli et al 1997; Le Bourg et al. 2001; Hercus et al 2003; Lithgow et al. 2006; Vermeulen y Loeschcke 2007; Tower 2009). De esta manera, la longevidad puede ser extendida en individuos jóvenes como consecuencia de la exposición a niveles sub-letales de estrés (e.g., Olsen et al. 2006). Este efecto beneficioso del estrés es conocido como el fenómeno de hormesis mencionado más arriba (Calabrese et al. 2007), de manera que bajas dosis de estrés pueden llegar a disminuir la tasa de senescencia y la tasa de mortalidad específica por edad en una población (Khazaeli et al 1997; Scannapieco et al 2007). Dicho de otro modo, la hormesis es un efecto beneficioso como consecuencia de dosis bajas de estrés, que se sabe que es perjudicial para el individuo en dosis más altas (Calabrese et al. 2007). El estrés sub-letal ha mostrado tener un efecto beneficioso sobre la longevidad en



muchos organismos incluyendo a los gusanos (Lithgow et al. 1995a; Butov et al. 2001; Cypser and Johnson 2001, 2002, 2003; Yashin et al. 2002; Rea et al. 2005; Olsen et al. 2006; Lithgow et al. 2006) y moscas (Khazaeli et al. 1997; Le Bourg et al. 2000; Hercus et al. 2003, Scannapieco 2007).

La evidencia más clara y mejor demostrada de hormesis proviene del efecto benéfico del estrés por falta de alimento (restricción dietaria) sobre la longevidad (ver Tatar 2011 para una revisión). Con respecto al estrés por calor, no está claro aún si la extensión de la longevidad inducida por esta forma de estrés se debe al estrés térmico per se (ej., inducción de Hsps) o a que debido al calor extremo las moscas interrumpen la alimentación y la reproducción y pueden invertir la energía “ahorrada” en la reparación y mantenimiento del soma y por ende la longevidad. En condiciones de estrés, las poblaciones podrían mantener en un mínimo el esfuerzo reproductivo, si debido al estrés los individuos pueden extender sus expectativas de vida. De esta manera, al aumentar su longevidad, los individuos pueden reproducirse en condiciones más benignas luego del período de estrés, aumentando así el fitness reproductivo global (Scannapieco et al., 2007)

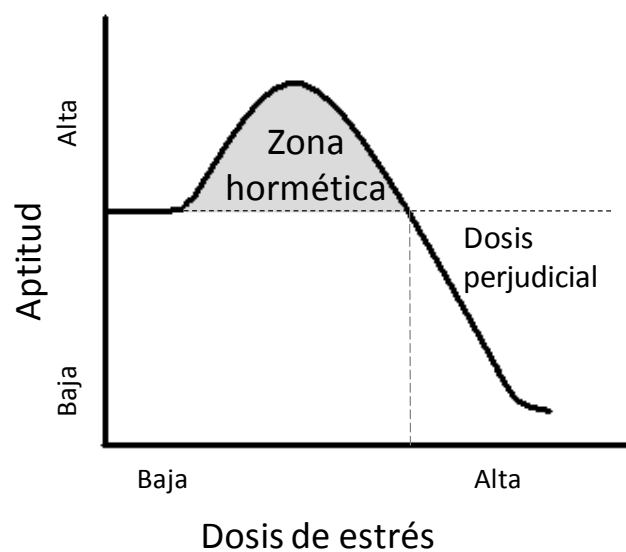


Figura 1.2. Modelo de hormesis. La aptitud puede ser evaluada o medida como un componente del fitness (ej., la longevidad) en una temperatura benigna y el estrés puede ser la exposición a alta temperatura. Existe una dosis de estrés para la cual ese parámetro de la aptitud o fitness del individuo es mayor que en la ausencia de estrés. Sin embargo, cuando el estrés se vuelve más severo la aptitud cae drásticamente. Se supone que la hormesis es genéticamente variable por lo que podría evolucionar (Parsons 2002a).

La relevancia del estudio de la hormesis en investigaciones sobre senescencia y envejecimiento, se debe a que la respuesta celular inmediata al estrés interno y externo está basada en la regulación de los procesos de mantenimiento y reparación somática. De esta manera, ha sido sugerido que la estimulación o inducción de rutas bioquímicas de mantenimiento y reparación (a través de tratamientos de estrés) puede ser una muy buena estrategia para comprender las rutas bioquímicas del envejecimiento (Lithgow y Kirkwood, 1996; Tatar et al., 1997; Rattan, 1998; Minois, 2000, Tower 2009, 2011). En consecuencia, el estudio de la hormesis puede ser de utilidad para comprender aspectos de la senescencia según sugiere la teoría del soma desechable.

En la presente tesis se estudiará el efecto de moderados tratamientos de calor sobre la longevidad, y se estudiará la sensibilidad térmica de dicho carácter. En algunas líneas, el tratamiento térmico tendrá efectos beneficiosos (hormesis), mientras que en otras líneas el efecto será neutro perjudicial.

---

## **1.7 La longevidad y la resistencia a la inanición**

En los ambientes naturales, los organismos frecuentemente soportan condiciones de estrés por falta de alimento y por baja temperatura (Hoffmann y Harshman 1999; Hoffmann et al. 2003). Como la energía ocupa un rol central en la vida de los

organismos, mejorar la resistencia al estrés por falta de alimento involucra cambios fenotípicos a diferentes niveles, desde señalización intracelular hasta caracteres de historia de vida. La resistencia al hambre severo se define como el tiempo de sobrevivencia a la privación total de alimento y sus valores fenotípicos rondan entre 20 a 200 horas en esa condición (Rion y Kawecki 2007). La resistencia al estrés por baja temperatura es un carácter ecológicamente relevante que puede regular el nivel de actividad bajo condiciones de frío en la naturaleza (David et al. 1998). Este carácter adaptativo puede tener múltiples correlatos a nivel de otros caracteres de historia de vida (Hoffmann et al. 2003).

Muchas formas de estrés muestran una correlación con la resistencia a la inanición. La asociación entre la resistencia al hambre (RH) y la resistencia a la desecación es, probablemente, la que cuenta con las evidencias más robustas (Harshman et al. 1999; Bublly y Loeschcke 2005). Otras formas de estrés que mostraron correlaciones genéticas con RH, son, por ejemplo, la alta densidad larvaria (Joshi et al. 1998; Borash et al. 2000) y heat shock (Bublly y Loeschcke 2005). Asimismo la bibliografía es inconsistente, mostrando que existen caminos alternativos para la adaptación a dichos estresores. Otra correlación interesante es la que se observó con la resistencia al frío (RF). Hoffman y colaboradores (Hoffmann et al. 2005) observaron una correlación negativa entre la RH y la RF en líneas seleccionadas para ambos caracteres mostrando un claro trade-off. Sin embargo otro experimento muestra que la RH aumenta en líneas de selección a la baja temperatura (Bublly y Loeschcke 2005). En la presente tesis se estudió la correlación entre estos caracteres aportando a esta discusión.

La bibliografía también muestra una robusta asociación evolutiva entre una alta RH y alta expectativa de vida. La asociación entre RH y el peso al momento de la

eclosión puede deberse a una mayor acumulación de reservas de lípidos o carbohidratos por parte de las larvas, sin un aumento grande en el tamaño corporal (Chippindale et al. 1996; Hoffmann et al. 2005). Una manera de tomar estas reservas adicionales es aumentar el tiempo de alimentación de las larvas, es decir, retardando el momento del empuje (Edgar 2006), de esta forma se puede explicar el tiempo de desarrollo más largo en líneas de selección a la RH. La disminución de la fecundidad y el aumento de la expectativa de vida de moscas seleccionadas para alta RH, no parece ser consecuencia de una mayor adquisición de lípidos al momento de la eclosión. Más aún, moscas seleccionadas para una acumulación mayor de reservas han mostrado tener una alta fecundidad temprana y una longevidad menor (Foley y Luckinbill 2001).

La relación evolutiva entre la resistencia a la inanición y la longevidad se ha confirmado en algunos experimentos de selección. Los datos relevantes de *Drosophila* se basan casi exclusivamente en estudios con *D. melanogaster*. Líneas de laboratorio seleccionadas para una mayor longevidad también son más resistentes al estrés inanición (Rose y Archer, 1996), además de selección para la resistencia al estrés puede aumentar la longevidad (Rose et al, 1992; Hoffmann y Parsons, 1993). Además, mutantes de *D. melanogaster* con una longevidad aumentada por lo general son resistentes al estrés (Lin y Benzer, 1998). El gen chico en *D. melanogaster* codifica un sustrato del receptor de la vía de señalización de factor de crecimiento de tipo insulina (insulin/insulin-like growth factor (IGF)). Algunas mutaciones de chico extienden la longevidad hasta en un 48% y también aumentan la resistencia a la inanición en las hembras (Clancy et al., 2001). Sin embargo, estos resultados no siempre son coherentes, como se explica en el párrafo siguiente.

También hay evidencia de procesos que afectan a la resistencia a la inanición y la longevidad de forma independiente. Por ejemplo, la vía de señalización del blanco de

de Rapamycin (TOR) se cree que regula la longevidad (Tatar et al., 2003). Varios genes que participan en esta vía pueden ser manipulados para aumentar la esperanza de vida sin cambios asociados en la resistencia a la inanición (Kapahi et al., 2004). Por otro lado, la hormona adipocinética (AKHs, neuropéptidos metabólicos) también puede regular el comportamiento alimenticio en la inanición. Las moscas carentes de neuronas AKH carecían de hiperactividad frente a la inanición y también mostraron una fuerte resistencia a la falta de alimento en comparación con de moscas de tipo salvaje, pero no mostraron expectativa de vida mayor (Lee y Park, 2004).

Existe una base genética que explica el aumento de la abundancia de lípidos que está asociada con resistencia a la inanición y la longevidad en *D. melanogaster* (Chippindale et al., 1996). El mapeo de caracteres cuantitativos (QTL) arroja evidencia de que muchos genes que determinan la resistencia a la inanición están involucrados en la acumulación de lípidos (Harbison et al., 2004). Por otra parte, los estudios fisiológicos de los mutantes indican que el aumento en la resistencia a la inanición puede estar asociado con cambios metabólicos que conducen a la acumulación de lípidos (Hader et al., 2003). El mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTL) indican que varios genes que explican la resistencia a la falta de alimento también están involucrados en la acumulación de lípidos (Harbison et al., 2004).

Cuando los recursos alimenticios son inadecuados o no comestibles, se llega a condiciones de inanición severa. Esto representa una forma significativa de estrés biológico, que probablemente padecen la mayoría de los organismos en diversas poblaciones naturales de una amplia variedad de taxa (White, 1993; Harshman y Schmid, 1998; Harshman et al, 1999; Rion y Kawecki de 2007). En respuesta a las alteraciones en el medio ambiente, incluidos los periodos de hambre o malnutrición, los organismos han evolucionado mecanismos fisiológicos de adaptación que alteran el

fenotipo para promover la supervivencia (Djawdan et al, 1998; Harshman y Schmid, 1998; Rion y Kawecki, 2007). Una respuesta adaptativa a la inanición puede lograrse a través de una respuesta fisiológica coordinada que involucra una reducción en el metabolismo más la conservación de las reservas energéticas (Harshman y Schmid, 1998). Esto se logra, en parte, mediante el almacenamiento de alimentos en momentos en que la comida es abundante para permitir el aumento de las reservas energéticas cuando los recursos alimenticios son más reducidos (Chippindale et al, 1996; Hoffman et al, 2005; Rion y Kawecki de 2007). Además, una reducción en la tasa metabólica y el movimiento es una manera de conservar energía durante los períodos en que la comida es escasa (Harshman y Schmid, 1998; Knoppien et al, 2000; Williams et al, 2004).

Tanto larvas como adultos poseen un cuerpo graso que se ocupa de funciones similares. En contra de la ubicación discreta de la grasa corporal en las larvas, el cuerpo de un adulto la grasa esta más dispersa en todo el organismo (Bharucha, 2009). Hojas de tejido adiposo compuesto por adipocitos se distribuyen por debajo de la cobertura que rodea el intestino y el tracto reproductivo dentro de cada mosca (Arrese y Soulages, 2010; Hong y Park, 2010). Los lóbulos finos del tejido graso se mantienen muy cerca de la hemolinfa, lo que permite un intercambio eficaz de nutrientes entre la grasa corporal y la hemolinfa (Arrese y Soulages, 2010). Dentro de la grasa corporal, la capacidad de la lipogénesis es mayor que la síntesis de glucógeno, con gotas de lípidos que ocupa la mayor parte del citoplasma. El espacio que queda dentro del cuerpo graso se compone de una pequeña concentración de gránulos de glucógeno y proteínas (Arrese y Soulages, 2010).

El metabolismo intermedio se modula en el cuerpo graso a través de la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, la síntesis de proteínas y catabolismo de aminoácidos y nitrógeno (Arrese y Soulages, 2010). Con el fin de

regular de manera eficiente las actividades metabólicas, el cuerpo graso debe poseer sensores de nutrientes para determinar el estado nutricional del organismo. Transportadores de aminoácidos situados en la membrana de cuerpo graso actúan como sensores de nutrientes estimulando al cuerpo graso a almacenar los alimentos cuando el alimento es abundante, y a la liberación de energía durante las horas de privación de nutrientes (Arrese y Soulages, 2010). La regulación del metabolismo de los hidratos de carbono en el organismo se produce en el cuerpo graso. Ahí se generan señales para estimular a las células productoras de insulina en el cerebro a segregar péptidos de tipo insulina, y esto promueve la captación y el almacenamiento de hidratos de carbono (Leopold y Perrimon, 2007; Bharucha 2009, Hong y Park, 2010).

Una de las principales funciones del tejido graso en *Drosophila* es almacenar lípidos en forma de triglicéridos (Hong y Park, 2010). Aproximadamente el 6,5% del peso corporal adulto de *Drosophila melanogaster* está compuesto de lípidos (Baker y Thummel, 2007) con una proporción de masa seca que corresponde a los lípidos del aproximadamente 50% (Arrese y Soulages, 2010). Los triglicéridos almacenados en el individuo derivan de la dieta de los hidratos de carbono, ácidos grasos, o proteínas a través de varias conversiones metabólicas (Arrese y Soulages, 2010). Durante periodos prolongados de hambre se liberan ácidos grasos, a través de la acción de la lipasa Brummer que se encuentra en la superficie externa de la gota de lípidos (Baker y Thummel, 2007). Los lípidos derivados del tejido graso son liberados a la hemolinfa en forma de diacilgliceroles que más tarde puede ser clivados para liberar ácidos grasos para su conversión en acetyl-CoA utilizado en la síntesis de ATP (Arrese y Soulages, 2010).

## 1.8 El modelo de estudio

*Drosophila melanogaster* (subgénero *Sophophora*, grupo *melanogaster*, subgrupo *melanogaster*) es otra de las especies que será utilizada en este trabajo. Esta especie de distribución cosmopolita fue adoptada como modelo de experimentación genética por el científico norteamericano Thomas Hunt Morgan a principios del siglo XX a partir de sus investigaciones con moscas mutantes. Desde entonces, *D. melanogaster* ha sido la especie más ampliamente utilizada como organismo modelo para estudios genéticos.

Una de las especies que será utilizada como modelo en este trabajo de tesis es *Drosophila buzzatii* (subgrupo *mullieri*, complejo *buzzatii*, cluster *buzzatii*). Esta especie cactófila habita principalmente zonas áridas y semiáridas desde bajas hasta altas elevaciones de Argentina (e.g., Fontdevila et al., 1988; Hasson et al., 1992; Fanara et al., 1999) y se encuentra principalmente asociada a cactus del género *Opuntia* (subfamilia *Opuntioideae*), en especial a *O. sulphurea* y *O. quimilio* (Hasson et al., 1992; Fanara et al., 2004). Las hojas en descomposición de estos cactus son usadas como sitios de alimentación y oviposición por *D. buzzatii*. La conocida ecología y patrón de reproducción de esta especie cactófila (Barrer et al., 1990; Etges, 1990; Hasson et al., 1992, 1995; Fanara et al., 1996, 1999; Powell, 1997) proveen una excelente oportunidad para estudiar diferentes aspectos evolutivos de la adaptación al ambiente y en particular, para explorar la evolución de la longevidad y su relación con la tolerancia al estrés ambiental (Norry y Loeschcke 2002a, 2002b, 2003, Sørensen y Loeschcke 2001, Sørensen et al 2005a, 2007 y otros caracteres de historia de vida.



*Drosophila* es un sistema modelo para el análisis de las respuestas evolutivas a las temperaturas extremas (ej., Maynard-Smith, 1956; Hollingsworth y Bowler 1966; David et al., 1983; Hoffman y Parsons, 1991; Norry et al., 1994). Además, su fácil manejo, corto ciclo de vida y cría económica facilitan analizar experimentalmente diversos caracteres relacionados con la aptitud, entre ellos la longevidad, ayudando a la comprensión de su adaptación a distintos ambientes. Asimismo, *Drosophila* es un organismo modelo para elucidar la base genética de la termotolerancia en ectotermos (ej., Loeschcke et al., 1997; Weeks et al., 2002; Hoffmann et al., 2002a; Norry et al., 2004; Morgan y Mackay, 2006). Por ejemplo, los genes de la respuesta fisiológica al estrés por calor han sido descubiertos en este modelo. Además, esta especie posee características genéticas deseables tal como un complemento cromosómico pequeño constituido por cuatro pares de cromosomas fácilmente observables dada su estructura politénica presente en las glándulas salivales. El estudio de los cromosomas politénicos de *D. melanogaster* ha permitido determinar la posición relativa de varios genes y marcadores moleculares a través de sus frecuencias de recombinación con genes o marcadores vecinos. Otra de las características que convierte a esta especie en un excelente modelo es que el genoma de *D. melanogaster* ha sido secuenciado y anotado (Adams et al., 2000). Además contamos con la base de datos flybase donde contamos con una extensa información de la función de sus genes (FlyBase Consortium 2003).

Este organismo modelo representa uno de los principales organismos de reproducción sexual sobre los cuales se estudian la base genética de la resistencia al estrés y su conexión con la longevidad (ej., Maynard-Smith, 1956; Loeschcke et al., 1997; Bettencourt et al., 1999; Weeks et al., 2002; Hoffmann y Parsons, 1991; Hoffmann et al., 2002a,b). Como se mencionó previamente, la longevidad media de *D.*

melanogaster a la temperatura benigna de 25°C puede llegar a aumentar más del 15% si las moscas son tratadas experimentalmente con un moderado estrés de calor.

---

### **1.9 Objetivo General:**

El objetivo general, al cual contribuyen los objetivos específicos de la presente tesis doctoral, es elucidar la base genética y molecular que relaciona el proceso de envejecimiento, la tasa de senescencia y los mecanismos de la respuesta al estrés ambiental a través de reino animal. *Drosophila* es utilizada como un organismo modelo, el estrés por calor y la falta de alimento como modelos de estrés

---

# Capítulo 2: Mapeo de QTL

## **2.1 - Introducción al mapeo de QTL para un diseño RIL**

### **Mapeo genético de la longevidad a 25°C, sensibilidad térmica sobre la longevidad y el estrés por hambre en el modelo *Drosophila*.**

---

#### **2.1.1 Los caracteres mapeados**

A menudo, los fenotipos de las plantas y los animales se ven influidos por muchos genes en lugar de un único locus (Falconer y Mackay 1996, para una revisión general). Estos rasgos se denominan caracteres cuantitativos y los lugares o regiones del genoma que influyen en estos rasgos son loci de caracteres cuantitativos, abreviado en adelante como QTL. Las líneas recombinantes endogámicas (RIL) pueden utilizarse para identificar QTL como regiones del genoma que explican un componente importante de la variación genética que segrega.

Tanto los caracteres morfológicos como los caracteres de historia de vida, como la resistencia al estrés, caracteres metabólicos, fertilidad y la longevidad pueden ser mapeados por medio del mapeo de Loci de Caracteres Cuantitativos (QTL) (Mackay, 2004). *Drosophila* es una herramienta fundamental para resolver el desafío de entender cómo interactúan múltiples loci que afectan a los caracteres complejos. El mapeo de (QTL) responsables de la variación natural es facilitado por la posibilidad de criar grandes cantidades de moscas, y por la construcción de líneas recombinantes

endogámicas (RIL). Los test de complementación en stocks con deficiencias permite un mapeo QTL de alta resolución, y la complementación de mutantes permite identificar genes candidatos. Finalmente, los estudios de la transcripción de genomas completos facilitan la identificación de genes que afectan a caracteres cuantitativos (Mackay 2004).

La longevidad es un rasgo típico cuantitativo, controlado por múltiples genes cuyos efectos están condicionados a los ambientes genéticos, sexuales y externos. El mapeo de QTL es una importante herramienta utilizada en *D. melanogaster* que pueden identificar regiones del genoma en las que se encuentran genes relevantes para la longevidad (Nuzhdin et al, 1997, 2005, Vieira et al, 2000. Leips y Mackay, 2000, 2002; Curtsinger y Khazaeli 2002; Wang et al 2004, Chao-Qiang Lai 2006; Vermeulen y Loeschcke 2007). Con respecto a la longevidad, los tres cromosomas mayores de *D. melanogaster* contienen QTL que contribuyen a la variación de la longevidad, la mayoría de estos trabajos estudiaron a la longevidad en ambientes de sexos juntos, pero en esta tesis se realizó un estudio de QTL para la longevidad en ambiente de sexos separados. A lo largo de varios estudios, Mackay y colegas encontraron al menos 23 QTL que explican la longevidad a lo largo del genoma de *D. melanogaster* (Nuzhdin et al, 1997, 2005, Vieira et al, 2000; Leips y Mackay, 2000, 2002). Muchos de estos QTL para la longevidad resultaron ser específicos del ambiente (Vieira et al, 2000). Como se mencionó anteriormente, todos los estudios previos se realizaron en ambientes de sexo mezclado. Para remover experimentalmente los efectos de la actividad reproductiva en esta tesis estudiamos la base genética de la longevidad pero esta vez en ambiente de sexo único en moscas control y en moscas que recibieron un tratamiento previo de calor. Con esto es interesante determinar si los QTL para la longevidad en condiciones de control y condiciones de estrés por calor, se mantienen. Este organismo modelo ha

sido utilizado también para el mapeo de QTL de la variación en la resistencia al estrés nutricional o por falta de alimento en adultos. Para este carácter también se han encontrado QTL que mapean en los tres principales cromosomas de *Drosophila* (Wang 2004, Harbison 2005, Nuzhdin SV 2007). Poco se sabe acerca de los QTL que explican la sobrevivencia de las larvas en medio pobre en alimentos.

La resistencia a la inanición es un carácter cuantitativo típico que muestra una considerable variación genética en *Drosophila* (Service y Rose 1985; Da Lage et al 1990; Hutchinson y Rose 1991; Hutchinson et al 1991; Toda y Kimura, 1997; van Herrewege y David de 1997; Karan y Parkash 1998; Karan et al 1998; Hoffmann y Harshman, 1999; Harbison et al 2004) y responde a la selección artificial (Harshman y Schmid, 1998; Harshman et al 1999). La forma de resistencia al estrés que indirectamente responde a la selección para la longevidad es inconsistente (Torre, 1996; Harshman y Hoffmann, 2000), porque los experimentos de selección pueden tener resultados heterogéneos, lo que podría deberse a una serie de factores que incluye a la intensidad de la selección (Harshman y Hoffmann, 2000). En consecuencia, el mapeo de QTL puede ser un buen método para analizar la relación genética entre estos caracteres. En este caso sería interesante encontrar QTL que sean compartidos entre la supervivencia a la inanición y la longevidad, es decir que existan QTL que dan cuenta de la variabilidad de ambos caracteres y que mapeen en las mismas regiones o regiones superpuestas (colocalización de QTL). También es interesante analizar el signo de los QTL que colocalizan para dos caracteres. Si comparten signo quiere decir que esa región afecta de la misma manera a ambos caracteres, aumentando o disminuyendo los valores fenotípicos de los caracteres en cuestión. Harbison et al. (2004) identificaron 383 inserciones de elementos P que afectan la resistencia a la inanición y encontraron

13 loci (seis con los efectos específicos por sexo) que contribuyen a una diferencia en la resistencia a la inanición entre dos cepas endogámicas de laboratorio.

En el presente trabajo se realizó un mapeo de QTL para varios caracteres a través de un diseño de líneas RIL disponibles en el laboratorio, estos son la longevidad medida a 25°C con y sin un pre-tratamiento de estrés por alta temperatura y la resistencia al estrés por falta de alimento tanto en moscas adultas como en larvas. El análisis se llevó a cabo empleando un diseño de mapeo del intervalo compuesto usando el programa QTL- Cartographer versión v2.5 para Windows (Wang et al 2009), para un diseño Ri2 con cinco marcadores de control y un tamaño de ventana de 10 cM. Se exploraron los efectos de alterar la combinación inicial de los valores de los parámetros. Las posiciones de los QTL detectados con los valores default de los parámetros fueron consistentes a lo largo de una amplia combinación de valores. Los umbrales de significación fueron determinados por 1000 permutaciones al azar.

Por último, las interacciones epistáticas fueron evaluadas utilizando un modelo lineal:  $y = m_x + m_y + m_x m_y + e$ , donde  $m_x$  y  $m_y$  son los genotipos de los marcadores x e y, respectivamente (Morgan y Mackay 2006).

---

### **2.1.2 Mapeo de loci de caracteres cuantitativos-Fundamentos**

Muchos loci de caracteres cuantitativos (QTL) se identificaron de forma fortuita, al descubrirse por casualidad por tener efectos muy grandes sobre el carácter. Estos incluyen las mutaciones morfológicas de efecto grande de la genética clásica que surgieron por mutación tanto espontánea como dirigida.

El principal objetivo del mapeo de QTL es la identificación de regiones del genoma que contengan genes que contribuyan a la variación fenotípica de caracteres cuantitativos de interés (revisado en Falconer y Mackay, 1996; Mackay, 1996; Lynch y Walsh, 1998). Esta herramienta permite explorar la arquitectura genética de estos caracteres, a través de la identificación del número y propiedades de las regiones QTL, las cuales constituyen el material sobre el cual actúa la selección natural (Falconer y Mackay, 1996). En el contexto de los programas de selección artificial, este conocimiento es fundamental para mejorar la eficacia de programas de selección artificial, en especial para caracteres de baja heredabilidad en especies de interés comercial. Asimismo, la tecnología transgénica puede ser aplicada a QTL previamente identificados. El mapeo de QTL constituye también una herramienta útil para la identificación de alelos que causan predisposición a enfermedades o susceptibilidad a diversos tipos de estrés o incluso aquellos involucrados en el proceso de senescencia (Falconer y Mackay, 1996).

Los diseños experimentales para estimar los efectos y las posiciones de los QTL son extensiones de los métodos comunes de cartografía de genes individuales y se basan en el desequilibrio de ligamiento entre los alelos del locus marcador y alelos de los QTL. Este desequilibrio es el fundamento principal del mapeo de QTL dado que esto crea asociaciones entre el marcador y el carácter, en donde los distintos genotipos para los marcadores presentan diferentes valores fenotípicos para el carácter influenciado por el QTL ligado. Por lo tanto, los requisitos necesarios para el mapeo de QTL son un mapa de ligamiento de loci polimórficos que cubra todo el genoma y la existencia de variación para el carácter cuantitativo bajo estudio dentro o entre poblaciones. Para ser útiles en este tipo de análisis, los marcadores deben cumplir con ciertos requisitos. Es deseable que los marcadores sean altamente polimórficos, deben ser neutrales,



abundantes y deben encontrarse espaciados entre sí de manera tal que los eventos de recombinación entre ellos ocurran a una frecuencia detectable para el tamaño de muestra y el diseño utilizado. Los microsatélites son muy abundantes y polimórficos y su detección mediante PCR permite construir mapas de forma más rápida y eficiente que otros marcadores, razón por la cual son muy utilizados. En la actualidad existen mapas de ligamiento con alta densidad de marcadores para los genomas de muchas especies de interés, tales como *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, y muchas especies de plantas y animales domésticos. El mapa de ligamiento es particular de cada estudio en particular, ya que depende de los eventos de recombinación que ocurrieron de manera aleatoria en la población/líneas utilizadas para el estudio, es decir, que depende de la historia de la población/líneas.

Conceptualmente el principio de identificación de QTL es sencillo. Consiste en la evaluación de los individuos en su genotipo para los marcadores y de los valores fenotípicos para el carácter cuantitativo de interés. En el caso que haya diferencias entre las medias fenotípicas de las clases genotípicas establecidas para el marcador, puede inferirse la presencia de un QTL ligado al marcador. Los loci marcadores pueden considerarse de forma aislada o simultáneamente. El número de QTL detectados por ligamiento con marcadores es siempre una subestimación del número de loci involucrados en la variación del carácter. Por ejemplo, dos QTL estrechamente ligados pueden identificarse como un solo QTL, si estos estuvieran en asociación; o no detectarse en absoluto si estuvieran en dispersión (Falconer y Mackay, 1996). Por este motivo, mientras menor sea la distancia genética entre el locus que afecta el carácter y el locus marcador, mayor será la asociación observada entre el marcador y el fenotipo y por lo tanto, mayor será la probabilidad de detectar un dado QTL. En la mayor parte de los experimentos, una distancia en el mapa de aproximadamente 20 cM es el límite de

resolución, de manera que lo que se detecta como un QTL es un segmento del cromosoma con esta longitud y que puede contener varios loci que afectan el carácter (Falconer y Mackay, 1996).

La aproximación al estudio genético de los caracteres cuantitativos es más fácil en organismos modelos que han sido descritos y caracterizados genéticamente. *Drosophila melanogaster* es uno de los organismos modelo que provee las herramientas necesarias para la identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTL) y para su caracterización a nivel molecular (Mackay, 2001). Por un lado, el profundo desarrollo de la biología molecular ha posibilitado la identificación de numerosos marcadores moleculares altamente polimórficos con localización física conocida en este modelo. Por otro lado, a lo largo de 40 años, *Drosophila* ha sido usada como organismo modelo para estudios moleculares y cuantitativos en genética de poblaciones, los cuales proveen un marco teórico donde interpretar los progresos recientes. Finalmente, la secuenciación y anotación del genoma completo de esta especie modelo (Adams et al., 2000) permite averiguar fácilmente qué genes candidatos mapean en la misma región que un QTL detectado.

---

### **2.1.3 Mapeo de loci de caracteres cuantitativos-Diseños y análisis**

Los diseños aplicados para el mapeo del QTL son habitualmente clasificados de dos maneras. Una manera de clasificación es caracterizar a los diseños por el tipo de poblaciones involucradas en los cruzamientos utilizados para generar el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores y el QTL a detectar (diseño F2, retrocruza, RIL, etc.). Para la obtención de líneas RIL se establecen a través de múltiples generaciones de

apareamiento entre hermanos enteros. El diseño de RIL es el que brinda mayor resolución como consecuencia de que el mapeo de numerosas líneas recombinantes entre ambas líneas parentales con un número muy superior de rondas de recombinación que para los diseños de retrocruza y  $F_2$  (Falconer y Mackay, 1996). Las líneas RIL obtenidas poseen muy poca varianza genética intra-línea, mientras que la varianza genética entre las líneas es considerable, dado que cada RIL representa un genotipo multi-locus diferente (Lynch y Walsh, 1998).

Los diseños experimentales pueden ser clasificados también de acuerdo a la cantidad de loci marcadores utilizados en el análisis. De esta manera, las asociaciones entre los marcadores y el carácter fenotípico de interés pueden ser evaluadas utilizando uno, dos o múltiples genotipos marcadores. Los diseños de mapeo del intervalo y mapeo de marcador único pierden precisión y pueden introducir sesgos cuando existen múltiples QTL que se encuentran ligados al marcador o intervalo marcador en consideración. Los métodos que consideran simultáneamente tres o más loci marcadores aumentan la precisión en la estimación de la ubicación y el efecto de los QTL. El diseño de mapeo del intervalo compuesto (Zeng 1993, 1994; Jansen, 1993; Jiang y Zeng, 1995) considera al mismo tiempo un intervalo de marcadores y además considera marcadores simples fuera del intervalo en cuestión en cada análisis, de manera que con  $n$  marcadores, se llevan a cabo  $n - 1$  pruebas de asociación entre el intervalo y el carácter. Tanto el diseño de mapeo del intervalo como el de mapeo del intervalo compuesto requieren la utilización de programas computacionales específicos y desarrollados para tal fin.

La estimación y detección de los QTL puede hacerse a través de modelos lineales tales como ANOVA o regresión. La detección de QTL puede llevarse a cabo también a través de métodos de máxima verosimilitud. Mientras que los modelos

lineales utilizan las medias de los marcadores, los métodos de máxima verosimilitud utilizan información detallada de la distribución de la relación entre marcador y carácter, brindando mayor potencia al análisis.

Para evaluar si un QTL se encuentra ligado al/los marcadores se calcula la razón de probabilidad como:

$$LR = -2\ln [\max l_r(z)/\max l(z)]$$

donde  $\max l_r(z)$  es el máximo de la función de probabilidad bajo la hipótesis nula de que ningún QTL está segregando (Lynch y Walsh, 1999). Esta prueba estadística aproxima a una distribución  $X^2$  con dos grados de libertad para el caso del diseño RIL. La probabilidad de que exista un QTL en una posición particular del mapa puede representarse graficando la razón de probabilidad en función de la posición de mapa del putativo QTL. Lander y Botstein (1989) introdujeron esta idea utilizando el “LOD scores” (“likelihood of odds”, Morton, 1955). El LOD score para una posición particular del genoma (c) se relaciona con la razón de probabilidad (LR) a través de:

$$LOD(c) = \log_{10} [\max l_r(z)/\max l(z, c)]$$

donde  $\max l(z, c)$  representa el máximo de la función de probabilidad dado un QTL con una frecuencia de recombinación c respecto al marcador (Lynch y Walsh, 1999). La estimación de la máxima probabilidad de c es aquella que produce el máximo valor sobre la probabilidad de mapa, y los valores para la media del QTL y la varianza que maximiza la probabilidad dado dicho valor de c, son la estimación de la máxima probabilidad para el efecto del QTL. De esta manera, la detección de un QTL y la estimación de su posición están acopladas. Si la razón de probabilidad excede el umbral crítico para un dado cromosoma, entonces se considera que existe un QTL ligado, cuya posición es estimada por el pico de la probabilidad de mapa. Si el pico no supera dicho valor umbral, entonces no existe evidencia de un QTL ligado.

## **2.1.4 Objetivos**

### **Objetivo General:**

El objetivo general, al cual contribuyen los objetivos específicos de la presente tesis, es investigar la base genética de la longevidad a temperatura benigna, la hormesis inducida por calor y la tolerancia a la inanición mediante mapeo de QTL utilizando a *Drosophila melanogaster* como un organismo modelo.

### **Objetivos específicos:**

Análisis genético de la longevidad en condiciones de control (25°C) como así también de la longevidad de moscas que recibieron un estrés sub-letal de calor, mediante la utilización de líneas recombinantes endogámicas (RIL) en *D. melanogaster*. Esta tesis también incluye como objetivo el análisis de la resistencia a la falta permanente de alimento en adultos y a la malnutrición en larvas para el mapeo de QTL (Quantitative Trait Loci) de dichos caracteres. Estos análisis pondrán especial énfasis en buscar regiones genómicas (QTL) que sean comunes para estos importantes caracteres mencionados ya que los mismos suelen estar genéticamente correlacionados uno con el otro.

Otro de los objetivos específicos de esta tesis es el mapeo genético de carácter de razón al que se llama “sensibilidad al estrés térmico” de la longevidad y que se estimó como la razón entre la longevidad en condiciones de estrés térmico sobre la longevidad en condiciones de control. Este nuevo carácter comprende tanto efectos perjudiciales, neutros y beneficiosos del estrés por calor sobre la longevidad en el modelo *Drosophila*. A los efectos beneficiosos del estrés por calor sobre la longevidad es lo que se conoce también como los efectos horméticos. Para esos objetivos se

utilizará una serie adecuada de líneas recombinantes endogámicas (RIL) de *D. melanogaster* disponibles en nuestro laboratorio GERES bajo la dirección de Fabián Norry, originalmente descritas en Norry et al (2008) como RIL-D48 y RIL-SH2. El fenómeno de hormesis ha sido demostrado en múltiples organismos, incluyendo nematodos, humanos y moscas, y se define como el efecto beneficioso que tienen moderados niveles de estrés sobre caracteres interesantes de la aptitud (o "*fitness*") tales como la longevidad y la tasa de envejecimiento (Figura 1.1). Dado que la base genética de la hormesis sobre la longevidad no se conoce, el estudio presente utilizará un mapeo con líneas RIL para descubrir QTL para la extensión del tiempo de vida inducida por sub-letales tratamientos de estrés por calor.

Finalmente, otro de los objetivos que me propongo es además de estudiar la resistencia a la inanición o al hambre en adultos (RH), analizar genéticamente la sobrevivencia a un medio pobre (MP) o malnutrición en larvas mediante la utilización de líneas recombinantes endogámicas (RIL) para un mapeo de QTL (Quantitative Trait Loci) de dicho carácter en *D. melanogaster*, utilizando las líneas RIL mencionadas arriba que difieren para múltiples caracteres. En particular, es interesante estudiar si las regiones de QTL que afectan a la malnutrición en larvas son las mismas que afectan a la RH en los adultos.

---

### **2.1.5 Hipótesis:**

Las hipótesis que se ponen a prueba en esta tesis se dividen en tres bloques. El primero concerniente al mapeo de la longevidad, tanto en condiciones de control como luego de un pretratamiento de estrés térmico y un carácter de razón que evalúa la

sensibilidad de la longevidad frente al estrés por alta temperatura. El segundo cuerpo de hipótesis son las que están relacionadas con otro carácter que es la resistencia o sobrevivencia a la inanición o malnutrición. Este carácter va a ser evaluado tanto en adultos como en larvas. Por último, evaluaremos hipótesis referidas a las posibles relaciones entre los caracteres mapeados.

Sobre la longevidad: En esta tesis se realiza un mapeo de QTL para la longevidad a 25°C en un ambiente de sexos separados, con y sin un pretratamiento subletal de estrés por calor. Para ello se utilizaron las ya mencionadas RIL-D48 y RIL-SH2 que fueron construidas a partir de moscas seleccionadas por estrés por calor (Norry et al 2008).

Primero, se evaluará si la longevidad a 25°C en las RIL de *D. melanogaster* es un carácter con varianza genética, que puede ser heredable.

Segundo, se evaluará si existen QTL para la longevidad medida a 25°C con y sin pretratamiento de calor, como así también para el carácter de razón entre las longevidades.

Tercero, se evaluará la hipótesis de que los QTL detectados para los antedichos caracteres mapean en las mismas regiones que genes candidatos sobre el genoma secuenciado y anotado de *D. melanogaster*.

Cuarto, se evaluará si un tratamiento de calor repetido (35.5°C por 35 min, dos veces a edades tempranas) tiene efectos detrimentales u horméticos sobre la longevidad para diferentes RIL.

Quinto, se evaluará si los QTL detectados para la longevidad medida en condiciones de control (siempre a 25°C) son los mismos o no que los QTL que explican la variabilidad de la longevidad cuando es medida luego de un estrés por calor.

Sobre la resistencia al hambre: Realizamos un mapeo de QTL para la resistencia al hambre en larvas y adultos de *D. melanogaster*. Para esto utilizamos un stock de líneas recombinantes endogámicas (RIL) en que fueron construidas a partir de moscas seleccionadas por estrés por calor (Norry et al 2008). En esta tesis usamos un tratamiento severo (constante) en vez de uno no severo (cíclico) como previamente utilizamos en nuestro grupo (Gómez et al 2009) sobre las mismas líneas utilizadas ahora para medir la resistencia al hambre en adultos.

Primero, se evaluará si la resistencia a la falta de alimento en las RIL de *D. melanogaster* es un carácter genéticamente variable.

Segundo, se evaluará si existen QTL autosómicos o ligados al cromosoma X para resistencia al hambre en larvas y adultos de *D. melanogaster*.

Tercero, se evaluará la hipótesis de que los QTL detectados para los antedichos caracteres mapean en las mismas regiones que genes candidatos sobre el genoma secuenciado y anotado de *D. melanogaster*.

Cuarto, se evaluará si los QTL detectados para la resistencia al hambre en adultos son los mismos o no que los QTL que explican la variabilidad de la resistencia al hambre en las larvas.

Quinto, es interesante evaluar si los QTL que resulten significativos en este estudio colocalizan (solapan) o no con el QTL encontrado por Gómez et al (2009) donde se utilizaron las mismas RIL pero un tratamiento de privación de alimento diferente (falta de alimento cíclica en lugar de permanente). Los QTL que colocalicen entre ambas mediciones serán QTL generales que estén explicando la variabilidad en la resistencia o sobrevivencia a la inanición, en vez de ser específicos del tratamiento utilizado.



Sobre la relación entre la longevidad control, la longevidad con pretratamiento de calor y la resistencia o sobrevida a la inanición o malnutrición:

Primero, se evaluará la posible correlación positiva entre la longevidad y la resistencia o sobrevida a la malnutrición en el insecto modelo *D. melanogaster*.

Segundo, se evaluará si existen QTL que colocalicen entre los tres caracteres (la longevidad control, la longevidad con pretratamiento de calor y la sobrevida a la inanición o malnutrición).

---

## **2.2-Materiales y métodos RIL y mapeo de QTL**

---

La totalidad de la construcción y genotipado de las líneas recombinantes endocriadas (RIL) utilizadas en la presente tesis fue realizada por otros investigadores previamente al inicio de mis actividades en el grupo de investigación GERES, FCEyN-UBA.

---

### **2.2.1 Origen de las líneas**

Las líneas parentales utilizadas para la construcción de las RIL fueron utilizadas dos líneas altamente homocigotas y divergentes. Estas líneas, llamadas SH2 y D48 provienen de poblaciones naturales australiana y danesa respectivamente descritas en Norry et al. (2004). Estas líneas fueron obtenidas por selección artificial sobre la

Resistencia al coma por alta temperatura (RCAT) y posterior endocría. La línea parental SH2 fue elegida de entre 23 líneas endocriadas previamente seleccionadas para alta RCAT. De la misma manera, la línea parental D48 fue elegida de entre 42 líneas endocriadas que habían sido seleccionadas para reducir la RCAT (ver Norry et al 2004 para más información). El criterio de elección de las líneas parentales se basó en, por un lado, la cantidad de marcadores informativos, como también en los valores fenotípicos de las líneas en cuestión.

---

### **2.2.2 Construcción de las líneas recombinantes endocriadas (RIL)**

La construcción y el genotipado de cada RIL fueron realizadas por otros investigadores, por lo que no es parte de esta tesis, y se describen en Norry et al (2008)”. Aquí se menciona de manera resumida la construcción. A partir de las líneas parentales seleccionadas, se cruzaron las líneas D48 y SH2-2. Cuatro hembras vírgenes de la F1 resultante fueron retrocruzadas con 7 machos de cada una de las respectivas líneas parentales para generar dos poblaciones de retrocruza. A cada una de estas poblaciones de retrocruza se les permitió aparearse libremente por otras dos generaciones. Después de la última generación de apareamiento aleatorio, se procedió a fundar líneas recombinantes endocriadas (RIL). Las RIL fueron iniciadas fundándose 100 parejas únicas para cada retro-cruza (RT) y se establecieron mediante sucesivas rondas de apareamiento entre parejas de hermanos enteros durante 15 generaciones (Figura 2.1). Todas las líneas RIL fueron construidas y mantenidas a 25°C y un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas, en tubos plásticos de 80 x 20 mm conteniendo 6 ml de

medio de cultivo estándar. Para esta tesis usamos 32 RIL para D48 (denotadas RIL-D48) y 21 RIL para SH2 (denotadas RIL-SH2).

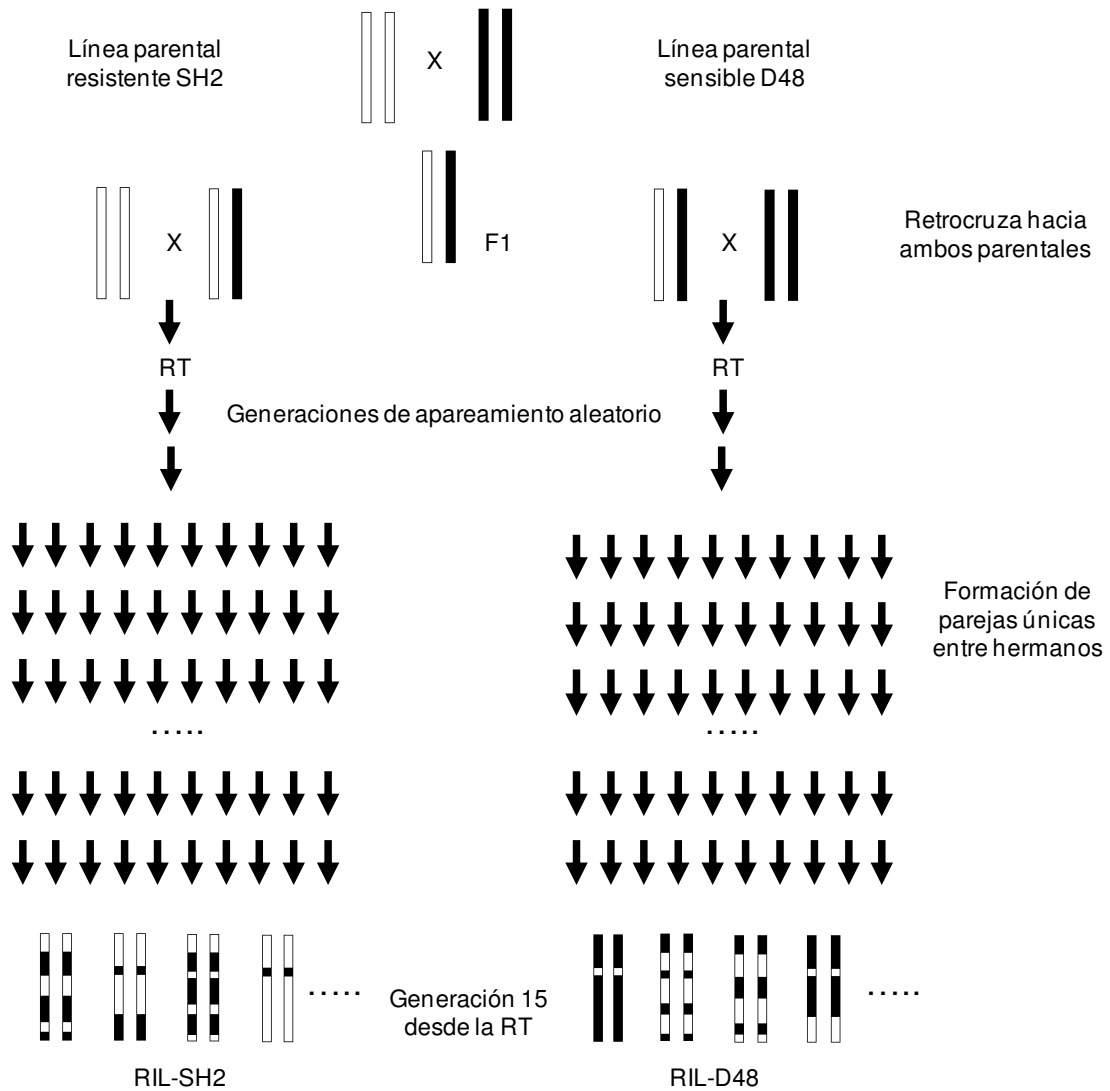


Figura 2.1. Esquema del diseño de cruzamientos empleado para la construcción de las líneas recombinantes endocriadas (RIL) descritas en Norry et al. (2008), que fueron luego utilizadas en la presente tesis para el mapeo de QTL para longevidad a 25°C (con y sin pre-tratamiento de calor) y la resistencia a la inanición en larvas y adultos de *D. melanogaster*.

### 2.2.3 Marcadores moleculares y genotipado

Los microsatélites (repeticiones en tándem de secuencias únicas) son marcadores moleculares muy buenos para el mapeo de QTL dado que poseen ciertas características deseables: neutralidad respecto al carácter bajo estudio, co-dominancia, alto nivel de polimorfismo y amplia distribución a lo largo de todo el genoma. La neutralidad del marcador es necesaria para descartar la existencia de un componente de varianza fenotípica debido al genotipo del marcador, mientras que la co-dominancia es necesaria para poder identificar todos los posibles genotipos del marcador (e.g entre el heterocigota y cualquiera de los dos homocigotas). Por estos motivos, los microsatélites fueron los marcadores elegidos en Norry et al (2008) para el genotipado de las líneas RIL utilizadas en este estudio. La información sobre el mapa citológico y genético de los marcadores asociados a las líneas RIL-D48 y RIL-SH2 se detalla en la Tabla 2.2. Las tasas de recombinación ( $r$ ) entre los marcadores fueron estimadas en Norry et al. (2008) como  $r = 1 / (4/R - 6)$ , donde  $R$  es la proporción de las líneas RIL que exhibieron un evento de recombinación entre marcadores (Silver, 1985). La posición de mapa de los marcadores en cM fueron estimados a partir de las frecuencias de recombinación ( $r$ ) usando la función de mapa de Kosambi:  $100d = \frac{1}{4} \ln [(1 + 2r) / (1 - 2r)]$  (Norry et al., 2008). La distancia promedio entre marcadores en el mapa estándar de *D. melanogaster* es de 8 cM, sin embargo la generación de RIL resultó en un mapa expandido (Tabla 2.2). Las distancias de mapa fueron promediadas sobre todas las líneas RIL (RIL-SH2 y RIL-D48), utilizando más líneas RIL que las utilizadas en la presente tesis. El mapa genético para RIL es expandido en relación al mapa de retrocruza porque suceden más eventos de recombinación durante su construcción.

Para el genotipado de las líneas RIL, se extrajo separadamente el ADN del cuerpo completo de dos machos y dos hembras de cada línea. Las extracciones se llevaron a cabo en el laboratorio de Genética Evolutiva de la Resistencia al Estrés y Senescencia (GERES) utilizando el kit Puregene (Gentra Systems) y siguiendo el protocolo para una única mosca que se indica para dicho kit (<http://gentra.com>). El ADN purificado de cada individuo fue conservado a -20°C. La extracción de ADN y el genotipado con loci de microsatélites no fue parte de este trabajo doctoral. El mismo fue realizado como se describe en Norry et al. (2008) mediante PCR con primers marcados y posterior secuenciación automática. La totalidad del genotipado y la obtención del mapa genético resultante (Tabla 2.2) fue realizado por Fabián Norry en colaboración con Volker Loeschcke del Aarhus Centre for Environmental Stress (Dinamarca).

Tabla 2.2. Lista de loci de microsatélites utilizados por Norry et al. (2008) como marcadores moleculares para las líneas (RIL-D48 y RIL-SH2 de *D. melanogaster*). Las posiciones genéticas se dan en cM (reproducido del trabajo de Norry et al., 2008)

Marcador	Posición citológica	Posición genética	Acceso al GenBank
AFO47180	1B8	1-0	AFO47180§
X2297267gt	3A	1-2	- ‡
DS06577	3C1-C6	1-5	- *
DMU56661	4F1-F2	1-15	U56661§
DMU96440	7B3	1-21.7	U96440¶¶
DROSEV	10A1-A2	1-40	J03158+
X11347407ca	10C3	1-45	- §§
AC010705	12D-E	1-54	C01705¶¶
DMTROPINI	16F3-F6	1-71	X58188+
AFO17777	19F3-F6	1-85	AFO17777§
DROEXPAND	21C3	2-1	L14768+
DROYANETSB	22C	2-6.44	M97694+
AC009392	23A-E	2-10.98	AC009392++
DROGPDHA	25F5-26A	2-25	J04567+
DRONINAC	28A1-A3	2-37	J03131+
AC005889	30A3-A6	2-49	AC005889**
AC006302	34C4-D2	2-70	AC006302+
AC004759	38E1-E9	2-76	AC004759§
DROTG121	42A	2-80	J01139+
SU(Z)2	49C	2-97	X56798+
DMMMASTER	50C	2-100	X54251+
DS00361	54B1-B2	2-115	- *
AC004307	56D11-E6	2-129	AC004307¶¶, ++
DS08011	59A1-A2	2-142	DS08011+
DMRHOb	62A	3-0.1	X52454§
AC004658	63D2	3-9	AC004658§
3L5235154gt	64D	3-17	- §§
AC008198	66D10-E2	3-34	AC008198¶¶
3L9222187ca	67A	3-45	- ¶¶¶¶
DM22F11T	73A1-B7	3-59	Z83456§
DROPROSA	86E3	3-71	D10609++
DMEHAB	90B1-B2	3-84	X72303+
DRONANOS	90E-F	3-95	M72421+
DMTF125	95C6-C8	3-112	X98235++
3R23156893gt	97F	3-128	- §§
DMU43090	99D6-D9	3-140	U43090§

\*Schlotterer et al. (1997); +Schug et al. (1998); †Harr et al. (1998); §Colson et al. (1999); ¶¶Isabelle Colson (no publicado); \*\*Gockel et al. (2001); ++Gockel et al (2002); ‡ Kauer et al (2002); §§Kauer et al (2003); ¶¶¶Kauer y Schlotterer (2004).

---

#### 2.2.4 Medición y análisis de la longevidad

Todos los individuos experimentales fueron crecidos a  $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$  en botellas estándar (botellas de vidrio de 125 ml conteniendo 40 ml de medio de cultivo por botella bajo condiciones de 12:12 horas de luz/oscuridad. El medio de cultivo fue preparado a base de papa disecada, levadura seca, azúcar, nipagin y agua destilada. Después de la eclosión, los individuos experimentales fueron colectados, separados por sexo usando una anestesia de  $\text{CO}_2$  y mantenidos en tubos estándar (tubos de 80 x 20 mm conteniendo 6 ml de medio de cultivo). La longevidad fue medida a  $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$  en cada RIL, con dos réplicas por sexo y RIL con 15-20 individuos por réplica.

Moscas tratadas: Un set de individuos experimentales recibió un pre-tratamiento de calor de  $35.5^{\circ}\text{C}$  por 35 minutos dos veces en la vida adulta de las moscas, a los 4 y 7 días después de la eclosión. Ese tratamiento fue elegido ya que tratamientos de calor en forma de repeticiones produce en algunas líneas niveles de hormesis considerables (ej, Hercus 2003). Además este tratamiento fue “sub-letal” ya que la mortalidad después del tratamiento fue del 0%. Para someter a las moscas al tratamiento de calor, se las trasladó a tubos experimentales vacíos y a estos se los sumergió en un baño conteniendo agua previamente regulada su temperatura en  $35.5^{\circ}\text{C}$ . La temperatura media en el interior del tubo fue  $35.5^{\circ}\text{C}$ . Después del pre-tratamiento de calor, las moscas fueron transferidas a tubos estándar con medio fresco de manera inmediata y mantenidas a  $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$  para medir la longevidad. Las muertes eran chequeadas cada dos o tres días (tres veces por semana) en el momento en que se transfirieron las moscas vivas por medio de un embudo a tubos estándar con medio fresco. Este procedimiento

se llevó a cabo hasta que murió la última mosca. A este grupo de moscas se las llamó moscas tratadas por calor y se realizaron dos réplicas con 15 a 20 moscas por réplica y por sexo. Para el mapeo de QTL se utilizó la longevidad media (en días) que fue estimada para cada RIL como el promedio de la longevidad media de cada réplica en las moscas tratadas.

Moscas control: Simultáneamente medimos la longevidad en moscas control, moscas que no recibieron el pre-tratamiento de calor y que fueron mantenidas a 25°C durante toda su vida. Como fue descrito más arriba, las muertes eran chequeadas tres veces por semana cuando, por medio de un embudo, las moscas vivas eran transferidas a tubos estándar con medio fresco. Este procedimiento se llevó a cabo hasta que murió la última mosca. A este grupo de mosca las llamamos moscas control y se realizaron dos réplicas con 15 a 20 moscas por réplica y por sexo. Para el mapeo de QTL se utilizó la longevidad media (en días) que fue calcula para cada RIL como el promedio de la longevidad media de cada réplica en las moscas control.

La variación en la longevidad media, así como cualquier posible interacción entre ambos paneles de RIL (RIL-D48 y RIL-SH2) y el pre-tratamiento de estrés por calor, se analizaron sobre datos de la longevidad transformados a logaritmo natural, con un ANOVA de tres factores. El panel de RIL (RIL-D48 vs. RIL SH2), el pre-tratamiento de calor (moscas tratadas vs. moscas control) y el sexo fueron considerados como factores fijos. Además, se realizaron pruebas t de Student por separado para cada RIL para comparar la longevidad media en moscas tratadas con las moscas de control.

La varianza genética de la longevidad de las RIL de *D. melanogaster* fue estimada a partir de la varianza entre líneas mediante ANOVAs de 2 factores con línea como efecto aleatorio y el pre-tratamiento de calor (moscas tratadas vs. moscas control) como efecto fijo. Se realizaron 4 ANOVA para cada sexo y panel de RIL.



En la medición de este carácter participaron otros integrantes del laboratorio: Federico Gómez, Alejandra Scannapieco, Pablo Sambucetti y Fabián Norry.

---

### **2.2.5 Medición y análisis de la resistencia a la inanición o al hambre**

Resistencia a la inanición o hambre permanente en moscas adultas (RH adultos): Todos los individuos experimentales fueron crecidos a  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  en botellas estándar (botellas de vidrio de 125 ml conteniendo 40 ml de medio de cultivo por botella; medio a base de papa disecada, levadura seca, azúcar, nipagin y agua destilada) bajo condiciones de 12:12 horas de luz/oscuridad. Después de la eclosión, los individuos experimentales fueron colectados, separados por sexo usando una anestesia de  $\text{CO}_2$  y mantenidos en tubos estándar hasta el momento que comenzó la medición (tubos de 80 x 20 mm conteniendo 6 ml de medio de cultivo).

Se midió la sobrevivencia a  $25^\circ\text{C}$  de 52 RIL (31 RIL-D48 y 21 RIL-SH2) bajo un tratamiento de privación de alimento. Para esto se utilizaron 4 tubos réplica con aproximadamente 20 individuos experimentales, de cuatro días de edad, por sexo y por RIL. Los individuos experimentales de 4 días de edad fueron colocadas en tubos de tubos de 80 x 20 mm con 6 ml de un medio sólido sin alimento (1.5% agar-agar). De manera, a los individuos experimentales se les proporcionaba la humedad necesaria para evitar la desecación, mientras que eran privadas de alimento. Durante el experimento, se chequeaba tres veces al día el número de moscas muertas por inanición, hasta que murió la última mosca. El valor de la resistencia al hambre en adultos (RH adultos) se calculó como la media del tiempo de sobrevivencia (en horas) promediando las réplicas para cada sexo y RIL.

La varianza genética de la RH en adultos de las RIL de *D. melanogaster* fue estimada a partir de la varianza entre líneas a partir de los ANOVAs de 1 factor con línea como efecto aleatorio. Se realizaron 4 ANOVA para cada sexo y panel de RIL.

Resistencia al hambre en larvas: Todas las moscas adultas fueron criadas como se describe arriba. Es decir, todos los individuos experimentales fueron crecidos a  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  en botellas estándar (botellas de vidrio de 125 ml conteniendo 40 ml de medio de cultivo por botella; medio a base de papa disecada, levadura seca, azúcar, nipagin y agua destilada) bajo condiciones de 12:12 horas de luz/oscuridad.

Se midió en cada RIL la sobrevivencia de larva a adulto en dos medios diferentes: control (MC) y pobre (MP). El medio control es un medio cocinado a base de levadura fresca, harina de maíz, azúcar, nipagin y agar. El medio pobre se prepara con los mismos ingredientes que el medio control, pero la harina de maíz y el azúcar se encuentran diluidas al 10% con respecto al medio control. Se realizaron pruebas piloto para determinar una dilución tal del medio, que cause una reducción significativa en la sobrevivencia, pero que no sea tan perjudicial, de manera de apreciar una variabilidad en la sobrevivencia de las larvas en medio pobre (MP). Se probaron medios diluidos al 40%, al 25%, al 15%, al 10% y al 5% y finalmente se eligió el medio diluido al 10% (ver ANOVA en resultados)

Se realizaron 6 tubos réplica por medio, sexo y RIL. En cada tubo se sembraron 20 larvas del primer estadio. Para obtener estas larvas se colocaron 20 moscas adultas dentro de un tubo con una cucharita de plástico conteniendo medio a base de agar y se las dejó ovipositar por 48 hs. Pasado ese tiempo se retiró la cucharita del tubo y bajo lupa se buscaron y colectaron larvas del primer estadio. Entre 11 a 20 días después de que se

sembraron las larvas, se contaron la cantidad de pupas y de adultos que emergieron de cada sexo, replica y RIL. Todos los cultivos se mantuvieron a 25 ° C.

La resistencia al hambre en pre-adultos (RH pre-adultos) se estimó como el porcentaje de supervivencia en MP, promediando sobre réplicas para cada RIL y sexo para emergidos. RH pre-adultos para cada tubo se calculó como el número de emergidos en MP de cada sexo, sobre total de larvas del primer estadio sembradas. Como se sembraron 20 larvas del primer estadio por tubo y suponiendo una proporción 1:1 entre sexos, el número total de larvas fue 10 para cada sexo. A unos pocos individuos emergidos (< 20% por réplica) no fue posible identificarles el sexo a causa de las moscas estaban muertas en el fondo del tubo y sus órganos genitales dañados. Estos individuos fueron considerados y anotados asumiendo una proporción de sexos 50:50.

La supervivencia de larva a pupa (datos no mostrados) también fué midió y analizado por mapeo de QTL. Los QTL significativos fueron los mismos en comparación con la supervivencia de larva a adulto, este análisis no se muestra. Otro fenotipo que se analizó fue un carácter de razón indexado como la razón entre los valores medios de emergido entre CM y SM para cada RIL y sexo. La variación en la supervivencia se analizó con un ANOVA de dos factores, con tratamiento (CM vs SM) y sexo como factores fijos para cada panel de RIL (RIL-D48 y RIL SH2).

La varianza genética de la RH en pre-adultos de las RIL de *D. melanogaster* fue estimada a partir de la varianza entre líneas a partir de los ANOVA de 1 factor con línea como efecto aleatorio. Se realizaron 4 ANOVA para cada sexo y panel de RIL.

En la medición de la RH en pre-adultos participó otro integrante del laboratorio: Carlos Ignacio Bertoli.

### 2.2.6 Mapeo y análisis de QTL

Se exploró la base genética de 2 caracteres de historia de vida en *Drosophila*. Se realizó un mapeo de QTL para identificar regiones que expliquen la variabilidad entre las RIL para la longevidad de *D. melanogaster*. Para esto se midió y se mapeo sobre todo el genoma (con excepción del cromosoma 4) de esta especie la longevidad media de machos y hembras por separado a 25°C en condiciones de control (siempre a temperatura constante) y en condiciones de estrés por calor (pre-tratamiento a 35.5°C dos veces en la vida por 30 minutos). Adicionalmente, se realizó un mapeo de QTL del carácter razón entre la longevidad medida en las dos condiciones mencionadas anteriormente. Este carácter de razón mide no solamente la hormesis inducida por calor sobre la longevidad, sino más bien la sensibilidad térmica. Lo llamamos sensibilidad térmica ya que el tratamiento de calor en las RIL produjo tanto efectos beneficiosos como perjudiciales y en algunas líneas no produjo efecto, dicho de otro modo, un efecto neutro (ni beneficioso ni perjudicial) sobre la longevidad media. El otro carácter que se mapeó fue la resistencia al hambre de *D. melanogaster*. Este carácter fue medido y analizado tanto en adultos como en larvas y en ambos sexos.

Para llevar a cabo dichos mapeos se utilizaron las líneas RIL mencionadas arriba. El mapeo de QTL fue realizado sobre los datos de las medias sin transformar estimadas para cada RIL, tanto para las mediciones de longevidad como las de resistencia a la falta de alimento, pero resultados similares se obtuvieron con los datos transformados. Para los caracteres de razón la transformación a logaritmo natural ( $\ln$ ) fue utilizada, de manera de mejorar la distribución de los datos, evitando los inconvenientes que pueden surgir de un carácter de razón (Atchley et al 1976). Los genotipos para los marcadores eran 0 o 2 indicando el número de alelos SH2 tanto para

RIL-D48 y RIL-SH2, para una determinada línea y marcador (Norry et al 2008). El valor 1 no fue asignado ya que las líneas eran altamente endogámicas, donde la homocigosis era casi total. Para identificar los QTL que contribuyen a la variación entre las líneas para cada uno de los caracteres estudiados se realizó un mapeo de intervalo compuesto (Zeng 1994).

Se utilizó el diseño RI2 en el programa QTL-Cartographer versión v2.5 (Wang et al 2011) para el mapeo de los caracteres cuantitativos. El diseño RI2 es el diseño apropiado para el análisis de QTL cuando se utiliza la metodología de RIL a partir de diseño de retrocruza como se describe en secciones anteriores. El mapeo por intervalo compuesto pone a prueba la hipótesis de que el intervalo entre dos marcadores adyacentes contiene un QTL que influye en el carácter, al mismo tiempo controlando los efectos de QTL fuera del intervalo que pone a prueba. Se utilizaron 5 parámetros de background con un tamaño de la ventana de 10 cM, aunque los efectos de la modificación de esta combinación inicial de los parámetros se analizaron también. Los umbrales de significación se determinaron con 1000 permutaciones al azar. En promedio, se espera que las moscas RIL-D48 tengan un 75% del genoma proveniente del parental D48, mientras que las moscas RIL-SH2 se espera que en promedio el 75% sus genes provengan del parental SH2 (Norry et al., 2008). Además de utilizar cada panel de RIL por separado en la detección de QTL, ambos paneles RIL se agruparon también para el análisis formando un “pool”. Se evaluó si existía epístasis entre regiones del genoma utilizando pares de marcadores genotipados para todas las posibles interacciones epistáticas utilizando un modelo lineal de  $y = m_x + m_y + m_x m_y + e$ , donde  $x$  y  $m_y$  son los genotipos de los marcadores  $x$  e  $y$  (Morgan y Mackay 2006).

### 2.2.7 Los genes candidatos

Los genes candidatos fueron identificados mediante el escaneo de genes de función comprobada y genes con función predicha computacionalmente contenidos dentro de cada región de QTL.

Para los QTL que resultaron significativos en el mapeo de la longevidad de las RIL de *D. melanogaster*, se buscaron loci con efectos conocidos sobre la esperanza de vida (los genes implicados en el metabolismo intermedio y señalización de la insulina, y los sistemas de respuesta al estrés, incluidos los genes involucrados en el heat shock y la respuestas de estrés oxidativo) en la base de datos FlyBase genontology (FlyBase Consortium 2003). También consideramos como genes candidatos, loci que han cambiado los niveles de expresión en líneas control frente a las líneas seleccionadas para aumentar la longevidad en estudios anteriores donde utilizaron un fondo genético intercontinental como en el presente estudio (Sørensen et al 2007).

Para los QTL que resultaron significativos en el mapeo de la resistencia al hambre de las RIL de *D. melanogaster*, buscamos genes candidatos que cambian su expresión en RIL con diferente resistencia al hambre y en líneas de control frente a las líneas seleccionadas aumentar para la resistencia al hambre en estudios previos (Sorensen et al 2005, 2007, Harbison et al 2005, Zinke et al 2002). También, hemos identificado los genes candidatos posicionales mediante la exploración de genes contenidos en cada región QTL para los loci con efectos conocidos en la resistencia al hambre como se representa en la base de datos de ontología FlyBase gen (FlyBase Consortium, 2003). Es importante mencionar que los genes candidatos se presentan en este estudio fueron seleccionados como se describe más arriba, pero que no incluye todos los genes que se encuentran en esas categorías.

## **2.3 Resultados y conclusiones Mapeo de QTL para la longevidad y la sensibilidad térmica sobre la longevidad en *D. melanogaster***

---

### **Resultados del mapeo de QTL para la longevidad y la sensibilidad térmica sobre la longevidad en *D. melanogaster***

Para la realización de esta tesis de doctorado se midió el tiempo de vida completo de 7047 moscas adultas de *Drosophila melanogaster* para evaluar los loci de caracteres cuantitativos que afectan a la longevidad a 25°C con y sin un pre-tratamiento de calor. La longevidad media se muestra en la figura 2.3.1 para las moscas que recibieron un estrés térmico, así como para las moscas que no recibieron el estrés por calor (control), agrupando las RIL de acuerdo con la retrocruza de origen. Además, la longevidad media se representa en la figura 2.3.2 y en la tabla 2.3.1 para cada RIL por separado, tanto en moscas tratadas como en el control para mostrar un panorama general de las aparentes diferencias entre líneas en sus respuestas al pre-tratamiento de calor.

La varianza entre líneas, es decir, la varianza genética de la longevidad fue estimada a partir de componentes de varianza (CV) en los ANOVA que se muestran en la tabla 2.3.2 con línea como efecto aleatorio y tratamiento como efecto fijo. Con respecto a la longevidad, las líneas difieren marcadamente para este carácter en ambas condiciones térmicas, con una contribución significativa del efecto línea a la varianza fenotípica total (ver componentes de varianza de la Tabla 2.3.2). La interacción línea x tratamiento resulta significativa en los 4 ANOVA, dicho efecto contribuye de manera

significativa a la varianza fenotípica total (ver componentes de varianza de la Tabla 2.3.2).

En promedio, las hembras vivieron más tiempo que los machos, y los efectos del pre-tratamiento de calor fueron dependientes del panel de RIL con un efecto significativo del término de la interacción entre el panel de RIL y el estrés por calor (Figuras 3.2.1 y 3.2.2; Tabla 3.2.3).

Sobre la base de las distintas pruebas t para cada RIL (Tabla 2.3.3), encontramos que los efectos beneficiosos sobre la longevidad fueron inducidos por el pre-tratamiento de calor en varias líneas del panel RIL-D48 (Tabla 2.3.4 y Figuras 2.3.2-2.3.3). Es importante destacar que, el mismo estrés por calor tuvo efectos neutrales o incluso perjudiciales en la longevidad en la mayoría de RIL-SH2 (Tabla 2.3.4 y Figuras 2.3.2-2.3.3). Por lo tanto, la proporción de las RIL que mostraron hormesis inducida por calor fue mayor para RIL-D48 que para RIL-SH2 (Tabla 2.3.4), lo que indica que la hormesis depende del fondo genético. Esto es importante de destacar ya que al usar un mismo tratamiento de calor dentro de un estudio se pueden obtener efectos horméticos (beneficiosos) en algunas líneas y en otras un efecto totalmente opuesto. Por esto, sería un error pensar que un mismo tratamiento genera un mismo tipo de efecto sobre todas las líneas y hacer un mapeo de QTL pensando que se está estudiando la variación en la hormesis solamente. Más bien, al no diferenciar en el mapeo a las líneas donde el tratamiento generó diferentes efectos, no se está mapeando solamente las regiones responsables en los efectos beneficiosos sobre la longevidad. Se está mapeando al mismo tiempo las regiones responsables en la variación de la respuesta al calor sobre la longevidad, sean los efectos sobre esta, beneficiosos, perjudiciales o neutrales. Por eso el carácter de razón se relaciona con la sensibilidad térmica y no solamente con los efectos horméticos del calor sobre la temperatura.



Se encontró una clara correlación negativa entre la longevidad media en moscas control y la diferencia de longevidades medias de control y calor (Figura 2.3.3; correlaciones Spearman variaron de -0,3 a -0,6 tanto en RIL-D48 y RIL-SH2, con todas las correlaciones fueron significativas [ $P < 0,05$ ], excepto en las hembras de RIL-D48). Particularmente, esta correlación negativa resultó significativa en machos de las RIL-D48 (valor de correlación de Spearman,  $r_s = -0.59$ ,  $P < 0.001$ ), como así también en los machos y las hembras de las RIL-SH2 ( $r_s = -0.62$ ;  $P < 0.005$ ;  $r_s = -0.65$ ;  $P < 0.005$  respectivamente) pero no para hembras de las RIL-D48 ( $r_s = -0.30$ ;  $P > 0.05$ ). En otras palabras, nuestro pre-tratamiento de calor tuvo un efecto beneficioso (hormesis) con más frecuencia en RIL de vida corta que en RIL más longevas (Figura 2.3.3).

Por medio de un mapeo por intervalo compuesto pudimos identificar varios QTL explicando la variación en la longevidad (longevidad-QTL) en los tres cromosomas grandes de *Drosophila* (Fig. 2.3.4, Tabla 2.3.5). Los rangos de los QTL detectados para la longevidad se muestran en la Tabla 2.3.4. En las moscas control detectamos cinco QTL significativos, dos de ellos en el cromosoma X (L1, L2), otros dos QTL en el cromosoma 2 (L3, L4), y otro QTL en el brazo derecho del cromosoma 3 (L5, Fig. 2.3.4 B; Tabla 2.3.5). En las moscas estresadas por calor, dos regiones QTL fueron significativas para la longevidad, uno en el cromosoma X (L2) y otro en el cromosoma 2 (L4, Fig. 2.3.4A; Tabla 2.3.5). Ambos QTL que fueron significativos al analizar las medias de moscas estresadas se superponen con dos de los cinco QTL en moscas control y además los efectos aditivos son idénticos en su signo (Tabla 2.3.5). En otras palabras, pre-tratamiento el calor parecería reducir el número de longevidad-QTL, ya que tres de los QTL que fueron significativos en el control desaparecieron tras el estrés por calor (Tabla 2.3.5).

Tres de los cinco QTL de longevidad (L1, L2, L3) resultaron positivos en sus efectos aditivos (Tabla 2.3.4), lo que indica que los alelos SH2 de estos QTL aumentan la longevidad (ya que el genotipo del marcador fueron el número de alelos SH2, ver materiales y métodos). Sin embargo, el QTL en el medio del cromosoma 2 y en el brazo derecho del cromosoma 3 (L4 y L5, respectivamente) tuvieron efectos aditivos negativos (Tabla 2), lo que indica que los alelos SH2 tendrían efectos negativo en lugar de efectos positivos sobre la longevidad en estos dos QTL.

También exploramos la relación entre la longevidad en las moscas estresadas por calor y en moscas control mediante un carácter de razón como un índice de los posibles cambios en la longevidad inducidos por el estrés de calor. En este caso, cuatro QTL fueron significativos, tres en el cromosoma X (R1, R2, R3), y otro en el cromosoma 2 (R4, Fig. 2.3.4C; Tabla 2.3.5). Estos cuatro QTL mostraron efectos aditivos negativos, lo que indica que los alelos SH2 de estos QTL disminuyen de nuestro carácter de razón "R" (Tabla 2.3.4). Los valores para R por encima de cero indican que el pre-tratamiento de calor produjo efectos horméticos en la línea mientras que un valor de R por debajo de cero muestra que esa línea sufrió un efecto negativo del estrés recibido.

Se testaron interacciones epistáticas para todas las combinaciones entre pares de marcadores. Antes de corregir la significación de la prueba por comparaciones múltiples, muchas interacciones fueron significativas. Por ejemplo, la interacción que involucra bandas 16F3-F6 y F-90E fue consistente en los rasgos y sexos. Sin embargo, ninguna de estas pruebas interacciones fueron significativos después de corregir por comparaciones múltiples.

Tabla 2.3.1: Valores medios y errores estándar (SE) de la media para la longevidad en las RIL-D48 y RIL-SH2 para cada sexo con y sin el pretratamiento de calor.

RIL-D48

Línea	Hembras				Machos			
	Control		Tratadas		Control		Tratadas	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
1	45.8	3.3	45.6	3.2	24.5	1.7	30.1	2.3
4	35.6	2.4	42.8	1.3	34.9	3.0	35.2	1.9
7	43.2	3.5	51.5	3.0	28.7	2.3	25.3	1.4
8	36.1	1.6	42.5	2.9	34.0	2.7	35.2	1.8
13	41.6	2.6	40.9	3.7	29.9	1.5	34.3	1.9
15	38.4	2.6	45.9	3.0	25.8	1.3	26.1	1.5
16	47.8	2.8	37.4	3.1	41.4	3.2	31.0	3.1
18	38.7	3.9	39.9	2.2	31.1	1.2	26.7	2.0
22	36.4	1.7	28.2	0.9	36.0	2.9	32.1	1.8
23	28.8	0.7	36.2	1.5	30.5	1.4	35.5	1.6
24	43.6	3.4	48.0	4.1	38.6	2.8	36.8	2.5
29	45.4	3.8	42.6	2.4	28.0	1.4	31.4	1.8
31	36.1	1.5	33.5	1.8	32.1	2.4	28.3	1.2
32	45.8	1.5	43.6	3.4	37.3	3.5	30.4	2.1
35	34.1	3.0	29.4	3.6	26.1	1.9	25.3	2.5
39	33.7	2.3	43.7	2.7	35.7	2.0	28.9	1.8
47	31.4	3.1	40.7	2.8	28.3	1.3	36.2	2.0
49	33.4	1.6	38.2	2.3	34.8	2.0	35.6	1.7
51	39.4	2.7	27.4	1.7	28.4	1.7	26.1	2.5
55	42.5	2.4	35.6	3.0	29.1	2.2	29.9	2.5
56	42.4	3.5	39.3	3.6	28.3	2.0	26.9	1.8
57	30.8	3.1	23.7	1.6	30.9	3.9	26.8	3.0
61	46.1	4.1	44.8	3.0	30.2	2.0	27.0	2.4
63	43.0	2.0	44.5	2.0	28.8	1.1	26.5	1.9
78	40.8	1.5	38.4	2.4	32.9	1.5	25.8	2.6
82	43.0	3.4	38.2	2.5	34.4	2.3	27.7	1.0
83	36.5	1.6	35.4	1.9	33.5	3.1	30.2	2.4
85	30.8	1.1	26.5	2.1	29.1	1.5	28.4	1.8
106	38.5	3.3	37.3	3.0	27.8	1.9	33.4	1.6
110	39.8	3.5	38.0	3.0	29.5	2.1	27.2	2.5
124	36.1	2.6	40.6	2.6	30.0	1.7	33.5	4.0
203	32.4	1.6	37.4	2.3	33.5	1.4	32.5	1.6

Línea	Hembras				Machos			
	Control		Tratadas		Control		Tratadas	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
2	40.1	2.1	39.6	3.6	26.0	2.2	23.6	1.6
4	21.0	2.7	21.1	1.5	29.0	2.0	24.6	1.8
12	17.4	2.7	16.8	1.0	19.8	1.4	18.8	3.6
18	35.8	3.5	27.8	1.3	25.8	1.8	27.6	1.8
26	29.5	2.0	22.1	1.9	29.3	2.3	25.9	1.9
31	41.2	3.3	35.3	2.7	27.0	2.2	25.0	1.8
32	38.5	3.6	33.1	3.2	26.1	1.5	30.0	2.7
38	39.8	5.3	30.4	3.5	41.4	3.0	30.7	2.3
40	34.8	3.1	23.7	2.6	31.5	2.3	18.6	2.9
50	32.4	4.1	27.6	2.6	29.5	1.8	22.7	1.0
52	29.3	2.8	18.4	1.0	23.5	1.2	21.5	1.9
81	25.1	3.3	20.3	1.5	22.9	2.3	22.0	2.9
83	40.7	2.5	25.0	1.9	23.4	2.7	23.0	1.1
89	27.3	1.8	28.0	1.7	27.3	2.0	27.8	2.0
98	42.3	2.7	32.8	2.3	28.7	2.1	27.3	1.5
99	25.2	2.4	28.4	2.3	27.5	2.2	29.4	2.2
122	38.0	3.0	37.4	3.0	26.9	1.4	28.9	1.5
138	18.6	1.0	25.2	1.9	18.6	1.5	18.0	1.1
145	47.8	3.1	32.1	2.4	26.6	1.8	26.2	2.1
201	42.7	4.6	30.5	2.5	29.1	2.7	23.7	1.7

Tabla 2.3.2: ANOVAs para analizar las diferencias en la longevidad media en ambos paneles de RIL (RIL-D48 and RIL-SH2) y sexo con (1) línea como factor aleatorio y (2) tratamiento (control vs. tratadas) como factor fijo.

Fuente de Variación	gl	RIL-D48			gl	RIL-SH2		
		CM	F	S <sup>2</sup> (%)		CM	F	S <sup>2</sup> (%)
<b>Hembras</b>								
(1) Línea	31	583.9	6.62***	6.56	19	748.4	9.20***	2.49
(2) Tratamiento	1	500.1	2.62	Fijo	1	522.5	1.04	Fijo
(1) x (2)	31	239	2.71***	4.96	19	502.4	6.78***	13.10
Error	1987			88.47	1342			84.41
<b>Machos</b>								
(1) Línea	31	1782.9	11.40***	9.40	19	3256.8	21.33***	18.07
(2) Tratamiento	1	1.22	2E-3	Fijo	1	10152	16.44***	Fijo
(1) x (2)	31	594.9	3.83***	6.96	19	617.6	4.04***	6.84
Error	2171			83.64	1338			75.09

S<sup>2</sup>: componentes de varianza; \*\*\*P < 0.001.

Tabla 3.2.3 ANOVA de tres factores para analizar las diferencias en la longevidad media con (1) RIL-D48 vs. RIL-SH2, (2) tratadas vs. control y (3) sexo como factores fijos.

Fuente de Variación	gl	CM	F
(1) Panel	1	4.08	87.6***
(2) Tratamiento	1	0.35	7.6**
(3) Sexo	1	2.97	63.8***
(1) x (2)	1	0.18	3.9*
(1) x (3)	1	0.15	3.2
(2) x (3)	1	0.04	0.8
(1) x (2) x (3)	1	0.12	0.002
Error	375		

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001).

Tabla 2.3.4: Número de líneas de RIL-D48 y SH2-RIL donde el pre-tratamiento de calor no tuvo efectos significativos sobre la longevidad (neutral), aumentó la longevidad (hormético) o produjo una reducción de la longevidad (detrimental), según lo determinado por una prueba t de dos colas para cada línea y sexo ( $P < 0,05$ ). Los números se muestran para hembras (H) y machos (M) por separado.

Efectos del estrés	RIL-D48		RIL-SH2		Total	
	M	H	M	H	M	H
Neutral	17	16	8	12	25	28
Hormético	7	8	1	1	8	9
Detrimental	8	8	11	7	19	15

Tabla 2.3.5: QTL para la longevidad en moscas estresadas por un pre-tratamiento de alta temperatura (calor) y en moscas control, así como también para un carácter de razón que mide la sensibilidad térmica en la longevidad (véase el texto) identificados por mapeo de intervalo compuesto en RIL de *D. melanogaster*. El rango de QTL se determina como en la ubicación de los marcadores más cercanos y los cromosomas se indican entre paréntesis. El efecto aditivo (a) se da en días para la longevidad, con valores positivos que indica que el alelo D48 disminuye la longevidad (Norry et al 2008). % Var es el porcentaje de la varianza fenotípica total explicada por el QTL.

	QTL	Sexo / RIL	Rango QTL	a	% Var	Refs.	Genes candidatos incluido en el rango del QTL
<b>Control (a)</b>	L1	F SH2	(X) 1B8-3C1	7.8	22.5	[3,7,8]	dor, Edem1, Adar
	L2	F SH2	(X) 3C1-4F2	7.5	18.5	[1,2,8]	rb, <u>CG7010</u>
	L3	F SH2	(2) 30 <sup>a</sup> 3-38E1	7.3	0.4	[1-8]	Eaat1, Trx-2, chico, Cdk5alpha, Mt2, Tor, Sir2, VhaSFD, hk, Hsp60D, <u>spir</u> , <u>tam</u> , <u>salr</u> , <u>CG16820</u>
	L4	M SH2	(2) 38E1-42A	-2.9	10.7	[1-5,7]	EcR
	L5	F pool	(3) 73A-90B2	-4.2	7.9	[1-4,6-8]	grim, Indy-2, gig, Prat, puc, Sirt6, mthl11, mthl5, mthl12, SdhC, ry, foxo, cher, CycT, Hcs, <u>CG10053</u> , <u>l(3)73Ah</u> , <u>CG2023</u> , <u>CG5359</u> , <u>CG31218</u> , <u>CG12360</u> , <u>CG31550</u> , <u>CG13698</u> , <u>CycT</u> , <u>pyd3</u> , <u>CG8223</u> , <u>CG1307Cat</u> , Ide, hsp70, hsc70-2y4,, Dca
<b>Calor (b)</b>	L2	F SH2	(X) 3C1-4F2	5	10.4	[2,3,8]	Mismos candidatos que para el QTL con igual rango
	L4	M pool	(2) 38E1-42A	-1.8	16.1	[1-5,7]	Mismos candidatos que para el QTL con el mismo rango
<b>Razon (b/a)</b>	R1	F SH2	(X) 10A1-12D	-0.16	13.1	[2,7,8]	SelG, hep, g, Clic, Hsp60, Hsc70-3, <u>CG4332</u>
	R2	F D48	(X) 12D-16F3	-0.13	4.3		rut, sun, mthl1, shi, <u>Arp14D</u> , <u>Scamp</u> , <u>CG4789</u>
	R2	F SH2	(X) 12D-16F3	-0.16	12.0		Mismos candidatos que para el QTL con igual rango
	R3	F SH2	(X) 16F3-19F6	-0.14	2.5	[3]	car, DD2R
	R3	M SH2	(X) 16F3-19F6	-0.14	11.6	[3]	Mismos candidatos que para el QTL con igual rango
	R4	M D48	(2) 42A-49C	-0.1	6.7	[1-8]	<u>Pgi</u>

Los genes candidatos son loci que tienen efecto sobre la determinación del tiempo de vida o en la respuesta al calor en *D. melanogaster* representados en la base de datos FlyBase genontology (FlyBase Consorcio, 2003). Los genes subrayados cambian sus niveles de expresión en líneas seleccionadas para mayor longevidad en estudios anteriores (Sørensen et al 2007). Las referencias (Refs.) se dan para regiones de QTL que se solapan con los QTL de longevidad identificados en estudios anteriores. <sup>1</sup>Nuzhdin et al 1997, <sup>2</sup>Leips y Mackay 2000, <sup>3</sup>Vieira et al 2000, <sup>4</sup>Wang et al 2004, <sup>5</sup>Curtsinger 2002, <sup>6</sup>Leips y Mackay 2002, <sup>7</sup>Nuzhdin et al 2005, <sup>8</sup>Vermeulen et al 2008

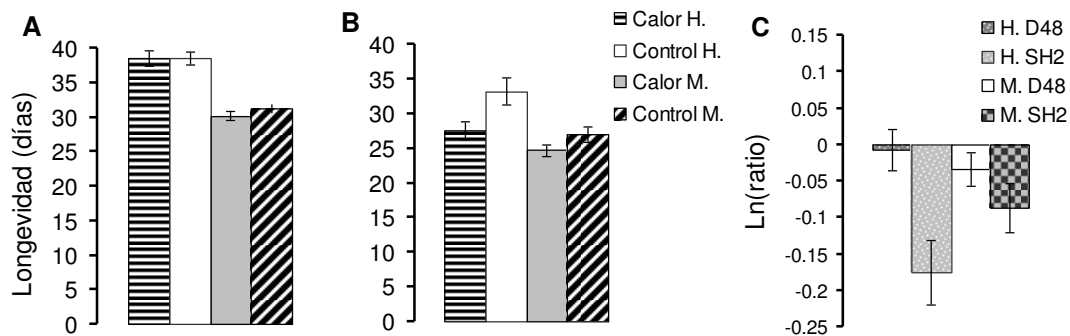


Figura 2.3.1: Longevidad media en días promediando por panel de RIL, RIL-D48 (A) y RIL-SH2 (B). También se muestran los valores medios del carácter razón (el cociente de la longevidad con y sin pre-tratamiento de calor) (C). "Calor" corresponde a la longevidad de las moscas tratadas con calor. "Control" corresponde a la longevidad de las moscas que no recibieron el pre-tratamiento de calor. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

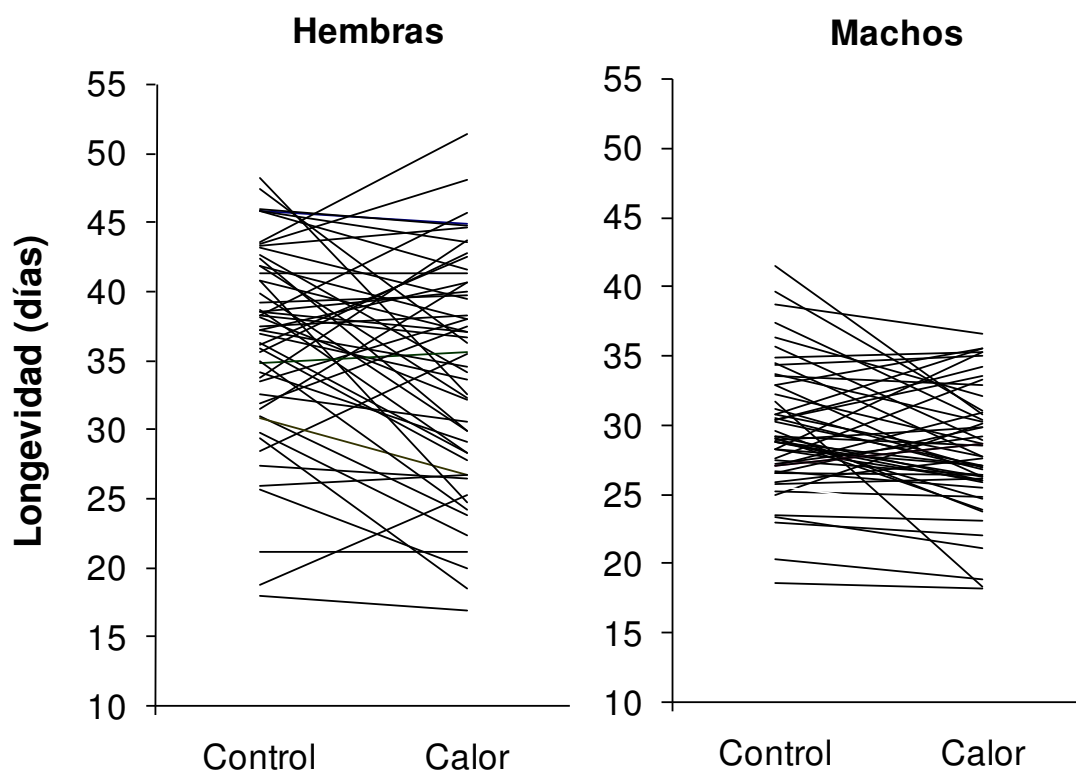


Figura 2.3.2: Longevidad media de cada RIL y sexo a partir de ambos paneles de RIL, RIL-D48 y RIL-SH2. "Calor" corresponde a la longevidad de las moscas que fueron sometidas a un pre-tratamiento de calor. "Control" corresponde a la longevidad de las moscas que no recibieron el estrés de calor.



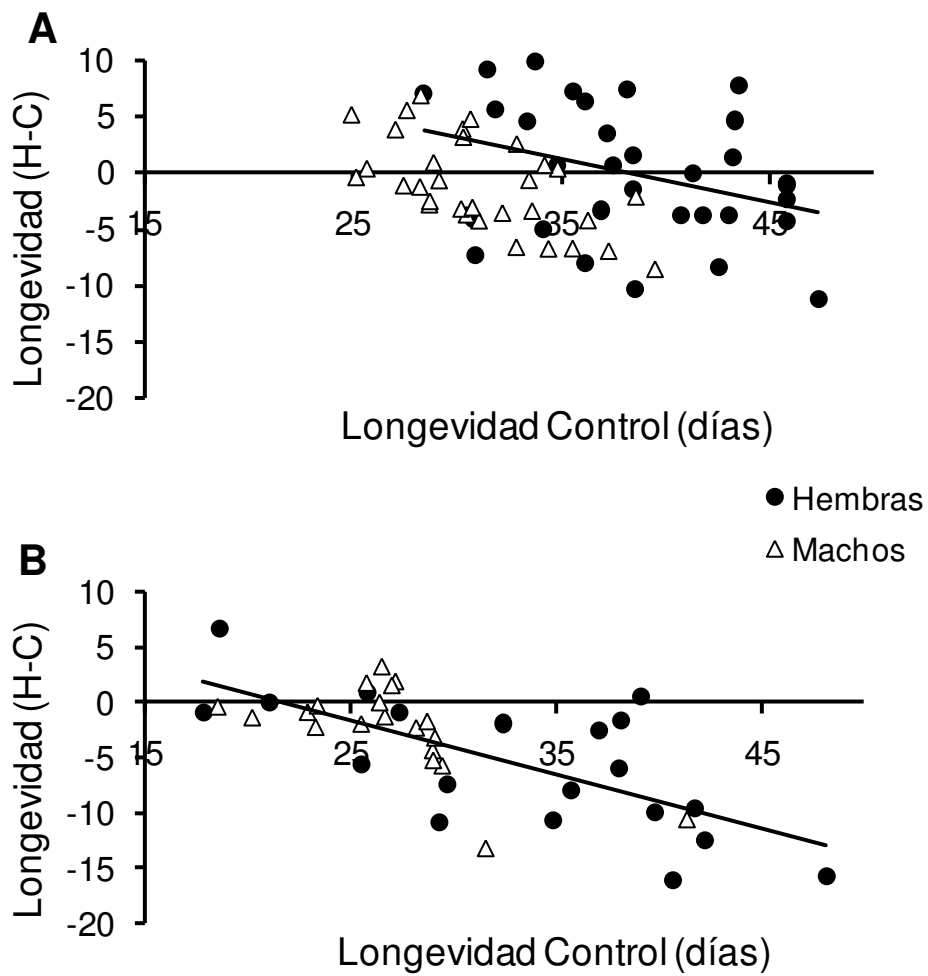


Figura 2.3.3: Diferencia de la longevidad de moscas sometidas al tratamiento de alta temperatura (H) y control (C) en función de la longevidad control para ambos paneles RIL, RIL-D48 (A) y RIL-SH2 (B).

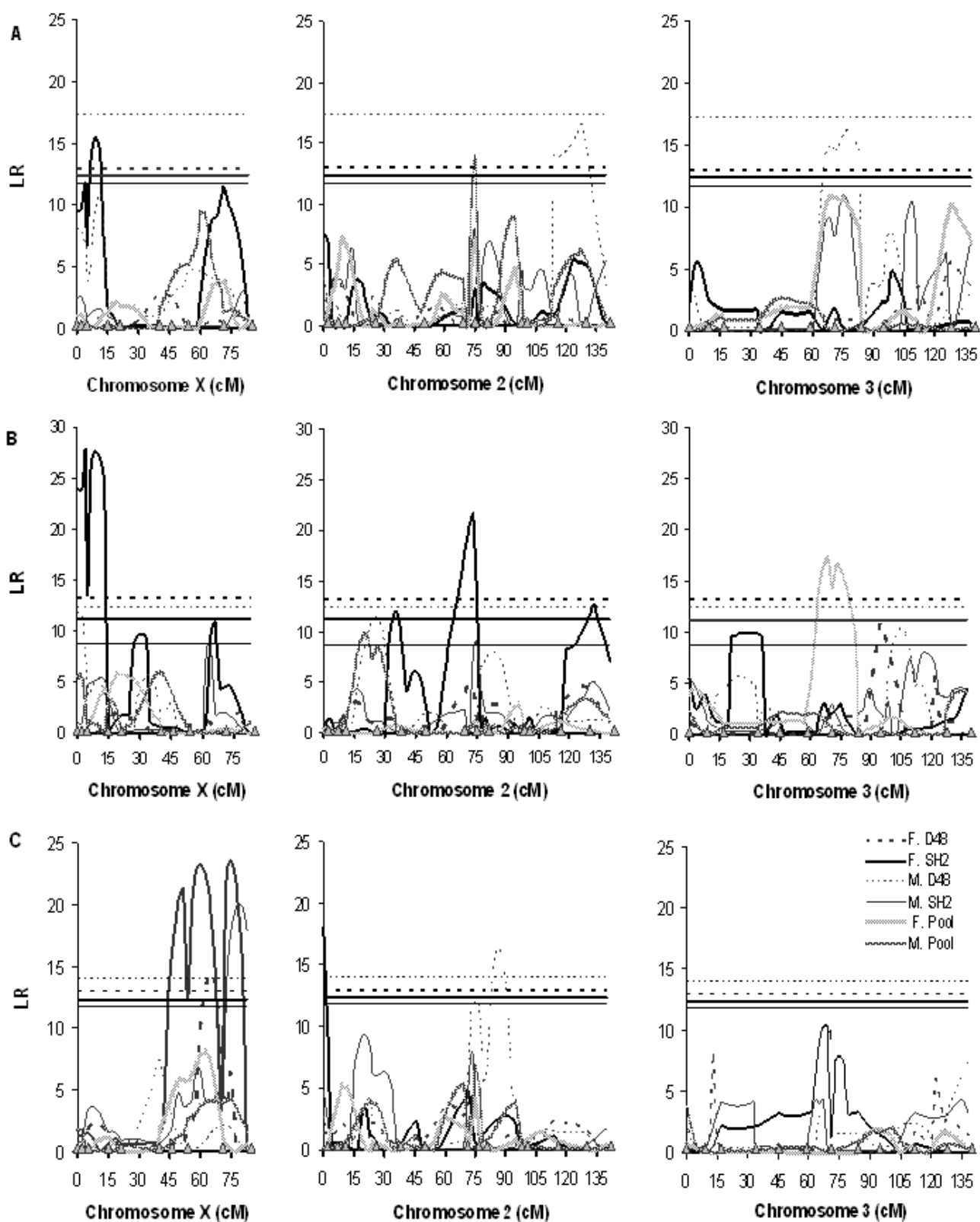


Figura 2.3.4: LR en función de la posición de mapa (cM) de mapeo por intervalo compuesto para la longevidad en moscas estresadas por calor (A) y moscas control (B) de *D. melanogaster* de los dos paneles de RIL (RIL-D48, RIL-SH2 ) y del pool. También se muestra el mapeo del carácter razón (R) calculado como  $\ln(\text{razón}) = \ln[(\text{longevidad en moscas estresadas}) / (\text{longevidad en moscas control})]$  (C). Los umbrales de significación fueron determinados por 1000 permutaciones (líneas horizontales), y fueron similares entre machos y hembras de RIL-D48 y de RIL poleadas, con línea gruesa discontinua para RIL-D48, línea gruesa sólida para RIL poleadas, línea delgada discontinua para los machos RIL-SH2 y línea delgada sólida para hembras de RIL-SH2. Los triángulos en el eje x corresponden a la ubicación de los marcadores utilizados en la mapeo de intervalo compuesto.

---

## **Conclusiones Mapeo de QTL para la longevidad y la sensibilidad térmica sobre la longevidad en *D. melanogaster***

Todos los organismos vivos tienen la capacidad intrínseca para responder, neutralizar y adaptarse a las fuentes externas e internas de estrés. El envejecimiento es una manifestación final de un fracaso en la homeostasis o la homeodinámica (Rattan 2006; Holliday 2007). Para lidiar con el estrés, los organismos desarrollaron una amplia y conocida gama de diferentes mecanismos.

Aunque la base genética de la longevidad ha sido ampliamente estudiada (Nuzhdin et al, 1997, 2005; Vieira et al, 2000; Leips y Mackay, 2000, 2002; Curtsinger y Khazaeli, 2002; Chao-Qiang Lai de 2007), aquí llevamos a cabo un mapeo de QTL para la longevidad a 25°C, utilizando un nuevo panel de RIL de *D. melanogaster* en un ambiente de sexo único, con y sin un pre-tratamiento subletal de estrés por calor. Por lo tanto, este trabajo contribuye a comprender la base genética de la variación en la longevidad en condiciones específicas ambientales y de fondo genético. Por otra parte, con el fin de aportar al estudio de los mecanismos relacionados con la longevidad llevamos a cabo la primera aproximación para mapear en el genoma de *D. melanogaster* regiones de QTL responsables del fenómeno de hormesis. Se ha demostrado que un tratamiento de estrés leve aumenta la esperanza de vida en *Drosophila melanogaster* y la comprensión del fenómeno de hormesis representa un método que puede aportar a aumentar los conocimientos acerca de los mecanismos que explican la longevidad (Lithgow et al, 1995a; Khazaeli et al 1997; Butov et al 2001; Le Bourg et al 2000; Cypser y Johnson 2001, 2002, 2003; Yashin et al 2002; Hercus et al 2003; Rea et al 2005; Lithgow et al 2006; Scannapieco 2007).

El número de QTL de gran efecto en la longevidad fue mayor en el control (5) que en las moscas estresadas por calor (2) en un ambiente de sexos separados a temperatura benigna. Esto sugiere que, el estrés por calor reduce el número de QTL de gran efecto en la longevidad. Este efecto del estrés por calor se observó en trabajos previos para caracteres de termotolerancia (Norry et al 2008). Además, cuatro QTL fueron significativos para el carácter de razón relacionado con la sensibilidad térmica sobre la longevidad. Es importante destacar que el efecto de nuestro pre-tratamiento fue diferente entre RIL, con un efecto detrimental sobre la longevidad en muchas RIL-SH2 y un efecto beneficioso, es decir, un efecto hormético por un estrés por calor sobre la longevidad en varias RIL-D48 (Tabla 2.3.3). Los QTL para la longevidad detectados en este estudio involucran a los tres cromosomas mayores, todos ellos colocan con intervalos de QTL para la longevidad identificados en estudios previos con conjuntos muy diferentes de RIL con diversos orígenes genéticos (Tabla 2.3.4).

Al igual que en trabajos anteriores (Norry et al 2008), el poder estadístico para detectar QTL se incrementó por el uso de dos paneles de RIL derivados de las dos retrocruzas posibles, ya que se detectaron QTL significativos en ambos paneles de RIL. Todos los QTL que fueron significativos en moscas estresadas por calor co-localizaron con los QTL detectados en moscas control, por lo que puede plantearse la hipótesis de que el estrés por calor disminuye el número de QTL significativos como ya se ha observado en otros caracteres correlacionados con la longevidad, principalmente para la resistencia al coma por alta temperatura (Norry et al 2008). Una visión general del conjunto de resultados sugiere que los QTL de gran efecto en la longevidad en las moscas estresadas por calor no son inducidos por estrés térmico en sí. Una hipótesis plausible para la disminución del número de QTL en las moscas estresadas por calor es que los niveles basales de algunas Hsp (y/u otras proteínas inducible por el calor que

afectan a la longevidad) difieren entre individuos más y menos longevos bajo condiciones de control, mientras que el estrés por calor puede reducir esta variación genética mediante el aumento de los niveles de Hsp con más frecuencia en individuos de corta longevidad (Norry y Loeschcke, 2003). En cualquier caso, no asumimos que los resultados serán idénticos para otras posibles poblaciones experimentales, a pesar de que los QTL para algunos otros caracteres son bastante consistente a través de diversas poblaciones de mapeo (por ejemplo, Norry et al 2004, 2008; Morgan y Mackay 2006).

Además, los QTL que colocalizan entre las moscas estresadas y las de control (L2, L4), serían QTL generales de la longevidad en lugar de QTL específicos para las moscas estresadas por un pre-tratamiento de calor. Estos dos QTL (L2, L4) incluyen al menos dos genes candidatos, *rb* y *ECR*, que tienen efectos sobre la longevidad (Sørensen et al 2007, Simonsen et al 2007). Además, el gen *CG7010* que mapea en L2 mostró cambios significativos en su nivel de expresión por la selección en la longevidad en moscas de *D. melanogaster* (Sørensen et al 2007). Rubi (*rb*) está involucrado en el transporte lisosomal y también participa en la vía funcional de blue cheese (*bchs*) (Simonsen et al 2007). Las mutaciones en el gen blue cheese pueden conducir a la reducción de la expectativa de la vida adulta y a un aumento de la muerte neuronal en *Drosophila* (Simonsen et al 2007). El gen *EcR* es el receptor de ecdisona, la principal hormona esteroide de *D. melanogaster* implicada en el desarrollo y la reproducción. Las moscas que son heterocigotos para las mutaciones del receptor de ecdisona viven un 40-50% más que las moscas control (Simon et al 2003).

Varios genes que alteraron significativamente su nivel de expresión por selección en la longevidad en Sørensen et al 2007, también mapean en nuestras regiones de QTL (Tabla 2.3.4): *tam*, *salr*, *CG16820*, *CG10053*, *1 (3) 73Ah*, *CG2023*, *CG5359*, *CG31218*, *CG12360*, *CG31550*, *CG13698*, *CycT*, *pyd3*, *CG8223*, *CG1307*, *CG4332*,

Arp14D, Scamp, CG4789. Este conjunto de loci candidatos son de gran interés en el estudio actual, porque las líneas de la población base para la construcción de las RIL-D48 y RIL SH2, se incluyeron en la población base utilizada en Sørensen et al. Algunos de estos, como tam y Cyc se relacionan también con ambos caracteres, la longevidad y la respuesta al heat shock en otros estudios (Lis et al 2000; Mandavilli et al 2002).

Muchos otros genes candidatos mapean en las regiones de los QTL que fueron significativas en este estudio, estos incluyen a varios genes que codifican para proteínas de shock térmico (heat-shock proteins), así como un número de loci con funciones conocidas o inferidas en la determinación del tiempo de vida adulta (por ejemplo, SelG, Indy-2, cher, hsp70, hsc70-2y4, Dca, muchos genes mth-like, hcs y rut) (FlyBase Consortium 2003). Las mutaciones en methuselah (mth) pueden aumentar dramáticamente el tiempo de vida adulta, así como afectar a la resistencia a diversas formas de estrés ambiental, como el estrés térmico (Lin et al 1998). Dca, que codifica para una proteína marcadora de la senescencia (SMP30), estaría involucrado en la regulación de los niveles del ion  $\text{Ca}^{(2+)}$  citosólico y de su señalización (Goto 2000). En cuanto a cher, este gen codifica para una proteína de unión a actina. Las mutaciones en cher perturban la organización de los filamentos de actina y comprometen la integridad de la membrana durante el desarrollo de los ovocitos, evitando la transferencia de citoplasma de las células nutricias a los ovocitos que se traduce en esterilidad en las hembras (Robinson et al 1997, Sokol y Cooley 1999). Un aumento de la esperanza de vida puede resultar de la sobreexpresión de cher (Kline y Morimoto 1997). Hcs y rut pertenecen tanto a los procesos biológicos "determinación del período de la vida adulta" y "respuesta al calor". Hsp70 es una proteína de shock térmico que tiene una variedad de funciones incluyendo la auto-regulación de la respuesta de shock térmico y la transducción de señales (Kline y Morimoto 1997). Hsp70 y otros genes estrechamente

vinculados también han sido implicados en influenciar el tiempo de vida adulta en *Drosophila*, tal como fue revisado recientemente (Tower 2009, 2011). La expresión inducida por calor de Hsp70 puede disminuir por la selección en la longevidad (Norry y Loeschcke 2003), y las líneas parentales utilizadas para construir las RIL se diferencian en el nivel de expresión de Hsp70 inducida por calor (Norry et al 2004).

La metaloproteinasa degradadora de insulina (Ide) es la principal enzima responsable de la degradación de la insulina (Duckworth et al 1994, Bennett et al 1997, Garcia et al 1998). La señalización de la insulina/IGF-like (factor de crecimiento similar a la insulina) es una vía de interacción crítica con otras vías que influyen sobre la longevidad, tal como fue revisado recientemente (Broughton y Partridge 2009). La insulina es una hormona fundamental para controlar el metabolismo de la glucosa (Wolfe 1995) y la vía del receptor de insulina regula el tiempo de vida de los adultos, la reproducción y la respuesta al estrés (Wolfe 1995, Garcia et al 1998, Tissenbaum y Ruvkun 1998). Las variantes alélicas de muchos de los genes implicados en la vía de señalización de la insulina/IGF-like (insulin-like growth factor) y vías de interacción, incluyendo chico, Ide y Foxo, se incluyen dentro de nuestras regiones QTL que potencialmente pueden influir en la expectativa de vida (Wolfe 1995, Clancy et al 2001, Tatar 2001), tal como fue estudiado en la introducción general de esta tesis. Otros genes clave como Tor también se incluyen dentro de la lista de QTL de la tabla 2. Por ejemplo, el papel de la vía de señalización de TOR en el envejecimiento es bien conocido y en procesos biológicos relacionadas, tal como fue revisado recientemente (Katewa 2011).

Otro de los mecanismos propuestos para regular la longevidad que mencionamos en esta tesis, es de las ROS. Los loci Sod y Cat son dos genes implicados en la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS), los subproductos tóxicos del



metabolismo principalmente generados por la cadena respiratoria mitocondrial (Wallace y Melov 1998). Varios estudios apoyan la hipótesis de que el daño oxidativo de ROS es un factor importante en el envejecimiento (Harman 1956), así como la limitación de duración de la vida en muchas especies (Sohal et al 1990, Ku et al 1993, Barja 1998, Garcia et al 1998, Sun et al 2002, Miwa 2006).

Se encontró variación genética significativa para la expectativa de vida adulta, con interacciones significativas entre el pre-tratamiento de calor y dos paneles de RIL (Tabla 2.3.2-2.3.3). Solo uno de los nueve QTL en este estudio fue significativa en ambos sexos (R1, Tabla 2), en consonancia con otros estudios donde los QTL parecen ser sexo-específicos para la longevidad (Nuzhdin et al 1997, Vieira et al 2000, Buck et al 1993a, b), pero otros diseños experimentales son más apropiados que el nuestro para probar la especificidad de sexo para la longevidad (Curtsinger y Khazaeli 2002). En un intento por explorar aún más la base genética de la longevidad, realizamos un mapeo de QTL para un carácter de razón relacionado con la sensibilidad de la longevidad al estrés por calor tanto en machos y hembras. Se ha demostrado que el estrés leve de calor aumenta la esperanza de vida de *D. melanogaster* y la comprensión del fenómeno de hormesis sigue siendo un campo sin explotar e importante para aprender más sobre la longevidad (Lithgow 1995, Khazaeli et al 1997, Le Bourg 2000, 2001, Yashin et al 2001, Cypser y Johnson, 2002, 2003, Hercus et al 2003, Rea et al 2005, Olsen et al 2006, Scannapieco et al 2007).

Aunque nuestro estrés térmico fue más bien leve (con 0% de mortalidad), no fue inducida la hormesis en muchas de las RIL (Tabla 2.3.3). Además, el pre-tratamiento en este estudio fue similar o incluso potencialmente menos estresante que otros utilizados en estudios anteriores que indujeron la hormesis en *D. melanogaster*, pero este pre-tratamiento redujo en lugar de aumentar la longevidad en muchas RIL-SH2 (Fig. 2.3.1,

Tabla 2.3.3). Otro resultado interesante fue que nuestro pre-tratamiento tuvo un efecto beneficioso (hormesis) con más frecuencia en las líneas con una longevidad corta que en las líneas más longevas (Fig. 2.3.3). En concordancia con esto, el panel de RIL que es menos resistente al calor resultó ser el más longevo (RIL-D48, Tabla 2.3.3). Este resultado es consistente con estudios previos (Gomez et al 2009), donde se encontraron correlaciones negativas también entre hormesis inducible por calor y la longevidad a 25°C en otras especies de *Drosophila*. Tal vez, los individuos de vida corta son más susceptibles al estrés por calor en términos de la inducción de Hsp u otras proteínas inducibles por calor (Lis et al 2000), mostrando efectos horméticos mayores inducidos por calor que los individuos más longevas. Este es un aspecto interesante de la variación genética en la hormesis inducible por calor, para examinar en futuros estudios sobre los posibles efectos de dosis posible del calor en diferentes fondos genéticos (Sarup y Loeschcke 2011). Insistimos en que nuestro mapeo de QTL para nuestro carácter de razón, no representa una prueba para encontrar QTL que expliquen la variaciones de la hormesis inducible por calor, sino más bien una prueba para detectar QTL posibles que expliquen tanto los cambios positivos como negativos en la longevidad inducidos por el estrés de calor en edades jóvenes.

Las líneas RIL-SH2, que son más resistentes al coma por alta temperatura (RCAT), fueron de menos longevas que las RIL-D48. Esto probablemente está relacionado no a la historia de la selección artificial para RCAT (Norry et al 2004), sino más bien al hecho de que las líneas de base utilizados para la construcción de las RIL se obtuvieron a partir de dos poblaciones salvajes no relacionadas que probablemente no compartieron las mismas presiones de selección natural. De todas maneras, la razón por la cual algunos QTL se han detectado a veces solo en uno de los dos paneles de RIL es, probablemente, no por efectos de epístasis ya que no se encontraron efectos epistáticos

o resultaron no significativos después de corregir para comparaciones múltiples. La razón para detectar diferentes QTL dependiendo del panel de RIL está probablemente relacionada a la potencia estadística para detectar la variación genotípica de las RIL (Norry et al 2008). Los cinco QTL que fueron significativos para la longevidad en el presente estudio colocalizan con regiones de QTL detectados previamente utilizando no solo poblaciones de mapeo muy diferentes (si se compara con el presente estudio), sino también condiciones ambientales distintas (por ejemplo, sexos separados vs. sexos juntos, así como también el estrés por calor vs. condiciones de control térmico, en el estudio actual vs. estudios anteriores, Tabla 2.3.3). Dada la amplia cantidad de regiones de QTL detectadas en las poblaciones de mapeo RIL-D48 y RIL-SH2, los presentes resultados pueden ser evidencia independiente para la amplia cantidad de QTL de longevidad detectados en estudios anteriores que se citan en la Tabla 2.3.3.

En general, el pre-tratamiento en este estudio tuvo un efecto beneficioso (hormesis) sobre la longevidad con mayor frecuencia en RIL de vida corta que en RIL de vida larga. Las regiones de QTL para la longevidad en moscas estresadas por calor se superponen con los QTL para la longevidad en moscas control. Además, todos los QTL para la longevidad incluyen genes candidatos y co-localizada con QTL para la longevidad identificados en estudios previos con conjuntos muy diferentes de RIL y en sexos mezclados. Estos QTL son de interés para la cartografía a escala fina en futuros estudios, ya que los QTL detectados en este estudio fueron encontrados en otros estudios y en otras condiciones ambientales. Nuestro pre-tratamiento de calor disminuye el número de QTL para la longevidad, ya que el número de QTL en moscas estresadas por calor fue menor que en moscas control.

## **2.4: Resultados y conclusiones Mapeo de QTL para resistencia al hambre en moscas adultas y larvas de *D. melanogaster***

---

### **Resultados del mapeo de QTL para resistencia al hambre en moscas adultas y larvas de *D. melanogaster***

La resistencia al hambre (RH) se midió en aproximadamente 9600 moscas en etapa adulta y en 6240 en etapa pre-adulta con el objetivo de estudiar la base genética y encontrar QTL que afecten a la RH permanente en adultos y RH en pre-adultas. Los valores medios se muestran en la tabla 2.4.1 de la RH tanto en larvas como en los adultos agrupando a las RIL según la retrocruza de origen. El valor medio de cada RIL se muestra en la Figura 2.4.1 tanto en las moscas de los adultos y en las larvas.

La RH en los adultos se calculó como el tiempo medio de supervivencia en medio sólido sin alimento promediando sobre réplicas, para cada RIL y el sexo. En promedio, las hembras adultas resultaron más resistentes a la inanición que los machos, tanto para RIL-D48 y RIL SH2 (Tabla 2.4.1; 2.4.2). La resistencia al hambre (RH) en pre-adultos se midió como el porcentaje de supervivencia en medio pobre de alimentos (MP), el cual se lograba a partir de una dilución al 10% del medio control (MC). En comparación con los controles, la RH de las larvas se redujo significativamente en MP como era de esperar, siendo menor el número de emergidos tanto en las RIL-D48 como en las RIL SH2 (Tabla 2.4.1; 2.). La varianza entre líneas, es decir, la varianza genética de la resistencia al hambre fue estimada tanto en adultos como en los pre-adultos a partir de componentes de varianza (CV) en los ANOVA que se muestran en la tabla

2.4.4 con línea como efecto aleatorio. Para la resistencia al hambre, las líneas difieren marcadamente para este carácter en ambas etapas del ciclo de vida, con una contribución significativa del efecto línea a la varianza fenotípica total (ver componentes de varianza de la Tabla 2.4.4).

Se encontró una correlación positiva para la RH entre machos y hembras tanto en adultos como pre-adultos emergidos de ambos medios: pobre y el control (Fig. 2.4.1, correlaciones de Spearman  $r_s$  desde 0.4 hasta 0.8, tanto en RIL-D48 y RIL SH2, todas las correlaciones fueron significativas [ $p < 0,001$ ]). No se encontró correlación significativa para la RH entre adultos y pre-adultos. Por el contrario, encontramos correlaciones positivas entre la RH de los pre-adultos emergidos de MC y MP para ambos sexos (correlación de Spearman  $r_s$  desde 0.3 hasta 0.8, tanto en RIL-D48 y RIL SH2, todas las correlaciones fueron significativas [ $P < 0,05$ ]).

Los QTL encontrados que explican la variación en la resistencia a la inanición o malnutrición (RH-QTL) tanto en la etapa adulta como en la pre-adulta de machos y hembras de *D. melanogaster* se muestran en la Tabla 2. El mapeo por intervalo compuesto reveló RH-QTL en los tres cromosomas mayores (Figura 2.4.4, Tabla 2.4.5). Encontramos cinco QTL que fueron significativos para la RH en adultos (adultos RH-QTL). Un QTL que mapea en el cromosoma X resultó significativo tanto en machos como en hembras (Tabla 2.4.4). En la etapa pre-adulta del ciclo de vida, se detectaron cinco QTL que explican la variación observada para la sobrevivencia en medio pobre en alimentos (pre-adultos RH-QTL), tres QTL en el medio control (control-QTL) y otro QTL para el carácter de razón (ratio-QTL) (Figura 2.4.4, Tabla 2.4.5). Curiosamente, un pre-adultos RH-QTL (P2) colocaliza con un QTL para la RH permanente en adultos (A1) que había resultado significativo en ambos sexos, con efectos aditivos idénticos en signo (Tabla 2.4.5). El QTL P3 para la RH en pre-adultos también coincidió con A2, un

QTL detectado en adultos (Tabla 2.4.5). Todos los RH-QTL, excepto P1 y P3, tuvieron efectos aditivos negativos de los alelos SH2 en ambos, moscas adultas y emergidos (Tabla 2.4.5), lo que indica que alelos SH2 para estos QTL disminuyen la RH (como los genotipos marcador son el número de alelos SH2, ver M. y M.).

Se testearon interacciones epistáticas para todas las combinaciones entre pares de marcadores. Sin embargo, ninguna de estas pruebas interacciones fueron significativas después de corregir por comparaciones múltiples.

Tabla 2.4.1. Valores medios para la resistencia a la inanición (RH) en adultos (horas  $\pm$  SEM) y en pre-adultos (% de supervivencia  $\pm$  SEM) a partir de dos paneles de RIL, RIL-D48 y RIL SH2. La SH en los adultos es el tiempo medio de supervivencia para cada RIL y el sexo. La SH en pre-adultos es el porcentaje de supervivencia en medio pobre (MP). También se muestra la supervivencia en la etapa pre-adulta del ciclo en medio control (MC) y para el carácter de razón en *D. melanogaster* de las RIL-D48 y RIL SH2.

	<b>Adultos</b>		<b>MP</b>		<b>MC</b>		<b>Ratio</b>	
	machos	hembras	machos	hembras	machos	hembras	machos	hembras
RIL-D48	51.2 $\pm$ (1.1)	66.7 $\pm$ (1.4)	10.3 $\pm$ (1.2)	9.8 $\pm$ (1.2)	53.5 $\pm$ (2.9)	53.9 $\pm$ (3.3)	19.3 $\pm$ (2.0)	17.3 $\pm$ (1.5)
RIL-SH2	52.3 $\pm$ (1.4)	69.3 $\pm$ (2.0)	12.4 $\pm$ (1.9)	11.1 $\pm$ (1.6)	48.1 $\pm$ (4.4)	43.4 $\pm$ (3.8)	28.3 $\pm$ (5.6)	25.4 $\pm$ (3.0)

Tabla 2.4.2 ANOVA de dos factores con (1) RIL-D48 vs. RIL-SH2 y (2) el sexo como factores fijos para la resistencia a la inanición (RH) en adultos.

Fuente de Variación	gl	CM	F
(1) Panel	1	2.1	2.1
(2) Sexo	1	105.7	105.4***
(1) x (2)	1	1.0	0.1
Error	405		

\*\*\* P < 0.001

Tabla 2.4.3 ANOVA de dos factores con (1) el sexo, y (2) MC vs. MP como factores fijos.

Fuente de Variación	RIL-D48		RIL-SH2	
	gl	F	gl	F
(1) Sexo	1	0.1	1	2.0
(2) Medio	1	613.1***	1	258.3***
(1) x (2)	1	0.2	1	0.7
Error	724		502	

\*\*\* P < 0.001

Tabla 2.4.4: ANOVA para analizar las diferencias en la resistencia a la inanición (RH) en adultos y en pre-adultos a partir de dos paneles de RIL, RIL-D48 y RIL-SH2 en ambos sexos. Anova de 1 factor con línea como factor aleatorio. S2 componentes de varianza.

		gl línea	CM línea	gl error	CM error	F	S2 (%) línea
Adultos	D48 machos	31	4172.2	3053	298.2	13.99***	11.9
	D48 hembras	31	9109.5	2892	425.5	21.41***	18.3
	SH2 machos	20	4500.9	1737	195.7	23.00***	20.8
	SH2 hembras	20	7941.6	1847	354.3	22.41***	19.4
Pre-adultos	D48 machos	31	2.6	147	1.3	1.97**	14.8
	D48 hembras	31	2.7	147	1.2	2.15**	17.1
	SH2 machos	20	4.5	106	2.0	2.24**	17
	SH2 hembras	20	3.3	106	1.4	2.48**	19.7

\*\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01.

Tabla 2.4.5: QTL para la resistencia al hambre de moscas adultas y para la sobrevivencia de larvas en dos medios: medio pobre (MP) y medio control (MC), así como también para un carácter de razón entre los valores obtenidos en los dos medios, identificados por mapeo de intervalo compuesto en RIL de *D. melanogaster*. El rango de QTL se determina como en la ubicación de los marcadores más cercanos y los cromosomas se indican entre paréntesis. El efecto aditivo (a) se da en horas para resistencia al hambre en adultos y en % de sobrevivencia en pre-adultos, con valores positivos que indica que el alelo D48 disminuye el valor del carácter (Norry et al 2008). % Var es el porcentaje de la varianza fenotípica total explicada por el QTL.

	QTL	Rango QTL	a	% Var	Genes candidatos incluido en el rango del QTL
<b>Adultos F.</b>	A1	16F3- 19F6	-9.1	3	RhoGAP18BY <sup>1</sup> , pcmY, Obp19c <sup>†4</sup> , cactinY, car
	A2	22C-26A	-8.8	6	CG17012 <sup>†</sup> , robl22E <sup>†</sup> , Chd1 <sup>†</sup> , Thor <sup>†1,2</sup> , CG14034 <sup>†</sup> , vri <sup>†</sup>
	A3	42A-49C	-5.5	4	Trap1Y <sup>1</sup> , sPLA2 <sup>†3</sup> , CG1600 <sup>†1</sup> , CG11669 <sup>†3</sup> , CG8690 <sup>†3</sup> , Pgi <sup>†3</sup> , Pdk <sup>†3</sup> , CG1809 <sup>†3</sup> , whd <sup>†1</sup> , wash <sup>†</sup> , nemy <sup>†</sup> , PGRP-SC1a <sup>†6</sup> , PGRP-SC1b <sup>†6</sup>
	A4	67A -86E3	-0.6	4	DhprY, Hsp23 <sup>1</sup> , Fad2 <sup>†3</sup> , Gr68a <sup>†4</sup> , bmm <sup>†2,3</sup> , Pgm <sup>†3</sup> , PGRP-SB1 <sup>†6</sup> , CycTY <sup>1</sup> , Est-6 <sup>†3</sup> , CG5932 <sup>†3</sup>
<b>Adultos M.</b>	A1	16F3- 19F6	-5	1	Mismos candidatos que para el QTL con igual rango
<b>MP F.</b>	P1	7B3- 10A2	0.6	6.9	flw <sup>†</sup> , Atg8a <sup>†2</sup> , ImpY,
<b>MP M.</b>	P2	16F3- 19F6	-0.4	3.4	Mismos candidatos que para el QTL con igual rango
	P3	23A-26A	0.6	5.2	Chd1 <sup>†</sup> , Thor <sup>†1,2</sup> , CG14034 <sup>†</sup> , vri <sup>†</sup>
	P4	56D11-59A2	-0.5	6.6	Obp56g <sup>†4</sup> , Mgat1Y <sup>2</sup> , Pu <sup>†</sup> , Glycogenin <sup>†3</sup> , dom <sup>†</sup> , rad50 <sup>†</sup> , ghrY <sup>5</sup> , Atg7
	P5	62A-64D	-0.5	1.2	Cct1 <sup>†</sup> , CG12018 <sup>†</sup> , Pxn <sup>†</sup> , Hsp83 <sup>†1</sup> , CG10592 <sup>†</sup> , CG5150 <sup>†</sup>
<b>MC F.</b>	P6	28A1-34D2	1.4	10.3	Eaat1 <sup>†2</sup> , numb <sup>†</sup> , chico <sup>1,2</sup> , CG18284 <sup>†</sup> , CG17097 <sup>†</sup> , crol <sup>†</sup> , CG6770 <sup>†1</sup> , Fatp <sup>†3</sup> , bun <sup>†</sup>
	P7	42A- 49C	1	19.5	Mismos candidatos que para el QTL con igual rango
<b>MC M.</b>	P6	28A1-34D2	1.1	3.5	Mismos candidatos que para el QTL con igual rango
<b>Ratio F</b>	R	12D-19F6	-0.5	2.7	Lsd-2 <sup>†</sup> , RhoGAP18BY <sup>1</sup> , pcmY, Obp19c <sup>†4</sup> , cactinY, car

Genes candidatos son loci que cambian su expresión entre dos líneas endocriadas endogámicas (RIL) resistentes al hambre y dos sensibles a la inanición y entre líneas de control frente a las líneas seleccionadas para la resistencia al hambre en estudios anteriores sobre la RH. Y Sorensen et al 2007, † Harbison et al 2005, ‡ Zinke et al 2002. Se dividieron los genes candidatos en seis clases definidas, como los genes prometedores que afectan la resistencia de hambre: (1) Genes determinantes en la resistencia a la inanición y otras formas de estrés, (2) Genes determinan la expectativa de vida, (3) Genes relacionados con la gluconeogénesis y el metabolismo de los lípidos, carbohidratos y ácidos grasos, (4) Genes involucrados en la percepción sensorial de los estímulos, (5) Genes relacionados con el desarrollo, (6) Genes implicados en la respuesta inmune.



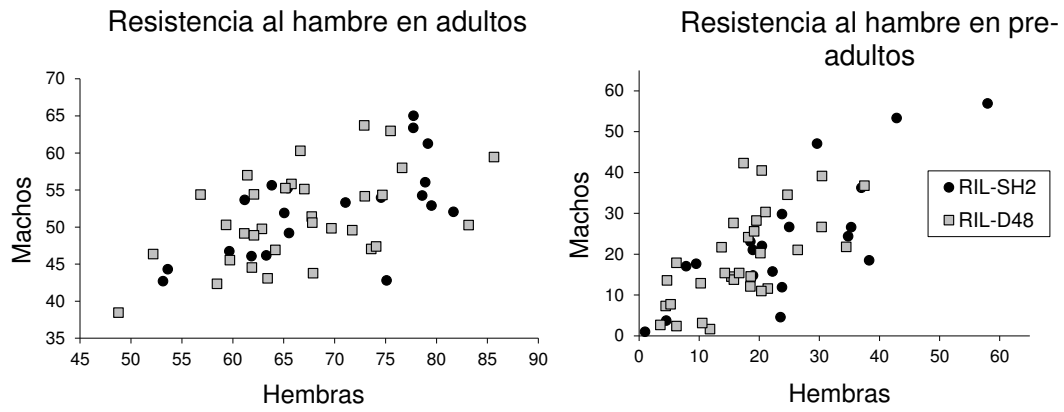


Figura 2.4.1. Valores medios para la resistencia a la inanición aguda (RH) en adultos y para el carácter de razón entre las sobrevividas en medio pobre y medio control en etapa del ciclo de vida pre-adulta en las RIL-D48 y RIL-SH2 de *D. melanogaster*. La RH en los adultos fue el tiempo de supervivencia media en horas para cada RIL y el sexo. El carácter razón se estimó como porcentaje de supervivencia calculada como el cociente entre las moscas emergidas de medio del pobre y de control para cada RIL.

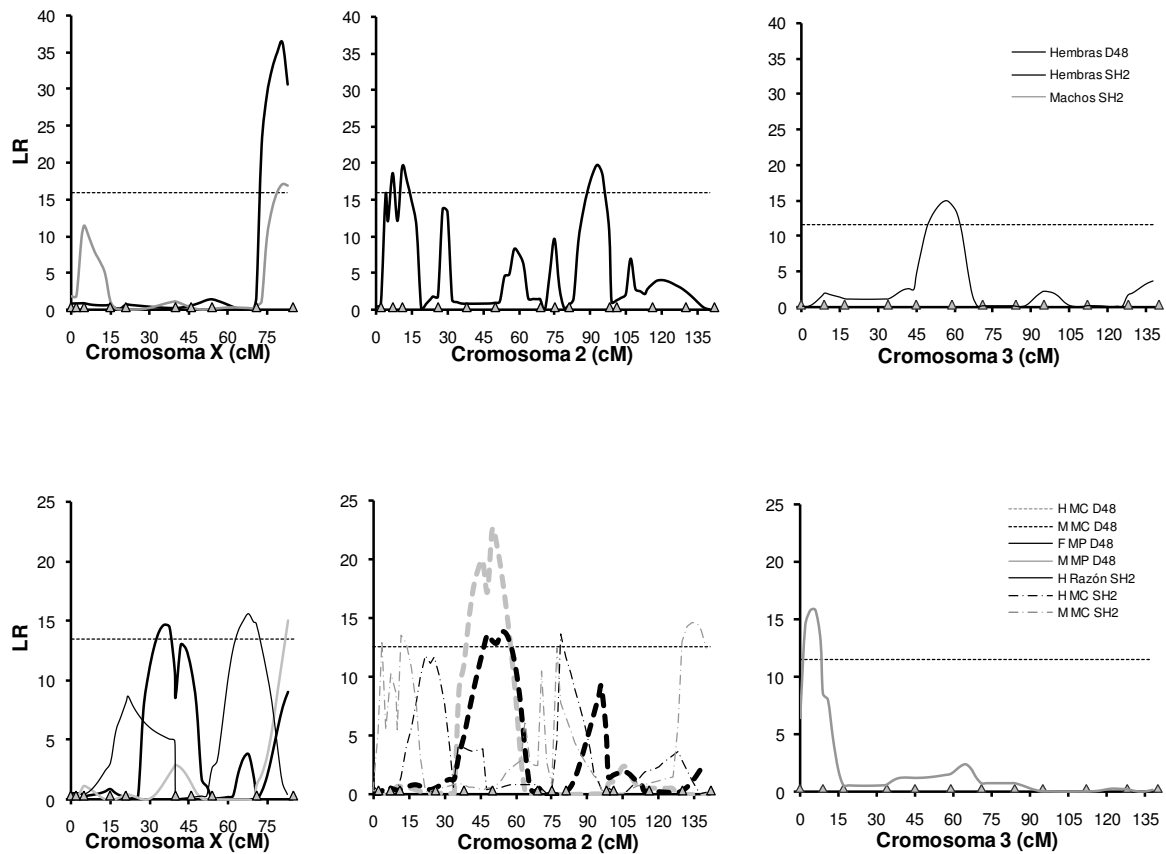


Figura 2.4.2. LR en función de la posición de mapa (cM) de mapeo por intervalo compuesto para la resistencia al hambre de moscas adultas (A) y para la sobrevivida de larvas en medio pobre (MP) y medio control (MC) (B) de *D. melanogaster* de los dos paneles de RIL (RIL-D48, RIL-SH2). También se muestra el mapeo del carácter razón (R) calculado como  $\ln(\text{razón}) = \ln[(\text{sobrevivida en MP}) / (\text{sobrevivida en MC})]$  (B). Los umbrales de significación fueron determinados por 1000 permutaciones (líneas horizontales). Los triángulos en el eje x corresponden a la ubicación de los marcadores utilizados en la mapeo de intervalo compuesto.

## **Conclusiones Mapeo de QTL para resistencia al hambre en moscas adultas y larvas de *D. melanogaster***

La resistencia a la inanición permanente había sido previamente mapeada en adultos de *Drosophila melanogaster* (Wang 2004, Harbison 2005, Nuzhdin SV 2007). En el presente estudio se realizó un análisis de QTL que explican la variación en la resistencia a la inanición o malnutrición (RH) tanto en larvas como en adultos mediante un mapeo de intervalo compuesto en dos paneles de RIL. Se encontró variación genética significativa entre las líneas de nuestra población de mapeo. Se identificaron cinco QTL para la resistencia al hambre (RH) en pre-adultos, además de otros cuatro QTL para RH permanente en adultos, que abarcan los tres cromosomas mayores de *D. melanogaster*.

Algunos de los RH-QTL colocalizan con QTL identificados en estudios previos (Tabla 2.4.3; Wang 2004, Harbison 2005, Nuzhdin SV 2007), aunque el poder estadístico del análisis se vio limitado por el número de marcadores y RIL. Dado que para evaluar si los QTL hallados son específicos de cada sexo necesitan, en parte, de una mayor cantidad de marcadores y RIL, esto no se ha evaluado específicamente (Curtsinger 2002). En cuanto a la colocalización con QTL hallados en estudios previos, por ejemplo nuestro A3/L7 RH-QTL colocaliza con un QTL para la resistencia al hambre identificado por Wang 2004; A3/L3, A4, L4 y L6 con QTL identificados por Harbison (2005) y A2/L3 y A4 con QTL identificados por Nuzhdin et al 2007. Además, un RH-QTL encontrado en la presente tesis solapa en las tres condiciones diferentes, cuando analizamos en moscas adultas (A1), tanto en machos como en hembras y cuando analizamos en larvas en medio pobre (L2: la Tabla 2.4.3, rango 16F3-19F6). Un QTL que colocaliza entre larvas y adultos, es decir, que explica al mismo tiempo la resistencia al hambre en dos etapas del ciclo de vida, sería mas bien un QTL general de

QTL que explica la resistencia al hambre, en vez de un QTL específico de una determinada fase del ciclo de vida.

Existen más de 400 genes que podrían ser considerados como genes candidatos que mapean dentro de nuestros RH-QTL como loci identificados por medio de estudios en RH con metodologías de microarrays y elementos p (Harbison et al 2004, 2005, Sorensen et al 2005, 2007). Si bien consideramos a todos estos genes como posibles candidatos, centramos nuestra atención en algunos de ellos (Tabla 2.4.3). Se dividieron a los genes candidatos en seis clases definidas según las funciones que cumplen, como genes prometedores que afectan la resistencia al hambre: (1) Genes determinantes de la resistencia a la inanición y otras formas de estrés, (2) Genes que determinan la longevidad, (3) Genes relacionados con la gluconeogénesis y el metabolismo de lípidos, carbohidratos y ácidos grasos, (4) Genes involucrados en la percepción sensorial de los estímulos, (5) Genes relacionados con el desarrollo, (6) Por último, genes implicados en la respuesta inmune (Tabla 2.4.3).

(1) Genes determinante la resistencia a la inanición y otras formas de estrés: Hsp23, Cyclin T (CycT), Trap1, CG1600, withered (whd), RhoGAP18B, chico, Thor, CG6770, hsp83. Los fisiólogos y genetistas evolutivos siempre han sostenido que existen mecanismos universales que promueven la resistencia a múltiples formas de estrés al mismo tiempo (ver Hoffmann y Parsons, 1991). De acuerdo con esto, encontramos muchos genes candidatos que mapean en las regiones de QTL que resultaron significativos en este estudio. La mutación en *Mgat1(1)*, cuando está en homocigosis es viable, pero los individuos adultos presentan importantes defectos en la actividad locomotora, en comparación con los heterocigotos o las moscas de tipo salvaje. Además, los machos son estériles y tienen la longevidad media y la máxima muy reducida (Sarkar et al., 2006). Varios genes como Hsp23 y CG1600 se

identificaron que desempeñan un papel importante en la tolerancia a la hipoxia (Azad, P., et al 2009). Un mutante, *withered* (*whd*), se encontró que era sensible tanto a la dieta y a la hiperoxia (Strub et al., 2008). Nuevos alelos de *whd* fueron inducidos sobre un fondo genético definido y líneas que portaban estos alelos resultaron ser sensibles al estrés oxidativo (Strub et al., 2008). Naylor y Tatar, 2007 propusieron que *CG6770* contribuye al control del crecimiento y proliferación celular, así como a la respuesta de estrés, incluyendo la resistencia a la inanición. *CG6770* es necesaria para la resistencia al estrés oxidativo en las células S2 (Naylor y Tatar, 2007).

(2) Genes que determinan la longevidad: UDP-GlcNAc:α-3-D-mannoside-?-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I (*Mgat1*), *brummer* (*bmm*), Excitatory amino acid transporter 1 (*Eaat1*), *chico*, *Cct1*, *Atg8a*, *Thor*. *Cct1* codifica un sustrato del receptor de insulina que actúa en la ruta metabólica del factor de crecimiento de tipo insulina/insulina (IGF). Clancy et al., 2001 encontró que la mutación en el gen *chico* extiende la longevidad media de la mosca *D. melanogaster* en un 36% en los heterocigotas. *chico* (Clancy et al., 2001) y *Thor* (Zid et al., 2009) determina tanto la longevidad y la respuesta a la inanición en *D. melanogaster*.

(3) Genes relacionados con la gluconeogénesis y el metabolismo de los lípidos, carbohidratos y ácidos grasos: *Glycogenin*, *Fad2*, Esterase 6 (*Est-6*), *brummer*, Phosphogluconate mutase (*Pgm*), *CG5932*, secretory Phospholipase A2 (*sPLA2*), *CG11669*, *CG8690*, Phosphoglucose isomerase (*Pgi*), Pyruvate dehydrogenase kinase (*Pdk*), *CG1809*, Fatty acid (long chain) transport protein (*Fatp*). La pérdida de *brummer* y *AKHR* causan obesidad extrema en las moscas (Gronke et al., 2007).

(4) Genes involucrados en la percepción sensorial de los estímulos químicos: Odorant-binding protein 56g (*Obp56g*), Odorant-binding protein 19c (*Obp19c*), Gustatory receptor 68a (*Gr68a*). Un componente del sistema olfativo de los insectos es

un grupo de proteínas de unión a odorantes (OBP) que están presentes en altas concentraciones en la linfa acuosa que rodea a las dendritas de las neuronas receptoras olfativas. El genoma de *Drosophila* contiene al menos 51 potenciales genes OBP que incluyen a *Obp19c* y *Obp56g* (Hekmat-Scafe et al., 2002). El olfato es de gran importancia para muchos insectos en comportamientos críticos para la supervivencia y la reproducción, incluida la ubicación de las fuentes de alimentos, la selección de los compañeros de apareamiento, el reconocimiento de la colonia con-específicos, y la determinación de sitios de oviposición (Hekmat-Scafe et al., 2002).

(5) Genes relacionados con el desarrollo: *grainy head* (*ghr*), *Punch* (*Pu*), *domino* (*do*), *rad50*, *cactin*, *Trithorax-like* (*Tr1*), *Cyclic-AMP response element binding protein A* (*CrebA*), *Larval cuticle protein 3*, (*Lcp3*), *crooked legs* (*crol*), *flap wing* (*flw*), *numb*, *Imp*, *Chd1*, *vri* (*vri*). *Grainy head* controla el crecimiento de la membrana apical y el alargamiento del tubo en respuesta a la señalización de *Branchless/FGF* (Hemphala, et al (2003). *Pu* es necesario para la pigmentación adecuada de la cutícula larval y la orientación adecuada y la diferenciación de estructuras de las larvas, especialmente en la región de la cabeza (Reynolds y O'Donnell, 1987). Los mutantes *Drosophila RAD50* son letales a nivel pupa, sin embargo, en el tercer estadio las larvas presentan niveles elevados de puentes en la anafase en las células en división (Gorski et al 2002). *Numb* (Wang et al., 2006, Lee et al., 2006), que también actúa como un supresor de tumores en el cerebro de larvas, e *Imp* (Koizumi et al., 2007) juegan un papel importante en la regulación de la neurogénesis. Un factor de remodelador de la cromatina *Chd1* (McDaniel et al., 2008) y *vri* (Szuplewski et al., 2003) son importantes para el desarrollo de las alas.

(6) Genes implicados en la respuesta inmune: *PGRP-SB1*, *PGRP-SC1a*, *PGRP-SC1b*. Los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana pueden desencadenar una

respuesta inmune en insectos y mamíferos. Una proteína de reconocimiento de peptidoglicano, PGRP, ha sido clonada a partir de las polillas, así como los vertebrados y se ha demostrado que participa en la detección de parásitos. Hay por lo menos 12 genes PGRP que se expresan en *Drosophila*. Las señales moleculares utilizadas por los insectos son altamente conservadas, por lo que es poco probable que las interacciones entre estos genes sea el foco de la coevolución huésped-parásito, al menos en *Drosophila* (Werner, T., et al 2000, Jiggins y Hurst, 2003).

El QTL localizado en la posición citológica 16F3-19F6 resultó ser significativo en las dos etapas analizadas del ciclo de vida de la mosca y en ambos sexos. Muchos genes mapean en este rango. Aquí resaltamos los siguientes: RhoGAP18B, pcm, Obp19c, cactin, car (Tabla 2.4.3). Estos genes son loci que cambian su expresión en líneas que difieren en la resistencia al hambre en estudios previos sobre este carácter (ver Tabla 2.4.3). RhoGAP18B está relacionado en la respuesta comportamental a la nicotina y a la respuesta al etanol (Rothenfluh et al., 2004). Pacman (pcm) es necesario para una fertilidad masculina normal (Zabolotskaya et al., 2008). Odorant-binding protein 19c está involucrada en la percepción sensorial de los estímulos químicos (Hekmat-Scafe et al., 2002). El gen cactin es importante en el desarrollo, es conocido por estar involucrado en la especificación del eje dorsal/ventral (Lin et al., 2000). Por último, carnation pertenece tanto a la categoría del proceso biológico "determinación de longevidad" y "respuesta a la inanición" que aparecen en FlyBase, en concordancia con el hecho de que la longevidad y la resistencia al hambre están correlacionados (Simonsen et al., 2007).

La longevidad y la resistencia al hambre son dos caracteres que están altamente correlacionados. La restricción dietaria fue uno de los más estudiados y el primer factor de estrés, que fue demostrado que causaba un aumento en la longevidad de *Drosophila*

(para una revisión ver Tatar 2011). Algunos de los QTL para sobrevivir a la malnutrición colocalizan con la QTL para longevidad y QTL relacionados con la longevidad de sensibilidad al estrés por calor detectados en la sección anterior en las mismas líneas que en el presente estudio. El QTL A1 y L2 (16F3-19F6) colocalizó con el QTL R3 de la sección anterior. Además, el QTL A3 (42A-49C) y A4 (67A-86E3) colocalizan con los QTL R4 y L5, respectivamente del estudio de la longevidad. En otras palabras, tres de cada cuatro QTL para la RH permanente en adultos solapan con QTL que explican la variación en la longevidad al analizar en los mismos paneles de RIL. Estos resultados soportan las hipótesis de que la resistencia al hambre y la longevidad comparten QTL pleiotrópicos.

En la naturaleza, las moscas suelen pasar períodos de malnutrición o períodos donde la ausencia de alimentación es absoluta (Rion y Kawecki 2007). En los laboratorios se emularon varias condiciones de malnutrición o no nutrición para evaluar la resistencia a la inanición en moscas (Wang 2004, Harbison 2005, Nuzhdin SV 2007). Nuestro mapeo de QTL para la RH en adultos se realizó con un tratamiento de hambre permanente, en otras palabras, el tratamiento consistía en mantener a las moscas en continua hambruna y encontramos cuatro QTL que explican la variabilidad en la resistencia al hambre en el adulto en esas condiciones. En Gómez et al (2009) se realizó un análisis QTL para RH en adultos en los mismos paneles de RIL utilizados en esta tesis. Pero en este trabajo el tratamiento de hambruna consistió un tratamiento cíclico más que en un tratamiento permanente. En Gómez et al (2009) logramos identificar una región QTL para SH (64D citológico rango - 66E2) en el brazo izquierdo del cromosoma 3 en los machos. Ninguno de los picos de QTL que fueron significativos en los adultos de la presente tesis se superponen con los picos del QTL hallado en el mencionado estudio (Gómez et al 2009). De todos modos, una porción del QTL de



Gómez et al. (2009) solapa con una porción del QTL P5, un RH-QTL que se detectó en los pre-adultos. La falta de solapamiento del QTL detectado en Gómez et al. (2009) y los RH-QTL de adultos detectados en esta tesis sugieren que la hipótesis de que la arquitectura genética es, al menos en parte, independiente para la resistencia al hambre con un tratamiento constante (agudo) o cíclica (no agudo). Teniendo en cuenta los resultados actuales y los resultados publicados en Gómez et al. (2009) se sugiere que algunas de las vías utilizadas para hacer frente al hambre en moscas podrían ser diferentes dependiendo del tipo de tratamiento (agudo o no agudo). Esta hipótesis debe ser puesta a prueba en un estudio donde el número de marcadores y RIL sea mayor de manera de aumentar el poder estadístico del análisis.

Como los resultados del mapeo de QTL podrían en parte depender del tratamiento utilizado, es de interés considerar cuál es la importancia ecológica de cada tratamiento utilizado en el laboratorio para la búsqueda de regiones del genoma de la mosca que expliquen la resistencia al hambre con un tratamiento agudo o cíclico. Las condiciones de hambre constante se producen en situaciones donde la comida es inexistente o es tan escasa que no puede ser encontrada por la mosca y las condiciones de hambre cíclica podrían ocurrir en situaciones en donde la comida es escasa, pero los individuos pueden tener acceso a ella durante un tiempo limitado de sus vidas. En la misma población, cuando el recurso es escaso, algunos individuos tendrán acceso a los alimentos por un tiempo limitado, mientras que otros fracasarán en la localización de los alimentos. Ambas situaciones (hambre aguda o no aguda) son probablemente parte del estrés nutricional que ocurre en la naturaleza, parte de un continuo que va desde el pleno acceso a los alimentos hasta la privación total del recurso alimenticio. En los laboratorios, un tratamiento de hambre no constante podría emular períodos de desnutrición en la naturaleza, mientras que un tratamiento de no nutrición constante

emularía períodos sin alimentación. Por lo tanto, los estudios en los laboratorios de ambas situaciones, contribuirían a la comprensión de la arquitectura genética de este carácter tan complejo, resistencia a la inanición o mal nutrición (RH).

El mapeo de QTL que explican la variabilidad fenotípica en la RH, es a menudo un primer paso en la identificación de los loci que contribuyen a la variación en el carácter, ya sea en las etapas del ciclo de vida adulta o pre-adulta. Los QTL que resultaron significativos en este estudio incluyen a regiones cromosómicas que contienen una serie de genes candidatos (Tabla 2.4.3). Para mapear en una escala más fina cada QTL, existe varios métodos que se encuentran disponibles para futuros estudios, incluyendo ensayos de complementación con líneas mutantes y estudios de expresión de genes candidatos.

---

## **2.5: Resultados y Conclusiones, la relación Longevidad y Resistencia al hambre**

---

### **Resultados Longevidad y Resistencia al hambre**

La supervivencia bajo condiciones de hambre puede ser un factor determinante en la evolución de la longevidad. La variación ambiental podría actuar como factor de selección produciendo una adaptación que promueva la supervivencia en tiempos de escasez de alimentos y permita su posterior reproducción cuando los recursos sean más abundantes. Cuando el hambre o la falta de alimento actúa como factor de selección, podrían evolucionar genes con efectos pleiotrópicos sobre ambos caracteres: la supervivencia al hambre (resistencia al hambre) y la supervivencia cuando el alimento está presente (longevidad). Por todo esto podemos encontrar colocalización de variación genética para la resistencia a la hambruna y la longevidad en el genoma de *Drosophila melanogaster*.

Se puso a prueba la correlación entre los caracteres estudiados, la resistencia al hambre y la longevidad. Esta correlación resultó marginalmente significativa en una sola comparación en adultos. Se verificó la correlación positiva entre estos caracteres al comparar los valores fenotípicos de machos entre la longevidad media en moscas que fueron pretratadas por estrés de alta temperatura y la resistencia al hambre media de adultos de RIL-SH2 (valor de correlación de Spearman,  $r_s = 0.43$ ,  $P < 0.06$ ). También puso a prueba esta correlación al comparar los valores fenotípicos de machos entre la longevidad media control y en moscas que fueron pretratadas por estrés de alta

temperatura y la resistencia al hambre media conjuntamente para RIL-D48 y RIL-SH2 (ver Figura 2.5.1). Si bien, en los machos el valor de la correlación es positivo (valor de correlación de Spearman,  $r_s = 0.15$  y  $r_s = 0.22$  respectivamente), esta no resultó significativa (Figura 2.5.1). En el resto de comparaciones no encontramos correlaciones que resultaran significativas, tanto al comparar valores de hembras entre la longevidad media tanto en moscas control como en tratadas con la resistencia al hambre y al comparar el carácter de razón (entre longevidades) y la resistencia al hambre. Resumiendo, encontramos una correlación positiva entre la longevidad y la resistencia al hambre solo en los machos tratados y en un panel de RIL y no en las hembras. Al analizar los valores fenotípicos de los machos de ambos paneles de RIL a la vez encontramos una tendencia de que los individuos más longevos son a la vez los más resistentes al hambre (Figura 2.5.1).

También se estudió la posible correlación entre la resistencia al hambre en pre-adultos y la longevidad media de moscas adultas tanto en condiciones de control como luego de un pretratamiento de estrés por alta temperatura. Acá también encontramos correlaciones significativas en los machos y no en las hembras (Figura 2.5.2). Pero a diferencia de la resistencia al hambre en adultos, en pre-adultos este carácter está correlacionado negativamente con la longevidad. Se verificó la correlación negativa entre estos caracteres al comparar los valores fenotípicos de machos entre la longevidad media en moscas que fueron pretratadas por estrés de alta temperatura y la resistencia al hambre media de pre-adultos de conjuntamente para RIL-D48 y RIL-SH2 (ver Figura 2.5.1, valor de correlación de Spearman,  $r_s = -0.28$ ,  $P < 0.04$ ).

Como mencionamos anteriormente, algunos de nuestros QTL que explican la variación de la resistencia al hambre (RH-QTL) colocan con QTL que explican la variabilidad en la longevidad (QTL de longevidad) y QTL relacionados con la

sensibilidad de la longevidad al estrés por calor en las RIL de *D. melanogaster* (Tabla 2.5.1). El QTL A1 y P2 (16F3-19F6) colocaliza con el QTL R3. Además, el QTL A3 (42A-49C) y A4 (67A-86E3) colocalizan con los QTL R4 y L5, respectivamente. Estos tres regiones-QTL tienen efectos aditivos negativos tanto sobre la resistencia al hambre como sobre la longevidad. En otras palabras, tres de cuatro QTL para la RH permanente en adultos solapan con QTL que explican la variación en la longevidad al analizar los mismos paneles de RIL. Estos resultados soportan las hipótesis de que la resistencia al hambre y la longevidad comparten QTL pleiotrópicos.

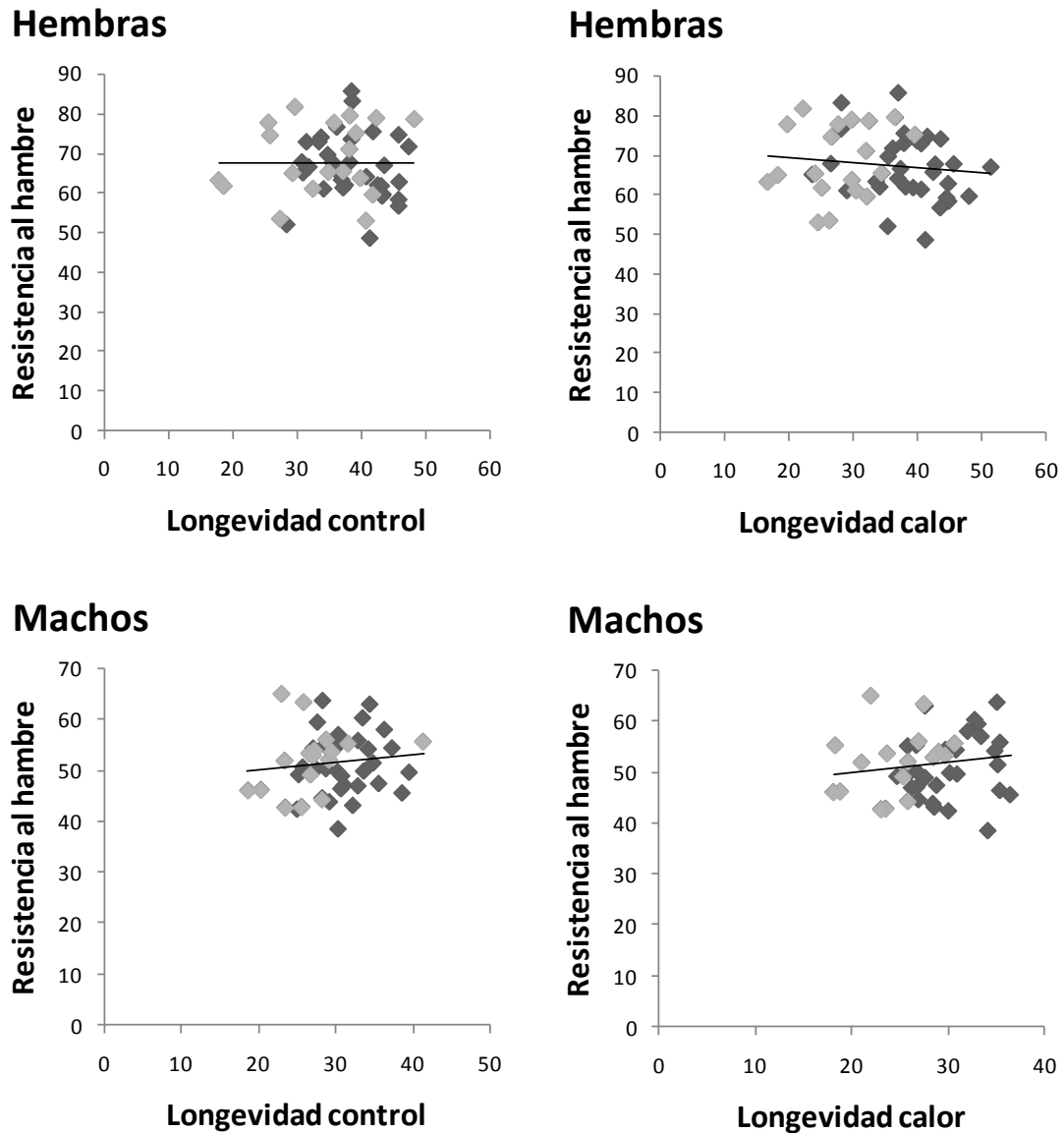


Figura 2.5.1. Valores medios de la resistencia al hambre en adultos en función de la longevidad media en moscas control o en moscas que fueron pretratadas por estrés de alta temperatura en machos y hembras de ambos paneles de RIL de *D. melanogaster*. En rombos grises se muestran los valores medios de las RIL-SH2 y en rombos negros se muestran los valores medios de las RIL-D48.

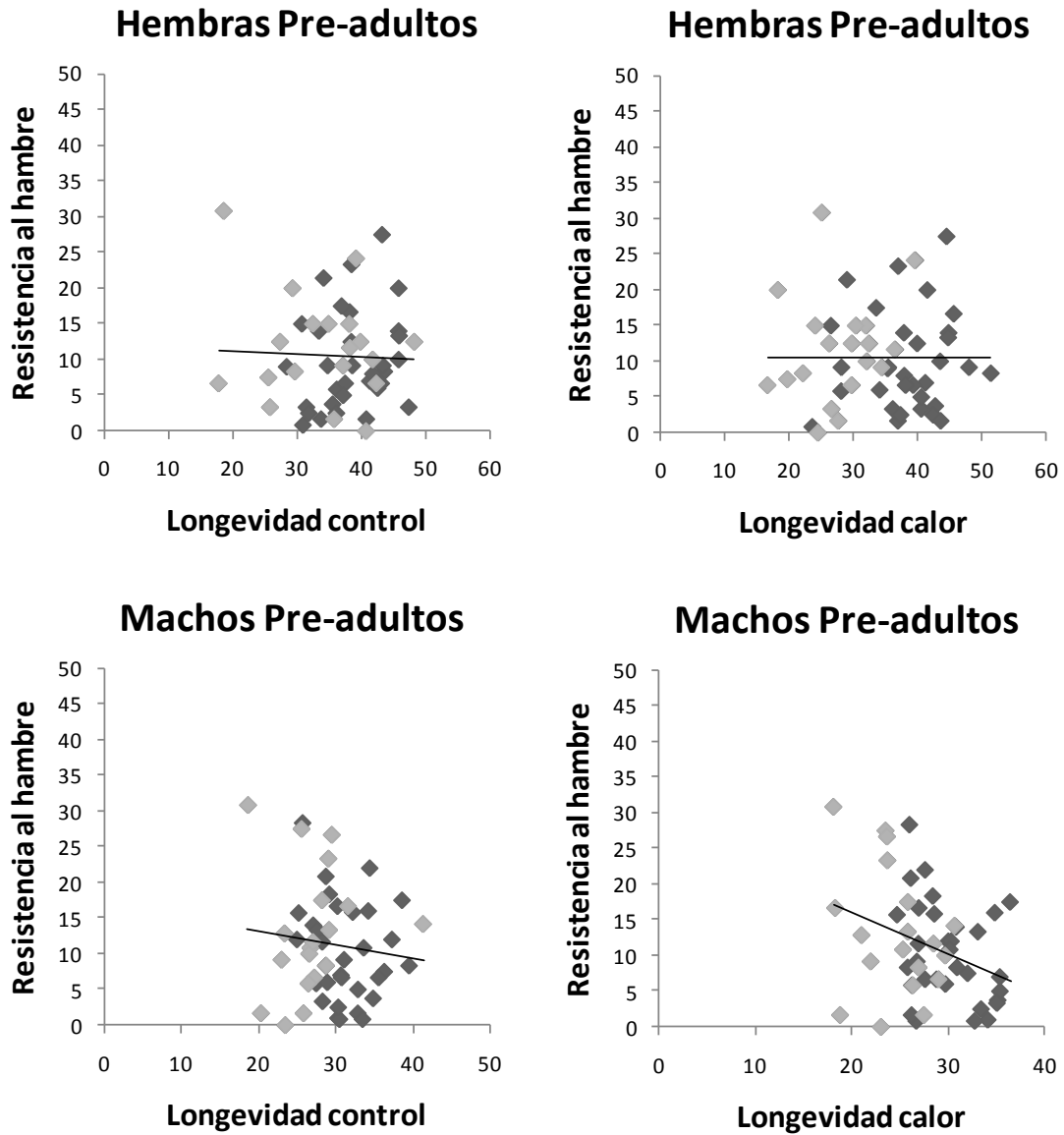


Figura 2.5.2. Valores medios de la resistencia al hambre en pre-adultos en función de la longevidad media en moscas control o en moscas que fueron pretratadas por estrés de alta temperatura en machos y hembras de ambos paneles de RIL de *D. melanogaster*. En rombos grises se muestran los valores medios de las RIL-SH2 y en rombos negros se muestran los valores medios de las RIL-D48.

Tabla 2.5.1. Regiones de QTL que resultaron significativos en el capítulo 2.3 y en el capítulo 2.4. QTL que se solapan para la resistencia al hambre de moscas adultas (A) y en pre-adultos (P) (tabla 2.4.3), con QTL para la longevidad en moscas control (L), así como también para un carácter de razón que mide la sensibilidad térmica en la longevidad (R) (tabla 2.3.4), identificados por mapeo de intervalo compuesto en RIL de *D. melanogaster*.

<b>Nombre (y rango) Longevidad-QTL</b>	<b>Nombre (y rango) RH-QTL</b>	<b>Genes candidatos dentro del rango que solapa</b>
R3 (16F3- 19F6)	A1/P2 (16F3- 19F6)	car, DD2R, RhoGAP18B, pcm, Obp19c, cactin.
R4 (42A-49C)	A3/P7 (42A-49C )	Pgi, Trap1, sPLA2, CG1600, CG11669, CG8690, Pgi, Pdk, CG1809, whd, wash, nemy, PGRP-SC1a, PGRP-SC1b
L5 (73A-90B2)	A4 (67A -86E3)	grim, , gig, Prat, puc, Sirt6, mthl11, SdhC, Hcs, <u>CG10053</u> , <u>CG2023</u> , <u>CG5359</u> , <u>CG31550</u> , <u>CG13698</u> , <u>CycT</u> , <u>pyd3</u> , <u>CG8223</u> , <u>CG1307</u> Cat, Ide

---

### **Conclusiones Longevidad y Resistencia al hambre o malnutrición**

Los estudios de loci de caracteres cuantitativos (QTL) sobre la longevidad y la resistencia al estrés sugieren que estos caracteres están genéticamente relacionados. Los experimentos de selección artificial de laboratorio sobre la longevidad en *D. melanogaster* han documentado las correlaciones genéticas entre la longevidad y la resistencia al estrés (Luckinbill et al., 1984; Rose, 1984; Service et al, 1985; Service,



1987; Dudas y Arking, 1995; Force et al., 1995; Arking et al., 2000a,b). Aunque la forma de resistencia al estrés que indirectamente responde a la selección para la longevidad es inconsistente (Tower, 1996; Harshman y Hoffmann, 2000). Por ejemplo, un conjunto de líneas seleccionadas para aumentar la longevidad, aumentaron la resistencia a la inanición y a la desecación (Rose, 1984; Service et al., 1985; Service, 1987), pero otro grupo de líneas seleccionadas para la longevidad desarrollaron resistencia al estrés oxidativo y no a la inanición o deshidratación (Luckinbill et al, 1984;. Dudas y Arking, 1995; Fuerza et al, 1995;.. Arking et al, 2000a, b). De manera similar la selección artificial para la resistencia al hambre aumenta la longevidad en un estudio (Rose et al., 1992), pero no en otro (Harshman et al., 1999). En consecuencia, una mejor prueba de la relación genética entre estos caracteres es, si colocan o no colocan QTL que tienen un efecto positivo sobre la supervivencia a la inanición y la longevidad (Wang et al 2004). Solo pocos estudios encontraron colocación de QTL entre la longevidad y la resistencia al estrés. Por ejemplo, Curtsinger y Khazaeli (2002) encontraron colocación de QTL para la resistencia al estrés oxidativo y la longevidad utilizando RIL que derivaban de líneas de selección para una mayor longevidad. En otro estudio, Wang et al (2004), encontraron QTL que afectan a la supervivencia bajo condiciones de hambre o condiciones de comida esta presente. Pero también identificaron QTL que afectan a la supervivencia en ambas condiciones ambientales (alimentación presente o ausente). Como una de estas regiones de QTL afectaban, de la misma manera a ambos caracteres, en Wang et al 2004, sostiene que esa región de QTL ofrece apoyo a la hipótesis de que la resistencia al hambre y la longevidad pueden tener una base genética común como resultado de una evolución conjunta de la resistencia a la inanición y la longevidad.

En esta tesis estudiamos dos caracteres de historia de vida: la longevidad y la resistencia a la inanición y realizamos un mapeo de QTL por intervalo compuesto utilizando RIL de *D. melanogaster* que derivan de líneas de selección sobre la resistencia al estrés térmico. Mapeamos QTL que explican la longevidad y QTL que explican la resistencia a la inanición (Tablas 2.3.4 y 3.4.3). Ambos caracteres, genéticamente variables (ver secciones 2.3 y 2.4), no presentan una correlación clara (ver resultados 2.5 y tabla 2.5.1 y 2.5.2). Si bien encontramos una correlación entre la longevidad luego de un pretratamiento térmico y la resistencia el hambre en adultos, esta correlación fue positiva solamente en machos y significativa en un solo panel de RIL (RIL-SH2). Además al estudiar la relación de la longevidad con la resistencia al hambre pero de los pre-adultos, encontramos evidencias de correlaciones negativas en los machos. Resumiendo, en las hembras, la longevidad y la resistencia al hambre de adultos y pre-adultos de las RIL de *D. melanogaster* no parecen estar relacionadas, mientras que si o están en los machos. En los machos el signo de la correlación parece depender de si comparamos la longevidad con la resistencia a la inanición de uno u otro estadio analizado. Al comparar la longevidad con la RH de los adultos, los caracteres se encuentran positivamente correlacionados, pero al compararla con la RH de pre-adultos la asociación es negativa (ver resultados 2.5 y tabla 2.5.1 y 2.5.2). Esta asociación negativa podría resultar adaptativa si pensamos que en condiciones de falta de alimento durante el desarrollo larval, los individuos priorizan la supervivencia, el empuje y finalmente la emergencia, por sobre el tiempo de vida adulta. Es decir, que existiría un trade-off entre la RH en larvas y la longevidad adulta dado que los recursos energéticos son escasos.

Otra evidencia que encontramos en esta tesis que apoya a la hipótesis de que estos caracteres están genéticamente relacionados es la superposición de QTL

encontrada. Tres de los cuatro RH-QTL de adultos colocalizan con QTL que explican la variación en la longevidad, estas regiones abarcan las bandas 16F3-19F6, 42A-49C y 73A-86E3 del genoma de *D. melanogaster* (Tabla 2.5.1).

Dentro de las regiones de colocalización de QTL de longevidad y resistencia al estrés, mapean genes candidatos que figuran en la tabla 2.5.1 y que fueron discutidos en las secciones anteriores 2.3 y 2.4. Algunos genes candidatos son conocidos por afectar a la longevidad y a la resistencia a la inanición, como por ejemplo *carnation* que pertenece tanto a la categoría del proceso biológico "determinación de longevidad" y "respuesta a la inanición" que aparecen en FlyBase (Simonsen et al., 2007). Este estudio es un punto de partida para analizar y conocer la arquitectura genética que puede ser compartida por la longevidad y la resistencia a la inanición. Por esto, en la tabla 2.5.1 mostramos otros genes interesantes de estudiar en un futuro. Algunos de ellos, como *RhoGAP18B*, que está relacionado en la respuesta a dos tipos de estrés, a la nicotina y al etanol (Rothenfluh et al., 2004) y *CG1600*, que desempeña un papel importante en la tolerancia a la hipoxia (Azad, P., et al 2009). Muchos genes que mapean en la región 42A-49C, como *sPLA2*, *CG1600*, *CG11669*, *CG8690*, *Pgi*, *Pdk* y *CG1809*, son genes relacionados con la gluconeogénesis y el metabolismo de lípidos, carbohidratos y ácidos grasos. Otros genes como *mthl11* y *Hcs* son genes que determinan la longevidad y la resistencia al estrés por calor, respectivamente. *Pacman* (*pcm*) es necesario para una fertilidad masculina normal (Zabolotskaya et al., 2008). *Odorant-binding protein 19c* está involucrada en la percepción sensorial de los estímulos químicos (Hekmat-Scafe et al., 2002). El gen *cactin* es importante en el desarrollo y es conocido por estar involucrado en la especificación del eje dorsal/ventral (Lin et al., 2000).

Capítulo 3:  
Isolíneas de  
*Drosophila buzzatii*

### **3.1- Introducción al análisis por isolíneas**

## **La base genética de la sobrevida a la restricción de alimento y su correlación con la resistencia al frío y el envejecimiento en *Drosophila***

---

En *Drosophila*, el análisis por isolíneas (cada línea es derivada de una única hembra) es una de las herramientas básicas para la investigación de la arquitectura genética de poblaciones naturales (Hoffmann and Parsons 1988; Capy et al. 1994; David et al. 2004) y para la interacción genotipo-ambiente (David et al. 1994; Karan et al. 1999, 2000). Este método permite el análisis de caracteres cuantitativos bajo condiciones de laboratorio controladas, con un alcance mucho más amplio que la mera evidencia de una heterogeneidad genética significativa entre las líneas. La variabilidad genética puede ser estimada a partir de la variabilidad entre líneas de un ANOVA. También es generalmente demostrada por un coeficiente significativo de correlación de intraclase, pero se deben tomar varios recaudos experimentales (David et al 2005). Suele considerarse la correlación de interclase como un parámetro genético específico que permite comparaciones entre diferentes caracteres, diferentes poblaciones o ambientes diferentes. El uso de isolíneas es, sin embargo, no restringido al cálculo de una correlación de intraclase y puede ser utilizado para estimar las correlaciones genéticas entre caracteres o ambientes. El método es también utilizado para el análisis de la plasticidad fenotípica en relación a un gradiente ambiental. Una descripción precisa de las curvas de respuesta (las normas de reacción) es posible, distinguiendo los parámetros de carácter y los parámetros de plasticidad. También es posible analizar los

caracteres que, como dimorfismo sexual, deben medirse en individuos diferentes. En muchos casos, más análisis empíricos y teóricos son posibles y necesarios. Se cree que, en el futuro, las isolíneas tendrán una importancia cada vez mayor entre las diferentes técnicas adecuadas para el análisis cuantitativo de la genética evolutiva, en una gran diversidad de especies (David et al 2005).

#### Metodología-Consideraciones

El análisis de la arquitectura genética de una población natural plantea un problema importante: ¿cómo se puede obtener una muestra no sesgada de moscas salvajes? Una posible estrategia es coleccionar muchas hembras inseminadas y usarlas para establecer una población en masa de laboratorio. Un método mejor es aislar en tubos independientes a las hembras silvestres recolectadas, para iniciar líneas independientes a partir de la descendencia de una hembra individual y que después de Parsons y Hosgood (1967) se llama líneas isolínea o isofemale lines. La metodología de isolíneas plantea por lo menos dos dificultades que hay que tener en cuenta. En primer lugar, se sabe que la gran mayoría de hembras salvajes capturadas en el campo han sido inseminadas por varios machos (Milkman and Zeitler, 1974; Imhof et al, 1998) y hay dos maneras de superar este problema. Una es cruzar una hembra y un macho de dos líneas independientes y, de esa manera, generar una "nueva línea", que alberga sólo cuatro genomas haploides independientes (véase Capy et al, 1993). Un segundo método consiste en aislar en cada frasco de cultivo cada hembra salvaje y cultivar la descendencia después de unos días. Debido a que los espermatozoides que fertilizan a la hembra son prioritariamente los últimos que entraron (Simmons, 2001), casi toda la progenie será engendrado por este último macho. La segunda dificultad que nos plantea la metodología de las isolíneas, es la estructura espacial de la población natural

muestreada. Si las moscas se colectan de una sola trampa, es probable que los individuos estén genéticamente relacionados (por ejemplo, serán la progenie de la misma madre). Idealmente, una población natural debería ser muestreada utilizando un número grande de trampas distantes. Sorprendentemente, este problema raramente se aborda en las publicaciones (David et al 2005). Se espera un sesgo similar pero más fuerte, cuando las aislíneas se forman a partir de los adultos emergidos de las trampas depositadas en la naturaleza.

Aunque se mantengan las mismas condiciones experimentales en los cultivos, se los haga crecer al mismo tiempo, a una temperatura controlada y en el mismo lote de medio de *Drosophila*, la descendencia de una misma línea indefectiblemente se cultiva en frascos diferentes y cada uno de ellos es un ambiente diferente. El número de larvas puede ser variable y, sobre todo, diferentes microorganismos (hongos, bacterias) pueden desarrollarse en diferentes tubos o botellas. En otras palabras, las diferencias entre líneas pueden ser debidas a la heterogeneidad entre los tubos, es decir, un efecto del medio ambiente. Varios enfoques se pueden utilizar para analizar este problema y minimizar su importancia. Con respecto a esto, una cuestión que se plantea frecuentemente es cuál es el número de líneas y el número de individuos por línea adecuados que tienen que ser analizados para obtener una muestra representativa de una población. Las cosas se hacen más difíciles cuando se estudian caracteres cuantitativos, así sean morfométricos, fisiológicos o comportamentales. Tales rasgos están generalmente más directamente relacionadas con la adaptación y, como se ha señalado por numerosos investigadores (por ejemplo, Lewontin, 1974) son más interesantes para los genetistas evolutivos. Son, sin embargo, más difícil de cuantificar, ya que las condiciones experimentales, tales como la temperatura y la calidad de los alimentos, deben definirse con precisión y ya que de no controlarlos puede cambiar la media de los

caracteres cuantitativos. Además, estas características, cuando se miden en isolíneas de laboratorio, es probable que cambien en generaciones sucesivas, pero en dos maneras opuestas. Por un lado, la adaptación a condiciones de laboratorio debe reducir la varianza entre las líneas, pero también puede modificar progresivamente la media general. Por otra parte, se espera que la deriva genética entre líneas produzca más divergencia entre las líneas en el transcurso de las generaciones. Hay que considerar también que el número de individuos por tubo mientras se mantienen las isolíneas puede tener un efecto importante, por ende se requiere que las isolíneas sean mantenidas con tamaños poblacionales similares.

Un efecto “tubo” importante es un argumento en contra de una base genética para la variación entre línea. Es, sin embargo, posible diseñar métodos para demostrar un componente genético. Por lo menos dos técnicas han sido aplicadas. Moreteau et al (1995) comparó las isolíneas con lo que llamó isogrupos. De una población natural, se aislaron parejas únicas para producir isolíneas clásicas, al mismo tiempo, grupos de 10 pares se juntaron permitiéndoles que ovipongan en un solo tubo. Un total de 10 descendientes de cada línea o grupo se midieron. El supuesto era que, si el efecto del medio era preponderante, las variaciones entre líneas y entre los grupos serían similares. Si, por el contrario, la variación entre las líneas tenía una base genética, cada isogrupo sería similar a una masa de la población y la variación entre ellos no debería ser significativa. Los resultados confirmaron la segunda expectativa: la variabilidad entre isogrupos fue siempre mucho menor que la variabilidad entre las líneas. Sin embargo, un ANOVA, puso de manifiesto una tendencia general de una ligera pero significativa heterogeneidad entre los grupos. Esta podría ser la consecuencia de algún efecto del ambiente. Sin embargo, también podría reflejar el hecho de que el tamaño efectivo de los grupos de padres fue mucho menor de 10 pares. Sabemos que las poblaciones



naturales presentan una gran variabilidad fenotípica (Coyne and Beecham, 1987; Imasheva et al, 1994; Moreteau et al, 1995; Gibert et al, 1998a) y que las hembras de tamaño corporal pequeño oviponen muy poco (Boule'treau, 1978), mientras que los machos más pequeños dejan menos descendencia (Partridge et al, 1987). Si, en lugar de 20, el tamaño efectivo promedio de cada grupo fue de 3 o 4 veces menos, puede haber todavía importantes diferencias genéticas entre la descendencia de los grupos.

Otro método convincente para demostrar una base genética responsable de las variaciones entre las isolíneas es investigar sus valores medios en las diferentes generaciones (Krebs y Loeschcke, 1997; Gibert et al, 1998a; Karan et al, 1998). Estos experimentos han demostrado una correlación positiva entre los valores medios de las diferentes generaciones. El fenotipo de una línea se puede repetir en distintas generaciones, y este fenómeno se llama repetibilidad genética (Gibert et al, 1998a). El valor de la correlación es, sin embargo, influenciado por el número de moscas que se mide en cada línea, y probablemente también por el error de muestreo en la elección de los padres en cada generación. La repetibilidad genética no es una estimación de la heredabilidad, aunque esperamos que los caracteres con alta heredabilidad sean más repetibles. Este problema merece una investigación empírica y teórica más amplia.

### Variabilidad genética

La variabilidad fenotípica es muy variable entre los diferentes caracteres. Como regla general, las características morfométricas, tales como el tamaño corporal, pigmentación, número de quetas o número de ovariola son sólo débilmente sensibles a las variaciones accidentales no controladas en las condiciones experimentales (David et al 2005). En consecuencia, el efecto ambiental para estos caracteres es pequeño. Los caracteres fisiológicos o comportamentales son mucho más difíciles de estandarizar, y

más sensibles a las variaciones accidentales. Esto no quiere decir que tales caracteres no sean genéticamente repetibles, y de hecho se ha demostrado capacidad de repetición de la tolerancia al calor (Krebs y Loeschcke, 1997) o el comportamiento sexual (Ritchie y Kyriacou, 1994). Otros caracteres pueden ser muy variables bajo las mismas condiciones de laboratorio. Por ejemplo, midiendo el tiempo de recuperación del coma después de un tratamiento de frío a 0°C es una buena manera para distinguir especies de ambientes templados (tolerantes al frío) y tropicales (sensibles al frío) (Gibert et al, 2001). Sin embargo, cuando se mide en una misma población y en las mismas condiciones, el tiempo de recuperación resultó ser muy variable, aunque la genética sigue siendo la misma (David et al, 1997). La técnica de isolíneas aplicada a este carácter ciertamente revela diferencias altamente significativas entre líneas, aunque el componente genético real podría ser muy bajo. Las condiciones óptimas de crianza favorecen y puede ser un pre requisito para una repetibilidad genética. Para análisis morfométricos, se utiliza un medio rico en nutrientes que contiene el 8% de levadura seca y nipagin para impedir el desarrollo de microorganismos (David y Clavel, 1965). Un solo frasco puede producir varios cientos de moscas de apariencia normal (dependiendo de la especie en cuestión), cuyo tamaño es prácticamente independiente de la densidad de larvas para un rango de densidad (Karan et al, 1999a). Por el contrario, un medio ordinario de azúcar y harina de maíz, sembrado con levaduras vivas, es mucho más sensible a los efectos del hacinamiento, y se observan moscas más pequeñas si la densidad alcanza 100 por tubo. El hecho de que diferentes laboratorios que investigan el mismo carácter no utilice la misma comida, complica todas las comparaciones. Por regla general, un medio no óptimo siempre resulta en un aumento de la variabilidad a nivel individual (véase Gibert et al, 1998a).

## Estimación de la varianza y del coeficiente de interclase

En las condiciones antes mencionadas (un carácter débilmente sensible al efecto ambiental, condiciones de buena alimentación, temperatura constante, tamaño de población similar entre isolíneas), las variaciones significativas entre líneas ponen de manifiesto la variabilidad genética. Un ANOVA revelará un componente dentro ( $V_w$ ) y uno entre líneas ( $V_b$ ).  $V_b$  es un estimador de la varianza genética ( $V_g$ ) cuando  $n$  es grande ( $N > 20$ ). En caso contrario, se realiza una corrección que es la siguiente:

$$V_g = V_b - V_w / n.$$

Con un diseño de isolínea, la variabilidad genética se puede estimar de otra manera, que no se utilizó en esta tesis, mediante el cálculo del coeficiente de correlación intraclase  $t$  (Hoffmann y Parsons 1988; Falconer 1989) según la fórmula:

$$t = \frac{V_b - V_w/n}{V_b + (n-1)V_w/n} = \frac{nV_b - V_w}{nV_b + (n-1)V_w}$$

Una discusión que surge en torno a esto es si el diseño de isolíneas permite una estimación de la varianza ambiental  $V_e$ , es decir, del componente no genético de la varianza. Existen varios puntos de vista al respecto. El primero es considerar que la varianza dentro  $V_w$  es mayormente un componente no genético (Bell, 1997), es decir,  $V_w \sim V_e$ . Sin embargo, los modelos cuantitativos genética (Falconer, 1989) proponen que  $V_w$  todavía alberga un componente genético significativo:  $V_w > V_e$ . Por último, podríamos tratar de estimar  $V_e$  con la varianza fenotípica total  $V_p = V_g + V_e$ .

## **Correlaciones entre caracteres**

El análisis de correlaciones entre caracteres es ampliamente utilizado en los estudios genéticos. La importancia en el estudio de las correlaciones se basa en que es útil para los estudios relacionados con: la acción pleiotrópica de los genes; estudios de selección artificial, es fundamental saber si la mejora en un carácter causa un efecto también en otro carácter. Por último en relación con la selección natural, el estudio de caracteres y sus correlaciones ayuda a entender la arquitectura genética de caracteres de historia de vida, como la longevidad y la resistencia a diferentes formas de estrés ambiental.

Existen dos causas que explican la correlación entre caracteres: una genética y otra ambiental. La causa genética de la correlación es principalmente la pleiotropía. No hay que perder de vista que el ligamiento puede dar cuenta de correlaciones transitorias, particularmente en poblaciones derivadas de cruces de líneas divergentes. La pleiotropía es la propiedad de un gen de afectar a dos o más caracteres, de forma que si el gen esta segregando afecta de manera simultánea a varios caracteres (Falconer y Mackay, 1996). La magnitud de la correlación explicada por pleiotropía expresa en qué medida los dos caracteres están influidos por los mismos genes. Pero esta correlación que surge de la pleiotropía es resultado de la acción conjunta de los genes segregantes que afectan a ambos caracteres. Puede pasar al mismo tiempo, que algunos genes aumenten la expresión de ambos caracteres, mientras que otros aumenten la de uno y disminuyan la del otro. Los primeros causan una correlación positiva, mientras que los segundos tienden a causar una correlación negativa, y por lo tanto la pleiotropía no produce necesariamente una correlación detectable. El ambiente puede ser causa de una correlación en cuanto los dos caracteres estén influenciados por las mismas condiciones

ambientales (Falconer y Mackay, 1996). De la misma manera, la correlación es una resultante de todos los factores que varían, algunos de los cuales pueden causar una correlación positiva y otros, negativa. La asociación entre dos caracteres que puede observarse directamente es la correlación de los valores fenotípicos o correlación fenotípica ( $r_p$ ).

En estadística, el **coeficiente de correlación de Spearman**,  $\rho$  es una medida de la correlación (la asociación o interdependencia) entre dos variables aleatorias continuas. Para calcular  $\rho$ , los datos son ordenados y reemplazados por su respectivo orden. El estadístico  $\rho$  viene dado por la expresión:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum D^2}{N(N^2 - 1)}$$

donde D es la diferencia entre los correspondientes estadísticos de orden de x - y. N es el número de parejas. Se tiene que considerar la existencia de datos idénticos a la hora de ordenarlos, aunque si éstos son pocos, se puede ignorar tal circunstancia. El valor del coeficiente de Spearman oscila entre -1 y +1, indicándonos asociaciones negativas o positivas respectivamente, donde un valor de cero significa no correlación.

---

### **Objetivo General:**

El objetivo general, al cual contribuyen los objetivos específicos de la presente tesis doctoral, es elucidar la base genética de los mecanismos de la respuesta a diferentes agentes de estrés ambiental a través de reino animal. *Drosophila* es utilizada

como un organismo modelo, la falta de alimento y la baja temperatura como modelos de estrés.

### **Objetivos específicos:**

Otro de los objetivos específicos de la tesis es el estudio genético de varios caracteres ecológicamente relevantes: la resistencia a la inanición o al hambre, la resistencia al frío, la resistencia a la desecación y longevidad en aislneas de *Drosophila buzzatii*. Asimismo, se estudiarán las posibles correlaciones genéticas entre la RH y los otros caracteres. Para este objetivo, se colectaron moscas en el campo y se fundaron en el laboratorio 30 aislneas aproximadamente (revisado en Hoffmann et al. 2003). Se analizaron varios caracteres en todas las aislneas como: resistencia hambre severo (RH), sobrevivida al frío (RF), recuperación desde el coma por enfriamiento (RCE), longevidad a 25°C, y la resistencia a desecación (RD).

---

### **Hipótesis:**

En las aislneas de *Drosophila buzzatii* se evaluarán las siguientes hipótesis: Primero, se evaluará si la resistencia al hambre es un carácter con varianza genética, que puede ser heredable. Segundo se estudiará si existe un trade-off entre la resistencia al hambre y la resistencia al frío en aislneas de *D. buzzatii* construidas desde una población natural. Finalmente, se pondrá a prueba la hipótesis de que existe una correlación positiva entre la resistencia al hambre, la longevidad, resistencia a la desecación y frío en *Drosophila* (Hoffmann et al. 2003). En el capítulo anterior se

estudió la base genética de la longevidad y de la resistencia al hambre en las líneas RIL antes descritas mediante el mapeo de QTL. Es interesante continuar estudiando la base genética tanto de resistencia al hambre como de la longevidad con otra metodología, mediante la utilización de líneas isóneas de *Drosophila buzzatii*.

---

## 3.2- Materiales y métodos del análisis por isolíneas

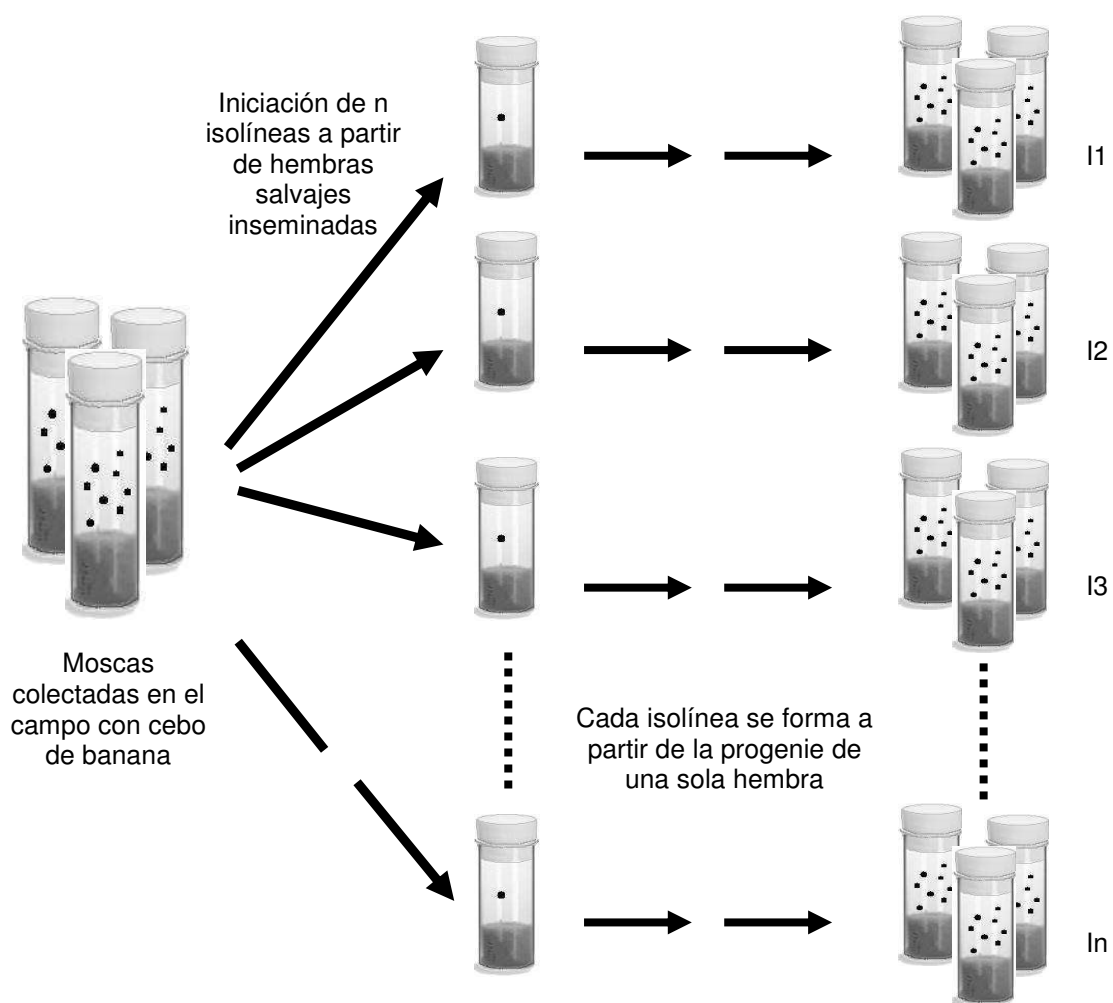
---

### Construcción de isolíneas

Se iniciaron aproximadamente 30 isolíneas a partir de hembras salvajes de *D. buzzatii* colectadas por Fabián Norry en agosto del año 2009 en la localidad de Chumbicha (Sur de Catamarca-Argentina, altitud 401 m, latitud 28.52°, longitud 66.15°, temperaturas extremas medias máxima y mínima: 35°C y 4°C, respectivamente). Las moscas fueron colectadas con una red por barrido, estas fueron atraídas con un cebo de banana en fermentación con levadura seca espolvoreada por encima. Las condiciones de muestreo se detallan a continuación: se colocaron 10 trampas posicionadas en línea recta dejando aproximadamente 10 m entre trampa y trampa (pero la presencia de cactus fue fundamental para determinar cada punto de muestro). La franja de muestreo fue aproximadamente 100 m. Una vez en el laboratorio, al día siguiente de colectadas en el campo, cada hembra salvaje se colocó en tubos individuales durante 3 días (tubos estándar con 6 ml de medio de cultivo) fundando las isolíneas y estas se mantuvieron separadas una de las otras en medio de cultivo estándar a 25°C (Figura 3.2.1).

Todos los caracteres que se describen a continuación se midieron en aproximadamente 20 isolíneas que sobrevivieron de *D. buzzatii*. Estas mediciones se realizaron desde la generación 2 hasta las 6. Los individuos experimentales fueron moscas de 3-4 días de edad desarrolladas a densidad larvaria estandarizada y a 25°C (Gibert et al. 1998; David et al. 2003; David et al. 2005).





**Figura 3.2.1.** Esquema la construcción de las isolíneas de *D. buzzatii* utilizadas para medir resistencia hambre severo en adultos (RH), sobrevida al frío (RF), recuperación desde el coma por enfriamiento (RCE), longevidad a 25°C, y la resistencia a deshidratación (RD).

### Mediciones de los caracteres cuantitativos:

#### Resistencia a la inanición o al hambre (RH):

Para cada isolínea, 60-80 individuos emergidos de cada sexo fueron crecidos a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  en botellas estándar (botellas de vidrio de 125 ml conteniendo 40 ml de medio de cultivo por botella; medio a base de papa disecada, levadura seca, azúcar, nipagin y

agua destilada) y en 12:12 h luz:oscuridad. Los individuos emergidos fueron contabilizados bajo ligera anestesia de CO<sub>2</sub> y luego fueron traspasados a tubos con medio de cultivo fresco donde se mantuvieron hasta la medición. A los 4 días de edad las moscas fueron traspasadas a tubos de vidrio de 110 x 20 mm conteniendo 6 ml de una solución de agar al 1.5% como único medio (20 moscas de cada sexo por tubo, 5 tubos por sexo y cada isolínea). De esta manera, los individuos quedan privados de alimento pero se evita la disecación. Tres veces al día se contó el número de individuos muertos de cada sexo para cada isolínea hasta que todos los individuos murieron. Se registró el tiempo en horas que permaneció vivo cada individuo desde el momento en que las moscas fueron traspasadas al medio de agar.

#### Sobrevida al estrés por frío:

Se colectaron 140-210 individuos experimentales de cada isolínea que fueron crecidos a 25±1°C en botellas estándar y en 12:12 h luz:oscuridad. Los individuos emergidos fueron traspasados a tubos con medio de cultivo fresco. A los 4 días de edad entre 30 a 40 moscas fueron traspasadas a tubos de vidrio vacíos, tapados con un algodón humedecido con agua destilada (7 tubos réplicas por isolínea). Estos tubos fueron colocados en una cámara de cría a 4°C durante 168 horas (una semana). Una vez dentro de la cámara de cría, a los pocos minutos las moscas se quedaban inmóviles y perdían la postura erecta, estado en el que permanecían hasta el final del tratamiento. Al cabo de ese tiempo de tratamiento las moscas fueron transferidas a tubos con medio de cultivo fresco por 24 horas a 25°C. Finalmente, para estimar la resistencia al frío se registró el porcentaje de moscas sobrevivientes para cada isolínea por sexo promediando los valores sobre réplicas.

### Longevidad a 25°C:

La longevidad se midió a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  con un ciclo de 12 h luz 12 h oscuridad en todas las aislíneas. Se utilizó la metodología general descrita en (Norry y Loeschcke 2002a,b, 2003). Todos los individuos experimentales fueron crecidos a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  en botellas estándar (botellas de vidrio de 125 ml conteniendo 40 ml de medio de cultivo por botella; medio a base de papa disecada, levadura seca espolvoreada por encima, nipagin y agua destilada) bajo condiciones de 12:12 horas de luz/oscuridad. Después de la eclosión, los individuos experimentales fueron colectados, separados por sexo usando una anestesia de  $\text{CO}_2$  y mantenidos en tubos estándar (tubos de 80 x 20 mm conteniendo 6 ml de medio de cultivo) a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  con 20 moscas por sexo por tubo y 8 tubos aislínea (4 por cada sexo). Los tubos fueron examinados cada 2 días registrando el número de individuos muertos, y las moscas sobrevivientes fueron transferidas a nuevos tubos con medio de cultivo fresco. Este procedimiento se llevó a cabo hasta que la última mosca murió. Para mantener la densidad aproximadamente constante dentro del tubo durante la medición, se juntaban las moscas de distintos tubos en uno, a medida que se reducía el número de moscas dentro de los tubos; sin mezclar aislíneas ni sexos. Se calculó la longevidad media en días promediando los valores de longevidad de todos los individuos por aislínea y por sexo.

### Resistencia a la deshidratación (RD):

Los individuos experimentales de cada aislínea que fueron crecidos a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  en botellas estándar y en condiciones en 12:12 h luz:oscuridad. Los individuos emergidos fueron contabilizados bajo ligera anestesia de  $\text{CO}_2$  y a los 4 días de edad las moscas fueron traspasadas a tubos de vidrio vacíos (20 moscas de cada sexo por tubo, 8-10 tubos por cada aislínea y sexo) que fueron colocados en una cámara de cría a  $25\pm 1^\circ\text{C}$

que se encontraba con 30% de humedad. Los tubos fueron examinados a las 32 horas de iniciado el experimento registrando el porcentaje de sobrevivencia (Bubliy y Loeschcke 2005) y promediando sobre réplicas como una estima de la resistencia a la deshidratación.

#### Recuperación del coma por enfriamiento (RCE):

Los individuos experimentales de cada aislón fueron criados a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  en botellas estándar y en condiciones en 12:12 h luz:oscuridad. Se registró la recuperación desde el coma por enfriamiento (RCE, en segundos) para 40-60 individuos de 4 días de edad de ambos sexos de todas las aislones. Previo a la medición, los individuos experimentales fueron sedados utilizando  $\text{CO}_2$  y traspasados a tubos plásticos vacíos de 80 x 20 mm. Los tubos se colocaron en una heladera térmica con hielo. Esta heladera se ubicó en una cámara fría estabilizada a  $5^{\circ}\text{C}$ . De esta manera es posible mantener la temperatura de tratamiento a  $0^{\circ}\text{C}$  hasta que se derrita todo el hielo. Luego de 20 horas a  $0^{\circ}\text{C}$ , los individuos fueron retornados a  $25^{\circ}\text{C}$ , momento en el cual se realizó la medición. Para cada sexo y línea, se registró el tiempo en segundos que demoró cada mosca en posarse sobre sus patas de manera voluntaria luego del tratamiento de frío. Vale aclarar aquí que las moscas con menores tiempos de recuperación son las moscas más resistentes y las que tardan más en recuperarse son las menos resistentes. Se aclara que las mediciones de la Recuperación del coma por enfriamiento (RCE) no fueron autorizadas ni supervisadas por director de esta tesis.

#### Tasa de senescencia

A partir de los datos registrados en el experimento de longevidad, se estimaron, además de la longevidad media, los parámetros de la función Gompertz. Esta función es

un modelo ampliamente utilizado en biología evolutiva para caracterizar los parámetros de mortalidad (Promislow y Haselkorn, 2002). Dicho modelo supone que la tasa de mortalidad aumenta con la edad. De acuerdo a este modelo, la tasa de mortalidad a la edad  $x$ ,  $\mu_x$ , está determinada por los parámetros  $a$  y  $b$ :  $\mu_x = a.e^{bx}$ , donde el parámetro  $a$  representa la tasa de mortalidad inicial y el parámetro  $b$  representa la tasa a la cual la mortalidad aumenta con la edad. El parámetro  $b$  puede interpretarse como la tasa de senescencia demográfica (Promislow et al., 2002). Estudios previos han encontrado que la variación en la longevidad entre genotipos o especies puede deberse principalmente a diferencias en la pendiente de la función Gompertz ( $b$ ) o bien en la ordenada al origen de dicha función ( $a$ ) (Promislow y Hasellkorn, 2002).

---

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de todos los caracteres medidos, se realizaron ANOVA de dos factores con sexo como factor fijo y la isolínea como factor aleatorio. Para todos los caracteres se calcularon los componentes de varianza y así obtener una estima de la varianza genética ( $V_g$ ). Adicionalmente, se realizaron las correlaciones de Spearman entre las todos los caracteres estudiadas, incluyendo a el parámetro  $b$  de la función de Gompertz y entre sexos. Todos los ANOVA y correlaciones fueron implementados utilizando STATISTICA (Statsoft, 1995).

---

### 3.3 Resultados del análisis por isolíneas

---

Para la realización de esta tesis de doctorado medí una serie de caracteres de historia de vida, la resistencia al hambre RH y la deshidratación RD, longevidad a 25°C L, recuperación desde el coma por enfriamiento RCE y sobrevida al frío SF, en isolíneas de *Drosophila buzzatii* que fueron construidas a partir de moscas salvajes capturadas en el campo en la localidad de Chumbicha, provincia de Catamarca, Argentina.

#### La resistencia al hambre

En la figura 3.3.1 se muestran los valores medios de la resistencia al hambre de cada una de las isolíneas de *D. buzzatii* medidos tanto en machos y en hembras. La resistencia al hambre resultó genéticamente variable en estas líneas (ANOVA con efecto línea significativo tabla 3.3.1). Las hembras resultaron significativamente más resistentes que los machos (ANOVA con efecto sexo significativo tabla 3.3.1, tabla 3.3.2), mientras que las hembras tuvieron una longevidad promedio en un medio de agar de 78.5 horas, los machos resistieron 70.1 horas (tabla 3.3.2). La interacción genotipo-ambiente (isolínea-sexo) resultó significativa, pero esta explica solo un 2.4% de la varianza fenotípica total, mientras que el efecto línea explica el 14.4 % de la varianza total (tabla 3.3.1). El efecto línea es un buen estimador de la varianza genética (David 2005) de la resistencia al hambre en estas líneas, lo que podría extrapolarse a la población de origen.

## La resistencia a la deshidratación

La resistencia a la deshidratación resultó un carácter genéticamente variable en las aislneas de *D. buzzatii* utilizadas en este estudio que fueron iniciadas a partir de moscas salvajes colectadas en la localidad de Chumbicha, provincia de Catamarca. La varianza genética explica un 29.0% de la varianza fenotípica total, mientras que la interacción genotipo-ambiente explica solo un 1.4% (tabla 3.3.1). En promedio las hembras resultaron ser más resistentes que los machos (tabla 3.3.1, tabla 3.3.2). Mientras que el 58% de las hembras sobrevivieron a un tratamiento de 32 horas en tubo vacío en un ambiente con 30% de humedad, 42.4 de cada 100 machos sobrevivieron a dicho tratamiento.

## Longevidad a 25°C

La longevidad media en las aislneas medida a 25°C también resultó ser un carácter genéticamente variable. La varianza genética explica un 14.2% y la interacción genotipo-ambiente explica un 4.8% de la varianza fenotípica total (tabla 3.3.1). Los machos, con una longevidad promedio de 22.7 días, resultaron ser menos longevos que las hembras que vivieron en promedio 30.1 días (tabla 3.3.2).

## Resistencia al frío: Recuperación desde el coma por enfriamiento y Sobrevida al frío

La resistencia al frío fue analizada midiendo dos caracteres: la recuperación desde el coma por enfriamiento (RCE) y la sobrevida al frío (SF). Al igual que el resto de los caracteres medidos en las aislneas de *D. buzzatii*, ambos caracteres de resistencia al frío son genéticamente variables y el efecto línea explica el 14.8% y el 38.1% de la varianza fenotípica total para la RCE y la SF, respectivamente (tabla 3.3.1). La varianza explicada por la interacción genotipo-ambiente es 0 para ambos caracteres (tabla 3.3.1).

Las hembras tienen valores de RCE significativamente más bajos (tabla 3.3.2), por lo que son más resistentes al frío que los machos (a menores tiempos de RCE mayor es la resistencia). Esta diferencia significativa en la resistencia al frío entre sexos, no resultó significativa al medir la SF como el porcentaje de moscas vivas luego de ser sometidas por una semana a 4°C (tabla 3.3.1).

#### Correlaciones fenotípicas entre sexos y entre caracteres

Se evaluaron las correlaciones de Spearman entre caracteres (tabla 3.3.3; figura 3.3.2 a la figura 3.3.5). La resistencia al hambre está correlacionada positivamente con la resistencia al frío (correlación negativa entre RCE y RH), siendo significativa esta correlación en las hembras (tabla 3.3.3; figura 3.3.3). A su vez, la longevidad está positivamente correlacionada tanto con la resistencia a la deshidratación, como con la resistencia al frío, siendo significativas estas correlaciones ahora en los machos (tabla 3.3.3; figura 3.3.2 y figura 3.3.4). Finalmente, encontramos una correlación positiva para los valores fenotípicos entre ambos caracteres de resistencia al frío. Dicho de otro modo, los valores de la RCE y la SF en las isóneas de *D. buzzatii* están correlacionados negativamente.

Para todos los caracteres medidos en las isóneas de *D. buzzatii* encontré una correlación positiva y altamente significativa ( $***P < 0.001$ ) entre sexos para un mismo carácter (tabla 3.3.3 panel B). Es decir que existe una asociación positiva para los valores fenotípicos entre machos y hembras para todos los caracteres medidos.

#### Tasa de senescencia

Se calcularon los parámetros de la función Gompertz a y b para cada una de las isóneas de *D. buzzatii* y en la tabla 3.3.4. Se evaluaron las correlaciones de Spearman



entre los parámetros y los demás caracteres medidos (tabla 3.3.4). No se encontraron correlaciones significativas entre el parámetro b (tasa de senescencia demográfica) y el resto de los caracteres. En cambio, al comparar estos caracteres con la tasa de mortalidad inicial, se encontraron ciertas correlaciones significativas. Tanto en machos como en hembras el parámetro a se encuentra negativa y significativamente correlacionado con la longevidad media. Además, se encontraron correlaciones negativas entre este parámetro con la resistencia a la desecación y la sobrevida al frío al evaluar en los machos.

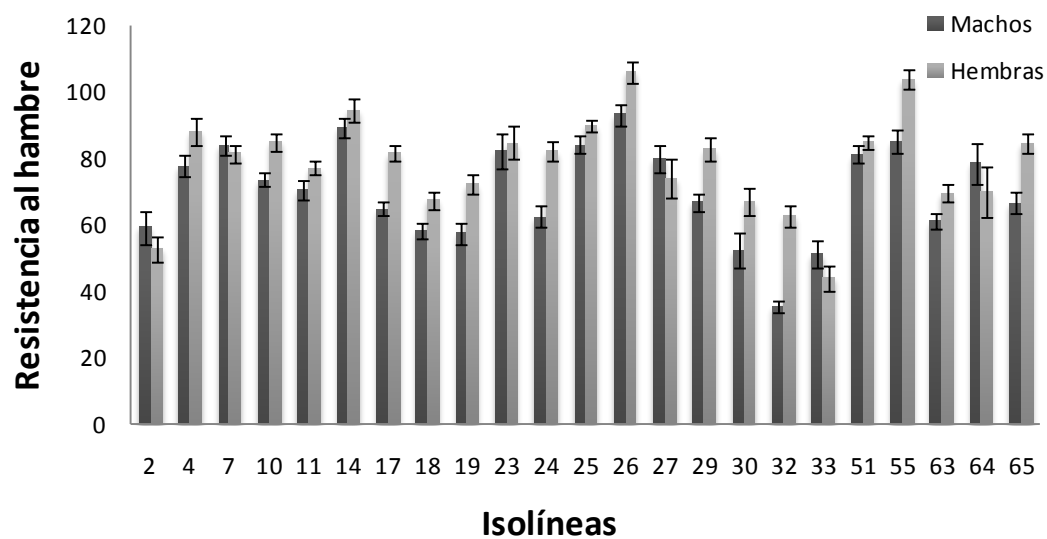


Figura 3.3.1. Valores medios de la Resistencia al hambre en machos y hembras de cada isolínea de *Drosophila buzzatii*.

Tabla 3.3.1: Análisis de varianza realizado para testear las diferencias en los diferentes caracteres medidos en las isolíneas de *Drosophila buzzatii* con (1) la línea como factor aleatorio y (2) el sexo como factor fijo. Se presenta el análisis para cada carácter estudiado (resistencia al hambre y la deshidratación, longevidad a 25°C, recuperación desde el coma por enfriamiento y sobrevida al frío).

Carácter	Fuente de variación	gl	CM	F	$\sigma^2$ (%)
Resistencia al hambre	(1) Línea	22	36.69	8.98***	14.4
	(2) Sexo	1	146.18	25.31***	Fijo
	(1) x (2)	22	3.93	3.10***	2.4
	Error	3391	1.27		83.2
Resistencia a la deshidratación	(1) Línea	21	3802.40	8.98***	29.0
	(2) Sexo	1	25218.87	25.31***	Fijo
	(1) x (2)	21	531.17	3.09***	1.4
	Error	340	451.14		69.6
Longevidad	(1) Línea	16	5418.65	5.65***	14.2
	(2) Sexo	1	26158.34	24.60***	Fijo
	(1) x (2)	16	925.96	5.17***	4.8
	Error	2396	179.05		81.0
Recuperación del coma por enfriamiento	(1) Línea	16	39108575.09	16.09***	14.8
	(2) Sexo	1	36357751.69	14.27**	Fijo
	(1) x (2)	16	2417903.711	2.03**	0
	Error	2972	1196654.012		85.2
Sobrevida al frío	(1) Línea	15	4536.88	25.37***	38.1
	(2) Sexo	1	722.05	4.05	Fijo
	(1) x (2)	15	179.76	0.40	0
	Error	221	449.40		61.9

$\sigma^2$ : componente de varianza; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Tabla 3.3.2: Valores medios y error estándar para los caracteres estudiados (resistencia al hambre y la deshidratación, longevidad a 25°C, recuperación desde el coma por enfriamiento y sobrevida al frío) en machos y hembras de las aislneas de *Drosophila buzzatii*.

	Machos	Hembras
Resistencia al hambre (horas)	70.1 (3.3)	78.5 (3.4)
Resistencia a la deshidratación	42.4 (6.1)	58.0 (7.1)
Longevidad (días)	22.7 (1.4)	30.1 (1.7)
Recuperación del coma por enfriamiento (seg)	2123.9 (121.6)	1910.5 (106.7)
Sobrevida al frío	60.3 (7.0)	56.9 (7.3)

Tabla 3.3.3: Correlaciones de Spearman para los valores medios (a) entre los caracteres medido en machos y hembras y (b) entre sexos, de las aislneas de *Drosophila buzzatii*. ns comparaciones que resultaron no significativas ( $p > 0.05$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Resistencia al hambre (RH) y la deshidratación (RD), longevidad a 25°C (L), recuperación desde el coma por enfriamiento (RCE) y sobrevida al frío (SF).

a-

<b>MACHOS</b>	<b>RH</b>	<b>RD</b>	<b>L</b>	<b>RCE</b>	<b>SF</b>
<b>RH</b>	-	Ns	ns	ns	ns
<b>RD</b>	-	-	0.53*	ns	ns
<b>L</b>	-	-	-	ns	0.60*
<b>RCE</b>	-	-	-	-	-0.56*
<b>SF</b>	-	-	-	-	-

<b>HEMBRAS</b>	<b>RH</b>	<b>RD</b>	<b>L</b>	<b>RCE</b>	<b>SF</b>
<b>RH</b>	-	Ns	ns	-0.54*	ns
<b>RD</b>	-	-	ns	ns	ns
<b>L</b>	-	-	-	ns	ns
<b>RCE</b>	-	-	-	-	ns
<b>SF</b>	-	-	-	-	-

b-

ENTRE SEXOS	
<b>RH</b>	0.833***
<b>RD</b>	0.760***
<b>L</b>	0.752***
<b>RCE</b>	0.784***
<b>SF</b>	0.856***

Tabla 3.3.4: Valores medios y error estándar sobre isolíneas para el parámetro a que representa la tasa de mortalidad inicial y el parámetro b que representa la tasa de senescencia demográfica (A). Correlaciones de Spearman para los valores medios entre los caracteres medidos en machos y hembras y los parámetros a y b de las isolíneas de *Drosophila buzzatii*. ns comparaciones que resultaron no significativas ( $p > 0.05$ ). m P = 0.07, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Resistencia al hambre (RH) y la deshidratación (RD), longevidad a 25°C (L), recuperación desde el coma por enfriamiento (RCE), sobrevivida al frío (SF), parámetro a y b (B).

(A)

	Machos	Hembras
Parámetro a	0.020 (0.004)	0.010 (0.002)
Parámetro b	0.058 (0.006)	0.069 (0.009)

(B)

MACHOS	RH	RD	L	RCE	SF
<b>a</b>	ns	-0.45m	-0.84***	Ns	-0.49*
<b>b</b>	ns	Ns	ns	Ns	ns

HEMBRAS	RH	RD	L	RCE	SF
<b>a</b>	ns	Ns	-0.61**	Ns	ns
<b>b</b>	ns	Ns	ns	Ns	ns

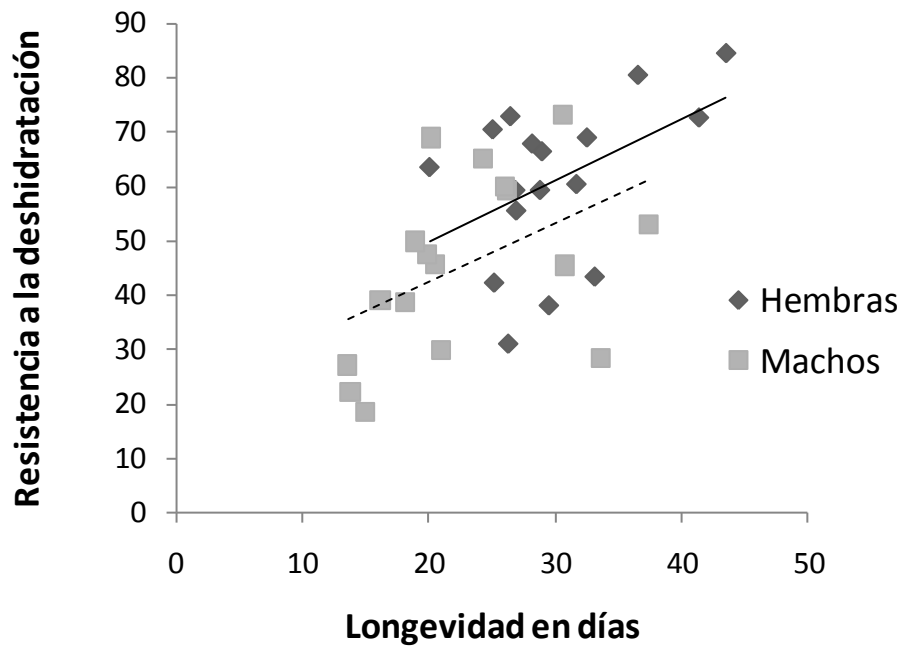


Figura 3.3.2. Resistencia a la deshidratación media en función de la longevidad media en machos y hembras para todas las aislneas de *Drosophila buzzatii*.

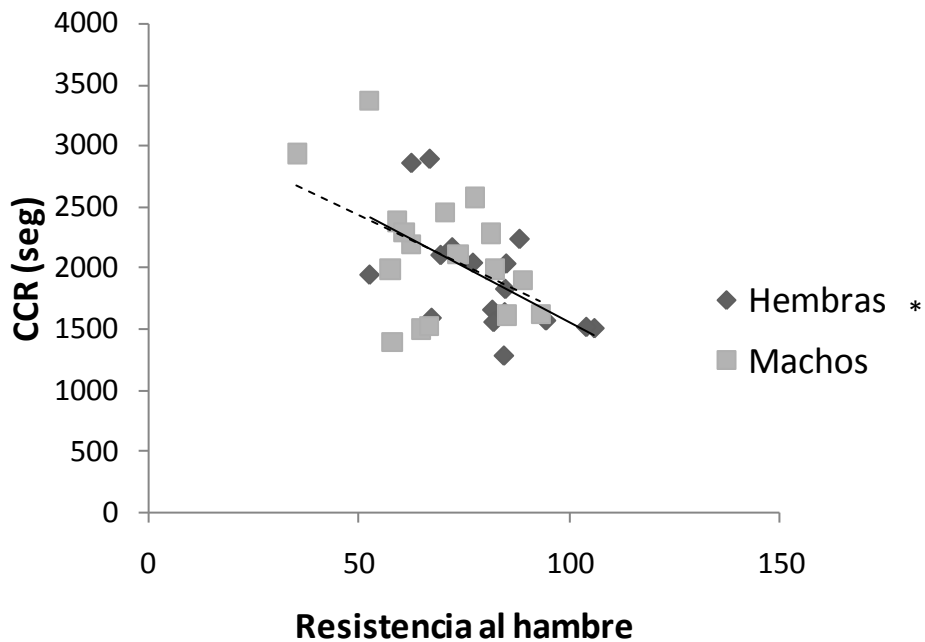


Figura 3.3.3. Resistencia al coma por baja temperatura media en función de la resistencia al hambre media en machos y hembras de todas las aislneas de *Drosophila buzzatii*.

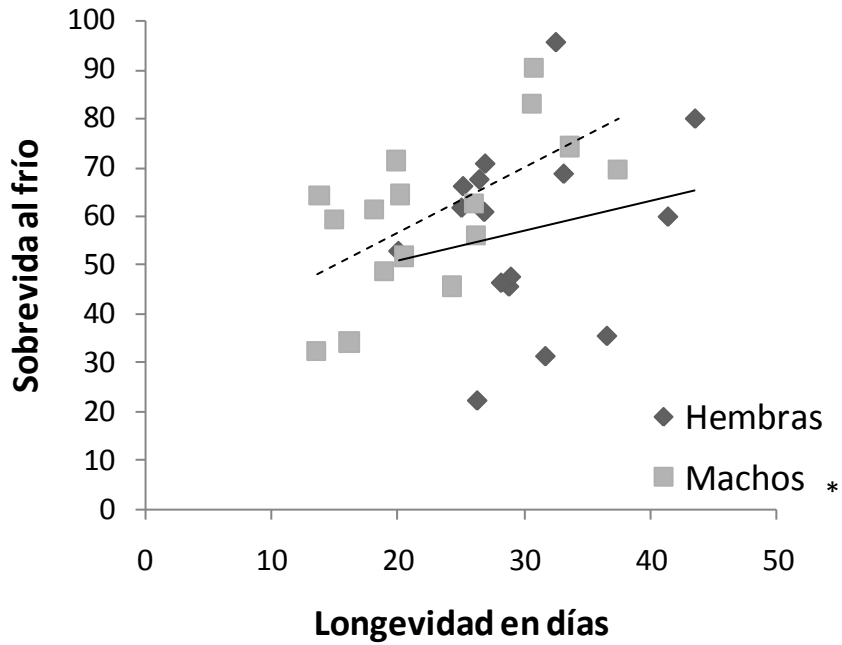


Figura 3.3.4. Sobrevida al frío media en función de la longevidad media en machos y hembras de todas las aislíneas de *Drosophila buzzatii*.

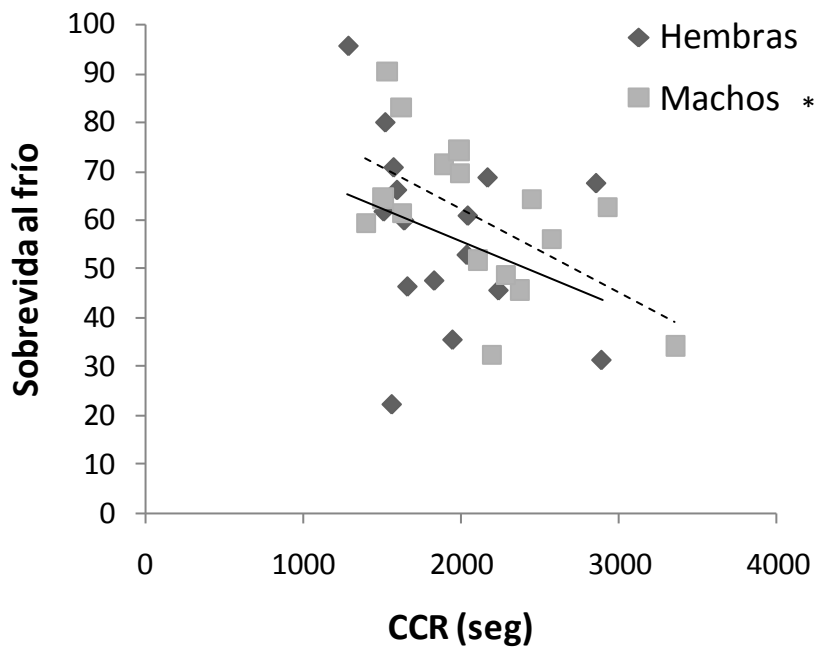


Figura 3.3.5. Sobrevida al frío media en función de la resistencia al coma por baja temperatura media en machos y hembras de todas las aislíneas de *Drosophila buzzatii*.

## 3.4 Discusión del

### Análisis por isolíneas de *Drosophila buzzatii*

---

La resistencia a la inanición, como el resto de los caracteres medidos, son caracteres genéticamente variables y heredables en las isolíneas de *Drosophila buzzatii*. Se observó una correlación positiva entre la resistencia al estrés por falta de alimento y por baja temperatura. Sin embargo no comprobamos una correlación entre la resistencia a la inanición y la longevidad o la resistencia a la deshidratación. También encontramos una correlación positiva entre la longevidad y dos caracteres de historia de vida: la resistencia al estrés por deshidratación y la resistencia a las bajas temperaturas. Para todos los caracteres evaluados en este estudio encontramos una correlación altamente significativa entre los sexos en las isolíneas. Las correlaciones positivas entre los diferentes tipos de estresores estudiados y también con la longevidad están en concordancia con la teoría del soma desechable, que propone justamente que las respuestas a los diversos tipos de estresores y la longevidad pudieron evolucionar a través de los mismos genes. De acuerdo a esta teoría, los individuos que soporten mejor el estrés ambiental, serán a la vez los más longevos.

La evolución de la resistencia al estrés por falta de alimento ha recibido mucha atención en los últimos años debido a la aparente asociación entre este carácter y la longevidad. Líneas de *Drosophila* con mayor resistencia a la inanición puede ser a la vez las más longevas (Hoffmann y Harshman, 1999) aunque no es siempre así (Harshman et al., 1999a). Además, mutantes de *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*

que tiene aumentados los niveles de resistencia a la inanición, a menudo muestran también un aumento en la longevidad (Lin et al., 1998, 2001; Clancy et al., 2001). Sin embargo, se ha prestado menos atención a las interacciones entre la resistencia a la inanición y otros caracteres (Hoffmann et al 2005). En las aislíneas no encontramos una asociación significativa entre la resistencia a la inanición y la longevidad, por lo que si bien existen muchas evidencias de que esta asociación existe en *Drosophila*, no fue evidente en nuestro estudio en la población de base de las aislíneas, Chumbicha.

Las líneas con mayor resistencia a la inanición generalmente también son las líneas con mayores tiempos de desarrollo larval (Harshman et al., 1999b). Además, las líneas con mayor resistencia a la falta de alimento muestran una reducción en la fecundidad temprana (Hoffmann y Parsons, 1989a; Leroi et al., 1994). Sin embargo, las respuestas correlacionadas no siempre son consistentes, tal vez debido a que la resistencia a la inanición esta determinada por múltiples mecanismos y las condiciones ambientales pueden hacer que las respuestas a la selección varíen (revisado en Hoffmann y Harshman, 1999). Al hacer generalizaciones acerca de las interacciones evolutivas entre los caracteres, es importante entender los mecanismos específicos implicados, así como los genes que rigen los mecanismos (Zera y Harshman, 2001).

A partir de un estudio de líneas de inserción del elemento P de *D. melanogaster* para la resistencia a la inanición (Harbison et al., 2004, 2005) y estudios donde analizan los perfiles de expresión génica de *Drosophila melanogaster* que fueron seleccionadas por su resistencia a diversos factores de estrés ambiental (Sorensen et al 2005, 2007), se ha visto que un gran número de genes pueden influir en este carácter. Estos genes están implicados en la reproducción, el metabolismo y la tasa de alimentación de las larvas. Estudios con mutantes han vinculado a la resistencia a la inanición con la vía de señalización de la insulina, tanto en *Drosophila* (Clancy et al., 2001) como en *C.*



elegans (Munoz y Riddle, 2003) así como también con el almacenamiento de lípidos (Hader et al., 2003). Muchos estudios fisiológicos indican que el nivel lipídico es en general el factor determinante de resistencia a la inanición. Por ejemplo se vió que cambios plásticos en la resistencia de hambre están estrechamente correlacionados con los niveles de lípidos en las moscas (Service, 1987). Las asociaciones entre los lípidos y resistencia a la inanición puede extenderse a nivel interespecífico (Van Herrewege y David, 1997), aunque no en todas las comparaciones (Bharathi et al., 2003). Los cambios en los niveles de lípidos tras la selección sobre la resistencia a la inanición pueden dar cuenta de los cambios correlacionados en la reproducción de las moscas, porque el metabolismo de los lípidos podría ser el que explique los trade-offs con el rendimiento reproductivo (Zera y Zhao, 2003).

En general, los experimentos de selección sugieren una correlación positiva entre los niveles de resistencia a diferentes estresores ambientales, es decir que líneas con alta resistencia a un tipo de estrés, generalmente es también resistente frente a diversos tipos de estrés (Hoffmann y Parsons, 1989b; Harshman et al, 1999b.). En concordancia a la bibliografía, todas las asociaciones que encontramos entre los caracteres medidos en las isolíneas fueron positivas. Encontramos que los individuos/isolíneas que son más resistentes a la resistencia a la inanición son también más resistentes a la RCE. Asimismo, los individuos más longevos son más resistentes a la deshidratación y a las bajas temperaturas. Sin embargo la relación entre la resistencia a la inanición y la resistencia al frío no es clara (Hoffmann et al 2005). En Hoffmann et al 2005 de acuerdo con la hipótesis del trade-off, las líneas seleccionadas para aumentar la resistencia a la inanición mostraron una disminución de la resistencia al estrés por frío, mientras que las líneas seleccionadas para mayor resistencia al frío mostraron una disminución de la resistencia a la inanición. Se confirmó la asociación negativa entre la

resistencia a estos tipos de estreses en hembras pero no en machos (Hoffmann et al 2005).

Las isolíneas muestran una clara correlación positiva entre estos dos caracteres, en contraposición a la teoría del trade-off. En *Drosophila*, los cambios en la composición de fosfolípidos, la acumulación de triglicéridos y la acumulación de prolina pueden desempeñar un papel en la resistencia a las bajas temperaturas (Chen y Walker, 1994, Misener et al, 2001). De acuerdo a una hipótesis de trade-off, puede haber una asociación negativa entre resistencia al frío y resistencia a la inanición si los lípidos son desviados hacia estos mecanismos en lugar de ser acumulado para momentos de escasez de alimentos. Dicha teoría plantea como principal determinante de la resistencia a inanición la acumulación de lípidos, los lípidos a su vez jugarían un rol fundamental en la resistencia al frío, siendo los lípidos y su ubicación un factor limitante. Como los insectos en épocas invernales deben al mismo tiempo soportar el estrés por frío y una reducción en los alimentos, este trade-off sería particularmente interesante desde un punto de vista evolutivo. A la luz de estos resultados, este mecanismo no sería el único que participa a la hora de determinar el nivel de resistencia a la inanición y al frío. Una hipótesis posible es que en estas isolíneas, el factor determinante para la resistencia a dichos estresores no sea la distribución de lípidos dentro los organismos, sino que sean vías más generales de resistencia al estrés y la senescencia.

---

# Capítulo 4: Conclusiones generales

## Conclusiones generales

Para el desarrollo de esta tesis estudiamos varios caracteres de historia de vida, avanzando en la elucidación de su arquitectura genética y las relaciones entre ellos, para esto lo abarcamos a partir de dos metodologías diferentes, el análisis por isolíneas y el mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTL). Se plantearon una serie de hipótesis mencionadas en los capítulos anteriores. Aquí revisaremos cada una de esas hipótesis, mencionando las principales conclusiones arribadas.

Sobre la longevidad: En esta tesis realizamos un mapeo de QTL para la longevidad en un ambiente de sexo único con y sin un pre-tratamiento de calor (estrés por calor moderado). Para esto utilizamos un stock de líneas recombinantes endogámicas (RIL) en *D. melanogaster* que derivan de moscas seleccionadas por estrés por calor (Norry et al 2008).

Primero, evaluamos si la longevidad a 25°C en las RIL de *D. melanogaster* es un carácter con varianza genética, que puede ser heredable. Antes de encarar cualquier estudio de mapeo de QTL, es fundamental contar con líneas que difieran en el carácter que se quiere estudiar. En la Tabla 2.3.2 estimamos la varianza entre líneas a partir de los componentes de varianza y hallamos que el componente línea es genéticamente variable explicando hasta un 18% de la varianza fenotípica total.

Segundo, evaluamos si existen QTL autosómicos o ligados al cromosoma X para la longevidad medida a 25°C con y sin pre-tratamiento de calor, como así también para el carácter de razón entre las longevidades. Tercero, evaluamos la hipótesis de que los QTL detectados para los antedichos caracteres mapean en las mismas regiones que genes candidatos sobre el genoma secuenciado y anotado de *D. melanogaster*. En la tabla 2.3.4 se muestran los QTL que resultaron significativos y la colocación de

estos con estudios previos y también se muestran los genes candidatos que mapean en las regiones de QTL. El número de QTL de gran efecto en la longevidad fue mayor en el control (5) que en las moscas estresadas por calor (2) en un entorno de sexos separados a temperatura benigna. Esto sugiere que, el estrés por calor reduce el número de QTL de gran efecto en la longevidad. Este efecto del estrés por calor se observó también en trabajos previos en caracteres de termotolerancia (Norry et al 2008). Además, cuatro QTL fueron significativos para el carácter de razón relacionado con la sensibilidad térmica sobre la longevidad.

Cuarto, evaluamos si nuestro tratamiento de calor repetido (35.5°C por 35 min, dos veces a edades tempranas) tuvo efectos detrimentales u horméticos sobre la longevidad para diferentes RIL. El efecto del pre-tratamiento de calor aplicado fue diferente para cada RIL, con un efecto detrimental sobre la longevidad en muchas RIL-SH2 y un efecto beneficioso, es decir, un efecto hormético por un estrés por calor sobre la longevidad en varias RIL-D48 (Tabla 2.3.3). Se encontró una clara correlación negativa entre la longevidad media en moscas control y la diferencia de longevidades medias de control y calor (Figura 2.3.3; correlaciones Spearman variaron de -0,3 a -0,6 tanto en RIL-D48 y RIL-SH2, con todas las correlaciones fueron significativas [ $P < 0,05$ ], excepto en las hembras de RIL-D48). En otras palabras, nuestro pre-tratamiento de calor tuvo un efecto beneficioso (hormesis) con más frecuencia en líneas de vida corta que en líneas más longevas (Figura 2.3.3).

Quinto, se evaluó si los QTL detectados para la longevidad en condiciones de control (siempre a 25°C) son los mismos o no que los QTL que explican la variabilidad de la longevidad cuando es medida luego de un estrés por calor. Esta hipótesis es interesante de evaluar para identificar QTL que explican la longevidad de manera independiente de las condiciones de temperatura a las que pueden estar expuestas en la

naturaleza de forma habitual. Encontramos colocación de QTL para estas dos condiciones. Los QTL que colocan entre las moscas estresadas y las de control mapean en los rangos 3C1-4F2 y 38E1-42A (L2 y L4; Tabla 2.3.4), serían QTL generales de la longevidad en lugar de QTL específicos para las moscas estresadas por un pre-tratamiento de calor. Estos dos QTL (L2, L4) incluyen al menos dos genes candidatos, *rb* y *ECR*, que tienen efecto sobre la longevidad (Sørensen et al 2007, Simonsen et al 2007). Además, el gen *CG7010*, que mapea en L4, mostró cambios significativos en su nivel de expresión por la selección en la longevidad en moscas de *D. melanogaster* (Sørensen et al 2007). *Rubi (rb)* está involucrado en el transporte lisosomal y también participa en la vía funcional de *blue cheese (bchs)* (Simonsen et al 2007). Las mutaciones en el gen *blue cheese* pueden conducir a la reducción de la expectativa de la vida adulta y a un aumento de la muerte neuronal en *Drosophila* (Simonsen et al 2007). El gen *EcR* es el receptor de ecdisona, la principal hormona esteroide de *D. melanogaster* implicada en el desarrollo y la reproducción. Las moscas que son heterocigotas para las mutaciones del receptor de ecdisona viven un 40-50% más que las moscas control (Simon et al 2003).

Sobre la resistencia al hambre: Realizamos un mapeo de QTL para la resistencia al hambre en larvas y adultos de *D. melanogaster*. Para esto utilizamos un stock de líneas recombinantes endogámicas (RIL) en que fueron construidas a partir de moscas seleccionadas por estrés por calor (Norry et al 2008). En esta tesis usamos un tratamiento severo (constante) en vez de uno no severo (cíclico) como previamente utilizamos en nuestro grupo (Gómez et al 2009) sobre las mismas líneas utilizadas ahora para medir la resistencia al hambre en adultos.

Primero, evaluamos si la resistencia a la falta de alimento en las RIL de *D. melanogaster* es un carácter con genéticamente variable. Al igual que la longevidad, este carácter resultó ser genéticamente variable. En la Tabla 2.4.1 estimamos la varianza entre líneas a partir de los componentes de varianza y hallamos que el componente línea es genéticamente variable explicando hasta un 21% de la varianza fenotípica total.

Segundo, estudiamos si existen QTL autosómicos o ligados al cromosoma X para resistencia al hambre en larvas y adultos de *D. melanogaster*. Tercero, estudiamos la hipótesis de que los QTL detectados para los antedichos caracteres mapean en las mismas regiones que genes candidatos sobre el genoma secuenciado y anotado de *D. melanogaster*. Logramos identificar cinco QTL para la resistencia al hambre (RH) en pre-adultos, además de otros cuatro QTL para RH permanente en adultos, que abarcan los tres cromosomas mayores de *D. melanogaster* y analizamos genes candidatos (Tabla 2.4.3). Los QTL hallados en este estudio colocalizan con QTL hallados por estudios previos. Por ejemplo A3/L7 RH-QTL colocaliza con un QTL para la resistencia al hambre identificados por Wang et al 2004; A3/L3, A4, L4 y L6 con QTL identificados por Harbison et al 2005 y A2/L3 y A4 con QTL identificados por Nuzhdin et al 2007.

Cuarto, evaluamos si los QTL detectados para la resistencia al hambre en adultos son los mismos o no que los QTL que explican la variabilidad de la resistencia al hambre en las larvas. Un RH-QTL encontrado en la presente tesis colocaliza en tres condiciones diferentes, cuando analizamos en moscas adultas (A1), tanto en machos como en hembras y cuando analizamos en larvas en medio pobre (P2; Tabla 2.4.3; rango 16F3-19F6). Un QTL que colocaliza entre larvas y adultos, es decir, que explica al mismo tiempo la resistencia al hambre en dos etapas del ciclo de vida de la mosca, sería mas bien un QTL general que explica la resistencia al hambre, en vez de un QTL

específico de una determinada etapa del ciclo de vida. Además el QTL P3 para la RH en pre-adultos también coincidió con A2, un QTL detectado en adultos (Tabla 2.4.3).

Quinto, se evaluó si los QTL que resultaron significativos en este estudio colocalizan o no con el QTL encontrado en Gómez et al 2009 donde se utilizaron las mismas RIL pero un tratamiento de privación de alimento diferente, en particular cíclico. Los QTL que co-localicen entre ambas mediciones serán QTL generales que estén explicando la variabilidad en la resistencia al hambre, en vez de ser específicas del tratamiento utilizado. Nuestro mapeo de QTL para la RH en adultos se realizó con un tratamiento de hambre permanente, en otras palabras, el tratamiento consistía en mantener a las moscas en continua hambruna y encontramos cuatro QTL que explican la variabilidad en la resistencia hambre en el adulto en esas condiciones. En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, Gómez et al 2009, realizamos un mapeo de QTL para RH en adultos en los mismos paneles de RIL utilizados en esta tesis. Pero en este trabajo, el tratamiento de hambruna consistió en un tratamiento cíclico más que en un tratamiento permanente. En Gómez et al 2009 se logró identificar una región QTL para RH (64D citológico rango - 66E2) en el brazo izquierdo del cromosoma 3 en los machos. Ninguno de los picos de QTL que fueron significativos en los adultos de la presente tesis se superponen con los picos del QTL hallado en el mencionado estudio (Gómez et al 2009). La falta de solapamiento del QTL detectado en Gómez et al 2009 y los RH-QTL de adultos detectados en esta tesis sugieren la hipótesis de que la arquitectura genética de la resistencia al hambre es, al menos en parte, dependiente del tratamiento utilizado, sea un tratamiento constante (agudo) o cíclica (no agudo) de hambreado.



Sobre la relación entre la longevidad control, la longevidad con pretratamiento de calor y la resistencia al hambre:

Primero, se evaluó la posible correlación positiva entre la longevidad y la resistencia al hambre en el organismo modelo *D. melanogaster*. En las hembras, la longevidad y la resistencia al hambre de adultos y pre-adultos de las RIL de *D. melanogaster* no parecen estar relacionadas, pero lo están en los machos. En los machos el signo de la correlación parece depender de si comparamos la longevidad con la resistencia a la inanición de uno u otro estadio analizado. Al comparar la longevidad con la RH de los adultos, los caracteres se encuentran positivamente correlacionados, pero al compararla con la RH de pre-adultos la asociación es negativa (ver resultados 2.5 y tabla 2.5.1 y 2.5.2). Las correlaciones fueron significativas al comparar con la longevidad de moscas que fueron sometidas al pre-tratamiento de calor aplicado. Esta asociación negativa podría resultar adaptativa si pensamos que en condiciones de falta de alimento durante el desarrollo larval, la selección natural “prioriza” la supervivencia, el empuje y finalmente la emergencia, por sobre el tiempo de vida adulta. Es decir, que podría existir un trade-off entre la RH en larvas y la longevidad adulta dado que los recursos energéticos son escasos.

Segundo, estudiamos si existen QTL colocalizan entre los caracteres estudiados (la longevidad control, la longevidad con pre-tratamiento de calor y la resistencia al hambre en larvas y adultos). El QTL A1/ P2 (16F3-19F6) un QTL que fue significativo tanto en machos y hembras adultas como en larvas, co-localiza con el QTL R3, un QTL que explica parte de la variabilidad en nuestro carácter de razón relacionada con la sensibilidad térmica de la longevidad. Además, el QTL A3 (42A-49C) y A4 (67A-86E3) colocalizan con los QTL R4 y L5 (longevidad-QTL significativo en moscas tratadas), respectivamente. Estas tres regiones de QTL tienen efectos aditivos negativos

tanto sobre la resistencia al hambre como sobre la longevidad. En otras palabras, tres de cuatro QTL para la RH permanente en adultos solapan con QTL que explican la variación en la longevidad al analizar en los mismos paneles de RIL. Estos resultados soportan las hipótesis de que la resistencia al hambre y la longevidad comparten QTL pleiotrópicos.

En las isolíneas de *Drosophila buzzatii* se evaluaron las siguientes hipótesis:

Primero, analizamos si la resistencia al hambre es un carácter con varianza genética, que puede ser heredable. La resistencia a la inanición (RH), como el resto de los caracteres medidos, son caracteres genéticamente variables y heredables en las isolíneas de *Drosophila buzzatii*. (Tabla 3.3.1). Para la RH el efecto línea explica un 14.4% de la varianza fenotípica total mientras que para la resistencia a la deshidratación, la longevidad, la recuperación desde el coma por enfriamiento y la sobrevivencia al frío explica un 29%, 14.2%, 14.8% y un 38.1%, respectivamente.

Segundo estudiamos si existe un trade-off entre la resistencia al hambre y la resistencia al frío en isolíneas de *D. buzzatii* construidas desde una población natural. Las isolíneas muestran una clara correlación positiva entre estos dos caracteres, en contraposición a la teoría del trade-off de Hoffmann et al 2005 (Tabla 3.3.3). Una hipótesis posible es que en estas isolíneas, el factor determinante para la resistencia a dichos estresores no sea la distribución de lípidos dentro los organismos, sino que sean vías más generales de resistencia al estrés y la senescencia.

Finalmente, se puso a prueba la hipótesis de que existe una correlación positiva entre la resistencia al hambre, la longevidad, resistencia a la desecación y frío en *Drosophila* (Hoffmann et al. 2003). Se observó una correlación positiva entre la resistencia al estrés por falta de alimento y por baja temperatura. Sin embargo no

comprobamos una correlación entre la resistencia a la inanición y la longevidad o la resistencia a la deshidratación. También encontramos una correlación positiva entre la longevidad y dos caracteres de historia de vida: la resistencia al estrés por deshidratación y la resistencia a las bajas temperaturas. Para todos los caracteres evaluados en este estudio encontramos una correlación altamente significativa entre los sexos en las isolíneas. Las correlaciones positivas entre los diferentes tipos de caracteres estudiados y también con la longevidad están en concordancia con la teoría del soma desechable, que propone justamente que las respuestas a las diversas formas de estrés y la longevidad podrían haber evolucionado a través de los mismos genes. De acuerdo a esta teoría, los individuos que soportan mejor el estrés ambiental, serán a la vez los más longevos.

Las poblaciones naturales de muchas especies, incluyendo *Drosophila*, son probablemente periódicamente sometidas a la escasez de alimentos en un grado que selecciona para la resistencia a la inanición. Por lo tanto, el hambre es una forma especialmente relevante de estrés, a nivel ecológico y evolutivo, que justifica una investigación en cuanto a sus mecanismos moleculares y genéticos subyacentes. Se estudió la resistencia al estrés en dos especies diferentes y su relación con la longevidad y otras formas de estrés. Todos los caracteres estudiados, son caracteres cuantitativos y con una arquitectura genética muy compleja. Las correlaciones encontradas dependen de las especies analizadas y de las condiciones aplicadas. Por ejemplo en *D. melanogaster* encontramos tanto correlaciones positivas como negativas entre la resistencia al hambre y la longevidad, dependiendo de si analiza la RH en adultos o pre-adultos. Mientras que en *D. buzzatii* no se comprobó dicha correlación, pero si encontramos correlaciones positivas entre la longevidad y dos tipos de estresores

ambientales diferentes. Mientras que otros autores encuentran una correlación negativa entre la resistencia al hambre y el frío (teoría de trade-off, Hoffman et al 2005). En esta tesis comprobamos esta correlación pero con signo contrario. Los resultados del mapeo de intervalo compuesto sobre las RIL de *D. melanogaster*, tanto de la longevidad en ambientes de sexos separados como de la resistencia al hambre nos mostraron que existen regiones comunes del genoma de *D. melanogaster* que explican dos caracteres. Por ejemplo, la longevidad en condiciones control y en condiciones después de un pre-tratamiento de estrés por calor. Así como también existen regiones comunes que explican la longevidad y la resistencia al hambre.

# Referencias

## Referencias

- Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., et al (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Austad, S. N. (1993). Retarded senescence in an insular population of opossums. *J. Zool.* 229, 695–708
- Arrese E.L., Soulages, J.L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol* 55: 207-25.
- Azad P., Zhou D., Russo E., Haddad G.G. (2009). Distinct mechanisms underlying tolerance to intermittent and constant hypoxia in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 4: 371.
- Balaban R.S., Nemoto S., Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483–495.
- Baker K.D., Thummel C.S. (2007). Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab* 6: 257-66.
- Barja, G. (2004). Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biological Reviews* 79 235–251.
- Barja G., (1998). Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 854: 224–238.
- Bauer J.H., Chang C., Morris S.N., Hozier S., Andersen S., Waitzman J.S., Helfand S.L. (2007). Expression of dominant-negative Dmp53 in the adult fly brain inhibits insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 13355–13360.
- Beckman K.B., Ames B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78: 547–581.
- Bell G. (1997). *The Basics of Selection*, Chapman and Hall: New York.
- Bennett R.G., Hamel F.G., Duckworth W.C. (1997). Characterization of the insulin inhibition of the peptidolytic activities of the insulin-degrading enzyme-proteasome complex, *Diabetes* 46: 197–203.
- Bettencourt, B.R., Feder, F.E. y Cavicchi, S., (1999). Experimental evolution of Hsp70 expression and thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53, 484-492.

- Bharathi N.S., Prasad N.G., Shakarad M., Joshi A. (2003). Variation in adult life history and stress resistance across five species of *Drosophila*. *J. Genet.* 82: 191–205.
- Bharucha K.N. (2009). The epicurean fly: using *Drosophila melanogaster* to study metabolism. *Pediatr Res* 65: 132-7.
- Bhole D., Allikan M.J., Tower J., (2004). Doxycycline-regulated overexpression of hsp22 has negative effects on stress resistance and life span in adult *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 125: 651-663.
- Bijlsma, R., Loeschcke, V. (1997). Introductionary remarks: Environmental stress, adaptation and evolution. Birkhauser Verlag, Basel pp XI-XV.
- Blows M. W., Hoffmann A. A. (1993). The genetics of central in and marginal populations of *Drosophila serrata*. I. Genetic variation for stress resistance and species borders. *Evolution* 47: 1255-1270.
- Bluher M., Kahn B.B., Kahn C.R. (2003). Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299: 572-574.
- Bjedov I., Toivonen J.M., Kerr F., Slack C., Jacobson J., Foley A., Partridge L. (2010). Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab.* 11: 35–46.
- Brand M.D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* 35: 811–820.
- Brogliolo W., Stocker H., Ikeya T., Rintelen F., Fernandez R., Hafen E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* 11: 213-221.
- Broughton S., Partridge L. (2009). Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and ageing, *Biochem. J.* 15: 1–12
- Brunet A., Bonni A., Zigmund M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K. C., Blenis J., Greenberg M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857–868
- Boulétreau J. (1978). Ovarian activity and reproductive potential in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Oecologia* 35: 319–342.
- Borash D. J., Teotonio H., Rose M. R., Mueller L. D. (2000). Density-dependent natural selection in *Drosophila*: correlations between feeding rate, development time and viability. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 181-187.

- Bubliy O.A., Loeschcke V. (2005). Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 18: 789-803.
- Buck S., Nicholson M., Dudas S.P., Baker III G.T., Arking R. (1993a). Larval regulation of adult longevity in a genetically selected long lived strain of *Drosophila melanogaster*, *Heredity* 71: 23–32.
- Buck S., Wells R.A., Dudas S.P., Baker III G.T., Arking R. (1993b). Chromosomal localization and regulation of the longevity determinant genes in a selected strain of *Drosophila melanogaster*, *Heredity* 71: 11–22.
- Butov A., Johnson T.E., Cypser J., Sannikov I., Volkov M., Sehl M., Yashin A.I. (2001). Hormesis and debilitation effects in stress experiments using the nematode worm *Caenorhabditis elegans*: the model of balance between cell damage and HSP level, *Exp. Gerontol.* 37: 57–66.
- Calabrese E.J., et al. (2007). Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222 122–128.
- Capy P., Pla E., David J.R. (1994). Phenotypic and genetic variability of morphometrical traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. II. Within population variability. *Genet Sel Evol* 26: 15–28.
- Capy P., Pla E., David J.R. (1993). Phenotypic and genetic variability of morphometrical traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. I. Geographic variations. *Genet Sel Evol* 25: 517–536.
- Carranza J., Alarcos S., Sánchez-Prieto C.B.; Valencia J., Mateos, C. (2004). Disposable-soma senescence mediated by sexual selection in an ungulate. *Nature* 432: 215- 218.
- Charlesworth, B. (1994). *Evolution in age - structured populations*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Chippindale A.K., Chu T. J. F., Rose M. R. (1996). Complex trade-offs and the evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 50: 753-766.
- Chippindale A.K., Hoang D.T., Service P.M., Rose M.R. (1994). The evolution of development in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Evolution* 48: 1880–1899.
- Chen C.P., Walker V.K. (1994). Cold-shock and chilling tolerance in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 40: 661–669.



- Clancy D.J., Gems D., Harshman L.G., Oldham S., Stocker H., Hafen E., Leevers S.J., Partridge L. (2001). Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292: 104–106.
- Comfort A. (1979). *The Biology of Senescence*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Cossins A.R., Bowler K. (1987). *Temperature Biology of Animals*. Chapman y Hall, New York.
- Coyne J.A., Elwyn S. (2006). Does the desaturase-2 locus in *Drosophila melanogaster* cause adaptation and sexual isolation? *Evolution* 60: 279–291.
- Curtsinger J.W., Khazaeli A.A. (2002). Life span, QTLs, age-specificity and pleiotropy in *Drosophila*, *Mech. Ageing Dev.* 123: 81–93.
- Cypser J.R., Johnson T.E. (2002). Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity. *J. Gerontol. Biol. Sci.* 57A: B109-B114.
- Cypser J.R., Johnson T.E. (2003). Hormesis in *Caenorhabditis elegans* dauer-defective mutants. *Biogerontology* 4: 203-214.
- Dahlgard J., Hoffmann A.A. (2000). Stress resistance and environmental dependency of inbreeding depression in *Drosophila melanogaster*. *Conserv. Biol.* 14: 1187-92.
- Da Lage J. L., Capy P., David J. R. (1990). Starvation and desiccation tolerance in *Drosophila melanogaster*: differences between European, North African, and Afrotropical populations. *Genet. Sel.Evol.* 22: 381–391.
- David J.R., Gibert P., Legout H., Pétavy G., Capy P., Moreteau B. (2005). Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity* 94, 3–12
- David J.R., Gibert P., Moreteau B. (2004). Evolution of reaction norms. Chapter 4. In: TJ DeWitt, SM Scheiner (eds). *Phenotypic Plasticity. Functional and Conceptual Approaches*, Oxford University Press: NY, USA. pp 50–63.
- David J.R., Gibert P., Mignon-Grasteau S., Legout H., Pétavy G., Beaumont C. et al. (2003). Genetic variability of sexual size dimorphism in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *J Genet* 82: 79–88.
- David J.R., Moreteau B., Gauthier J.R., Pétavy G., Stockel J., Imasheva A. (1994). Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in *Drosophila melanogaster*: an isofemale lines analysis. *Genet Sel Evol* 26: 229–251.
- David J.R., Allemand R., Van Herrewege J., Cohet Y. (1983). Ecophysiology: abiotic factors. In: Ashburner, M., Carson, H. L., Thompson Jr., J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, London, 3d: 105–170.

- David R.J., Gibert P., Pla E., Petavy G., Karan D., Moreteau B. (1998). Cold stress tolerance in *Drosophila*: Analysis of chill coma recovery in *D-melanogaster*. *Journal of Thermal Biology* 23: 291-299.
- David J., Clavel M.F. (1965). Interaction entre le génotype et le milieu d'élevage. Conséquences sur les caractéristiques du développement de la *Drosophile*. *Bull Biol Fr Belg* 99: 369–378.
- Djawdan M., Chippindale A.K., Rose M.R., Bradley T.J. (1998). Metabolic reserves and evolved stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Zool.* 71: 584–594.
- Defays R., Gómez F.H., Sambucetti P., Scannapieco A.C., Loeschcke V., Norry F.M. (2011). Quantitative trait loci for longevity in heat-stressed *Drosophila melanogaster*. *Experimental gerontology*. In press.
- Doyle R.W., Hunte W. (1981). Demography of an estuarine amphipod (*Gammarus Lawrencianus*) experimentally selected for high R – A model of the genetic-effects of environmental change. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 1120-1127.
- Duckworth W.C., Bennett R.G., Hamel F.G. (1994). A direct inhibitory effect of insulin on a cytosolic proteolytic complex containing insulin-degrading enzyme and multicatalytic protein-ase, *J. Biol. Chem.* 269: 24575–24580.
- Edgar B.A. (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat. Rev. Genet.* 7: 907–916.
- Etges W.J. (1990). Quantitative genetic analysis of life-histories in *Drosophila mojavensis*. University of Maryland and the Smithsonian Institute. Four International Congress of Systematic and Evolutionary Biology. Pagination Varies University of Maryland: College Park, Maryland, USA pp: 402.
- Ewens W.J. (1979). Problems in population-genetics. *Advances in applied probability* 11: 293-293.
- Falconer D.S., Mackay T.F.C. (1996). *Introducción a la genética cuantitativa*. Cuarta edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Falconer D.S. (1989). *Introduction to Quantitative Genetics* 3rd edn. John Wiley and Sons: New York.
- Fanara J.J., Mensch J., Folguera G., et al. (2004). Developmental time and thorax length differences between the cactophilic species *Drosophila buzzatii* and *Drosophila koepferae* reared in different natural hosts. *Evolutionary Ecology* 18: 203-214.

- Fanara J.J., Fontdevila A., Hasson E. (1999). Oviposition preference and life history traits in cactophilic *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association with their natural hosts. *Evolutionary Ecology* 13: 173-190.
- Fanara J.J., Hasson E., Rodriguez C., et al. (1996). The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. 33. Are *Opuntia* hosts a selective factor for the inversion polymorphism? *Heredity* 77: 500-508.
- Feder M.E., Hofmann G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243 – 282.
- Feder M.E., Krebs R.A. (1997). Ecological and evolutionary physiology of heat-shock proteins and the stress response in *Drosophila*: complementary insight from genetic engineering and natural variation. *Environmental Stress, Adaptation and Evolution.* 83: 155–173.
- Feder M.E., Parsell D.A., Lindquist S.L. (1995). The stress response and stress proteins. In: *Cell Biology of Trauma* (J. J. Lemasters y C. Oliver, eds), pp. 177–191. CRC, Boca Raton.
- Feder M.E., Rossi J.M., Solomon J., Solomon N., Lindquist S.L. (1992). The consequences of expressing Hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Develop.* 6: 1402-1413.
- Finkel T., Holbrook N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239–247.
- FlyBase Consortium, The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature, *Nucleic Acids.*31 (2003) 172–175. <http://flybase.org>.
- Foley P. A., Luckinbill L. S. (2001). The effects of selection for larval behavior on adult life-history features in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 55: 2493-2502.
- Fontdevila A., Pla C., Hasson E., Wasserman M., Sanchez A., Naveira H., Ruiz A. (1988). *Drosophila koepferae*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera-Drosophilidae) superspecies taxon. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 81: 380-385.
- Force A.G., Staples T., Soliman S., Arking R. (1995). Comparative biochemical and stress analysis of genetically selected *Drosophila* strains with different longevities. *Dev. Genet.* 17: 340-351.
- Friedman, D. B., Johnson, T. E. (1988). A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 118: 75–86
- Garcia J.V., Fenton B.W., Rosner M.R. (1988). Isolation and characterization of an insulin-degrading enzyme from *Drosophila melanogaster*, *Biochemistry* 27: 4237–4244.

- Gems D., Partridge L. (2008). Stress-response hormesis and aging: "That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger". *Cell Metabolism* 7: 200-203.
- Giannakou M.E., Goss M., Junger M.A., Hafen E., Leivers S.J., Partridge L. (2004). Longlived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* 305, 361.
- Gibert P., Capy P., Imasheva A., Moreteau B., Morin J.P., Pétavy G. et al. (2004). Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. *Genetica* 120: 165–179.
- Gibert P., Moreteau B., David J.R. (2000). Developmental constraints on an adaptive plasticity: reaction norms of pigmentation in adult segments of *Drosophila melanogaster*. *Evol Dev* 2: 249–260.
- Gibert P., Moreteau B., Moreteau J.C., David J.R. (1998a). Genetic variability of quantitative traits in *Drosophila melanogaster* (fruit fly) natural populations: analysis of wild living flies of several laboratory generations. *Heredity* 80: 326–335.
- Gibert P., Moreteau B., Pétavy G, Karan D, David JR (2001). Chill-Coma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species. *Evolution* 55: 1063–1068.
- Gibert P., Moreteau B., Scheiner S.M., David J.R. (1998b). Phenotypic plasticity of body pigmentation in *Drosophila*: correlated variations between segments. *Genet Sel Evol* 30: 181–194.
- Greenberg A.J., Moran J.R., Wu, C.I. (2006). Proper control of genetic background with precise allele substitution: a comment on Coyne and Elwyn. *Evolution* 60: 623–625.
- Greenberg A.J., Moran J.R., Coyne J.A., Wu, C.I. (2003). Ecological adaptation during incipient speciation revealed by precise gene replacement. *Science* 302: 1754–1757.
- Gomez F.H., Bertoli C.I., Sambucetti P., Scannapieco A.C., Norry F.M. (2009). Heat-induced hormesis in longevity as correlated response to thermal-stress selection in *Drosophila buzzatii*, *J. Thermal Biol.* 34: 17–22.
- Goto S.G. (2000). Expression of *Drosophila* homologue of senescence marker protein-30 during 674 cold acclimation, *J. Insect Physiol.* 46: 1111–1120.
- Gorski M.M., Eeken J.C.J. (2002). The *Drosophila* rad50 mutants are pupal lethal, however the third instar larvae show elevated levels of anaphase bridges in dividing cells. *A. Dros. Res. Conf.* 43 : 201C.

- Grönke S., Clarke D.F., Broughton S., Andrews T.D., Partridge L. (2010). Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. *PLoS Genet.* 6, e1000857.
- Grönke, S., Müller, G., Hirsch, J., Fellert, S., Andreou, A., Haase, T., Jäckle, H., Kühnlein, R.P. (2007). Dual lipolytic control of body fat storage and mobilization in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 5(6): e137.
- Coyne J.A., Beecham E. (1987). Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117: 727–737.
- Hader T., Muller S., Aguilera M., Eulenberg K., Steuernagel A., Closssek T., et al. (2003). Control of triglyceride storage by a WD40/TPR domain protein. *EMBO Rep.* 4: 511–516.
- Haldane J.B.S., Waddington (1931). Inbreeding and linkage. *Genetics* 16: 357-374.
- Hamilton M.L., Van Remmen H., Drake J.A., Yang H., Guo Z.M., Kewitt K., Walter C.A., Richardson A. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 10469–10474.
- Harbison S.T., Yamamoto AH, Fanara J.J., Norga K.K., Mackay T.F.C. (2004). Quantitative trait loci affecting starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 166:1807-1823
- Harbison S.T., Chang S., Kamdar K.P., Mackay T.F.C. (2005). Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila*. *Genome Biol* 6: R36.
- Harshman, L.G., Moore K.M., Sty M.A., Magwire M. M. (1999). Multiple stress resistance and longevity in selected lines of *Drosophila melanogaster*. *Neurobiol. Aging* 20: 521–529.
- Harshman, L.G., Hoffmann, A.A., Clark, A.G. (1999a). Selection for starvation resistance in *Drosophila melanogaster*: physiological correlates, enzyme activities and multiple stress responses. *J. Evol. Biol.* 12: 370-379.
- Harshman, L.G., Moore, K.M., Sty, M.A., Magwire, M.M. (1999b). Stress resistance and longevity in selected lines of *Drosophila melanogaster*. *Neurobiol Aging* 20: 521-9.
- Harshman L.G., Schmid J.L., (1998). Evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster* : aspects of metabolism and counter-impact selection. *Evolution* 52: 1679–1685.
- Harman D. (1956). Aging – a theory based on free-radical and radiationchemistry. *Journals of Gerontology* 11: 298–300.

- Hasson E., Naveira H., Fontdevila H. (1992). The breeding sites of the Argentinian species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). *Revista Chilena de Historia Natural* 65: 319-326.
- Hasson E., Rodriguez C., Fanara J.J., Naveira H. Reig O.A., Fontdevila A. (1995). The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXVI. Macrogeographic patterns of inversion polymorphism in new world populations. *J. Evol. Biol.* 8: 369-384.
- Hekmat-Scafe D.S., Scafe C.R., McKinney A.J., Tanouye M.A. (2002). Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 12(9): 1357--1369.
- Hercus M.J., Loeschcke V., Rattan S.I.S. (2003). Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology* 4: 149-156.
- Hemphala J., Uv A., Cantera R., Bray S., Samakovlis C. (2003). Grainy head controls apical membrane growth and tube elongation in response to Branchless/FGF signalling. *Development* 130(2): 249-258.
- Hochachka R.W., Somero N. (1984). *Biochemical adaptation*. Princeton University Press, Princeton.
- Hoffmann A.A. and Weeks A.R. (2007). Climatic selection on genes and traits after a 100 year-old invasion: a critical look at the temperature-tropical clines in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *Genetica* 129: 133-147.
- Hoffmann A.A. and Daborn P.J. (2007). Towards genetic markers in animal populations as biomonitors for human-induced environmental change. *Ecology Letters* 10: 63-76.
- Hoffmann A.A., Hallas R., Anderson A.R., Telonis-Scott M. (2005). Evidence for a robust sex-specific trade-off between cold resistance and starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 804-810.
- Hoffmann A.A., Sørensen J.G., Loeschcke V. (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology* 28: 175-216.
- Hoffmann A.A., Anderson A., Hallas R. (2002a). Opposing clines for high and low temperature resistance in *D. melanogaster*. *Ecology Letters* 5: 614-618.
- Hoffmann A.A., Sørensen J.G., Loeschcke V. (2002b). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology* 28:175-216.

- Hoffmann A.A., Hercus M.J. (2000). Environmental stress as an evolutionary force. *Bioscience* 50: 217-226.
- Hoffmann A.A., Merilä, J. (1999). Heritable variation and evolution under favorable and unfavorable conditions. *Trends Ecol. Evol.* 14: 96-101.
- Hoffmann A.A., Harshman L.G. (1999). Desiccation and starvation resistance in *Drosophila*: patterns of variation at the species, population and intrapopulation levels. *Heredity* 83: 637-643.
- Hoffmann A.A., Parsons P.A. (1997). *Extreme environmental Change and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hoffmann A. A., Parsons P. A. (1993). Selection for adult desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*: fitness components, larval resistance and stress correlations. *Biol. J. Linn. Soc.* 48: 43–54.
- Hoffmann A.A., Parsons P.A. (1991). *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, Oxford.
- Hoffmann A.A., Parsons P.A. (1989a). An integrated approach to environmental stress tolerance and life-history variation: desiccation tolerance in *Drosophila*. *Biol. J. Linn. Soc* 37:117–135.
- Hoffmann A.A., Parsons, P.A. (1989b). Selection for increased desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*: additive genetic control and correlated responses for other stresses. *Genetics* 122: 837–845.
- Hoffmann A.A., Parsons P.A. (1988). The analysis of quantitative variation in natural populations with isofemale strains. *Genet Sel Evol* 20: 87–98.
- Hollingsworth M.J., Bowler K. (1966). The decline in ability to withstand high temperature with increase in age in *Drosophila subobscura*. *Exp. Gerontol.* 1: 251-257.
- Holzenberger M., Dupont J., Ducos B., Leneuve P., Geloën A., Even P. C., Cervera P., Le Bouc Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421: 182-187.
- Hong J.W., Park K.W. (2010). Further understanding of fat biology: lessons from a fat fly. *Exp Mol Med* 42: 12-20.
- Huey R.B., Bennett F. (1987). Phylogenetic studies of coadaptation: Preferred temperatures versus optimal performance temperatures of lizards. *Evolution* 41: 751-756.
- Hutchinson E.W., Rose, M.R. (1990). Quantitative genetic analysis of postponed aging in *Drosophila melanogaster*. *Genetic Effects on Aging II*, D. E. Harrison (ed.). Telford Press, Caldwell, pp. 66-87.

- Hughes K.A., Alipaz J.A., Drnevich J.M., Reynolds R.M. (2002). A test of evolutionary theories of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 99: 14286-14291.
- Humphries M.M., Boutin S., Thomas D.W., Ryan J.D., Selman C., McAdam A.G., Berteaux D., Speakman, J.R. (2005). Expenditure freeze: the metabolic response of small mammals to cold environments. *Ecology Letters* 8: 1326–1333.
- Hutchinson E. W., Rose M. R. (1991). Quantitative genetics of postponed aging in *Drosophila melanogaster*. I. Analysis of outbred populations. *Genetics* 127: 719-727.
- Hwangbo D.S., Gershman B., Tu M.P., Palmer M., Tatar M. (2004). *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429: 562–566
- Ikeya T., Broughton S., Alic N., Grandison R., Partridge L. (2009). The endosymbiont *Wolbachia* increases insulin/IGF-like signalling in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 276: 3799–3807.
- Imasheva A.G., Loeschcke V., Zhivotovsky L.A., Lazebny O.E. (1998). Stress temperatures and quantitative variation in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 81: 246–253.
- Imhof M., Harr B., Brem G., Schlotterer C. (1998). Multiple mating in wild *Drosophila melanogaster* revisited by microsatellite analysis. *Mol Ecol* 7: 915–917.
- Jansen R.C. (1993). Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205-211.
- Jiang C., Zeng, Z.B. (1995). Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140: 1111-1127.
- Jiggins F.M., Hurst G.D. (2003). The evolution of parasite recognition genes in the innate immune system: purifying selection on *Drosophila melanogaster* peptidoglycan recognition proteins. *J. Mol. Evol.* 57(5): 598--605.
- Johnston I.A., Bennett A.F. (1996). Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation. *Society for Experimental Biology Seminar Series* 59: 1-419.
- Johnson T.E. (2002). A personal retrospective of the genetics of ageing. *Biogerontology* 3: 7-12.
- Joshi A., Wu W. P., Mueller L. D. (1998). Density-dependent natural selection in *Drosophila*: Adaptation to adult crowding. *Evolutionary Ecology* 12: 363-376.



- Kapahi P., Zid B.M., Harper T., Koslover D., Sapin V., Benzer S. (2004). Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.* 14: 885–890.
- Karan D., Morin J.P., Gibert P., Moreteau B., Scheiner S., David J.R. (2000). The genetics of phenotypic plasticity. IX. Genetic architecture, temperature and sex differences in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54: 1035–1040.
- Karan D., Morin J.P., Gravot E., Moreteau B., David J.R. (1999). Body size reaction norms in *Drosophila melanogaster*: temporal stability and genetic architecture in a natural population. *Genet Sel Evol* 31: 491–508.
- Karan D., Parkash R. (1998). Desiccation tolerance and starvation resistance exhibit opposite latitudinal clines in Indian geographical populations of *Drosophila kikkawai*. *Ecol. Entomol.* 23: 391–396.
- Karan D., Dahiya N., Munjal A. K., Gibert P., Moretear B. et al. (1998). Desiccation and starvation tolerance of adult *Drosophila*—opposite latitudinal clines in natural populations of three different species. *Evolution* **52**: 825–831.
- Kaveiva P.M., Kingsolver J.G., Huey R.B. (1993). *Biotic interactions and global change*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Katewa S.D., Kapahi P., Role of TOR signaling in aging and related biological processes in *Drosophila melanogaster*, *Exp. Gerontol.* (in press)  
doi:10.1016/j.exger.2010.11.036.
- Khazaeli A.A., Tatar M., Pletcher S.D., Curtsinger J.W. (1997). Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, mortality, and thermotolerance. *Journal of Gerontology* 52: B48-52.
- Keller, L. y Genoud, M. (1997). Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of aging. *Nature* 389, 958–960
- Kenyon C.J., (2010). The genetics of ageing. *Nature* 464: 504–512.
- Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. (1993). *Nature* 366, 461.
- Kirkwood T.B., Austad S.N. (2000). Why do we age? *Nature* 408: 233-238.
- Kirkwood T.B.L., Rose M.R. (1991). Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Proc. R. Soc. B*, 332: 15-24.
- Kirkwood T. B. L. DNA, mutations and aging. *Mut. Res.* 219, 1–7 (1989).
- Kirkwood T.B.L., Holliday R. (1979). The evolution of ageing and longevity. *Proc. R. Soc. B* 205: 531-546.

- Kimura K. D., Tissenbaum H. A., Liu Y., Ruvkun, G. (1997). Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277: 942–946.
- Klass M.R. (1977). Ageing in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Major biological and environmental factors influencing life span. *Mech. Ageing and Dev.* 6: 413-430.
- Kline M.P., Morimoto R.I. (1997). Repression of the heat-shock factor-1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation, *Mol. Cell. Biol.* 17 2107–2115.
- Knopp P., der Pers J.N.C., van Delden W. (2000). Quantification of locomotion and the effect of food deprivation on locomotor activity in *Drosophila*. *J. Insect Behav.* 13: 27-43.
- Kops G.J., de Ruiter N.D., De Vries-Smits A.M., Powell D.R., Bos J.L., Burgering B.M. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398: 630-634.
- Krebs R.A., Feder M.E. (1997). Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress Chaperones* 2: 60-71.
- Krebs R.A., Loeschcke V. (1997). Estimating heritability in a threshold trait: heat-shock tolerance in *Drosophila buzzatii*. *Heredity* 79: 252–259.
- Krebs R.A., Loeschcke V. (1996). Selection for increased resistance and acclimation to thermal stress in *Drosophila buzzatii*. *Genetics* 142: 471-479.
- Krebs R.A., Loeschcke V. (1995). Resistance to thermal stress in adult *Drosophila buzzatii*: Acclimation and variation among populations. *Biol. J. Linn. Soc.* 56: 505-515.
- Krebs R.A., Loeschcke V. (1994). Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* 8: 730-737.
- Kristensen T.N., Sorensen J.G., Loeschcke V. (2003). Mild heat stress at a young age in *Drosophila melanogaster* leads to increased Hsp70 synthesis after stress exposure later in life. *Journal of Genetics* 82: 89-94.
- Ku H.H., Brunk U.T., Sohal R.S. (1993). Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free. Radic. Biol. Med.* 15: 621–627.
- Kuether K., Arking R. (1999). *Drosophila* selected for extended longevity are more sensitive to heat shock. *Age* 22: 175-180.
- Kujoth G.C., Bradshaw P.C., Haroon S., Prolla, T.A. (2007). The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PLoS Genetics*, 3: 161–173.

- Kurapati R., Passananti H.B., Rose M.R., Tower J. (2000). Increased hsp22 RNA levels in *Drosophila* lines genetically selected for increased longevity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55A: B552–B559.
- Law R., Bradshaw A.D., Putwain P.D. (1977). Life-history variation in *Poa-annua*. *Evolution* 31: 233-246.
- Le Bourg E., Valenti P., Luccetta P., Payre F. (2001). Effects of mild heat shocks at young age on aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* 2: 155-164.
- Lee G.H., Park J.H. (2004). Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167: 311–323.
- Leips J., Mackay T.F.C. (2000). Quantitative trait loci for life span in *Drosophila melanogaster*: Interactions with genetic background and larval density. *Genetics* 155: 1773–1788.
- Leips J., Mackay T.F.C. (2002). The complex genetic architecture of *Drosophila* life span, *Exp. Aging Res.* 28: 361-390.
- Leopold P., Perrimon N. (2007). *Drosophila* and the genetics of the internal milieu. *Nature* 450: 186-8.
- Leroi A. M., Chippindale A. K., Rose M. R. (1994a) Long-term laboratory evolution of a genetic life-history trade-off in *Drosophila melanogaster*. 1. The role of genotype-by-environment interaction. *Evolution* 48: 1244–1257.
- Leroi A. M., Chen W. R., Rose M. R. (1994b). Long-term laboratory evolution of a genetic life-history trade-off in *Drosophila melanogaster*. 2. Stability of genetic correlations. *Evolution* 48: 1258–1268.
- Lewontin R.C. (1974). *The Genetic Basis of Evolutionary Change*, Columbia University Press: New York.
- Lin K., Hsin H., Libina N. Kenyon C. (2001). Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* 28: 139–145.
- Lin P., Huang L.H., Steward R. (2000). Cactin, a conserved protein that interacts with the *Drosophila* IkappaB protein Cactus and modulates its function. *Mech. Dev.* 94: 57-65.
- Lin Y.-J., Seroude L., Benzer S. (1998). Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science* 282: 943–946.

- Lin K., Dorman J. B., Rodan A., Kenyon, C. (1997). Daf-16: an HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278: 1319–1322
- Lindquist S. (1986). The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry* 55: 151-91.
- Lithgow G.J. (1996). Invertebrate gerontology: the age mutations of *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* 18: 809-815.
- Lithgow G.J., Kirkwood T.B.L. (1996). Mechanism and evolution of aging. *Science* 273: 80.
- Lithgow G.J., White T.M., Melov S., Johnson T.E. (1995). Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutation and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92: 7540 -7544.
- Lithgow G.J., White T.M., Hinerfeld D.A., Johnson T.E. (1994). Thermotolerance of a long-lived mutant of *Caenorhabditis elegans*. *J. Gerontol.* 49: B270-B276.
- Loeschcke V., Krebs R.A., Dahlgaard J., Michalak P. (1997). High temperature stress and the evolution of thermal resistance. In: Bijlsma, R. and Loeschcke, V., *Environmental stress, adaptation and evolution*. Birkhauser Verlag, Basel, pp 175-191.
- Loeschcke V., Hoffmann A.A. (2007). Heat hardening benefits and costs on field fitness of *Drosophila* depend on environmental temperature. *Amer Nat.* 169: 175-183.
- Luckinbill L.S. (1998). Selection for longevity confers resistance to low-temperature stress in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences* 53A: B147-B153.
- Luckinbill L.S, Arking M. J., Clare M.J, Cirocco W.C, Buck S.A. (1984). Selection for delay senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 38: 996-1003.
- Luckinbill L.S, Clare M.J, Krell W. L, Cirocco W.C, Richards P.A. (1987). Estimating the number of genetic elements that defer senescence in *Drosophila*. *Evol. Ecol.* 1: 37-46.
- Luong N., Davies C.R., Wessells R.J., Graham S.M., King M.T., Veech R., Bodmer R., Oldham S.M. (2006). Activated FOXO-mediated insulin resistance is blocked by reduction of TOR activity. *Cell Metab.* 4: 133–142.
- Lynch M., Walsh B. (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.

- McCull G., Hoffmann A.A., McKechnie S.W. (1996). Response of two heat shock genes to selection for knockdown heat resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*: 143 1615–1627.
- Mackay T.F.C (2004). The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics y Development*. 14: 253–257.
- Mackay T.F.C., Fry J.D. (1996). Polygenic mutation in *Drosophila melanogaster*: genetic interactions between selection lines and candidate quantitative trait loci. *Genetics* 144: 671–688.
- Maynard Smith J. (1956). Acclimatization to high temperatures in inbred and outbred *Drosophila subobscura*. *J. Genet.* 54: 497-505.
- Maynard Smith J. (1958). The effects of temperatures and of egg-laying on the longevity of *Drosophila subobscura*. *J. Exp. Biol.* 35: 832-42.
- Medawar P.B. (1946). Old age and natural death. *Mod. Quart.* 1: 30-56.
- Medawar P.B. (1952). An unsolved problem of biology: The uniqueness of the individual. Dover, New York, pp28 -55.
- Milkman RD, Zeitler RR (1974). Concurrent multiple paternity in natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 78: 1191–1193.
- Min K.J., Yamamoto R., Buch S., Pankratz M., Tatar M. (2008). *Drosophila* lifespan control by dietary restriction independent of insulin-like signaling. *Aging Cell* 7: 199–206.
- Min K.T., Benzer S. (1997). *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10792–10796.
- Minois N. (2000). Longevity and aging: beneficial effects of exposure to mild stress. *Biogerontology* 1: 15-29.
- Misener S.R., Chen C.P., Walker V.K. (2001). Cold tolerance and proline metabolic gene expression in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 47: 393–400.
- Miwa S., Riyahi K., Partridge L., Brand M.D. (2006). Lack of Correlation between Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production and Life Span in *Drosophila*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1019: 388–391.
- Mockett R.J., Orr W.C., Rahmandar J.J., et al. (2001). Antioxidant status and stress resistance in long- and short-lived lines of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* 36: 441-463.

- Morgan T.J., Mckay T.F.C. (2006). Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 96: 232-242.
- Morimoto RI, Jolly C, Satyal S, et al. (1999). Molecular chaperones and the heat shock response. *British Journal of Cancer* 80: 5-5.
- Moreteau B., Capy P., Alonso-Moraga A., Munoz-Serrano A., Stockel J., David J.R. (1995). Genetic characterization of geographic populations using morphometrical traits in *Drosophila melanogaster*: isogroups versus isofemale lines. *Genetica* 96: 207–215.
- Monaghan P., Haussmann M.F. (2006). Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? *Trends in Ecology y Evolution* 21: 47–53.
- Morris J.Z., Tissenbaum H.A. and Ruvkun G. (1996). A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382: 536–539
- Morrow G., Samson M., Michaud S., Tanguay R.M. (2004). Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J.* 18: 598–599.
- Munoz M.J., Riddle D.L. (2003). Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity. *Genetics* 163: 171–180.
- Nagylaki T. (1977). The evolution of one- and two-locus systems. II. *Genetics* 85: 347-354.
- Naylor S.L., Tatar M. (2007). Characterization of CG6770, a potential translational inhibitor. *A. Dros. Res. Conf.* 48: 404B.
- Nemoto S., Finkel T. (2004) Ageing and the mystery at Arles. *Nature*, 429, 149–152.
- Norry F.M, Scannapieco A.C, Sambucetti P., Bertoli C.I., Loeschcke V. (2008). QTL for the thermotolerance effect of heat hardening, knockdown resistance to heat and chill-coma recovery in an intercontinental set of recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* 17: 4570-4581.
- Norry F.M., Gomez F.H., Loeschcke V. (2007). Knockdown resistance to heat stress and slow recovery from chill coma are genetically associated in a quantitative trait locus region of chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* 16: 3274-3284.
- Norry F.M., Sambucetti P., Scannapieco A.C., Loeschcke V. (2006). Altitudinal patterns for longevity, fecundity and senescence in *Drosophila buzzatii*. *Genetica* 128: 81-93.

- Norry F.M, Dahlgard J., Loeschcke V. (2004). Quantitative trait loci affecting knockdown resistance to high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* 13: 3585-3594.
- Norry F.M., Loeschcke V. (2003). Heat-induced expression of a molecular chaperone decreases by selecting for long-lived individuals. *Experimental Gerontology* 38: 673-681.
- Norry F.M., Loeschcke, V. (2002a). Temperature-induced shifts in associations of longevity with body size in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 56: 299-306.
- Norry F.M., Loeschcke V. (2002b). Longevity and resistance to cold stress in cold-stress selected lines and their controls in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 15: 763-774.
- Norry F.M., Bubily O., Loeschcke V. (2001). Developmental time, body size and wing loading in *Drosophila buzzatii* from lowland and highland populations in Argentina. *Hereditas* 135: 35-40.
- Norry F.M., Vilarde J.C., Fanara J.J, Hasson E., Rodriguez C. (1995). An adaptive chromosomal polymorphism affecting size-related traits, and longevity selection in a natural population of *Drosophila buzzatii*. *Genetica* 96: 285-291.
- Nuzhdin SV, Harshman LG, Zhou M, Harmon K. (2007). Genome-enabled hitchhiking mapping identifies TLs for stress resistance in natural *Drosophila*. *Heredity* 99:313–321.
- Nuzhdin S.V., Khazaeli A.A., Curtsinger J.W. (2005). Survival analysis of life span quantitative trait loci in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 170: 718–731.
- Nuzhdin S.V., Pasyukova E.G., Dilda C.L., Zeng Z.B., Mackay T.F.C. (1997) Sex-specific quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 94: 9734–9739.
- Olsen A., Vantipalli M.C., Lithgow G.J. (2006). Lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* following repeated mild hormetic heat treatments. *Biogerontology* 7: 221-30.
- Ogg S., Paradis S., Gottlieb S., Patterson G. I., Lee L., Tissenbaum H. A., Ruvkun G. (1997). The forkhead transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389: 994–999
- Partridge L., (2010). The new biology of ageing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365: 147–154.

- Partridge L., Mangel M. (1999). Messages from mortality: the evolution of death rates in the old. *Trends Ecol. Evol.* 14: 438–442.
- Partridge L., Barton N.H. (1993). Optimally, mutation and evolution of aging. *Nature* 362: 305-311.
- Partridge L., Hoffmann A., Jones J.S. (1987). Male size and mating success in *Drosophila melanogaster* and *D. pseudoobscura* under field conditions. *Anim Behav* 35: 468–476.
- Parsons P.A. (2005). Environments and evolution: interactions between stress, resource inadequacy and energetic efficiency. *Biol. Rev.* 80: 589–610.
- Parsons P.A. (2002). Aging: The fitness-stress continuum and genetic variability. *Experimental Aging Research* 28: 347-59.
- Parsons P.A., Hosgood S.M.W. (1967). Genetic heterogeneity among the founders of laboratory populations of *Drosophila*. *Genetica* 38: 328–339.
- Pierce SB, Costa M, Wisotzkey R, Devadhar S, Homburger SA, Buchman AR, Ferguson KC, Heller J, Platt DM, Pasquinelli AA, et al. (2001). Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes y Dev.* 15:672–686.
- Promislow, D. E. L., and Haselkorn, T. S. (2002). Age-specific metabolic rates and mortality rates in the genus *Drosophila*. *Aging Cell.* 1:66–74.
- Promislow, D. E; Tatar, M.; Khazaeli, A. A and Curtsinger, J. W. (1996). Age-specific patterns of genetic variance in *Drosophila melanogaster*. I. Mortality. *Genetics* 143: 839 – 848. Promislow D.E, Tatar M., Khazaeli A.A., Curtsinger J.W. (1996). Age-specific patterns of genetic variance in *Drosophila melanogaster*. I. Mortality. *Genetics* 143: 839-848.
- Powell J.R. (1997). Progress and prospects in evolutionary biology: The *Drosophila* model Pp. 562.
- Ramsay N. (1988). A mutant in a major heat shock protein of *Escherichia coli* continues to show inducible thermotolerance. *Molecular and General Genetics* 211: 332-34.
- Rattan S.I.S. (2008). Hormesis in aging. *Ageing Research Reviews* 7: 63-78.
- Rattan S.I.S. (1998). The nature of gerontogenes and vitagenes. Antiaging effects of repeated heat shock on human fibroblasts. *Annal. NY Acad. Sci.* 854: 54-60.
- Rea S.L., Wu D., Cypser J.R., Vaupel J.W., Johnson T.E. (2005). A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*, *Nat. Genet.* 37: 894–898



- Reynolds E.R., O'Donnell J.M. (1987). An analysis of the embryonic defects in Punch mutants of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 123: 430--441.
- Rion S., Kawecki T. J. (2007). Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, 20: 1655-1664.
- Ricklefs, R. E. (1998). Evolutionary theories of aging: confirmation of a fundamental prediction, with implications for the genetic basis and evolution of life span. *Am. Nat.* 152, 24--44
- Ritchie M.G., Kyriacou C.P. (1994). Genetic variability of courtship song in a population of *Drosophila melanogaster*. *Anim. Behav.* 48: 425--434.
- Robinson D.N., Smith-Leiker T.A., Sokol N.S., Hudson A.M., Cooley L. (1997). Formation of the *Drosophila* ovarian ring canal inner rim depends on *cheerio*. *Genetics* 145: 1063--1072.
- Rose M. R., Burke M. K., Shahrestani P. and Mueller L. D. (2008) Evolution of ageing since Darwin. *J. Genet.* 87, 363--371
- Rose M.R., Rauser C.L, Mueller L.D., Benford G. (2006). A revolution for aging research *Biogerontology* 7: 269--277
- Rose M.R., Archer M.A. (1996). *Current opinion in Genetics* 6: 366-370.
- Rose M.R., Vu L.N., Park S.U., Graves J.L. (1992). Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 27: 241-250.
- Rose M.R. (1991). *Evolutionary biology of aging*. Oxford University Press. New York.
- Rose M.R. (1984). Laboratory evolution of postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 38: 1004-10.
- Rose M.R., Charlesworth B. (1980). A test of evolutionary theories of senescence. *Nature* 287: 141-142.
- Rose M.R., Charlesworth B. (1981). Genetics of life history in *Drosophila melanogaster*. I. Sib analysis of adult females. *Genetics* 97: 173-86.
- Rutherford S.L., Lindquist S. (1998). *Hsp90* as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396: 336-342.
- Sørensen J.G., Nielsen M.M., Loeschcke V. (2007) Gene expression profile analysis of *Drosophila melanogaster* selected for resistance to environmental stressors. *J. Evol. Biol.* 20: 1624--1636.
- Sørensen J.G., Norry F.M., Scannapieco A.C., Loeschcke V. (2005a). Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *J. Evol. Biol.* 18: 829-837.

- Sørensen J.G., Nielsen M.M., Kruhøffer M., Justesen J., Loeschcke V. (2005b). Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chap.* 10: 312-328.
- Sørensen J.G., Michalak P., Justesen J., Loeschcke V. (1999). Expression of the heat-shock protein Hsp70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal resistance. *Hereditas* 131: 155-164.
- Sørensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6: 1025–1037.
- Sørensen J.G., Loeschcke V. (2002). Natural adaptation to environmental stress via physiological clock-regulation of stress resistance in *Drosophila*. *Ecology Letters* 5: 16-19.
- Sørensen J.G., Loeschcke V. (2001). Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and lead to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *J. Insect Phys.* 47: 1301-1307.
- Sambucetti P., Sørensen J.G., Loeschcke V., Norry F.M. (2005). Variation in senescence and associated traits between sympatric cactophilic sibling species of *Drosophila*. *Evol. Ecol. Res.* 7: 915-930.
- Sarkar M., Leventis P.A., Silvescu C.I., Reinhold V.N., Schachter H., Boulianne G.L. (2006). Null mutations in *Drosophila* N-acetylglucosaminyltransferase I produce defects in locomotion and a reduced life span. *J. Biol. Chem.* 281(18): 12776-12785.
- Sarup P., Loeschcke V. Life extension and the position of the hormetic zone depends on sex and genetic background in *Drosophila melanogaster*, *Biogerontology* (in press) doi: 10.1007/s10522-010-9298-z.
- Serra V., von Zglinicki T., Lorenz M., Saretzki, G. (2003) Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *Journal of Biological Chemistry* 278: 6824–6830.
- Service P.M. (1987). Physiological mechanisms of increased stress resistance in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Physiol. Zool.* 60: 321–326.
- Service P.M., Hutchinson E.W., MacKinley M.D., Rose M.R. (1985). Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Physiol. Zool.* 58: 380–389.
- Service P.M., Rose M.R. (1985). Genetic covariation among life-history components: the effect of novel environments. *Evolution* 39: 943-945.

- Scannapieco A.C., Sørensen J.G., Loeschcke V., Norry F.M. (2007). Heat-induced hormesis in longevity of two sibling *Drosophila* species. *Biogerontology* 8: 315-325.
- Schlesinger M.J., Ashburner M., Tissieres A. (1982). Heat-shock: From bacteria to man. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Shama, S., Lai C.Y., Antoniazzi J.M., Jang J.C., Jazwinski S.M. (1998). Heat stress-induced life span extension in yeast. *Exp. Cell Res.* 245: 379-388.
- Silbermann R., Tatar M. (2000). Reproductive costs of heat-shock proteins in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54: 2038-2045.
- Simon A.F., Shih C., Mack A., Benzer S. (2003). Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster*, *Science* 299: 1407–1410.
- Simonsen A., Cumming R.C., Lindmo K., Galaviz V., Cheng S., Rusten T.E., Finley K.D. (2007). Genetic modifiers of the *Drosophila* blue cheese gene link defects in lysosomal transport with decreased life span and altered ubiquitinated-protein profiles, *Genetics* 176: 1283–1297.
- Simmons L.W. (2001). Sperm Competition and its Evolutionary Consequences in the Insects. Princeton University press: Princeton and Oxford.
- Sgrò C., Partridge L. (1999). A Delayed Wave of Death from Reproduction in *Drosophila*. *Science* 286: 2521-2524.
- Slack C., Werz C., Wieser D., Alic N., Foley A., Stocker H., Withers D.J., Thornton J.M., Hafen E., Partridge L. (2010). Regulation of lifespan, metabolism, and stress responses by the *Drosophila* SH2B protein, Lnk. *PLoS Genet.* 6, e1000881.
- Sohal R. S.; Ku H., Agarwal S. (1993). Biochemical correlates of longevity in two closely-related rodent species. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 196: 7-11.
- Sohal R.S., Mockett R.J., Orr, W.C. (2002). Mechanisms of aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine* 33: 575–586.
- Sohal R.S., Arnold L.A., Sohal B.H. (1990). Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species, *Free. Radic. Biol. Med.* 9: 495–500.
- Sokol N., Cooley L. (1999). *Drosophila* Filamin encoded by the cheerio locus is a component of ovarian ring canals, *Curr. Biol.* 9: 1221–1230.
- Solomon J.M., Rossi J.M., Golic K., McGarry T., Lindquist S. (1991). Changes in Hsp70 alter thermotolerance and heatshock regulation in *Drosophila*. *New Biol.* 3: 1106–1120.

- Speakman J.R., Talbot D.A., Selman C., Snart S., McLaren J.S., Redman P., Krol E., Jackson D.M., Johnson M.S., Brand M.D. (2004). Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell* 3: 87–95.
- Stadtman E.R. (1992) Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220–1224.
- Stearns S.C. (1989). The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience* 39: 436-445.
- Strub B.R., Parkes T.L., Mukai S.T., Bahadorani S., Coulthard A.B., Hall N., Phillips J.P., Hilliker A.J. (2008). Mutations of the withered (whd) gene in *Drosophila melanogaster* confer hypersensitivity to oxidative stress and are lesions of the carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) gene. *Genome* 51(6): 409--420.
- Sun J., Folk D., Bradley T.J, Tower J. (2002). Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 161: 661-672.
- Taguchi A., Wartschow L.M., White M.F. (2007). Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* 317: 369-372.
- Takahashi KH, O Yasukazu and T Kouhei (2011) Genome-wide deficiency screen for the genomic regions responsible for heat resistance in *Drosophila melanogaster*, *BMC Genetics*, 12:57
- Tatar M. (2011). The plate half-full: Status of research on the mechanisms of dietary restriction in *Drosophila melanogaster*, *Experimental Gerontology*, doi: 10.1016/j.exger.2010.12.002
- Tatar M., Bartke A., Antebi A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299: 1346–1351.
- Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.P., Yin C.M., Garofalo R.S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292: 107–110.
- Tatar M. (1999). Evolution of senescence: longevity and the expression of heat shock proteins. *Am. Zool.* 39: 920-927.
- Tatar M., Khazaeli A.A., Curtsinger J.W. (1997). Chaperoning extended life. *Nature* 390, 30.
- Tatar M., Promislow D.E.L., Khazaeli A.A., Curtsinger J.W. (1996). Age-specific patterns of genetic variance in *Drosophila melanogaster*. II Fecundity and its genetic covariance with age-specific mortality. *Genetics* 143: 849-858.

- Teleman A.A. (2010). Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem. J.* 425: 13–26.
- Tissenbaum H.A., Ruvkun G. (1998). An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* 148: 703–717.
- Tower J. (2009). Hsp and aging, *Trends Endocrinol. Metab.* 20: 216–222.
- Tower J., Heat shock proteins and *Drosophila* aging, *Exp. Gerontol.* (in press). doi:10.1016/j.exger.2010.09.002.
- Toda M.J., Kimura M.T. (1997). Life-history traits related to host selection in mycophagous drosophilids. *J. Anim. Ecol.* 66:154–166.
- Van Herrewege J., David J. R. (1997). Starvation and desiccation tolerances in *Drosophila*: comparison of species from different climatic origins. *Ecoscience* 4: 151–157.
- Verbeke P., Fonage J., Clark B.F.C., Rattan S.I.S. (2001). Heat shock response and ageing: mechanisms and applications. *Cell Biol. Int.* 25: 845-857.
- Vieira C., Pasyukova E. G., Zeng Z., Hackett J. B., Lyman R. F., Mackay T. F. C. (2000). Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 154:213-227.
- Velazquez J.M., Sonoda S., Bugaisky G., Lindquist S. (1983). Is the major *Drosophila* heat shock protein present in cells that have not been heat shocked? *J. Cell Biol.* 96: 286-290.
- Vellai T., Takacs-Vellai K., Zhang Y., Kovacs A.L., Oros L., Muller F. (2003). Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426, 620.
- Vermeulen C. J., Bijlsma R., Loeschcke V. (2008). A major QTL affects temperature sensitive adult lethality and inbreeding depression in life span in *Drosophila melanogaster*, *BMC Evolutionary Biology* 8: 1–1.
- Wachter K.W., Finch C.E. (1997). *Between Zeus and the salmon: The biodemography of longevity*. National Academy Press, Washington DC,
- Wallace D. C., Melov S. (1998). Radicals r'aging, *Nat. Genet.* 19: 105–106.
- Wang M.H., Lazebny O., Harshman L.G., Nuzhdin S.V. (2004). Environment-dependent survival of *Drosophila melanogaster*: a quantitative genetic analysis, *Aging Cell* 3: 133–140.
- Wang M.C., Bohmann D., Jasper H. (2005). JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121: 115–125.

- Wang M.C., Bohmann D., Jasper H. (2003). JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell* 5: 811–816.
- Wang H.-D., Kazemi-Esfarjani P., Benzer S. (2004). Multiple stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 12610–12615
- Wang S., Basten C.J., Zeng Z.-B. (2011). Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.  
(<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)
- Wattiaux J. M. (1968). Cumulative parental effects in *Drosophila subobscura*. *Evolution* 22: 406-21.
- Weeks A.R., Mckechnie S.W., Hoffmann A.A. (2002). Dissecting adaptive clinal variation: markers, inversions and size/stress associations in *Drosophila melanogaster* from a central field population. *Ecology letters* 5: 756-763.
- Weismann A. (1889). *Essays Upon Heredity and Kindred Biological Problems*. Clarendon Press, Oxford.
- Werner T., Liu G., Kang D., Ekengren S., Steiner H., Hultmark D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(25): 13772--13777.
- Westendorp R.G.J., Kirkwood T.B.L. (1998). Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature* 396: 743-746.
- White T.C.R. (1993). *The Inadequate Environment: Nitrogen and the Abundance of Animals*. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
- Williams A.E., Rose M.R., Bradley T.J. (2004). The respiratory pattern in *Drosophila melanogaster* selected for desiccation resistance is not associated with the observed evolution of decreased locomotory activity. *Physiol. Biochem. Zool.* 77: 10–17.
- Williams G.C. (1957). Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411.
- Wolfe S.L., *Introduction to Cell and Molecular Biology*. Hadsworth Publishing Company. Belmont, CA, (1995).
- Yashin A.I., Cypser J.R., Johnson T.E., Michalski A.I., Boyko S.I., Novoseltsev V.N. (2001). Ageing and survival after different doses of heat shock: the results of analysis of data from stress experiments with the nematode worm *Caenorhabditis elegans*, *Mech. Ageing Dev.* 122: 1477– 1495.
- Zabolotskaya M.V., Grima D.P., Lin M.D., Chou T.B., Newbury S.F. (2008). The 5'-3' exonuclease Pacman is required for normal male fertility and is dynamically

- localized in cytoplasmic particles in *Drosophila* testis cells. *Biochem. J.* 416(3): 327--335.
- Zeng Z.B., Precision mapping of quantitative trait loci, *Genetics* 136 (1994) 1457–1468.
- Zeng Z.B. (1993). Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping of quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10972-10976.
- Zera A.J., and Harshman L.G. (2001). The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 95-126.
- Zera A.J., Zhao Z.W. (2003). Life-history evolution and the microevolution of intermediary metabolism: Activities of lipid-metabolizing enzymes in life-history morphs of a wingdimorphic cricket. *Evolution* 57: 586–596.
- Zid B.M., Rogers A.N., Katewa S.D., Vargas M.A., Kolipinski M.C., Lu T.A., Benzer S., Kapahi P. (2009). 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*. *Cell* 139(1): 149--160.
- Zinke I., Schutz C.S., Katzenberger J.D., Bauer M., Pankratz, M.J. (2002). Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J.* 21(22): 6162--6173.
- Zwaan B., Bijlsma R., Hoekstra R.F. (1995). Direct selection on life-span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 49: 649-659.
- Zwaan B.J. (1999). The evolutionary genetics of ageing and longevity. *Heredity*, 82: 589-597.