

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**Estudio de la regulación de la vía de la  
autofagia por p53 en *Drosophila  
melanogaster***

**Lic. María Clara Ingaramo**

Director de Tesis: Dr. Andrés Dekanty

Laboratorio de Biología Molecular –  
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral –  
FBCB – UNL

**-2022-**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Quisiera expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Dekanty por su dirección durante mi trabajo de tesis. Adicionalmente quisiera extender mi agradecimiento a CONICET por el apoyo económico y al IAL y la FCB por brindarme de múltiples recursos para el desarrollo de mi trabajo.*

## TRABAJOS PUBLICADOS

- **Sanchez JA, Mesquita D, Ingaramo MC, Ariel F, Milán M, Dekanty A.** Eiger/TNF $\alpha$ -mediated Dilp8 and ROS production coordinate intra-organ growth in *Drosophila*. *PLOS Genetics* 2019, 15(8), e1008133.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008133>
- **Ingaramo MC, Sánchez JA, Perrimon N, Dekanty A.** Fat Body p53 Regulates Systemic Insulin Signaling and Autophagy Under Nutrient Stress via *Drosophila* Upd2 Repression. *Cell Rep.* 2020; 33(4):108321.  
[https://doi: 10.1016/j.celrep.2020.108321](https://doi:10.1016/j.celrep.2020.108321)

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
---------------------	----------

---

<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
----------------	-----------

---

<b>INTRODUCCION</b>	<b>13</b>
---------------------	-----------

---

<b>1. DROSOPHILA MELANOGASTER COMO ORGANISMO MODELO</b>	<b>14</b>
1.1 ASPECTOS GENÉTICOS	14
1.1.1 Conservación	14
1.1.2 Herramientas genéticas	14
i. Sistema GAL4/UAS	15
ii. Sistema FLP/FRT	16
1.2 ASPECTOS FISIOLÓGICOS	18
1.2.1 Ciclo de vida	18
1.2.2 Anatomía funcional	19
i. Cuerpo graso o Fat body	20
ii. Oenocitos	21
iii. “Páncreas” de Drosophila: IPCs y células de la Córpora Cardíaca	22
1.3 ASPECTOS METABÓLICOS	23
1.3.1 Insulina/IGFs en Drosophila	23
1.3.2 Vía de la Insulina/TOR	24
1.3.3 Rol del Fat body en la regulación de las IPCs	26
i. Unpaired2	27
ii. CCHamide2	28
iii. Dawdle	28
iv. Growth Blocking Peptides 1 y 2	28
v. Stunted	29
vi. Neural Lazarillo	29
vii. Adiponectina	29
viii. Eiger	30
<b>2. P53 Y DROSOPHILA P53</b>	<b>31</b>
2.1 ESTRUCTURA	31
2.2 FUNCIONES	34
2.2.1 Apoptosis	34
2.2.2 Arresto del ciclo celular y senescencia	34
2.2.3 Reparación de ADN	35
2.2.4 Funciones no canónicas de p53	35
i. Proliferación inducida por apoptosis	36
ii. Coordinación de crecimiento	36
iii. Competición celular	37
2.2.5 Homeostasis metabólica	37
2.3 REGULACIÓN	39
<b>3. AUTOFAGIA</b>	<b>42</b>

3.1	MACROAUTOFAGIA EN DROSOPHILA	42
3.1.1	Mecanismo molecular	42
3.1.2	Funciones fisiológicas	46
i.	Reciclado molecular y abastecimiento de reservas energéticas	46
ii.	Mecanismo de reparación de organelas y proteínas	47
iii.	Muerte celular dependiente de autofagia	47
iv.	Funciones inmunológicas	47
3.2	REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR P53	47
3.2.1	Rol de p53 como inhibidor de autofagia	48
3.2.2	Rol proautofágico de p53	49
3.2.3	CG4025/DRAM en la regulación de la autofagia por p53 en Drosophila	50

## **OBJETIVOS** **52**

---

<b>1.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>53</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>53</b>
2.1	ESTUDIAR LA REGULACIÓN DE AUTOFAGIA POR P53 EN RESPUESTA A LA PRIVACIÓN DE NUTRIENTES	53
2.2	ESTUDIAR LA FUNCIÓN DEL GEN CG4025 EN LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA MEDIADA POR DP53	53

## **MATERIALES Y METODOS** **54**

---

<b>1.</b>	<b>LÍNEAS DE DROSOPHILA Y MANTENIMIENTO</b>	<b>55</b>
<b>2.</b>	<b>CRUCES Y EXPERIMENTOS DE MOSAICOS GENÉTICOS</b>	<b>55</b>
<b>3.</b>	<b>TRATAMIENTOS DE HAMBREADO Y EXPERIMENTOS DE SUPERVIVENCIA</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>CRECIMIENTO EN DIETAS RICAS EN NUTRIENTES</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>INMUNOENSAYOS</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>EXPERIMENTOS <i>EX-VIVO</i></b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>CUANTIFICACIÓN DE FLUORESCENCIA</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>WESTERN BLOT</b>	<b>59</b>
<b>9.</b>	<b>EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-PCR CUANTITATIVA</b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>NIVELES DE DILP2 EN HEMOLINFA</b>	<b>60</b>
<b>11.</b>	<b>DETERMINACIONES DE METABOLITOS</b>	<b>61</b>
<b>12.</b>	<b>TIEMPO DE DESARROLLO Y TAMAÑO DE PUPA</b>	<b>61</b>
<b>13.</b>	<b>SECUENCIACIÓN MASIVA DE ARN, AGRUPAMIENTOS Y ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENES</b>	<b>64</b>

## **RESULTADOS** **66**

---

<b>1.</b>	<b>RELEVANCIA DE P53 PARA LA ADAPTACIÓN A DISTINTAS CONDICIONES NUTRICIONALES</b>	<b>67</b>
1.1	REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y DE LA ACTIVIDAD DE P53 EN EL FB BAJO CONDICIONES DE HAMBREADO	67
1.2	IMPLICANCIAS METABÓLICAS DE LA DEPLECIÓN DE LA ACTIVIDAD P53 EN EL FB	69
1.2.1	Depleción de p53 en condiciones control	69
1.2.2	Depleción de P53 frente a condiciones de hambreado	70
1.3	P53 EN INDIVIDUOS CRECIDOS BAJO DIETA RICA EN AZÚCARES O HSD	70

<b>2. P53 Y LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA FRENTE A LA FALTA DE NUTRIENTES</b>	<b>72</b>
<b>3. ROL DE AUTOFAGIA Y P53 EN LA SUPERVIVENCIA A LA FALTA DE NUTRIENTES</b>	<b>77</b>
<b>4. P53 Y LA REGULACIÓN DE LA VÍA TOR POR FALTA DE NUTRIENTES</b>	<b>80</b>
<b>5. CARÁCTER SISTÉMICO DEL ROL DE P53 FRENTE A CONDICIONES DE HAMBREADO</b>	<b>82</b>
<b>6. ROL DE P53 EN LA MODULACIÓN DE LA VÍA DE LA INSULINA (IIS) FRENTE A ESTRÉS NUTRICIONAL</b>	<b>85</b>
6.1 REGULACIÓN DE DILP2 POR P53 FRENTE A LA FALTA DE NUTRIENTES	85
6.2 ROL DE P53 EN LA COMUNICACIÓN INTER-ÓRGANO ENTRE EL FB Y LAS IPCS FRENTE A LA FALTA DE NUTRIENTES	93
6.3 REGULACIÓN DE UPD2 POR P53 EN LA RESPUESTA A LA PRIVACIÓN DE NUTRIENTES	97
<b>7. REGULACIÓN DE P53 POR AMPK EN RESPUESTA AL ESTRÉS NUTRICIONAL</b>	<b>100</b>
<b>8. ROL DE P53 EN LA ADAPTACIÓN AL EXCESO DE NUTRIENTES</b>	<b>104</b>
<b>9. ROL DE P53 EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN PERIODOS DE HAMBREADO</b>	<b>106</b>
<b>10. RESPUESTAS TRANSCRIPCIONALES MEDIADAS POR P53 EN RESPUESTA AL ESTRÉS NUTRICIONAL</b>	<b>108</b>
10.1 RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DEPENDIENTE DE P53 EN RESPUESTA AL ESTRÉS NUTRICIONAL	108
10.2 ROL DE LA TRADUCCIÓN Y BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS EN EL CONSUMO ACELERADO DE GLUCÓGENO EN AUSENCIA DE P53	113
<b>11. CG4025 Y P53</b>	<b>116</b>
11.1 CG4025 SE INDUCE EN RESPUESTA A LA FALTA DE NUTRIENTES DE FORMA INDEPENDIENTE DE P53	116
11.2 CG4025 NO ES NECESARIO PARA APOPTOSIS DEPENDIENTE DE P53	116
<b>DISCUSION</b>	<b>118</b>
<b>1. Discusión</b>	<b>119</b>
1.1 REGULACIÓN DE P53 EN RESPUESTA A LA PRIVACIÓN DE NUTRIENTES	120
1.2 NEXO ENTRE AMPK Y AUTOFAGIA	122
1.3 ROL DE P53 FRENTE AL EXCESO DE NUTRIENTES	123
1.4 LEPTINA/UPD2 COMO MOLÉCULA EFECTORA DE P53	124
1.4.1 Upd2 como homólogo de Leptina	124
1.4.2 Relevancia fisiológica de la interacción entre Upd2/Leptina y p53	125
1.4.3 Rol de la hormona Leptina en el desarrollo de cáncer	126
1.5 EJE AMPK-P53 EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO	126
1.6 P53 Y BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS	128
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>130</b>
<b>1. CONCLUSIONES</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>132</b>
<b>ANEXO</b>	<b>155</b>



## **ABREVIATURAS**

## Abreviaturas

<b>4EBP</b>	<i>Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AEL</b>	<i>After Egg Laying</i> , Desde la ovipuesta
<b>Akh</b>	<i>Adipokinetic hormone</i>
<b>AMPK</b>	<i>AMP-activated protein kinase</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>bp</b>	<i>Base pair</i> , pares de bases
<b>CCha2</b>	<i>CCHamide-2</i>
<b>dILP</b>	<i>Drosophila insulin-like peptide</i>
<b>Dome</b>	<i>Domeless</i>
<b>Egr</b>	<i>Eiger</i>
<b>FB</b>	<i>Fat body</i> , cuerpo graso
<b>Fc</b>	<i>Fold change</i>
<b>FOXO</b>	<i>Forkhead Box O</i>
<b>FRT</b>	<i>Filippase recognition target</i> , sitio de reconocimiento de la flipasa
<b>GABA</b>	<i>Gamma aminobutyric acid</i>
<b>GBP1/2</b>	<i>Growth Blocking Peptide 1/2</i>
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>GO</b>	<i>Gene Ontology</i> , Ontología de genes
<b>GRASP</b>	<i>Golgi reassembly stacking protein</i>
<b>HSD</b>	<i>High-sugar Diet</i> , dieta rica en azúcares
<b>InR</b>	<i>Insulin receptor</i> , receptor de insulina
<b>IPCs</b>	<i>Insulin-Producing Cells</i> , células productoras de insulina
<b>JAK-STAT</b>	<i>Janus-kinase-signal transducers and activators of transcription</i>
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>L1</b>	Estadio larvario 1

<b>L2</b>	Estadio larvario 2
<b>L3</b>	Estadio larvario 3
<b>LDs</b>	<i>Lipid droplets</i>
<b>Mdm2</b>	<i>Murine double minute 2</i>
<b>miARN</b>	Micro ARN
<b>n.s.</b>	Non significant, no significativo
<b>p53RE</b>	P53 Response Element, Elemento de Respuesta a p53
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline, buffer fosfato
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction, Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PH</b>	Plekstrin Homology domain, dominio homologo a Plekstrina
<b>RNAi o ARNi</b>	RNA interference, ARN de interferencia
<b>RT</b>	Room temperature, Temperatura ambiente
<b>RT-PCR</b>	Retrotranscripción PCR
<b>S6K</b>	<i>Ribosomal protein S6 Kinase</i> , Quinasa de la proteína ribosomal S6
<b>STV</b>	<i>Starvation</i> , hambreado
<b>Sun</b>	<i>Stunted</i>
<b>TAD</b>	<i>Transactivation domain</i> , dominio de transactivación
<b>TAG</b>	Triacilglicéridos
<b>TOR</b>	<i>Target of Rapamycin</i>
<b>UAS</b>	<i>Upstream Activation Sequence</i>
<b>Upd2</b>	<i>Unpaired-2</i>
<b>WF</b>	<i>Well Fed</i> , condiciones control en comida estándar
<b>β-Gal</b>	β-Galactosidasa

**RESUMEN**

**RESUMEN**

El factor de transcripción p53 es capaz de regular múltiples vías metabólicas a nivel celular. A pesar de ello, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de p53 *in vivo* en respuesta a perturbaciones metabólicas, así como su posible rol en la comunicación entre distintos órganos, no se conocen en profundidad. Mediante la utilización de *Drosophila* como organismo modelo se demostró que la activación de p53 dependiente de AMPK es necesaria para el mantenimiento de la homeóstasis metabólica y la supervivencia frente a distintos tipos de estrés nutricional. Tanto la privación de nutrientes como el crecimiento bajo una dieta rica en sacarosa inducen la activación de p53 en el tejido adiposo. A través de la represión del homólogo de Leptina Upd2, esta activación controla la secreción de dILP2 en las células productoras de insulina (IPCs). Larvas que expresan una versión dominante negativa de p53 y que han sido privadas de nutrientes muestran mayores concentraciones de Upd2 y, consecuentemente, una mayor activación de la vía JAK/STAT en el cerebro. Consistente con esto, la desregulación de Upd2 en estos animales resulta en mayores niveles de dILP2 en circulación, activación de la señalización de insulina e inhibición de la inducción de autofagia a nivel sistémico. Los mayores niveles en la señalización de insulina presentes en estos animales finalmente derivan en la reducción de las tasas de supervivencia bajo estrés nutricional. Nuestros resultados muestran un rol novedoso y esencial del eje AMPK-p53 en el tejido adiposo de *Drosophila* integrando las condiciones nutricionales con sus correspondientes respuestas fisiológicas.

**ABSTRACT**

Tumor suppressor p53 has been shown to regulate multiple metabolic pathways at a cellular level. However, the molecular mechanisms underlying its *in vivo* regulation in response to metabolic perturbations as well as its possible role in inter-organ communication remain largely uncharacterized. By using *Drosophila* as a model organism we show that AMPK-dependent p53 activation is critical for sensing nutrient stress, maintaining metabolic homeostasis and extending organismal survival. Under both nutrient deprivation and high-sugar diet, p53 activation in the adipose tissue remotely controls dILP2 secretion in insulin producing cells (IPCs) through repression of *Drosophila* Leptin homolog, Unpaired-2. Elevated Upd2 levels and activation of JAK/STAT signaling in the brain of starved fat body p53-depleted animals result in sustained Dilp2 circulating levels, activation of insulin signaling and impaired autophagy induction therefore reducing survival rates upon nutrient deprivation. Our results demonstrate a novel and essential role for AMPK-p53 axis in *Drosophila* adipose tissue integrating nutrient status with metabolic and physiological responses.

## **INTRODUCCION**

## 1. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

A lo largo de la historia, el uso de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo ha impulsado grandes avances en el campo de las ciencias biológicas. Los altos niveles de conservación entre este organismo y el ser humano permiten que *Drosophila* sea utilizada en múltiples campos de estudio, incluidos el de metabolismo y el de la fisiología (Padmanabha & Baker, 2014). El estudio realizado en esta tesis involucra distintos fenómenos fisiológicos relacionados a enfermedades y conservados en el ser humano que, junto a la versatilidad genética y otras ventajas que ofrece *Drosophila*, fundamentan la elección de la mosca de la fruta para el desarrollo del presente trabajo. A continuación, se elaboran de manera más detallada los distintos aspectos de este organismo que fundamentan su elección.

### 1.1 Aspectos genéticos

Algunas de las principales ventajas que ofrece *Drosophila* son la amplia disponibilidad de herramientas genéticas y su alto nivel de conservación con respecto a mamíferos. Esto es particularmente ventajoso en el caso de este trabajo dado que se estudian fenómenos relacionados a genes conservados. Además, el hecho de que estos genes hayan sido abarcados en el pasado por la comunidad científica de *Drosophila*, implica una amplia disponibilidad de herramientas genéticas.

#### 1.1.1 Conservación

El pequeño genoma de *Drosophila* cuenta con 4 pares de cromosomas: tres autosomas y los cromosomas sexuales. Desde su secuenciación completa, llevada a cabo hace más de 20 años (Adams et al., 2000), se mostró que el genoma de *Drosophila* contiene genes homólogos para casi el 65% de los genes relacionados a enfermedades humanas (Chien et al., 2002)(Ugur et al., 2016) y el 48% de las secuencias proteicas presentes en el mismo tienen homólogos en mamíferos (Yamamoto et al., 2014). En efecto, una cantidad significativa de genes relacionados a enfermedades humanas asociadas a tejidos específicos, se expresan en tejidos análogos de *Drosophila* (Chintapalli et al., 2007).

#### 1.1.2 Herramientas genéticas

*Drosophila* ha sido un organismo clave para el desarrollo del campo de la genética, originalmente a partir de su utilización en el rastreo de genes o *forward genetics*. Desde los descubrimientos de Thomas Hunt Morgan sobre la herencia genética al comienzo del siglo XX (Morgan, 1910), este organismo se ha utilizado incansablemente para el mapeo genético y el esclarecimiento de funciones

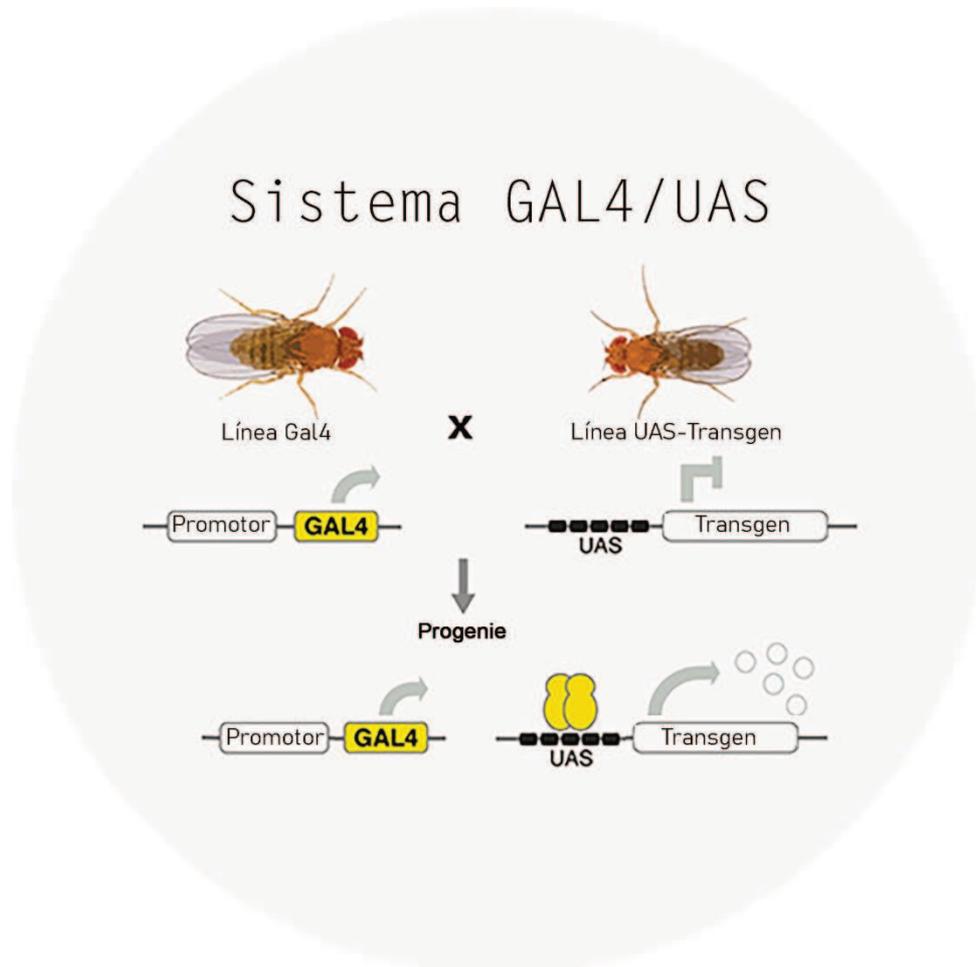
moleculares de genes mediante la generación de mutaciones aleatorias. Más adelante, a partir del desarrollo de tecnologías de secuenciación de ADN y del desarrollo de la genética reversa, muchas otras herramientas genéticas han sido generadas e innumerables líneas o “stocks” son mantenidos hoy en día en múltiples centros como Bloomington Drosophila Stock Center, Vienna Drosophila RNAi Center y el Instituto Nacional de Genética de Japón. Además de líneas mutantes, este gran número de stocks de Drosophila disponibles a nivel mundial incluye líneas con construcciones cuya combinación permite la expresión de transgenes en tejidos específicos de forma controlada. Este tipo de manipulación genética ocurre a través del uso de distintos sistemas de expresión como GAL4/UAS (ver sección *i* de este apartado), LexA/LexAOp, QF/QS, entre otros. A su vez, se dispone de múltiples transgenes con diversos fines: reporteros, de silenciamiento (ej. expresando ARNs de interferencia o ARNi), de sobreexpresión, etc.

Entre las herramientas genéticas que se utilizarán en este trabajo se encuentran:

### *i. Sistema GAL4/UAS*

Varios sistemas de expresión heterólogos han sido incorporados en Drosophila. En este trabajo se utilizará el sistema de expresión GAL4/UAS (Figura 1) (Brand & Perrimon, 1993), proveniente originalmente de levaduras y el cual se encuentra constituido, en su versión básica, por dos componentes. En primer lugar, este sistema consta de un promotor tejido-específico fusionado a la proteína GAL4, un factor de transcripción capaz de unir secuencias *UAS* (*Upstream activation sequence*). En segundo lugar, una secuencia *UAS* fusionada corriente arriba de la construcción a expresar. Mediante la combinación de estos dos elementos, la construcción objetivo se expresará sólo en aquellos tejidos donde el factor de transcripción GAL4 este activo, los cuales, como mencionado anteriormente, son determinados utilizando distintos promotores tejido-específicos. La ventaja de tener estos dos elementos desacoplados en líneas de Drosophila independientes es que la misma línea de Drosophila puede ser utilizada para dirigir la expresión de un transgen en distintos tejidos mediante el mero cruce entre líneas de Drosophila ya existentes. Un tercer elemento clave en la utilización de este sistema es la proteína inhibidora GAL80. El efecto inhibitor de la expresión de GAL80 se basa en su capacidad de unir la proteína GAL4 e inhibir su unión al sitio *UAS*, y evitando así la expresión del transgen. Existen varias modalidades para su incorporación, entre ellas la expresión de una versión termosensible (GAL80<sup>ts</sup>) que permite un control temporal de la actividad de la proteína

GAL4 o su expresión bajo la dirección de promotores específicos (ej. Elav-GAL80) con el fin de ejercer un control de la actividad GAL4 a nivel espacial.

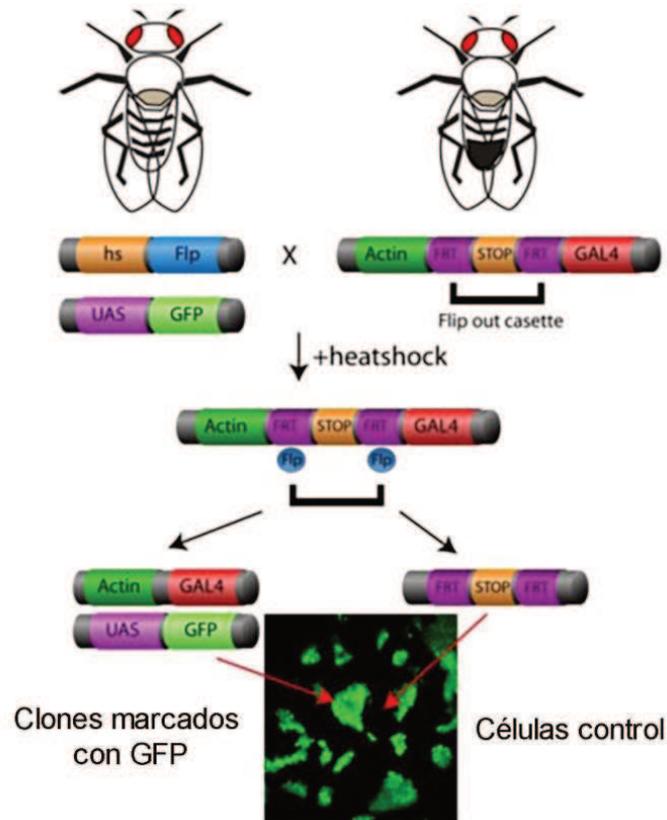


**Figura 1.** Sistema GAL4/UAS en *Drosophila* (Imagen modificada de <https://andreabrandlab.org/>). En animales de la línea GAL4, el factor de transcripción GAL4 que dirige la expresión se encuentra bajo el control de un promotor tejido específico. Al cruzar esta línea con otra conteniendo la secuencia UAS corriente arriba del gen de interés (transgen), el factor de transcripción GAL4 une la secuencia UAS y dirige de forma tejida específica la expresión del gen de interés.

## ii. Sistema FLP/FRT

Otras herramientas verdaderamente útiles de *Drosophila* son las que conllevan la posibilidad de generar mosaicos genéticos de manera muy simple y con alta frecuencia. Por “mosaico genético” se entiende la generación de tejidos portando células de distinto genotipo, originalmente una solución para el estudio de genes con índices elevados de letalidad (Germani et al., 2018). Uno de los principales sistemas disponibles en *Drosophila* para la generación de mosaicos genéticos es el sistema FLP (*flipase recombinase*)/FRT (*FLP recombination target*) (Golic & Lindquist, 1989). Este sistema consta de la expresión de una “flipasa” (Flp), una recombinasa con

actividad de topoisomerasa IB, que provoca la recombinación mitótica entre sitios FRT ubicados en *trans* en cromosomas homólogos.



**Figura 2.** Sistema *hsflp*, *Actin*<*Gal4* (figura modificada de Amanda Lee et al., 2012). Un choque de calor (*Heat shock*) induce la expresión de la flipasa (FLP) y la recombinación mediada por ésta remueve la señal de *Stop* (señal terminadora de la transcripción) de la construcción. El promotor de actina dirigirá la expresión de la proteína GAL4 quien, a su vez, regula la de los elementos UAS (ej. UAS-transgen, UAS-GFP) (Amanda Lee et al., 2012).

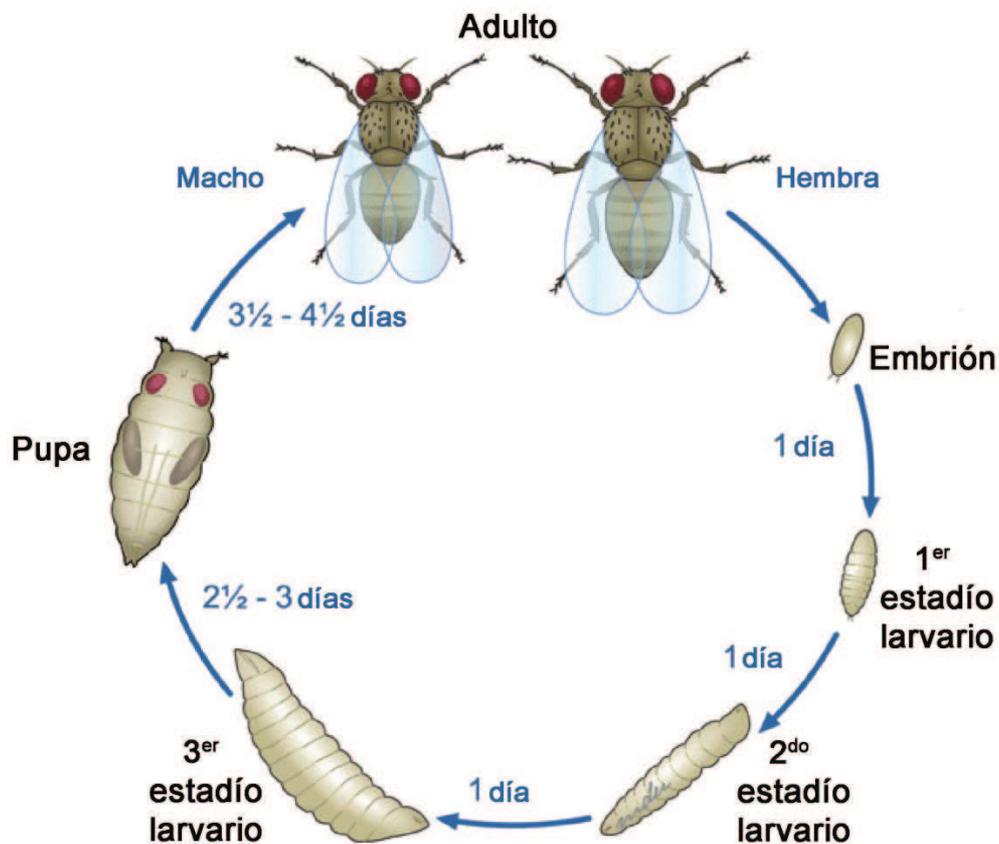
Una versión modificada de este sistema es la denominada *Flp-out* donde varios sitios FRT se encuentran, esta vez en *cis*, a ambos lados de una señal transcripcional de *Stop* (conformando una secuencia denominada *flip-out cassette*, Figura 2). En el extremo 5' de esa secuencia se encuentra un promotor constitutivo mientras que en el extremo 3' la secuencia del transgen a expresar. Cuando la flipasa media la recombinación sitio específica entre los sitios FRT, la señal de *Stop* se escinde (de aquí el término *flip-out*) y la secuencia ubicada en el extremo 3' puede ser transcrita bajo la acción del promotor constitutivo (Germani et al., 2018; Griffin et al., 2014). En el caso particular de este trabajo se utilizará el sistema *hsFlp*, *Actin*<*GAL4* (Figura 2). Este sistema involucra una flipasa inducible por calor y el promotor constitutivo de actina, el cual dirige la expresión de la proteína GAL4. A su vez, estos mismos individuos portan una secuencia UAS-GFP (o UAS-RFP) que resulta en la marcación por fluorescencia de aquellas células donde ocurrió el evento *flip-out* y se expresa la

proteína GAL4 (denominados clones). De esta manera, al cruzar individuos *hsFlp*, *Actin<GAL4* con individuos portando la secuencia UAS dirigiendo un transgen de interés, éste solo se expresará en aquellas células o clones de células que co-expresan el marcador de fluorescencia correspondiente (Figura 2).

## 1.2 Aspectos fisiológicos

### 1.2.1 Ciclo de vida

Además del gran potencial para el desarrollo de estudios genéticos, las altas tasas de fecundidad y su corto ciclo de vida representan otro aspecto importante que convierte la mosca de la fruta en un organismo modelo tan beneficioso.



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (imagen modificada de Ong et al., 2015). Esquemas de moscas adultas, macho y hembra, y su ciclo de vida a 25°C. Luego del transcurso de un día, el embrión pasa al primer estadio de larva, seguido del segundo y tercer estadio larvario, ambos con duración de un día. Seguido del estadio larvario, durante 3 días se atraviesa el estadio de pupa donde ocurre el proceso de metamorfosis. Finalmente, luego de 4 días, se produce la eclosión del adulto (Ong et al., 2015).

En términos generales, el ciclo de vida de *Drosophila* dura aproximadamente 10 días bajo condiciones controladas de alimentación, temperatura y humedad (25°C, 60% de humedad). Éste, a su vez, se encuentra dividido en estadios bien definidos

(Figura 3). En el estadio de embrión se establecen los ejes de simetría, seguido de la celularización y segmentación y se producen otros complejos eventos morfogénicos que derivan últimamente en el traspaso al estadio de larva. La larva, además de los tejidos y órganos involucrados en su propio crecimiento y desarrollo, posee tejidos, denominados imagales o imaginales, que son los que darán origen a los órganos del adulto (o *imago*). Antes de llegar a esta etapa, *Drosophila* atraviesa tres estadios larvarios (L1, L2 y L3) separados por ecdisis o mudas de cutícula permitiendo así el crecimiento continuo del animal antes de la metamorfosis. Al final del tercer estadio larvario (L3) las larvas entran en pupariación, una transición que marca el comienzo de la metamorfosis e inicia una fase de intensa remodelación y cambios en la estructura corporal. Dentro de la pupa se conforma un exoesqueleto rígido que limita el desarrollo de cualquier estructura futura en las dimensiones del mismo. Como consecuencia, el crecimiento corporal es restringido al periodo de alimentación durante los estadios larvarios, y la transición de larva a pupa determina el tamaño del futuro adulto. Una vez finalizada la metamorfosis, el estadio de pupa finaliza y se produce la eclosión del adulto. Luego de aproximadamente 8 horas desde su eclosión, los adultos son sexualmente receptivos para dar un nuevo comienzo al ciclo.

### 1.2.2 Anatomía funcional

A pesar de encontrarse separados evolutivamente por más de 500 millones de años, existen similitudes sorprendentes entre la anatomía funcional de *Drosophila* y la de organismos vertebrados. Al igual que estos últimos, la anatomía de *Drosophila* se organiza en sistemas de órganos (sistema digestivo, sistema nervioso, etc.; Figura 4). Los distintos órganos que componen todos estos sistemas, de forma análoga al ser humano, presentan funciones con distinciones claras y muchas veces se encuentran reguladas por los mismos genes que en vertebrados, un fenómeno que en el campo del desarrollo se conoce como *Homología Profunda* (Tschopp & Tabin, 2017). Esto conforma una gran ventaja del uso de *Drosophila* como organismo modelo y es de especial interés en el campo de la fisiología, donde esta homología, tanto genética como funcional, permite el desarrollo de estudios con gran potencial de traslación al ser humano.

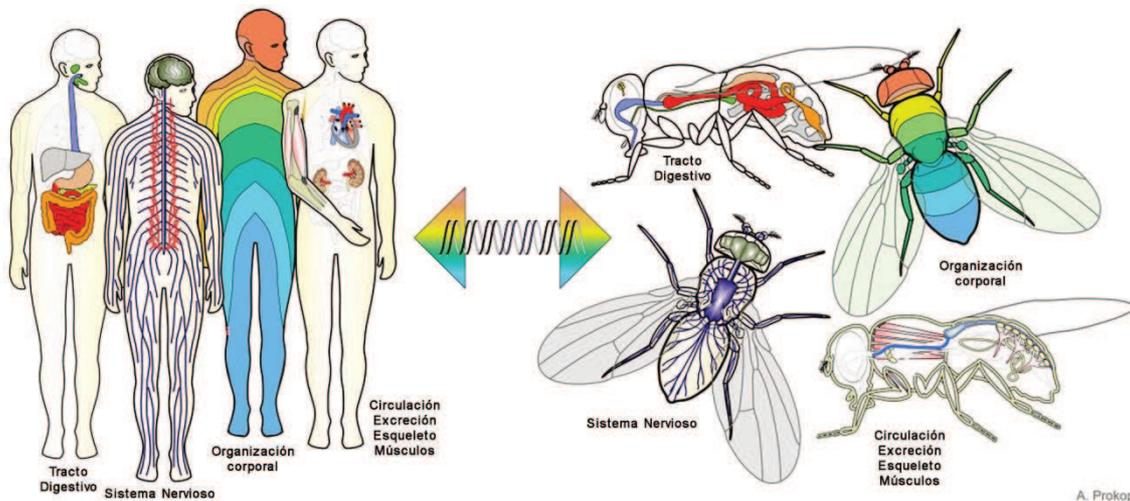
Este trabajo se focalizará en varios órganos y tejidos de *Drosophila* involucrados en el mantenimiento de la homeostasis metabólica. Para ello es importante entender las características de estos órganos y como sus distintas funciones se relacionan entre sí.

*i. Cuerpo graso o Fat body*

El órgano de *Drosophila* principalmente implicado en el mantenimiento de la homeostasis metabólica es el cuerpo graso o Fat Body (FB). Este órgano es análogo al tejido adiposo e hígado de vertebrados (Padmanabha & Baker, 2014) y adopta diferentes morfologías según el estadio en que se encuentre el individuo. En el estadio larvario, el FB se extiende como una monocapa de células, denominadas adipocitos, formando, a cada lado de la larva, una hoja longitudinal expuesta a la *hemolinfa* (sistema circulatorio interno en invertebrados y análogo a la sangre de vertebrados), rodeando el intestino y órganos reproductivos (Figura 5). Al final del desarrollo larvario, el FB sufre un proceso de remodelación acompañado de autofagia masiva que da inicio a la transición al estadio de pupa. El FB larvario entonces decrece gradualmente durante la metamorfosis y los primeros 3 días luego de la eclosión del adulto, donde sus células son reemplazadas por células del FB adulto (Parra-Peralbo et al., 2021). Bajo condiciones óptimas de alimentación, el FB puede crecer ya sea aumentando el número de células (a partir de células madre o *Adipocyte Stem Cells*, ASC; las cuales se encuentran sólo presentes en el adulto) o aumentando el tamaño celular. A diferencia del tejido adiposo del adulto y del ser humano, los adipocitos que componen el FB larvario poseen la característica de ser endoreplicativos. Esta característica les confiere la capacidad de aumentar en gran medida el tamaño de la célula a partir de sucesivas rondas de duplicación génica en ausencia de división celular (S. Li et al., 2019), permitiendo así un alto crecimiento del tejido en ausencia de células madres.

De forma similar al tejido adiposo blanco en humanos, el crecimiento del FB se encuentra relacionado a su rol en el almacenamiento y la utilización de reservas energéticas. La presencia de nutrientes en exceso en condiciones óptimas de alimentación deriva en un aumento en el contenido de lípidos, depósitos de glucógeno y gránulos proteicos presentes en el FB. En el caso particular de los lípidos, éstos se acumulan dentro de estructuras intracelulares denominadas *Lipid Droplets* (LDs), organelas claves en el control tanto del almacenamiento de lípidos como su movilización (Beller et al., 2010; Olofsson et al., 2009). Estructuralmente, las LDs consisten en un núcleo de lípidos neutros (triacilglicéridos y ésteres de colesterol) rodeados de una monocapa de fosfolípidos y colesterol en donde varias proteínas de encuentran embebidas (Thiam & Beller, 2017). Frente a la falta de nutrientes, los lípidos presentes en las LDs (principalmente triacilglicéridos o TAGs) junto a reservas en forma de glucógeno, son movilizados hacia la circulación en forma de ácidos grasos libres y trehalosa, respectivamente (Arrese & Soulages, 2010).

De forma adicional a su rol en el manejo de reservas energéticas, el FB funciona como un sensor directo de nutrientes capaz de coordinar el metabolismo y el gasto energético de acuerdo a las condiciones nutricionales del organismo (Colombani et al., 2003). En respuesta al *sensado* directo de nutrientes (Colombani et al., 2003; Géminard et al., 2009) y/o señales provenientes de otros tejidos, el FB es capaz de regular el metabolismo energético a nivel local y sistémico, esto último mediante la producción y secreción de adipoquinas. Las adipoquinas son un grupo de citoquinas de señalización producidas por el tejido adiposo que, a partir de su secreción a la hemolinfa, regulan tanto de forma autócrina, parácrina o endócrina, múltiples procesos biológicos como el crecimiento, la alimentación, la respuesta inmune, la fertilidad, etc. (Droujinine & Perrimon, 2016; S. Li et al., 2019; Meschi & Delanoue, 2021).



**Figura 4.** Similitud entre los órganos presentes en el ser humano y en *Drosophila* (imagen modificada de <https://droso4public.wordpress.com/>).

## ii. Oenocitos

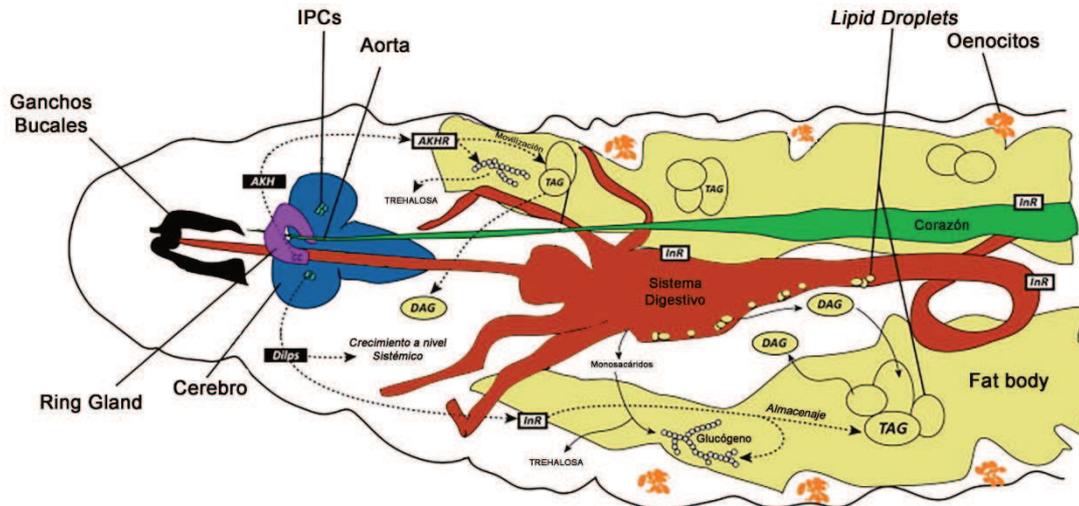
Los oenocitos son células secretoras organizadas en grupos o *clusters* que se encuentran distribuidos a cada lado del cuerpo del adulto y larva de *Drosophila* (Figura 5). De forma necesaria para el FB, los oenocitos participan de la regulación del almacenamiento y movilización de lípidos (Chatterjee et al., 2014; Makki et al., 2014; Toprak et al., 2020). En condiciones de alimentación óptimas, alteraciones en los oenocitos pueden derivar en el desarrollo de obesidad (Ghosh et al., 2020) mientras que frente a la falta de nutrientes, estos órganos se han mostrado estrictamente necesarios para la movilización de lípidos desde el FB (Gutierrez et al., 2006).

Muchos estudios han equiparado las funciones de los oenocitos a aquellas ejercidas por el hígado del ser humano (Ghosh et al., 2020; Gutierrez et al., 2006;

Makki et al., 2014). Muchas evidencias apoyan esta teoría, entre ellas la expresión en los oenocitos de 22 ortólogos de genes relacionados al metabolismo de lípidos expresados específicamente en hepatocitos, la acumulación de LDs en los oenocitos frente a la falta de nutrientes similar a lo que ocurre en los hepatocitos, y la regulación del contenido de lípidos en oenocitos por la lipasa Brummer y Lsd2 en el FB de forma análoga a la regulación por las proteínas ATGL y perilipina de la afluencia de grasas en el hígado. Sin embargo, los hepatocitos guardan grandes cantidades de glucógeno, un rol principalmente ejercido por el FB en *Drosophila*. De esta manera, las funciones del hígado de mamíferos en el almacenamiento de glucógeno y procesamiento de lípidos se encuentran aparentemente distribuidas entre los oenocitos y el FB (Gutierrez et al., 2006).

*iii. "Páncreas" de Drosophila: IPCs y células de la Córpora Cardíaca*

En vertebrados, hormonas como la insulina y el glucagón coordinan el crecimiento y el metabolismo en función de la disponibilidad de nutrientes. De forma similar, la homeostasis energética en *Drosophila* se mantiene por la acción combinada de dos hormonas: la primera análoga a la insulina (dILPs, *Drosophila insulin-like peptides*) y otra al glucagón (Akh, *Adipokinetic hormone*). En situaciones de buena alimentación, los dILPs promueven el almacenamiento de energía mientras que Akh y niveles reducidos de dILPs contribuyen a la movilización de las reservas energéticas en situaciones de escasez nutricional. Los dILPs, principalmente dILP2, dILP3 y dILP5, son producidos por dos grupos de 7 células neuroendocrinas análogas a las células  $\beta$  pancreáticas (IPCs, *Insulin-producing cells*) ubicadas en el cerebro de *Drosophila* (Figura 5). Una vez en circulación, se unen al receptor de insulina (InR, *Insulin receptor*) en los diferentes tejidos del organismo, lo que activa la vía conservada de señalización intracelular PI3K/TOR estimulando así el crecimiento y el metabolismo anabólico (Andersen et al., 2013). Akh, por su lado, es producido y secretado por células de la *Corpora Cardíaca* (CC), de forma análoga a las células pancreáticas  $\alpha$  (S. Wang et al., 2007).



**Figura 5.** Esquema de órganos involucrados en el metabolismo de *Drosophila* (figura modificada de Padmanabha et al., 2014). El metabolismo de *Drosophila* involucra una red de órganos y tejidos que realizan gran parte de las funciones básicas presentes en mamíferos. Perspectiva dorsolateral de una larva 3L. El receptor de insulina (InR) detecta los péptidos análogos a la insulina (dILPs) producidos en las células neurosecretoras denominadas IPCs favoreciendo el aumento de reservas energéticas (triacilglicéridos o TAG y glucógeno) en el FB y los tejidos periféricos. Por su lado, la *Corpora Cardiac* (CC), que junto al *Corpus Allatum* y la glándula protorácica conforman la *Ring Gland*, secreta la hormona Akh. Akh es una hormona análoga al glucagón de mamíferos y la unión a su receptor, AkhR, favorece la movilización hacia la hemolinfa de reservas energéticas: TAG almacenados en el FB y oenocitos en estructuras denominadas *Lipid Droplets* pasan a la hemolinfa en forma de diacilglicéridos (DAG) y glucógeno en forma de monosacáridos y trehalosa (Padmanabha & Baker, 2014).

### 1.3 Aspectos metabólicos

#### 1.3.1 Insulina/IGFs en *Drosophila*

En *Drosophila* existen 8 péptidos, dILP 1-8, similares a la insulina y factores de crecimiento IGF (*Insulin-like Growth Factor*) que son capaces de unir el receptor de insulina (InR). Individuos mutantes para los genes que los codifican resultan en defectos en el desarrollo y anomalías metabólicas (H. Zhang et al., 2009). Si bien poseen una estructura génica y proteica similar, los distintos dILPs se expresan en distintas etapas del desarrollo y en diferentes tejidos ejerciendo así funciones específicas (Brogiolo et al., 2001; Ikeya et al., 2002; Rulifson et al., 2002). En el caso de dILP2, dILP4 y dILP7, éstos se expresan en estadios embrionarios mientras que los niveles de dILP3, dILP5, dILP6 y dILP8 no se detectan hasta estadios larvarios (Brogiolo et al., 2001; Kannan & Fridell, 2013). dILP1 se expresa en la pupa y los primeros días de moscas adultas, ejerciendo funciones en estadios de no alimentación y diapausa (Yiting Liu et al., 2016). En el caso de dILP8, este péptido se expresa en la larva y pupa principalmente en respuesta a daños en tejidos imaginales (Colombani et al., 2012; Garelli et al., 2012), mientras que en adulto se ha reportado que regula el

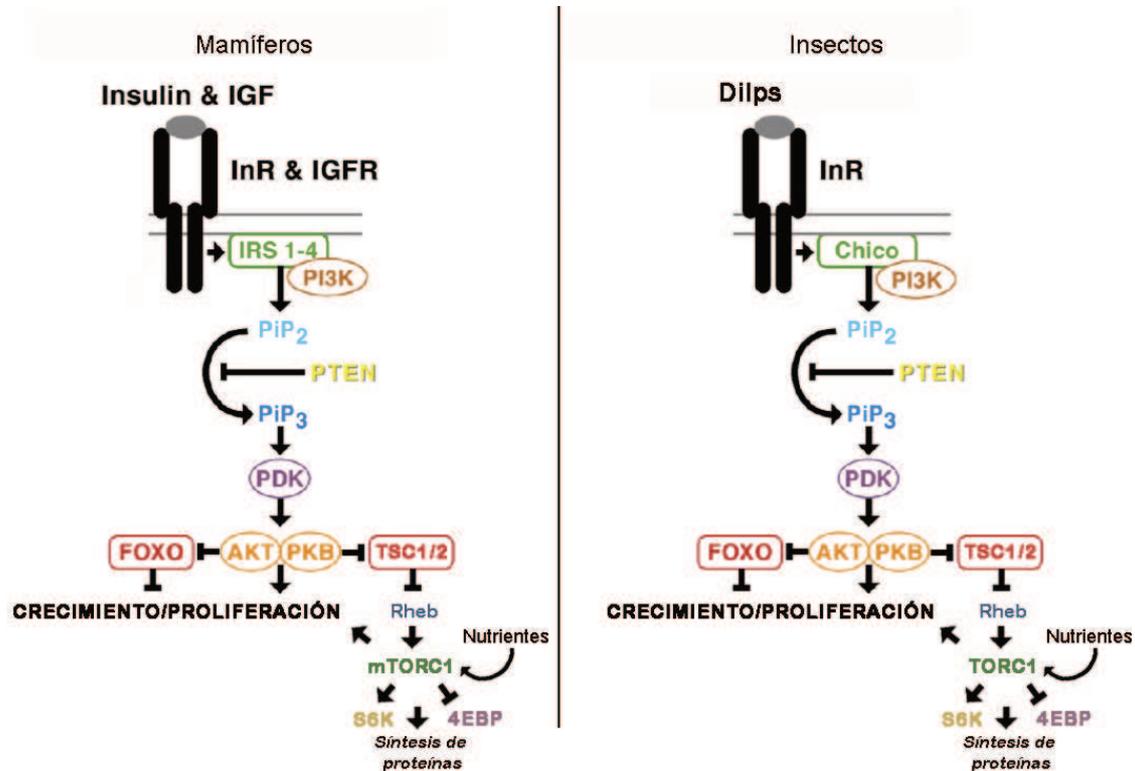
comportamiento reproductivo (S & DR, 2020). Por el contrario, no se conoce expresión de dILP4 en moscas adultas (Grönke et al., 2010).

DILP2 se produce en las IPCs, tanto en larva como en adulto, junto con dILP3 y dILP5 (Brogiolo et al., 2001). Dado que mutantes para estos genes, así como la ablación de las IPCs, simulan los efectos observados en humanos con diabetes tipo I (Frederich et al., 1995), estos péptidos han sido propuestos como homólogos de la insulina. Particular es el caso de dILP2, el único de éstos capaz de modular los niveles de azúcar en sangre y de tiempo de vida (*lifespan*). Se ha demostrado que dILP2 genera una respuesta transitoria, como la necesaria para responder a cambios nutricionales abruptos, mientras que dILP5 activa la señalización de insulina de forma más sostenida (Post et al., 2018; Semaniuk et al., 2021). DILP3 también es secretado desde las IPCs y ha sido descrito como un activador de TOR en el FB en respuesta a azúcares en la dieta (Jung Kim & Neufeld, 2015). Adicionalmente, dILP7 no se produce en las IPCs pero sí es capaz de regular la actividad de estas neuronas desde las *Dilp7-producing Neurons* (D7Ns) manteniendo los niveles basales de insulina en moscas alimentadas con dietas ricas en calorías y bajas en proteínas (Prince et al., 2021). Por último, dILP6 se expresa a altos niveles en el FB y es capaz de inhibir la secreción de dILP2 desde las IPCs en respuesta a la activación del factor de transcripción FOXO en este órgano (Bai et al., 2012).

### 1.3.2 Vía de la Insulina/TOR

La vía de la Insulina y la vía TOR se encuentran altamente conservadas en *Drosophila* (Figura 6). La activación del receptor de insulina (InR, *Insulin Receptor*) por unión a los dILPs resulta en su acople a la proteína adaptadora *Chico* (Clancy et al., 2001), el homólogo en *Drosophila* de las proteínas IRS1-4 (*Insulin Receptor Substrate 1, 2, 3 y 4*) (Sarbassov et al., 2005). Este fenómeno recluta la quinasa PI3K (fosfatidilinositol-3 quinasa) a membrana plasmática, sitio donde cataliza la conversión de PIP2 a PIP3 (fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato a fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato). Ésta es una reacción que puede ser revertida por la fosfatasa y regulador negativo PTEN. La generación de PIP3 por PI3K recluta, a su vez, la quinasa Akt a través de su dominio homólogo a Plekstrina (PH) el cual une PIP3 con gran afinidad. Akt, una vez en membrana, es fosforilada por PDK1 y actúa sobre múltiples proteínas objetivo, entre ellas el factor de transcripción FOXO (*Forkhead Box class O*). FOXO es un regulador negativo del crecimiento celular y su fosforilación por Akt en condiciones nutricionales óptimas inhibe su translocación a núcleo. Ante la privación de nutrientes, la baja en las concentraciones de dILPs y en la actividad de Akt permite la

desfosforilación de FOXO y su ingreso al núcleo para actuar sobre múltiples genes blanco, entre ellos el gen *4EBP* (*translational repressor 4E-binding protein*) o *Thor* en *Drosophila* (Puig et al., 2003).



**Figura 6.** Conservación de la vía de señalización de TOR/Insulina en mamíferos e insectos (Figura modificada de Emlen et al., 2012). En mamíferos, la insulina y los factores de crecimiento (IGF) tienen receptores específicos (InR e iGFR para insulina y factores de crecimiento, respectivamente), mientras que en *Drosophila* los péptidos dILPs cumplen ambas funciones actuando a través de un mismo receptor (InR). La unión de estas moléculas a sus receptores activan el sustrato de receptor de insulina (IRS1-4 en mamíferos, Chico en *Drosophila*) lo que deriva en la activación de la quinasa PI3K y producción de PIP3. La producción de PIP3 puede ser revertida mediante la fosfatasa PTEN o en caso contrario activar la quinasa PDK y reclutar Akt, resultando en la fosforilación de esta última. Akt inhibe el factor de transcripción inhibitor del crecimiento, FOXO, y el complejo TSC1/2, resultando en la activación de TOR por presencia de nutrientes y consecuente aumento en la síntesis de proteínas mediante los efectores S6K y 4EBP (Emlen et al., 2012).

Uno de los puntos de encuentro de la vía de la insulina con la vía TOR es la quinasa Akt. Adicionalmente a su rol en la inhibición del factor de transcripción FOXO, Akt fosforila e inhibe TSC1/2 (*Tuberous sclerosis complex 1 and 2*), un regulador negativo de la vía TOR. TSC1/2 regula negativamente esta vía a través de la inhibición de Rheb, una proteína de unión a GTP necesaria para la activación de TOR (Dibble & Cantley, 2015; Gao & Pan, 2001). Asimismo, la vía TOR es una vía de *sensado* directo de nutrientes, principalmente aminoácidos. De esta manera, esta vía desempeña un rol clave en el *sensado* de las condiciones nutricionales a nivel celular integrando señales provenientes de dos mecanismos independientes; por un lado *sensando* los

niveles de aminoácidos disponibles de manera directa (mecanismo autónomo celular), y por otro lado integrando señales sistémicas a través de la vía de insulina (mecanismo no autónomo celular) (Dibble & Cantley, 2015). Una vez activa, la vía TOR involucra múltiples mecanismos que favorecen el crecimiento celular, siendo uno de los más importantes el aumento en la síntesis de proteínas. Por un lado, la inhibición por fosforilación directa de 4EBP mejora la eficiencia de unión de ARN mensajeros a los ribosomas (Miron et al., 2003). Por otro lado, TOR es capaz de fosforilar la quinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K), aumentando así la actividad de ribosomas (Miron et al., 2003). Todos estos procesos regulados por TOR derivan en el aumento de la tasa de síntesis de proteínas y en el favorecimiento del crecimiento y proliferación celular.

### *1.3.3 Rol del Fat body en la regulación de las IPCs*

Como mencionado anteriormente, las IPCs son un pequeño grupo de neuronas ubicadas en el cerebro de la mosca capaces de producir y liberar dILPs a la hemolinfa. La secreción de dILP2 desde las IPCs promueve el crecimiento del organismo durante el desarrollo y regula la homeostasis de glucosa en adultos (Rulifson et al., 2002). En trabajos previos se demostró que la secreción de dILP2 por parte de las IPCs es el principal mecanismo de control de los niveles circulantes de esta hormona (Géminard et al., 2009). Este proceso se encuentra finamente controlado, depende del estado nutricional del organismo e involucra un sofisticado sistema de comunicación inter-órgano.

Al igual que en humanos, el tejido adiposo de *Drosophila* es un órgano endocrino complejo. En función del *sensado* directo de nutrientes y otras señales, el FB produce y secreta adipoquinas con el fin de comunicar a otros órganos el estado nutricional y fisiológico del organismo (Meschi & Delanoue, 2021). Un gran número de estudios recientes han descifrado como el FB de *Drosophila* *sensa* distintos parámetros metabólicos y fisiológicos, y adapta su respuesta a través de la producción de distintas adipoquinas dirigidas a múltiples órganos objetivo. En el caso particular de las IPCs, el FB produce moléculas de señalización capaces de promover o inhibir la secreción de insulina en estas células (Figura 7). En respuesta a la ingesta de azúcares y lípidos, el FB produce la citoquina Upd2 (Unpaired 2) y el péptido CCHa2 (CCHamide-2) que estimulan la secreción de insulina (Rajan & Perrimon, 2012; Sano et al., 2015). De forma análoga, en respuesta a aminoácidos, las células del FB producen Sun (*Stunted*), GBP1 y GBP2, quienes promueven la liberación de dILP2 en las IPCs (Delanoue et al., 2016; Koyama & Mirth, 2016). Por el contrario, dietas de

bajo contenido proteico inducen la secreción desde el FB de Eiger, el homólogo de TNF $\alpha$  en *Drosophila*, quien actúa en las IPCs reprimiendo la expresión de dILP2 (Agrawal et al., 2016). Cada una de estas señales actúa ya sea sobre receptores específicos ubicados en las mismas IPCs o en circuitos neuronales relacionados. En conjunto, esta serie de datos revela como una compleja red de señales involucradas en la comunicación entre el FB y las IPCs, regula los niveles de insulina en circulación de acuerdo a las condiciones nutricionales.

*i. Unpaired2*

Unpaired 2 (*Upd2*) fue identificado como la primer adipoquina de respuesta a nutrientes y su transcripción en el FB responde a grasas y azúcares en la dieta (Rajan & Perrimon, 2012). Esta proteína es homóloga a la leptina en humanos, una hormona producida por el tejido adiposo en respuesta a las calorías en la dieta. En mamíferos, la producción de leptina inhibe el apetito, favorece la secreción de insulina, estimula la termogénesis, favorece la oxidación de ácidos grasos, disminuye la glucosa y reduce el peso y grasa corporal (Parra-Peralbo et al., 2021). De forma similar, en *Drosophila*, la producción de Upd2 genera alteraciones en el apetito, el gasto energético y en el metabolismo a nivel sistémico (Yiying Zhang & Chua, 2017). Más específicamente, en respuesta a los azúcares y grasas de la dieta, Upd2 activa la señalización JAK-STAT (*Janus-kinase-signal transducers and activators of transcription*) (Boulay et al., 2003) a través de su unión al receptor Domeless (Dome) en un grupo de neuronas específicas denominadas GABAérgicas. Estas neuronas se encuentran en contacto con las IPCs y el bloqueo de la secreción del neurotransmisor inhibitorio GABA (Acido gama-aminobutírico o *Gamma aminobutyric acid*) por activación de la vía JAK-STAT deriva en la secreción de dILP2 en las IPCs. De esta manera, la secreción de dILP2 en respuesta a Upd2 favorece el correcto control del azúcar en hemolinfa y acumulación de grasas. En este sentido, individuos hemicigotas para Upd2 o silenciados para este gen específicamente en el FB muestran acumulación de dILP2, altos niveles de azúcar en sangre y acumulación anormal de reservas lipídicas (Rajan & Perrimon, 2012). Recientemente, al igual que en humanos, se ha demostrado que esta adipoquina también regula el apetito actuando como una señal de saciedad a través de su unión al receptor Domeless (Dome) directamente en las IPCs (Ertekin et al., 2020).

Upd2 es secretado a la hemolinfa a través de un mecanismo de secreción de proteínas atípico o no convencional denominado GRASP (*Golgi reassembly stacking protein*) (Rajan et al., 2017). Luego de periodos de hambre, Upd2 deja de transcribirse en las células del FB, mientras que su secreción es inhibida por la acción

de la hormona Akh. Akh, producido por células de la *Corpora Cardíaca*, media una suba en el calcio citosólico de los adipocitos. Los altos niveles de calcio citosólico resultan en la fosforilación de GRASP por activación de la enzima Calmodulina Quinasa II (CamKII), inhibiendo su agrupamiento atípico e impidiendo así la secreción de Upd2 (Rajan et al., 2017).

*ii. CCHamide2*

Otra adipoquina que responde a azúcares presentes en la dieta es el péptido CCHamide2 (CCHa2) (Sano et al., 2015). Luego de un período de hambreado, la expresión de CCHa2 disminuye en las células endocrinas del intestino como en el FB y aumenta luego de la re-administración de glucosa o levadura como fuente de nitrógeno. La unión de CCHa2 a su receptor CCHa2-R en las IPCs induce la expresión de *dILP5* y la secreción de dILP2 (Sano et al., 2015) regulando así los niveles de dILPs en función de la disponibilidad de nutrientes.

*iii. Dawdle*

Dawdle (Daw) es un ligando de la vía TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) (Chng et al., 2017) que se expresa en varios órganos, principalmente en FB y músculo (Bai et al., 2013; Chintapalli et al., 2007). Luego del consumo de glucosa, la expresión de Daw aumenta en el FB para reducir la expresión de enzimas digestivas en el intestino adulto (Chng et al., 2014). Esta reducción tendría como objetivo disminuir la cantidad de azúcares y lípidos disponibles para su absorción y así evitar la ingesta de nutrientes en demasía. Asimismo, se ha reportado que Daw se encuentra involucrado en la tolerancia a glucosa, el balance de pH y el metabolismo mitocondrial en larvas de *Drosophila* (Ghosh & O'Connor, 2014). Las moscas mutantes para Daw presentan acumulación de dILPs en las IPCs y baja en la señalización de insulina, sugiriendo que Daw actúa como hormona para controlar los niveles de insulina en circulación de forma indirecta durante estadios larvarios (Ghosh & O'Connor, 2014).

*iv. Growth Blocking Peptides 1 y 2*

GBP1 y GBP2 (*Growth Blocking Peptide 1 y 2*, GBPs) son dos factores insulíntrópicos expresados principalmente en el FB y relacionados al factor de crecimiento epidérmico EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Tsuzuki et al., 2012). La transcripción de ambos de estos factores depende de los niveles de aminoácidos presentes en la dieta y la señalización de la vía TOR (Koyama & Mirth, 2016). Los GBPs, a partir de su unión al receptor EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), señalizan a las IPCs a través de neurotransmisiones provenientes de neuronas

inhibitorias de las IPCs (*IPC-Connecting Neurons*, ICN). Su unión al receptor EGFR inhibe la actividad neuronal de las ICN y así favorecen la secreción de dILPs y el crecimiento sistémico (Meschi et al., 2019).

*v. Stunted*

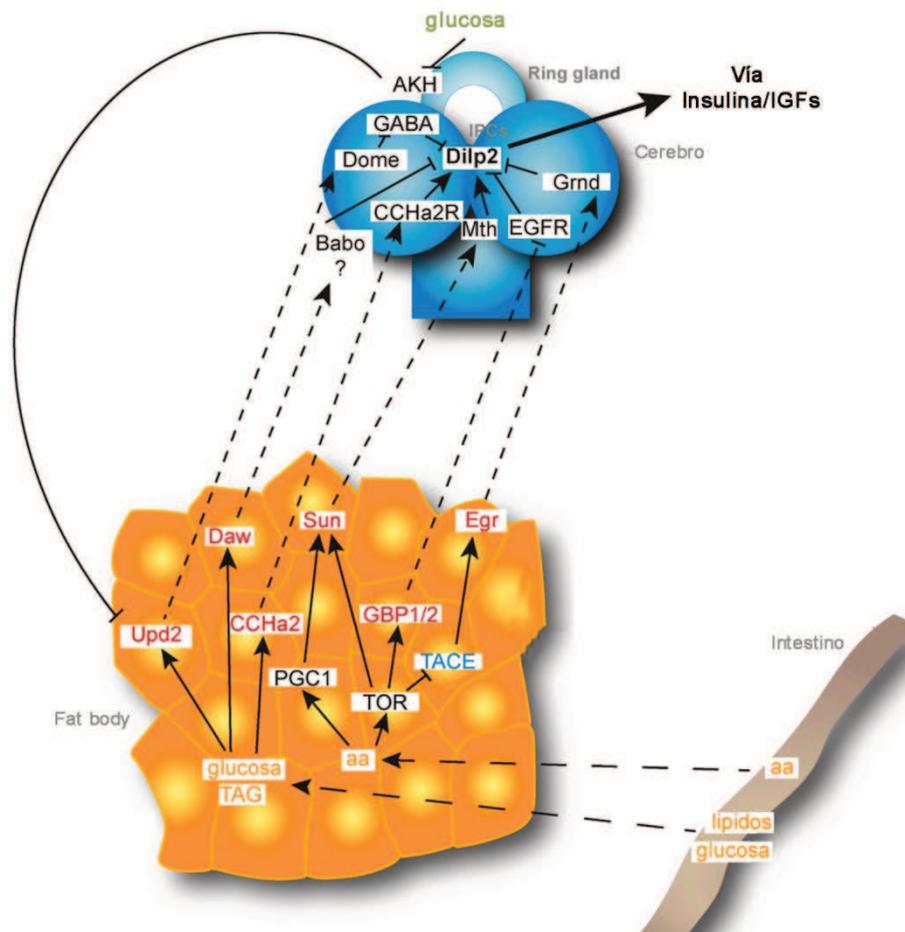
Stunted (Sun) es la subunidad  $\epsilon$  de la F1F0-ATP Sintasa mitocondrial del complejo V y es una proteína crucial para la síntesis de ATP. De forma adicional a su rol en mitocondria, Sun fue identificado como un ligando del receptor de proteína G Methusaleah (Mth) expresado en las IPCs (Cvejic et al., 2004). Tanto la expresión como la secreción a hemolinfa de Sun desde el FB está regulada por maquinarias sensibles a nutrientes involucrando el coactivador transcripcional PGC1 (*PPAR $\gamma$  coactivator 1*, spargel en *Drosophila*) y la señalización TOR (Delanoue et al., 2016). Sun actúa como una adipoquina insulínica en respuesta a aminoácidos presentes en la dieta y esta función es independientemente de su localización mitocondrial.

*vi. Neural Lazarillo*

La lipocalina secretada NLaz (*Neural Lazarillo*), un ortólogo de la adipoquina de vertebrados RBP4 (*Retinol Binding Protein 4*) implicado en los inicios de diabetes tipo 2 en ratones y humano, es producida en elevados niveles en células del FB de *Drosophila*. NLaz fue caracterizada originalmente por su rol en el mantenimiento de la homeostasis metabólica controlando la biogénesis de lípidos y los niveles de carbohidratos en circulación (Hull-Thompson et al., 2009). Luego de una dieta rica en azúcares, la expresión de NLaz es altamente inducida en el FB de larvas y contribuye a la resistencia a insulina (Hull-Thompson et al., 2009).

*vii. Adiponectina*

Otra adipoquina involucrada en la sensibilidad a insulina es la Adiponectina (Ruan & Dong, 2016). La concentración plasmática de adiponectina se correlaciona inversamente con la sensibilidad a insulina (Hotta et al., 2000). Sin embargo, el homólogo de la adiponectina en *Drosophila* todavía no se conoce y hasta ahora los estudios utilizando este organismo se han visto limitados a la identificación de su receptor (AdipoR) (Kwak et al., 2013). AdipoR se expresa en varias neuronas del cerebro de larva y adulto incluyendo las IPCs. Animales que han sido silenciados para AdipoR en las IPCs muestran glicemia y trehalosemia elevadas junto con retención de Dilp2 en las IPCs. Esto sugiere una conexión entre la adiponectina y la secreción de insulina (Kwak et al., 2013).



**Figura 7.** Comunicación interórgano entre el FB y el cerebro en estadios de larva (figura modificada de Meschi y Delanoue., 2021). Luego de su absorción en el intestino, los nutrientes pasan a hemolinfa y son distribuidos para proveer energía, aportar componentes celulares esenciales y promover el crecimiento. El FB, el órgano principal en lo que respecta al *sensado* de nutrientes, coordina el crecimiento sistémico a través de un mecanismo humoral. Azúcares y lípidos promueven la secreción de Upd2 y CCHa2 a la hemolinfa para alcanzar sus receptores Dome y CCHa2-R, respectivamente, y modificar la secreción de DILP2 en el cerebro, ya sea por la neurotransmisión inhibitoria GABA o directamente actuando en las IPCs. Los bajos niveles de azúcares en circulación inducen la secreción de AKH desde la *Ring Gland* y bloquean la secreción de Upd2 desde el FB. Adicionalmente, los azúcares en la dieta promueven la producción de Daw y su secreción desde el FB hacia la hemolinfa. Consecuentemente, Daw reprime la secreción de DILPs desde las IPCs mediante un mecanismo no conocido hasta ahora. Los aminoácidos de la dieta son *sensados* por TOR y modifican la expresión de PGC1 en los adipocitos para estimular la secreción de Sun y GBP1/2 a la circulación. Sun une su receptor Mth en las IPCs, mientras que GBP1/2 une EGFR para aliviar la neurotransmisión inhibiendo la secreción de DILPs. La falta de aminoácidos induce la expresión de la enzima TACE y consecuentemente el clivaje de Egr solubilizándolo y enviándolo a circulación. Egr une su receptor Grnd para reprimir la expresión de DILP2 en las IPCs (Meschi & Delanoue, 2021).

### viii. Eiger

Eiger (Egr), el homólogo de  $TNF\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), es otro factor derivado del FB (Agrawal et al., 2016). A diferencia de otras adipoquinas, Egr es un

regulador negativo de la producción de insulina al igual que su homólogo en mamíferos. En *Drosophila*, las dietas bajas en proteínas inducen la expresión de una metaloproteasa denominada TACE (*TNF $\alpha$  converting enzyme*) la cual cataliza el clivaje de Egr y su solubilización. La versión soluble de Egr luego actúa sobre su receptor Grindelwald (Grnd) que activa la vía JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) en las IPCs inhibiendo la transcripción de los dILPs (Agrawal et al., 2016).

## **2. p53 y *Drosophila* p53**

Desde su descubrimiento en 1976, el factor de transcripción p53 ha mostrado ser una proteína clave en la supresión de tumores. Más del 50% de todas las formas de cáncer humano reportadas muestran inactivación de p53, ya sea por mutación o depleción directa del gen, o mediante la disrupción de cualquiera de sus vías regulatorias (Perri et al., 2016). p53 es activado en respuesta a múltiples señales de estrés como daño al ADN, activación de oncogenes, hipoxia, etc. Entre sus funciones canónicas se encuentra la capacidad de arrestar el ciclo celular, la inducción de senescencia, mecanismos de reparación de ADN y apoptosis. Todas estas funciones son llevadas a cabo mediante la regulación transcripcional directa de genes blanco específicos (Kasthuber & Lowe, 2017) y son cruciales para evitar el desarrollo de cáncer, por lo que se considera el “guardián del genoma”. Evidencia clara de esto último son los individuos portadores del síndrome Li-Fraumeni, un síndrome de predisposición temprana al cáncer causado por mutaciones en ambos alelos del gen p53 (Frebourg et al., 2020). Este apartado de la introducción ahondará en el conocimiento actual de la biología de p53, las similitudes y diferencias entre p53 de mamíferos y *Drosophila*, su regulación y sus funciones biológicas más relevantes.

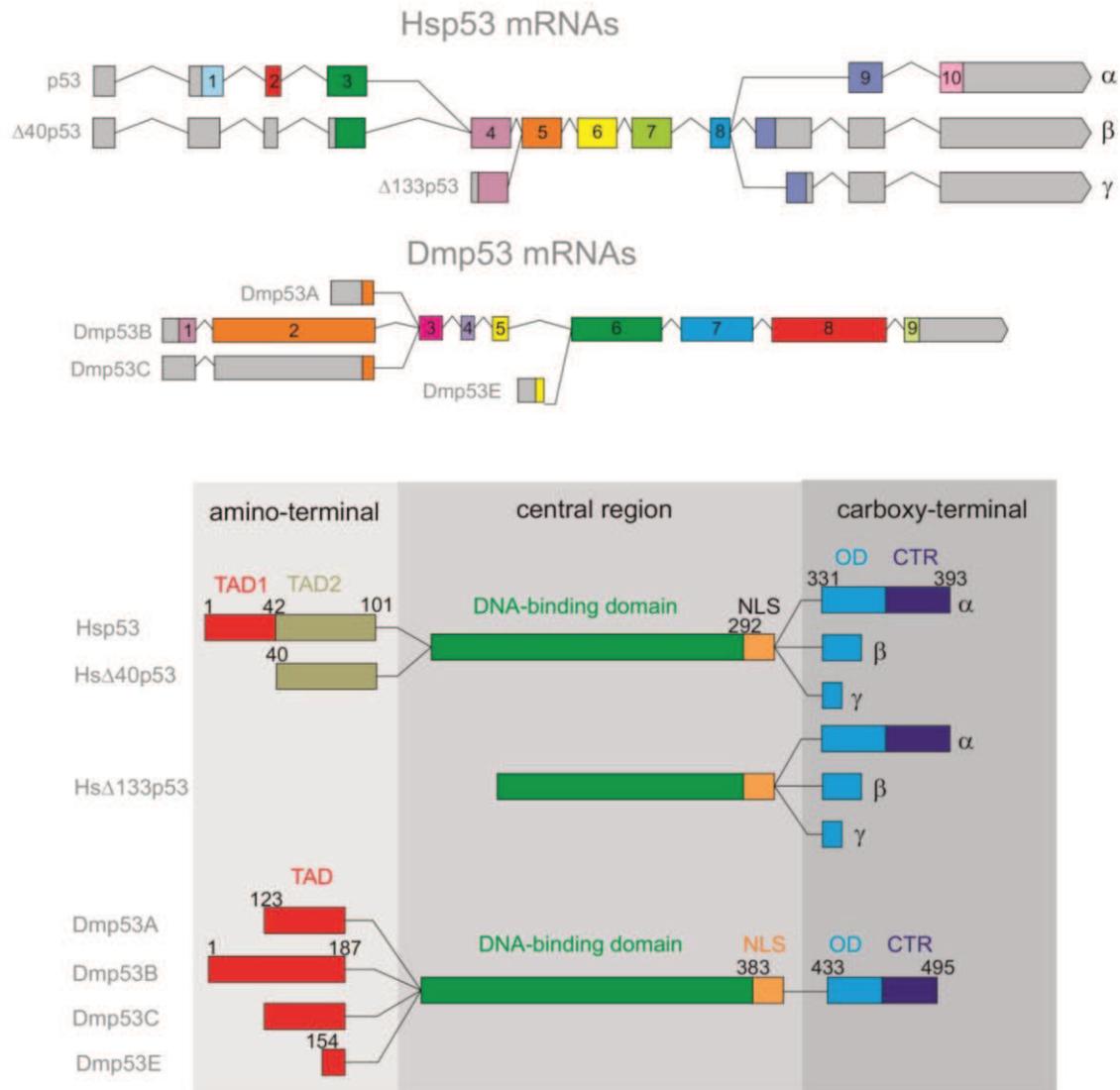
### **2.1 Estructura**

En mamíferos, los integrantes de la familia de genes que comprende a p53 muestran un alto grado de similitud funcional y estructural (Murray-Zmijewski et al., 2006). Además de p53, esta familia se compone de otros dos integrantes, p63 y p73. A pesar de que estos dos últimos miembros fueron identificados posteriormente a p53, el ancestro común de la familia de este factor de transcripción parece ser más similar a p63 y p73 (Dötsch et al., 2010; Murray-Zmijewski et al., 2006). Los fenotipos distintivos de ratones *knock-out* (KO) indican roles únicos en el desarrollo para p63 y p73 no compartidos por p53. Mientras ratones p53KO se desarrollan normalmente, ratones p63KO o p73KO muestran fuertes defectos en la diferenciación epitelial y el desarrollo neuronal, respectivamente (Mills et al., 1999; Yang & McKeon, 2000). En *Drosophila*, existe un único gen p53 que codifica proteínas homólogas a p53 de mamíferos (W. J.

Lu et al., 2009; Ollmann et al., 2000). La similitud estructural entre estos genes se corresponde con funciones similares en tanto este gen se induce como respuesta a daños al ADN y su ausencia no tiene ninguna consecuencia evidente en el desarrollo (Michael H. Brodsky et al., 2000; Jin et al., 2000; Ollmann et al., 2000; Xie & Golic, 2004).

Hace más de dos décadas, se demostró que p53 de *Drosophila* es capaz de unir secuencias de ADN conteniendo sitios consensos de unión para p53 de humanos (Jin et al., 2000; Ollmann et al., 2000). La proteína de humanos, al igual que en *Drosophila*, une el ADN en forma de tetrámero y su secuencia consta de 4 dominios, un dominio de transactivación (*transactivation domain*, TAD), un dominio de unión al ADN (*DNA-binding domain*, DBD), una señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*, NLS) junto a un dominio de oligomerización (*oligomerization domain*, OD) y un dominio C-terminal regulatorio (*C-terminal regulatory domain*, CTR). El DBD de *Drosophila* comparte un 25% de identidad de secuencia y un 43% de similitud de secuencia con su contraparte en humanos y ambos adoptan una estructura tridimensional similar (Herzog et al., 2012). Interesantemente, distintos análisis estructurales han mostrado que muchas mutaciones “*hot-spot*” reportadas en distintos tipos de cáncer se corresponden estructuralmente con herramientas de pérdida de función de p53 conteniendo mutaciones puntuales y desarrolladas en *Drosophila* (Herzog et al., 2012).

El descubrimiento de distintas isoformas para p53, tanto en vertebrados como en *Drosophila*, han revelado una gran complejidad en la regulación y función de este gen (Figura 8; (Dichtel-Danjoy et al., 2012a; Olivares-Illana & Fåhræus, 2010)). La expresión de cada isoforma de p53 es regulada diferencialmente y juega un rol crítico en el control de las distintas respuestas celulares. En este sentido, la expresión anormal y abundancia relativa de las distintas isoformas de este gen contribuyen a la tumorigénesis y tienen profundos efectos en la respuesta de tumores a las distintas terapias (B. Zhang et al., 2015). Las isoformas presentes en humanos pueden ser divididas principalmente en dos grupos: isoformas transactivadoras (p53) e isoformas sin actividad transcripcional truncadas de forma N-terminal ( $\Delta 40p53$  y  $\Delta 133p53$ ). Las isoformas truncadas carecen completamente del dominio de transactivación (TAD, Figura 8). Las isoformas de p53 pueden interaccionar entre ellas de muchas maneras y clarificar las relaciones entre ellas es crucial para la investigación en cáncer.



**Figura 8.** Estructura del gen p53 en humano y *Drosophila* (figura modificada de Ingaramo et al., 2018). (A) Múltiples variantes de ARNm e isoformas proteicas son generadas a partir del gen p53 de *Homo Sapiens* (Hs) y *Drosophila melanogaster* (Dm) a partir de distintos promotores, sitios de *splicing* y codones de iniciación de la traducción. Hsp53 codifica al menos 9 isoformas proteicas. El transcripto completo codifica para p53 y Δ40p53, mientras que las variantes Δ133p53 son generadas a partir de un promotor interno. Adicionalmente, el *splicing* alternativo del exón 9 produce las isoformas α, β y γ. El gen Dmp53 genera 3 potenciales isoformas proteicas. El transcripto completo codifica para Dmp53B y Dmp53C, mientras que Dmp53A se genera a partir de un promotor interno. Los exones están representados por cajas (los exones no codificantes se presentan en color gris). (B) Esquema mostrando las isoformas de p53 donde se indican las posiciones de los aminoácidos que definen los distintos dominios dentro de cada variante. La proteína p53 de secuencia completa incluye: un dominio de transactivación (*transactivation domain*, TAD, en colores rojo y marrón), un dominio de unión al ADN (*DNA-binding domain*, DBD, en color verde), una señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*, NLS, en color anaranjado), un dominio de oligomerización (*oligomerization domain*, OD, en color celeste) y un dominio C-terminal regulatorio (*C-terminal regulatory domain*, CTR, en azul). Dmp53B incluye un TAD completo equivalente a la versión completa Hsp53α; Dmp53A (también conocida como DΔNp53) contiene un TAD truncado pareciéndose a las versiones de p53 Δ133p53 y Δ40p53 en *Homo sapiens*. Dmp53E (también conocida como Dmp53ΔC) es codificada por un transcripto de corta longitud derivando en una isoforma putativa conteniendo una versión truncada del TAD (Ingaramo et al., 2018)

En *Drosophila*, el gen p53 codifica para 3 isoformas (Figura 8; (Joruz & Bourdon, 2016; Marcel et al., 2011)). La mayoría de los estudios se han focalizado en la versión truncada de forma amino terminal p53A (también conocida como Dm $\Delta$ Np53), la isoforma más abundante y la principal inductora de apoptosis luego del tratamiento con radiación ionizante (Chakravarti et al., 2022). A pesar de esto, recientemente se ha demostrado que p53B es capaz de inducir apoptosis masiva cuando se la sobre-expresa y también de mediar proliferación inducida por apoptosis (AiP), una función no canónica de p53 (Ver apartado 2.2.4i) (Dichtel-Danjoy et al., 2012b; B. Zhang et al., 2015).

## **2.2 Funciones**

### *2.2.1 Apoptosis*

Apoptosis, un tipo de muerte celular programada (*programmed cell death*, PCD), es inducida por p53 en respuesta al daño al ADN principalmente a través de la activación de genes pro-apoptóticos, entre ellos PUMA, BAX y NOXA en humanos o *head involution defective (hid)*, *reaper (rpr)*, *grim* y *sickle* en *Drosophila* (Michael H. Brodsky et al., 2000; Ollmann et al., 2000). La activación de estos genes deriva en una cascada de señalización que involucra la activación de proteínas caspasas (D. Xu et al., 2009). p53 también modula apoptosis mediante su interacción con moduladores de apoptosis en el citoplasma o en la membrana plasmática (Berkers et al., 2013) o la interacción con otras vías de señalización proapoptótica como es el caso de la vía JNK (*Jun-N-terminal kinase*) (Shlevkov & Morata, 2012) o de la vía Hippo (Colombani et al., 2006). Además de inducir apoptosis en respuesta a estrés, se han descrito funciones de p53 en el desarrollo de las gónadas de *Drosophila*, donde induce apoptosis en un grupo de células germinales denominadas *Primordial Germ Cells* (PGC) y células germinales mitóticas durante las primeras etapas de la embriogénesis y la espermatogénesis, respectivamente (Napoletano et al., 2017; Y. Yamada et al., 2008). En consecuencia, se puede concluir que la apoptosis mediada por p53 ocurre no sólo en respuesta a estrés sino también en distintos procesos durante el desarrollo.

### *2.2.2 Arresto del ciclo celular y senescencia*

Modelos animales han demostrado que la actividad supresora de tumores de p53, en gran parte, depende de la habilidad de esta proteína de inducir senescencia o arresto del ciclo celular. La inducción de senescencia dependiente de p53 puede ser desatada por pérdida de telómeros, estrés replicativo o señalización oncogénica, y depende de la activación transcripcional del inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas p21. Similarmente, el arresto del ciclo celular es inducido por p53 tanto en la

transición G1-S, mediante la inducción de p21, como en la transición G2-M, mediante la represión de la fosfatasa Cdc25c. A pesar de que el genoma de *Drosophila* codifica para la mayoría de los reguladores del ciclo celular conocidos hasta la actualidad (incluyendo los homólogos de p21/27 y Cdc25, Dacapo y String (Ollmann et al., 2000), respectivamente), el rol de p53 en este proceso celular en *Drosophila* sigue siendo controversial. A diferencia de lo que ocurre en vertebrados, el arresto del ciclo celular en *Drosophila* en respuesta al daño al ADN es ejercido por Dacapo de forma independiente de p53 (M H Brodsky et al., 2000; Michael H. Brodsky et al., 2004; Jaklevic & Su, 2004; Ollmann et al., 2000). Más aún, se ha reportado que el arresto del ciclo celular en *Drosophila* inhibe la actividad proapoptótica de p53 por acción de la ciclina quinasa Cdk1 (Ruiz-Losada et al., 2022). Si bien p53 no parece ser necesario para el arresto del ciclo celular en *Drosophila*, se ha reportado que en ciertos contextos puede contribuir al mismo mediante la regulación positiva de la estabilidad de ciclina E (Mandal et al., 2010; Ouyang et al., 2011).

### *2.2.3 Reparación de ADN*

En respuesta al daño al ADN, p53 induce el arresto del ciclo celular junto a varios genes de reparación de ADN permitiendo que las células reparen las lesiones producidas antes de proseguir con el proceso de división celular. En *Drosophila* se ha visto que p53 promueve en distintos contextos la reparación por escisión de nucleótido (*nucleotide excision repair*, NER) (Jassim et al., 2003), reparación por recombinación homóloga (*Homologous recombination*, HR) (Michael H. Brodsky et al., 2004) y reparación por unión de extremos no homólogos (*Non-homologous end joining*, NHEJ) (Michael H. Brodsky et al., 2004).

### *2.2.4 Funciones no canónicas de p53*

A pesar del rol fundamental de las funciones canónicas de p53 en la homeostasis de tejido, recientes observaciones han demostrado que p53 participa en muchos otros procesos fisiológicos. En este sentido, investigaciones utilizando *Drosophila* como organismo modelo han contribuido de forma significativa en la identificación de nuevas funciones de p53 incluyendo su rol en la regeneración de tejido y proliferación inducida por apoptosis, la coordinación de crecimiento, la competición celular y respuestas adaptativas al estrés nutricional (Barrio et al., 2014; Bondar & Medzhitov, 2010; De La Cova et al., 2014; Dichtel-Danjoy et al., 2012a; Sanchez et al., 2019; Wells et al., 2006).

*i. Proliferación inducida por apoptosis*

El proceso de regeneración requiere una coordinación fina de proliferación celular, senescencia, apoptosis y diferenciación, todos procesos celulares regulados por p53. La proliferación inducida por apoptosis (*Apoptosis-induced proliferation, AiP*), proceso esencial para la regeneración, fue inicialmente descrito en *Drosophila* demostrándose luego su conservación en vertebrados (Jung et al., 2010; F. Li et al., 2010). En respuesta al daño en tejidos de *Drosophila*, las células apoptóticas secretan moléculas señalizadoras pertenecientes a las familias Wnt, TGF- $\beta$  y Hedgehog que promueven la proliferación de las células vecinas no apoptóticas con el fin de que las células próximas a morir sean reemplazadas y se recupere el tamaño original del tejido (Ingaramo et al., 2018; Pérez-Garijo et al., 2013; Ryoo et al., 2004). Tanto en *Drosophila* como en otros organismos, se ha reportado que p53 participa en este proceso regulando la producción de moléculas mitogénicas desde las células apoptóticas para favorecer el desarrollo de las células vecinas (Dichtel-Danjoy et al., 2012b; Wells et al., 2006).

*ii. Coordinación de crecimiento*

Durante el desarrollo de tejidos en *Drosophila*, poblaciones de células adyacentes crecen de manera coordinada para compensar variaciones locales en la tasa de crecimiento, manteniendo la homeostasis de tejido y así produciendo órganos de proporciones correctas (Duarte Mesquita et al., 2010). Se ha reportado que la activación de p53 es importante en células de *Drosophila* cuyo crecimiento ha sido interrumpido, para regular de forma no autónoma celular (parácrina y/o sistémica) el crecimiento de células adyacentes (Duarte Mesquita et al., 2010). Mecanismos similares dependientes de p53 han sido documentados en vertebrados, principalmente en el marco de la supresión de tumores (Krizhanovsky et al., 2008; Lujambio et al., 2013).

De forma adicional a respuestas a nivel local, la perturbación del crecimiento o daños en discos imaginales de *Drosophila* retrasan la metamorfosis con el objetivo de asegurar un crecimiento sistémico coordinado y que todos los órganos alcancen el tamaño final correcto. Interesantemente, se ha demostrado que Dp53 no sólo es capaz de inducir un retardo en el desarrollo en respuesta a daño masivo al ADN (Wells & Johnston, 2012) sino también de regular mecanismos encargados de la expresión de *dilp8*, un péptido clave en la coordinación de crecimiento a nivel sistémico (Sanchez et al., 2019).

### *iii. Competición celular*

La competición celular es un mecanismo homeostático mediante el cual un tejido elimina células genéticamente distintas o subóptimas para promover su correcto funcionamiento (Morata & Ripoll, 1975). Más allá de haber sido descrito inicialmente en tejidos de *Drosophila*, este fenómeno ha sido observado en vertebrados (Di Gregorio et al., 2016). La competición celular ocurre cuando dos poblaciones celulares con diferentes propiedades metabólicas o de crecimiento se ven confrontadas entre sí resultando en la expansión de la población más fuerte (células ganadoras o *winner cells*) a expensas de la más débil (células perdedoras o *loser cells*). A pesar de haberse observado activación de p53 en células perdedoras (Kucinski et al., 2017), no hay evidencias de que ésta sea requerida para la eliminación de dichas células (Kale et al., 2015). Por el contrario, en otros contextos se ha demostrado que la activación de p53 es necesaria y suficiente para lograr un estado celular ganador (Bondar & Medzhitov, 2010; G. Zhang et al., 2017).

La competición celular además de ser un importante proceso fisiológico, bajo ciertas condiciones puede contribuir al desarrollo de cáncer. Se ha demostrado que la activación de oncogenes pueden derivar en un estado celular “supercompetidor” que, de forma dependiente de p53, elimina células adyacentes logrando la colonización del tejido (De La Cova et al., 2014).

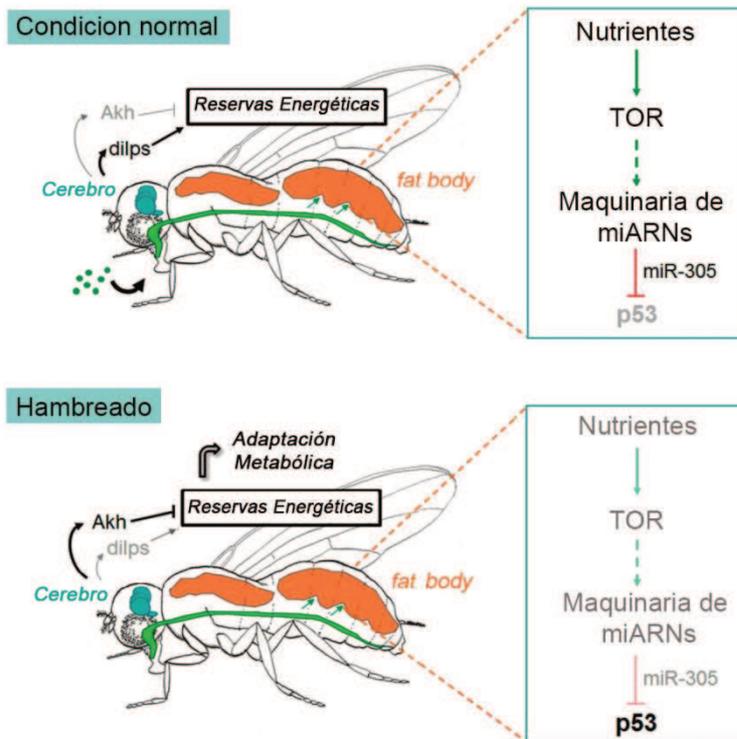
#### *2.2.5 Homeostasis metabólica*

Durante la última década, p53 ha emergido como un regulador clave de la homeostasis metabólica. La activación de p53 ha sido regularmente observada en respuesta a diferentes estímulos metabólicos como cambios en la tensión de oxígeno, el estado redox o la disponibilidad de nutrientes (Berkers et al., 2013). Frente a éstos y otros tipos de estrés, p53 regula el metabolismo energético al inhibir la glucólisis y promover la respiración mitocondrial (Liang et al., 2013). Por un lado, p53 reduce la expresión de transportadores de glucosa (GLUT1/3/4) y la enzima glicolítica fosfolicerato mutasa (PGM) al mismo tiempo que induce TIGAR (*Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator*), un inhibidor de la enzima limitante glicolítica fosfofructoquinasa 1 (PFK1). Por otro lado, p53 mantiene la integridad mitocondrial y promueve la fosforilación oxidativa al regular la expresión de *synthesis of cytochrome c oxidase 2* (SCO2), un regulador clave del ensamblaje del complejo IV, junto a la enzima *mitochondrial glutaminase 2* (GLS2) y *apoptosis-inducing factor* (AIF) (Berkers et al., 2013). De esta manera, p53 regula el metabolismo de glucosa para favorecer la generación de energía a través de la fosforilación oxidativa y el caso contrario se

observa en células deficientes de actividad p53. Estas células muestran altas tasas de glucólisis y respiración mitocondrial reducida, un perfil metabólico característico de células cancerígenas o altamente proliferativas denominado efecto Warburg (Liang et al., 2013). Particularmente en el tejido adiposo, la expresión de p53 ha sido asociada al desarrollo de obesidad y resistencia a insulina. Se ha demostrado que la senescencia de preadipocitos mediada por p53 es un mecanismo de protección frente a la adiposidad excesiva asociada al envejecimiento (Chen et al., 2012). En estudios adicionales, se reportó que la expresión de p53 en el tejido adiposo se encuentra inversamente relacionada con los niveles de resistencia a insulina y que tratamientos con Metformina, un fármaco antidiabético, aumentan su expresión (Ortega et al., 2013).

En *Drosophila* también se ha asociado p53 a la regulación de varias vías metabólicas. De forma similar a su homólogo en mamíferos, la activación de p53 regula las vías de la glucólisis y OXPHOS como parte de un mecanismo homeostático en tejidos sobre-expresando el oncogen Myc (De La Cova et al., 2014). A su vez, p53 regula la glucólisis frente a la falta de nutrientes mediante la represión de dos enzimas glicolíticas, PGM y la Hexoquinasa C (Hex-C) (Barrio et al., 2014). Junto a su capacidad de regular el metabolismo celular, se ha demostrado que p53 en *Drosophila* participa en la adaptación metabólica a nivel de organismo. La depleción de la actividad de p53 específicamente en el FB de *Drosophila* acelera el consumo de reservas energéticas, reduce los niveles de azúcares y compromete la supervivencia frente a la privación de nutrientes (Figura 9) (Barrio et al., 2014). p53 es regulado en el FB por miR-305 de manera dependiente de las condiciones nutricionales y de la activación de la vía TOR. Mientras que en animales bien alimentados la señalización TOR contribuye a la inhibición de p53 mediada por miR-305, la privación de nutrientes reduce los niveles de los componentes de la maquinaria de miARNs (micro ARNs) bajando los niveles de miR-305 y deteniendo este mecanismo de represión sobre p53 (Barrio et al., 2014). El mecanismo a partir del cual p53 regula la homeostasis metabólica a nivel sistémico y la supervivencia a la falta de nutrientes no se conoce aún. En este sentido, la actividad de p53 se ha asociado a la regulación de las vías de la insulina y factores de crecimiento similares a la insulina (*Insulin/insulin-like growth factor signalling*, IIS). La falta de p53 en las IPCs deriva en un aumento del *lifespan* o tiempo de vida de moscas adultas, acompañado de una disminución en los niveles de transcritos de dILP2 y una menor activación de IIS en el FB (Bauer et al., 2007). Asimismo, se ha descrito que, en respuesta al hambre o al estrés ribosomal, la depleción de p53 en las IPCs también regula dILP2 a nivel de secreción (Hasygar &

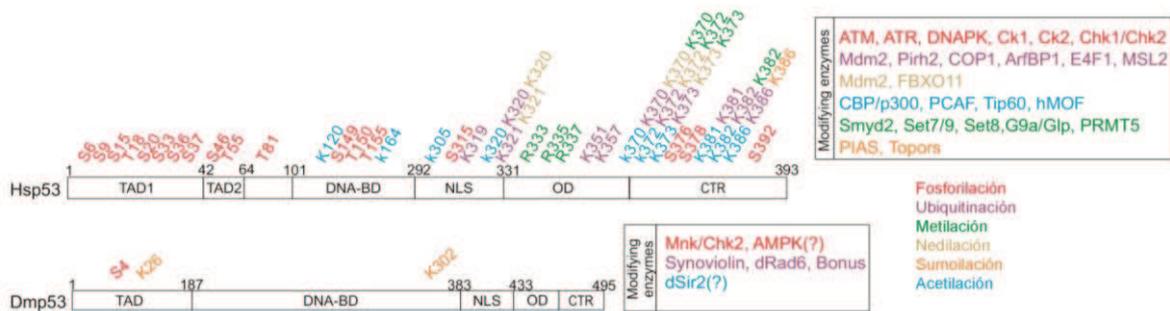
Hietakangas, 2014). De esta manera, la modulación de la IIS por parte de p53 en el tejido adiposo es un potencial candidato por el cual p53 regula la homeostasis metabólica a nivel sistémico en respuesta al estrés nutricional.



**Figura 9.** Rol de p53 en *Drosophila* en la adaptación metabólica a la privación de nutrientes (figura modificada de Barrio et al., 2014). En animales bien alimentados, la señalización TOR contribuye a la inhibición de p53 vía miR-305 en células del FB. Frente a la privación de nutrientes, los niveles de los principales elementos de la maquinaria de miARNs se ven reducidos, lo que deriva en una baja en la represión de p53. La depleción específica de la actividad p53 en las células del FB acelera el consumo de reservas energéticas y compromete la supervivencia del animal frente a periodos de hambre (Barrio et al., 2014).

### 2.3 Regulación

Múltiples niveles de regulación aseguran que p53 se active exclusivamente en respuesta a condiciones de estrés. P53 se encuentra regulado a nivel transcripcional y post-transcripcional, pero son las modificaciones post-traduccionales las que principalmente afectan tanto la estabilidad, su localización subcelular y actividad transcripcional. Todos estos aspectos de la proteína p53 son regulados mediante fosforilación, ubiquitinación, acetilación, sumoilación y glicosilaciones, entre otras (Figura 10, (Dai & Gu, 2010; Ingaramo et al., 2018)).



**Figura 10.** Modificaciones post-traduccionales de la proteína p53 en humano y *Drosophila* (Figura modificada de Ingaramo et al., 2018). Esquema general de la proteína p53 con sus principales dominios. Los sitios de modificación se encuentran indicados a lo largo de las proteínas. Las enzimas responsables (*Modifying enzymes*) y el tipo de modificación en cada organismo se encuentran detalladas a la derecha en el color correspondiente. (Ingaramo et al., 2018).

En células normales bajo condiciones óptimas, p53 se mantiene en niveles fisiológicos bajos principalmente por la acción de la ubiquitina-ligasa MDM2 (*Murine Double minute 2*), la cual promueve la exportación nuclear de p53 y su posterior degradación por ubiquitinación (Nag et al., 2013). De esta manera, la inhibición de MDM2 por diferentes efectores resultan en la estabilización y activación de p53. Este es el caso de ARF (*ADP-ribosylation factor 1*), un gen supresor tumoral que secuestra MDM2 en el nucléolo e inhibe su actividad (Pimkina & Murphy, 2009). Una vez superadas las condiciones de estrés, la inhibición de MDM2 es regulada negativamente por retroalimentación mediante activación transcripcional por p53. Muchas otras modificaciones post-traduccionales distintas de la ubiquitinación y deubiquitinación son responsables de la estabilización de p53. Luego de daño al ADN, una serie de proteínas quinasas incluidas ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*Ataxia telangiectasia related*), Chk1 (*Checkpoint kinase 1*) y Chk2 (*Checkpoint kinase 2*) (Dai & Gu, 2010; Ingaramo et al., 2018) fosforilan y estabilizan p53. De la misma manera, en respuesta a la privación de glucosa, la fosforilación en la serina 15 de p53 por AMPK (*AMP-activated protein kinase*) es necesaria para una detención transitoria del ciclo celular. Además de fosforilación, se ha reportado que p53 es regulado por acetilación y deacetilación. Deacetilasas como las Sirtuinas (especialmente Sirt1) actúan como importantes reguladores negativos de la actividad transcripcional de p53. Finalmente, la señalización de p53 es también regulada por la maquinaria de micro-ARN (miARN) y se ha reportado que muchos miARNs reprimen tanto p53 como muchos de sus reguladores (Juan Liu et al., 2017).

En *Drosophila*, se ha reportado que p53 es regulado por ubiquitinación, fosforilación y sumoilación. La activación de p53 luego del daño al ADN depende de la

actividad de Lok, el ortólogo en *Drosophila* de Chk2. La fosforilación de p53 dependiente de Lok/Chk2 en la serina 4 activa una respuesta transcripcional global al daño al ADN que induce la reparación del ADN como también vías apoptóticas (Peters et al., s. f.). Aunque la vía canónica ARF/MDM2 se encuentra ausente en especies invertebradas, se ha reportado que las proteínas Synoviolin (dSyno) y *gene companion of reaper* (Corp) son capaces de regular la actividad de p53. dSyno es una E3 ubiquitina-ligasa implicada en la degradación asociada a retículo endoplásmico (*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*, ERAD) que se ha demostrado capaz de ubiquitinar a p53 *in vitro* y su sobreexpresión capaz de reducir los niveles y la apoptosis dependiente de este factor de transcripción (Yamasaki et al., 2007). Por su parte, la sobreexpresión de Corp promueve la supervivencia celular luego de daño al ADN en células somáticas pero lo reduce en la línea germinal, similar a lo que ocurre en mutantes de p53. De forma análoga a MDM2, Corp es regulado transcripcionalmente por p53 sugiriendo un mecanismo de retroalimentación negativa conservado para limitar la respuesta dependiente de p53 (Akdemir et al., 2007; Michael H. Brodsky et al., 2004). Asimismo, Corp comparte un motivo proteico con MDM2 en una región esencial para la interacción entre MDM2 y p53 en vertebrados, y es esta región en *Drosophila* la que interesantemente media la interacción entre Corp y p53.

La acetilación de p53 no ha sido completamente demostrada en *Drosophila*. Aun así, se ha demostrado que la deacetilasa Sir2 de *Drosophila* es capaz de interaccionar físicamente con p53 y evidencia genética sugiere que, de forma similar a lo que ocurre en mamíferos, p53 es un gen objetivo de Sir2 (Bauer & Helfand, 2009). Junto con la acetilación, p53 puede ser sumoilada en *Drosophila* en dos lisinas (K26 y K302) y mutaciones de ambos sitios reducen dramáticamente la actividad transcripcional de p53 y su habilidad de inducir apoptosis por su sobreexpresión (Mauri et al., 2008). Finalmente, se ha reportado que p53 es regulada por miARNs (microARNs) en varios tejidos e interesantemente, la regulación de p53 por miARNs en el FB es modulada por la disponibilidad de nutrientes y la vía TOR (Barrio et al., 2014). En su conjunto, todos estos estudios indican que p53 es regulado de forma similar en *Drosophila* y mamíferos, lo cual apoya el uso de *Drosophila* como organismo modelo en investigaciones sobre nuevas funciones fisiológicas de p53 (Ingaramo et al., 2018).

### **3. Autofagia**

El proceso de autofagia es un proceso catabólico celular altamente conservado en eucariotas. El término autofagia se deriva de las raíces griegas *autos*; "uno mismo" y *phagein*; "comer" y en biología se refiere al proceso mediante el cual distintos componentes celulares son derivados al lisosoma para su degradación. Se ha demostrado que distintas afectaciones en el proceso de autofagia están íntimamente relacionadas a múltiples condiciones fisiopatológicas de índole neurodegenerativa, infecciosa, autoinmune, cardiovascular, reumática, metabólica, pulmonar, y relacionadas a enfermedades malignas y al envejecimiento (Galluzzi et al., 2017). Todas estas implicancias fisiológicas demuestran que este proceso es de vital importancia para el mantenimiento de la homeostasis celular y sistémica.

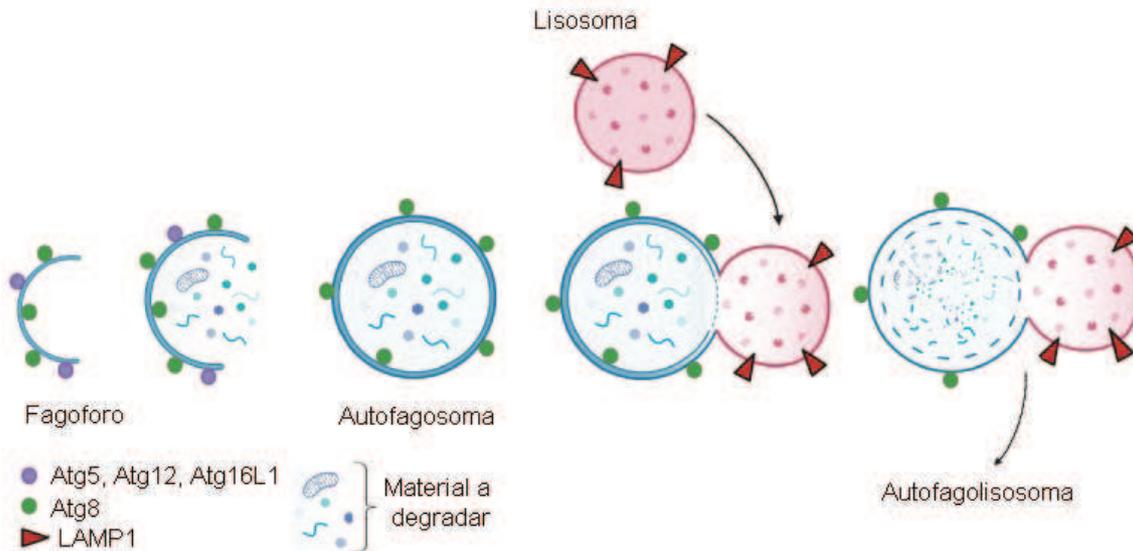
En este trabajo se utilizará el término autofagia para referirse a la macroautofagia, un tipo particular de autofagia que involucra la formación de vesículas citosólicas que se fusionan a lisosomas. Junto a la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (*Chaperone-mediated Autophagy* o CMA) se encargan de la degradación de gran parte del material celular. Tanto la macroautofagia, como la microautofagia y la CMA pueden ser selectivas, degradando moléculas objetivo mediante receptores específicos, como no selectivas, degradando material celular en masa. La microautofagia involucra la captación de componentes celulares a través de la invaginación directa de la membrana de endolisosomas mientras que la CMA permite la entrada de componentes celulares al lisosoma a través de la actividad de proteínas chaperonas. A pesar de ser inducidas fuertemente frente a la falta de nutrientes y otros tipos de estrés, todos estos tipos de autofagia ocurren de manera basal en la mayoría de las células metabólicamente activas como un mecanismo de control de calidad que elimina organelas defectuosas y agregados proteicos que puedan afectar el correcto funcionamiento celular (Lőrincz et al., 2017; Mizushima & Komatsu, 2011; Mukherjee et al., 2016; Tekirdag & Cuervo, 2018). De todas estas clases de autofagia, en este trabajo nos focalizaremos particularmente en la macroautofagia.

#### **3.1 Macroautofagia en Drosophila**

##### *3.1.1 Mecanismo molecular*

La macroautofagia es un proceso altamente conservado en *Drosophila* mediante el cual los componentes celulares presentes en el citosol son engolfados en masa por una doble membrana formando vesículas denominadas autofagosomas.

Para la degradación de su contenido, estas vesículas se fusionan al lisosoma dando lugar a una vesícula ácida denominada autofagolisosoma (Figura 11).

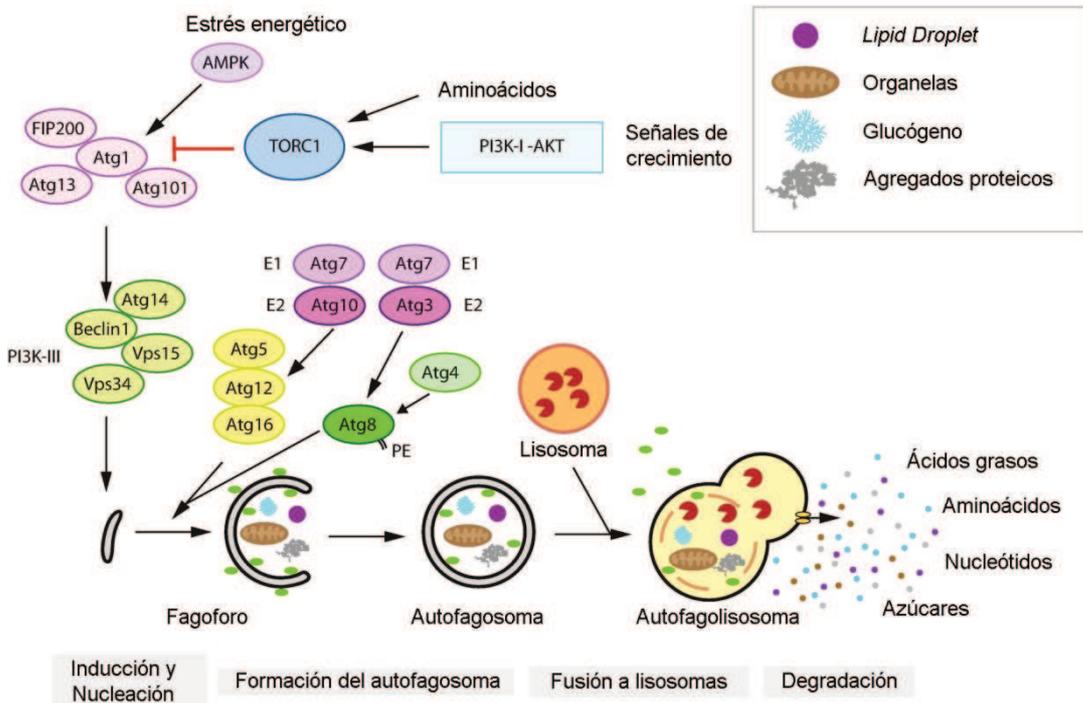


**Figura 11.** Esquema del proceso de autofagia (figura modificada de Fleming y Rubinsztein, 2020). Un saco de membrana denominado fagoforo, asociado al complejo proteico Atg5-Atg12-Atg16L1 y la proteína Atg8, envuelve material del citosol y da origen a una vesícula denominada Autofagosoma. Esta vesícula luego se fusiona a lisosomas (asociados a la proteína de membrana LAMP1) formando un autofagolisosoma y permitiendo la degradación de su contenido (Fleming & Rubinsztein, 2020).

Los genes que participan en este proceso fueron inicialmente descubiertos en levaduras y se los refiere como genes Apg o Atg (*Autophagy-related genes*, ej. Atg1) (Mizushima et al., 2011; Tsukada & Ohsumi, 1993). Muchas de las herramientas utilizadas para monitorear el proceso de autofagia se basan en la marcación de estas proteínas. En este trabajo se utilizara el marcador mCherryAtg8, el cual se encuentra presente en autofagosomas y autofagolisosomas (Figura 11). Otra herramienta ampliamente utilizada es la tinción con LysoTracker, compuesto químico que emite fluorescencia exclusivamente en medios ácidos. Esta característica permite la marcación fluorescente de lisosomas y autofagolisosomas (Figura 11, la marcación de LysoTracker coincide con vesículas portando la proteína de membrana lisosomal LAMP1).

Luego de su inducción, el proceso de autofagia comienza a partir de la nucleación o reclutamiento de moléculas al sitio PAS (*phagophore site assembly*) o sitio de formación del fagoforo. El fagoforo, precursor del autofagosoma, es una cisterna transitoria doble membrana que engloba el material a degradar (organelas, agregados proteicos y estructuras o moléculas de almacenamiento energético como *Lipid Droplets* y glucógeno) (Lőrincz et al., 2017; Yin et al., 2016). Una vez formado el

fagoforo, mediante procesos de expansión y sellado, éste termina en la formación del autofagosoma. A lo largo de las etapas de inducción, nucleación y elongación y formación del autofagosoma, intervienen distintos complejos proteicos: el complejo de iniciación (compuesto por Atg1, Atg17 o FIP200 en mamíferos, Atg101 y Atg13), el complejo de nucleación (o “complejo PI3K de clase III”, compuesto por Beclin1, Vps34, Vsp15 y Atg14) y el complejo de elongación (compuesto por Atg5, Atg12 y Atg16) (Chang & Neufeld, 2010).



**Figura 12.** Mecanismos moleculares del proceso de autofagia en *Drosophila* (figura modificada de Khezri y Rusten, 2019). AMPK y TOR regulan la inducción de autofagia mediante la activación/inactivación del complejo de iniciación (Atg1/Atg13/Atg101/FIP200). El complejo de nucleación o PI3K-III (Beclin1/Vsp34/Atg14/Vsp15) define el sitio de formación del fagoforo. Durante la formación del autofagosoma, las proteínas Atg5-Atg12 conjugadas mediante la acción de Atg7 y Atg10, son reclutadas al PAS por Atg16. El complejo de elongación (Atg5/Atg12/Atg16) en el PAS media la incorporación a la membrana del fagoforo de Atg8-PE, conjugado mediante la acción de Atg7 y Atg3. Mediante procesos de elongación y sellado, se forma el autofagosoma que luego se fusionará a lisosomas (generando un autofagolisosoma) para la degradación de su contenido (*Lipid Droplets*, glucógeno, agregados proteicos y organelas completas, a modo de ejemplo). La degradación de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos generará así la provisión a la célula de aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y azúcares, entre otros (Khezri & Rusten, 2019).

Uno de los estímulos que derivan en la inducción del proceso de autofagia es la falta de nutrientes. Una de las vías principales que *sensan* este tipo de estrés es la vía de TOR. La privación de nutrientes, y particularmente la falta de fuente de nitrógeno o aminoácidos, inician una cascada de señalización intracelular a partir de la inhibición del complejo TORC1. En levaduras, al igual que en vertebrados, bajo condiciones ricas en nutrientes, TORC1 fosforila Atg13 disminuyendo su afinidad por Atg1 e

inhibiendo la formación del complejo de iniciación (Fujioka et al., 2014). Frente a la falta de nutrientes, la baja en la actividad de TORC1 y la consecuente desfosforilación de Atg13, junto a la autofosforilación de Atg1, activa el complejo de iniciación y se da inicio al proceso de autofagia (Wong et al., 2013; Yin et al., 2016). Por el contrario, en *Drosophila*, la fosforilación de Atg13 la ejerce Atg1 y tiene un impacto regulador positivo en la inducción de autofagia (Yu-Yun Chang & Thomas P. Neufeld, 2009). A diferencia de levaduras, la inhibición de autofagia por TORC1 en *Drosophila* ocurre mediante la fosforilación de Atg1. Ante estrés por falta de nutrientes, TORC1 se inactiva, Atg1 se desfosforila resultando en su activación y posterior fosforilación de Atg13 (Yu-Yun Chang & Thomas P. Neufeld, 2009).

De forma opuesta a TORC1, AMPK es un regulador positivo del proceso de autofagia. En vertebrados, una vez activa, AMPK fosforila ULK1, homólogo de Atg1, lo que induce la formación del complejo de iniciación e induce el proceso de autofagia (Figura 12) (Joungmok Kim et al., 2011). En condiciones ricas de nutrientes TORC1 inhibe la interacción AMPK y ULK1 mediante fosforilación de ULK1 (Joungmok Kim et al., 2011). En *Drosophila*, y al igual que en mamíferos, se ha descrito que la sobreexpresión de AMPK es capaz de inducir autofagia (Ulgherait et al., 2014).

Una vez activo el complejo de iniciación, Vps34, una fosfoinositol-3-quinasa de clase III (PI3K), como parte del complejo de nucleación, genera la síntesis localizada de fosfatidinositol-3-fosfato (PI3P) lo que determina el sitio PAS e inicia la formación del fagoforo (Nascimbeni et al., 2017).

Para la expansión del fagoforo son necesarios dos sistemas similares a los de conjugación de ubiquitina (*Ubiquitin-like*, Ubl). Estos se componen de las proteínas Ubl Atg12 y Atg8, dos proteínas de estructura similar a la ubiquitina. Atg12 es conjugado a Atg5 mediante la acción de las ligasas Atg7 y Atg10. Para el caso de Atg8 (LC3 en mamíferos), éste es conjugado al lípido fosfatidiletanolamina (PE) y esto ocurre mediante la acción de Atg7 y Atg3 junto a la proteasa Atg4, la cual remueve parte del C-terminal de Atg8 (Figura 12) (Yin et al., 2016) (es por esta razón que los marcadores que se utilizan fusionados a Atg8 se ubican en su extremo N-terminal, ej. mCherryATG8). La incorporación de Atg8-PE a la membrana del fagoforo depende del complejo Atg5/Atg12, el cual es reclutado al PAS por Atg16 (Wesselborg & Stork, 2015). Una vez unido a membrana, Atg8-PE media los eventos de fusión que ocurren durante la expansión y el cierre del fagoforo e interactúa con adaptadores y receptores autofágicos que presentan motivos LIR (*LC3 interaction motif*, regiones de

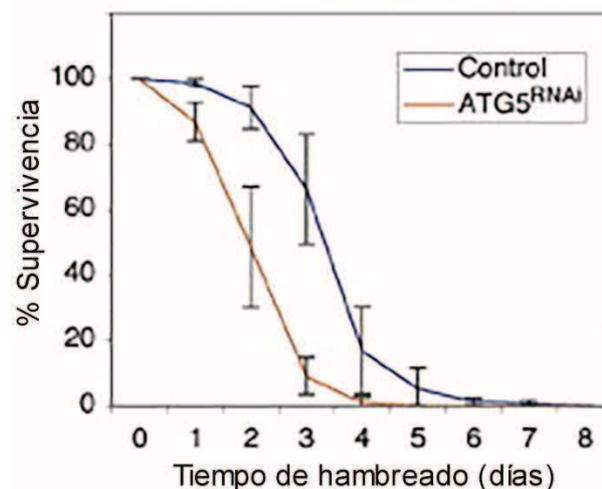
interacción con Atg8), una función crucial en la autofagia selectiva (Birgisdottir et al., 2013).

### 3.1.2 Funciones fisiológicas

El proceso de autofagia se induce en respuesta a distintos tipos de estrés, como la privación de nutrientes, hipoxia, ausencia de factores de crecimiento, estrés relacionado al Retículo Endoplásmico, la generación de ROS (*reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno) e infecciones de patógenos intracelulares. Ya sea de forma basal o en respuesta a estos estímulos, el proceso de autofagia se activa para cumplir las siguientes funciones:

#### i. Reciclado molecular y abastecimiento de reservas energéticas

La autofagia actúa como un mecanismo de reciclaje molecular proveyendo a la célula de aminoácidos libres y otros precursores anabólicos generados a partir de la degradación de organelas y/o biomoléculas, para ser utilizados como energía o para la biosíntesis de nuevos componentes celulares. En el caso particular de la autofagia en órganos involucrados en el metabolismo energético, se ha descrito que moscas adultas de *Drosophila* deficientes de autofagia específicamente en el FB son más sensibles a la falta de nutrientes (Figura 13), sugiriendo un rol para este proceso en el reciclado y abastecimiento de reservas energéticas. Asimismo, en este sentido, se ha reportado que autofagia es un proceso necesario para la degradación eficiente de glucógeno en respuesta a la privación de nutrientes (Zirin et al., 2013).



**Figura 13.** Figura modificada de Scott et al., 2004. Sensibilidad a la privación de nutrientes de moscas adultas expresando un ARN de interferencia (ARNi o RNAi) específicamente en el FB contra el gen esencial para el proceso de autofagia, *Atg5* (Scott et al., 2004).

*ii. Mecanismo de reparación de organelas y proteínas*

En células saludables y en condiciones óptimas, las proteínas mal plegadas son conjugadas a ubiquitina y degradadas en el proteosoma. Sin embargo, la actividad proteosomal es propensa a la inactivación por distintos tipos de estrés y disminuye con la edad. Si la capacidad degradativa del proteosoma se ve sobrecargada, el sistema autofágico se activa para remover la acumulación de agregados como también las organelas que han sido dañadas irreparablemente por proteínas agregadas o no funcionales (Dikic, 2017). Apoyando el rol fisiológico de este proceso, ratones deficientes en autofagia en su sistema nervioso central muestran altos niveles de neurodegeneración ratificando el rol de autofagia en la eliminación de agregados proteicos (Komatsu et al., 2006).

*iii. Muerte celular dependiente de autofagia*

Además del proceso de muerte celular programada o apoptosis, se ha descrito otro tipo de muerte celular programado denominado muerte celular dependiente de autofagia (*Autophagy-dependent cell death*, ADCD). Este tipo de muerte cumple con tres criterios: otros tipos de muerte celular quedan excluidos, se presenta un aumento en el flujo autofágico, y la inhibición genética o farmacológica del proceso de autofagia rescata la célula de la muerte celular (Schwartz, 2021). Un clásico ejemplo de este tipo de muerte celular se da en la metamorfosis de *Drosophila* donde las células del intestino, entre otros, atraviesan la muerte celular para ser reemplazadas por células que formarán los órganos de la mosca adulta.

*iv. Funciones inmunológicas*

Autofagia ha sido relacionada a una variedad de funciones del sistema inmune, como la remoción de bacterias intracelulares, secreción de citoquinas, control de la inflamación, presentación antigénica y desarrollo de linfocitos. Se ha observado que distintas patologías relacionadas al sistema inmune como lupus eritematoso, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes y esclerosis múltiple están asociadas a defectos en la vía de la autofagia (Dikic & Elazar, 2018).

**3.2 Regulación de la autofagia por p53**

La actividad moduladora de p53 con respecto a autofagia depende del contexto y es altamente influenciada por su localización subcelular. A grandes rasgos, mientras que p53 inhibe el proceso de autofagia en citoplasma, adquiere un rol proautofágico al trasladarse a núcleo (Maiuri et al., 2010).



reprime autofagia podría ser su interacción directa con FIP200, la cual interfiere con las primeras etapas en la inducción de autofagia (Morselli et al., 2011).

### 3.2.2 Rol proautofágico de p53

Al menos en ciertas circunstancias, la respuesta a estrés mediada por p53 involucra la transactivación de genes codificando para la subunidad  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de AMPK, TSC2, *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), Sestrin 1 y 2 e *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP3), todas proteínas que antagonizan la función supresora de autofagia de mTOR o activan la quinasa proautofágica AMPK (Feng et al., 2007; Maiuri et al., 2009). Particularmente, p53 es capaz de inducir los genes *IGF-BP3*, *TSC2* y *PTEN* en tejidos de ratón involucrados en el metabolismo energético como tejido adiposo, musculo esquelético, corazón, hígado y riñón, donde la vía IIS/TOR actúa en respuesta a niveles exógenos de glucosa (Feng et al., 2007). Junto a estos genes, en células humanas, se ha observado también la inducción de *AMPK $\beta 1$*  y *AMPK $\beta 2$*  de forma dependiente de p53 (Feng et al., 2007). Adicionalmente, en células de ratón y humanas tratadas con doxorubicina para generar daño al ADN se observó la inducción de autofagia de forma dependiente de p53. En este contexto, se realizaron estudios de secuenciación masiva de ARN (*RNA-seq*) y de secuenciación luego de inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP-seq) y se encontraron varios genes con un rol directo en autofagia que unen p53 y cuya transcripción es regulada por éste, entre ellos *ULK1* y *Atg7* (Kenzelmann Broz et al., 2013). En estudios similares se identificó el gen objetivo de p53, *Isg20L1*, cuya sobreexpresión induce autofagia y células cancerígenas deficientes en este gen muestran menores niveles de autofagia ante su inducción mediante métodos farmacológicos (Eby et al., 2010). Asimismo, en respuesta al estrés genotóxico p53 induce las proteínas Sestrin 1 y Sestrin 2, proteínas activadoras de AMPK e inhibidoras de la señalización TOR (Budanov & Karin, 2008; Maiuri et al., 2009).

Adicionalmente, roles proautofágicos se le han asignado a varios miembros de la respuesta apoptótica mediada por p53, incluyendo Bax (perteneciente a la familia de Bcl-2) (Yee et al., 2009) junto a Bad (Maiuri et al., 2007), Bnip3 (J. Zhang & Ney, 2009) y PUMA (Yee et al., 2009), todas proteínas *BH3-only*. Se propone que las proteínas que contienen BH3 inducen autofagia al menos en parte, desestabilizando interacciones inhibitorias entre las proteínas antiapoptóticas Bcl-2/Bcl-XL y Beclin1 (L.Omonosova & C.Hinnadurai, 2008; Maiuri et al., 2010). De forma similar, se ha reportado que el gen proapoptótico objetivo de p53, *DAPK1* (*death-associated protein kinase 1*), promueve autofagia mediante múltiples mecanismos incluyendo el

secuestro de la proteína MAP1B asociada a microtúbulos (inhibidor de ATG8/LC3), la fosforilación de Beclin1 (inhibiendo su interacción con Bcl-2/Bcl-XL) y la acumulación de p53 mediada por ARF, resultando en la transducción de señales proautofágicas tanto dependientes como independientes de p53 (P. Singh et al., 2016).

Por último, se ha identificado que el gen correspondiente a la proteína lisosomal DRAM1 (*damage-regulated autophagy modulator 1*) es gen objetivo de p53 y se encuentra involucrado tanto en las funciones proapoptóticas como proautofágicas de p53 (Crighton et al., 2006; Criollo et al., 2009; Kerley-Hamilton et al., 2007; Takahashi et al., 2013). A pesar de que la sobreexpresión de DRAM1 por si sola causa mínimos niveles de muerte celular, en múltiples experimentos se ha mostrado esencial para la apoptosis mediada por p53 (Crighton et al., 2006; Takahashi et al., 2013). Interesantemente, la sobreexpresión de este gen, a su vez, causa una clara inducción de autofagia (Maiuri et al., 2009).

### 3.2.3 *CG4025/DRAM en la regulación de la autofagia por p53 en Drosophila*

Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio han señalado el gen *CG4025* como inducible frente a la falta de nutrientes. La función de *CG4025* no se conoce, sin embargo, a partir de un análisis de su secuencia aminoacídica identificamos un dominio conservado (IPR019402) presente en proteínas Frag1/DRAM/Sfk1. En particular, DRAM es una familia de proteínas altamente conservada desde nematodos hasta humanos (Criollo et al., 2009; Mah et al., 2012; O'Prey et al., 2009). La familia DRAM en humanos consta de cinco miembros (DRAM1-5) y, a pesar de que todos sus miembros se encuentran involucrados en la regulación del proceso de autofagia, sólo la regulación de DRAM1 parece ser dependiente de p53 (Barthet et al., 2022; Crighton et al., 2006; Kerley-Hamilton et al., 2007; Mrschtik et al., 2015; Yoon et al., 2012).

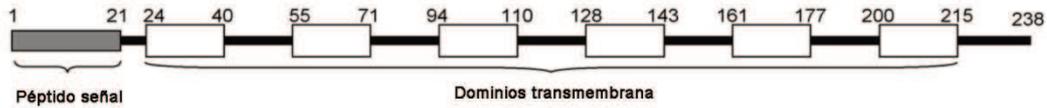
La proteína humana DRAM1 codifica para un polipéptido conteniendo seis dominios transmembrana y se localiza en membrana de lisosomas (Crighton et al., 2006). Experimentos de sobreexpresión del gen de *Drosophila* en células humanas sugieren que la capacidad de regular autofagia de las proteínas DRAM estaría conservada (Criollo et al., 2009; O'Prey et al., 2009). Mientras que DRAM1 es necesario para la inducción de apoptosis mediada por p53, hasta el corriente año, no se había descrito funciones de las proteínas DRAM en homeostasis metabólica. En un estudio reciente<sup>1</sup>, se describió que, en células humanas, DRAM4 y DRAM5 se inducen frente a la falta de glucosa pero de forma independiente de p53 (Barthet et al.,

---

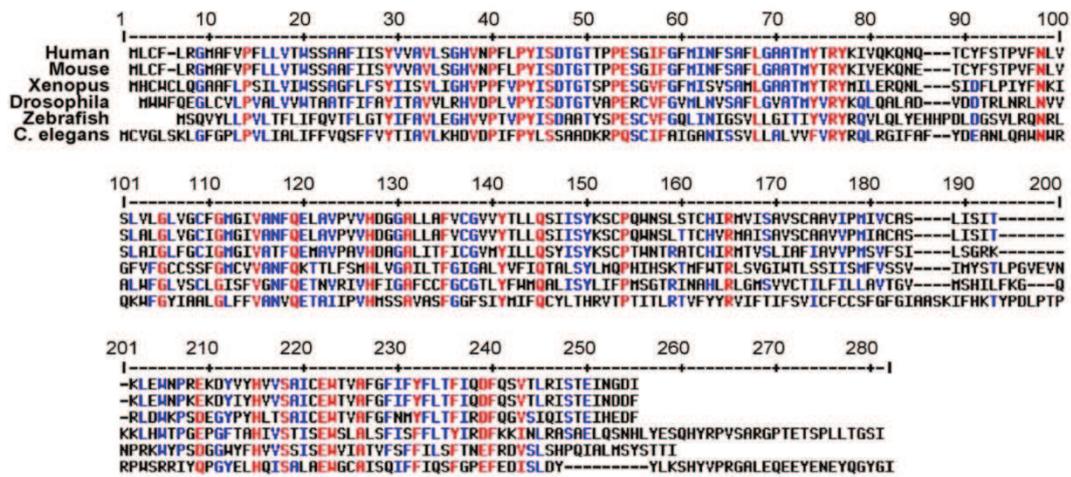
<sup>1</sup> Fecha de publicación: 21 de Enero de 2022

2022). En base a esto último, sería importante la realización de experimentos *in vivo* que permitan definir el rol de p53 en los mecanismos regulatorios de autofagia ejercidos por la proteína DRAM.

A



B



**Figura 15.** Figura modificada de Crighton et al., 2006. **(A)** La proteína DRAM1 humana consta de 238 aminoácidos. La predicción de dominios indican la presencia de seis dominios transmembrana (cajas en blanco) y un péptido señal que dirige la proteína al retículo endoplásmico (cajas en gris). **(B)** Alineamiento de secuencias de DRAM correspondiente a varias especies. Aminoácidos altamente conservados se muestran en rojo y los pocos conservados en azul (Crighton et al., 2006).

## **OBJETIVOS**

## **1. Objetivo general**

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo central estudiar la función del gen supresor de tumores p53 en metabolismo y crecimiento utilizando *Drosophila melanogaster* como sistema modelo.

## **2. Objetivos particulares**

### **2.1 Estudiar la regulación de autofagia por p53 en respuesta a la privación de nutrientes**

Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio indican que en ausencia de p53 la vía de autofagia no se induce en respuesta a la privación de nutrientes. Proponemos llevar a cabo un análisis genético detallado para identificar el/los pasos en la vía de autofagia regulados por p53.

### **2.2 Estudiar la función del gen CG4025 en la inducción de autofagia mediada por dp53**

El gen CG4025 presenta homología con el gen DRAM que codifica para una proteína humana involucrada en el proceso de autofagia. Dado que CG4025 es capaz de regular autofagia en *Drosophila*, como parte de este trabajo nos proponemos analizar si la expresión de este gen es dependiente de p53 y, a su vez, si esta interacción es relevante para la modulación de autofagia por parte de p53.

## **MATERIALES Y METODOS**

## **1. Líneas de Drosophila y mantenimiento**

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas de Drosophila:  $w^{1118}$ , *cg-Gal4* (BL7011), *ppl-Gal4* (BL58768), *R4-Gal4* (BL33832), *lsp2-Gal4* (BL6357), *vgat-Gal4* (BL58980), *Fkh-Gal4* (BL78061), *p53<sup>ns</sup>* (BL23283), *p53<sup>5A14</sup>* (BL6815), *UAS-P53<sup>H159N</sup>* (BL8420), *UAS-P53<sup>R155H</sup>* (BL8419), *GUS-P53<sup>259H</sup>* (BL6582), *UAS-atg1<sup>i</sup>* (BL26731), *UAS-AMPK $\alpha$ <sup>i</sup>* (BL57785), *UAS-sun<sup>i</sup>* (VDRG23685), *UAS-upd2<sup>i</sup>* (BL33949), *UAS-ccha1<sup>i</sup>* (BL57562), *UAS-ccha2<sup>i</sup>* (BL57183), *UAS-gbp1<sup>i</sup>* (VDRG15512), *UAS-gbp2<sup>i</sup>* (VDRG330018), *UAS-dome<sup>i</sup>* (BL53890), *tGPH* (Britton et al., 2002), *unk-lacZ* (Tiebe et al., 2015), *Dilp2-HF* (Park et al., 2014); *p53RE-GFP* (W.-J. Lu et al., 2010), *UAS-mCherry-ATG8a* (Yu-Yun Chang & Thomas P. Neufeld, 2009) *UAS-Dram<sup>i</sup>* (VDRG6924); las demás líneas se encuentran descritas en flybase. Individuos provenientes del cruce de las líneas Gal4 con animales  $w^{1118}$  fueron utilizadas como control. Las líneas de moscas fueron crecidas a 25°C en medio estándar de Drosophila (glucosa 4%, levadura deshidratada 40 g/L, agar 1%, harina de maíz 25 g/L, polenta 50 g/L, ácido propiónico 4.5 ml/L y Nipagin 1.1 g/L).

## **2. Cruces y experimentos de mosaicos genéticos**

Se utilizó el sistema binario GAL4/UAS para dirigir la expresión de distintos transgenes a diferentes tejidos de Drosophila (Brand & Perrimon, 1993). Los cruces fueron llevados a cabo a 25°C a no ser que se indique lo contrario. El cruce de las líneas Gal4 con la línea  $w^{1118}$  fue utilizado como control para cada experimento.

Para el análisis de clones (clones “flip-out”), hembras *hsFLP; act>y+>Gal4*, *UAS-RFP/TM6* o *hsFlp; UAS-Dicer2*; *R4-Cherry-ATG8*, *act>y+>Gal4*, *UAS-GFP/TM6* (Arsham & Neufeld, 2009) fueron cruzadas con las líneas UAS-transgen correspondientes a 25°C. Se analizaron eventos de recombinación espontánea ocurridos en el cuerpo graso previos al inicio del proceso de endoreplicación (Britton et al., 2002).

## **3. Tratamientos de hambre y experimentos de supervivencia**

Para los tratamientos de hambre, los huevos de individuos del genotipo deseado fueron colectados por intervalos de 4h. Pasadas las 24h, inmediatamente después de la eclosión, las larvas L1 (en su primer estadio larvario) fueron transferidas a tubos conteniendo comida estándar a una densidad de 50 larvas por tubo. Previo al tratamiento de hambre, las larvas fueron crecidas a 25°C por 72h. En el medio de su tercer estadio larvario, las larvas fueron lavadas en PBS y transferidas a placas de

petri de 60 mm conteniendo 250  $\mu$ l de este mismo buffer (condición de hambreado, STV) o mantenidas en comida estándar (condiciones control, WF). Las placas con larvas sometidas a condiciones de hambreado fueron selladas con parafilm e incubadas durante el tiempo indicado en cada experimento. En cuanto a los tratamientos de hambreado de moscas adultas, 10 individuos por replica de 5 a 7 días de edad fueron transferido desde tubos con comida estándar a tubos con agar al 2% por el periodo detallado en cada experimento. Luego de la incubación, los adultos o larvas (o sus cuerpos grasos obtenidos por disección inmediata) fueron utilizados para inmunoensayos, extracción de proteínas o ARN, o determinaciones de distintos metabolitos.

Para los ensayos de supervivencia, adultos de 5 a 7 días luego de su eclosión fueron transferidos a tubos conteniendo agar al 2%. Se contaron los individuos muertos cada 6h, transfiriendo los sobrevivientes a tubos frescos cada 24h. Líneas de moscas control fueron analizadas en paralelo en cada experimento realizado. Las estadísticas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6.0, que utiliza el estimador Kaplan-Meier para calcular la supervivencia media y máxima, y las curvas fueron comparadas utilizando el test de Mantel-Cox. En cuanto a los tratamientos con cloroquina y rapamicina, individuos adultos fueron transferidos entre 18 y 24h previas a los tratamientos de hambreado a tubos con comida estándar suplementada ya sea con 2.5 mg/ml de hidroxiclороquina (Sigma) o 400  $\mu$ M de rapamicina o un volumen equivalente de etanol como control. El número de individuos utilizados en cada experimento se encuentra detallado en el Anexo al final de esta tesis.

#### **4. Crecimiento en dietas ricas en nutrientes**

Para experimentos con dieta rica en azúcares (*High-Sugar Diet*, HSD) o dieta rica en grasas (*High Fat Diet*, HFD), se recolectaron huevos en intervalos de 4h e inmediatamente luego de su eclosión 50 larvas por tubo fueron transferidas a tubos con comida estándar (sacarosa al 4%, sin aceite de coco) o tubos con comida rica en sacarosa (sacarosa al 34%) o rica en grasas (aceite de coco al 20%). Las tasas de supervivencia fueron medidas como el porcentaje de individuos capaces de entrar en la etapa de pupariación y los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al genotipo control. Se realizaron análisis de t de Student para analizar la significancia estadística de los resultados.

## 5. Inmunoensayos

Larvas en la mitad de su tercer estadio y diseccionadas en buffer PBS a 4°C fueron fijadas en 4% formaldehído en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente (*Room Temperature*, RT). En el caso de los experimentos *ex vivo*, las larvas invertidas y los tejidos diseccionados fueron directamente fijados luego de la correspondiente incubación. Luego de la fijación, los tejidos se lavaron 3 veces en PBS y se permeabilizaron por 30 minutos en PBT (0.2% Tritón X-100 en PBS). Las muestras se bloquearon por una hora en BBT (.3% BSA, 250 mM NaCl en PBT) y fueron incubadas ON (*overnight*, 16 h) a 4°C con anticuerpo primario diluido en BBT. Luego de tres lavados en BBT, se incubaron con el anticuerpo secundario por 90 minutos a RT. Luego de otros tres lavados en PBT, los tejidos fueron sumergidos en medio de montaje (80% glicerol/PBS). Todos los lavados fueron de 15 minutos y todos los pasos se realizaron en una plataforma de agitación. A continuación una tabla listando los anticuerpos utilizados y sus condiciones de uso (Tabla 1).

**Tabla 1.** Lista de anticuerpos utilizados en experimentos de inmunotinciones.

Anticuerpos	Identificador y Fuente	Dilución
Anti-p53 de ratón	7A4, DSHB	1/20
Anti-β-Gal de conejo	A11132, Invitrogen	1/100
Anti-Dilp2 de rata	(Géminard et al., 2009)	1/400
Anti-GFP de ratón	12A6, DSHB	1/20
Anti-IgG de ratón Alexa Flúor 594	Jackson ImmunoResearch	1/200
Anti-IgG de ratón Alexa Flúor 488	Jackson ImmunoResearch	1/200
Anti-IgG de conejo Alexa Flúor 594	Jackson ImmunoResearch	1/200
Anti-IgG de conejo Alexa Flúor 488	Jackson ImmunoResearch	1/200
Anti-IgG de rata Alexa Flúor 488	Jackson ImmunoResearch	1/200

Para las tinciones con Lysotracker, 5 individuos en la mitad del tercer estadio larvario, tanto en condiciones control como en hambruna, fueron diseccionadas en PBS a 4°C e incubadas con Lysotracker Green (ThermoFisher) a una concentración final de 0,5 μM en PBS. Los tejidos fueron sumergidos en medio de montaje y llevados al microscopio inmediatamente.

Todas las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal invertido Leica SP8 y procesadas utilizando Fiji (Schindelin et al., 2012) y Adobe

Photoshop. La orientación de los tejidos y/o la posición de los mismos se ajustaron para la mejor presentación de las imágenes.

## **6. Experimentos *ex-vivo***

Se realizaron dos tipos de experimentos *ex-vivo*: utilizando larvas invertidas y tejidos diseccionados. Para los experimentos de larvas invertidas, 16 larvas L3 por cada condición fueron lavadas, diseccionadas e invertida su carcasa. Las larvas fueron transferidas posteriormente a tubos conteniendo 50  $\mu$ l de medio Shields and Sang M3 a RT por el lapso de 3h. Previamente ha sido mostrado que la incubación de larvas invertidas en medio M3 induce la reducción de la vía TOR e induce autofagia similar a aquella que se observa frente a periodos de hambreado (Jung Kim & Neufeld, 2015). Los individuos invertidos fueron luego fijados, permeabilizados y sometidos a inmunotinciones como descrito anteriormente utilizando anticuerpos anti-Dilp2. En el caso de los experimentos de incubación conjunta, 8 larvas de cada genotipo (*cg>GFP* and *cg>p53H159.N*) fueron incubadas juntas en medio M3 y todos los pasos siguientes fueron realizados en el mismo tubo para minimizar las fuentes de variabilidad. Se realizaron las cuantificaciones utilizando de 6 a 8 cerebros para cada genotipo y condición.

En cuanto a los experimentos *ex vivo* de tejidos, se utilizaron cerebros diseccionados de 8 larvas control incubados con 8 cuerpos grasos de diferentes genotipos (*cg>GFP* and *cg>p53H159.N*) en 25  $\mu$ l de medio M. a RT por 3h. Luego de las inmunotinciones con anticuerpos anti-Dilp2, 5 cerebros fueron analizados y cuantificada su fluorescencia.

## **7. Cuantificación de fluorescencia**

Para la cuantificación de fluorescencia se obtuvieron series de imágenes en el eje Z utilizando el microscopio confocal Leica SP8 como descrito anteriormente. Las imágenes control fueron obtenidas utilizando configuraciones idénticas y se procesaron de la misma manera recibiendo el mismo tratamiento que las imágenes experimentales. La intensidad de fluorescencia total de las proyecciones máximas en Z fueron medidas utilizando Fiji y los datos fueron normalizados a las imágenes obtenidas de animales control. La significancia estadística se determinó mediante test t de Student. Para cuantificar los niveles de Dilp2 en cerebro, se obtuvieron secciones confocales cubriendo el total de las células productoras de insulina (IPCs) de al menos 15 cerebros por genotipo y por condición. En cuanto a la cuantificación de  $\beta$ -gal (correspondiente al reportero *unk-lacZ*) en células del FB, secciones confocales

cubriendo el total de los núcleos fueron tomadas midiendo la fluorescencia total en los mismos. En el caso de la GFP de membrana (reportero tGPH), se midieron los niveles de intensidad de fluorescencia en secciones de 5 micrones de membrana plasmática de 10 FBs. Los niveles de intensidad de LysoTracker y de puntos mCherry-ATG8 fueron medidos a partir de imágenes tomadas aleatoriamente procesadas automáticamente en Fiji. La intensidad total y el área de fluorescencia para las medidas de LysoTracker y mCherry-ATG8, respectivamente, fueron determinadas y normalizadas a aquellas obtenidas de animales control. Se realizaron al menos 2 a 3 experimentos independientes de 10 imágenes de FBs. Se utilizó el test de Student para el análisis estadístico.

## **8. Western blot**

Cuerpos grasos diseccionados de individuos en su tercer estado larvario fueron homogenizados y lisados en 25 µl de buffer de lisis (Cell lysis buffer, Cell Signaling) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific) e inhibidores de fosfatasas (Phos-STOP de Roche). La concentración de proteínas en los distintos extractos fue determinada mediante métodos basados en la técnica de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Se sembraron 25 µg de extractos de proteína los cuales fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 4-20% con SDS (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels). Los geles fueron luego transferidos a membranas de PVDF (Immobilion-P, Millipore) y estas últimas bloqueadas por 1 hora a RT con 5% BSA en TBS-T (TBS con 0.1% Tween 20). Las membranas fueron incubadas a 4°C ON con el anticuerpo primario de cobayo anti-S6K total o [18] el anticuerpo de conejo anti-fosfoS6K de *Drosophila* (#9209, Cell Signaling) en TBS-T. Las membranas fueron lavadas extensivamente e incubadas por 1 hora a RT con los anticuerpos secundarios anti-IgG de cobayo o anti-IgG de conejo conjugados a la enzima peroxidasa (Thermo Fisher). Luego de una serie de lavados, las membranas fueron reveladas utilizando el reactivo de detección ECL (Cell Signaling).

## **9. Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa**

El ARN total de larvas completas o cuerpos grasos diseccionados de 10 individuos por réplica se extrajo utilizando el reactivo TRIZOL RNA Isolation Reagent (Invitrogen). Para extracción de ARN total de moscas adultas, se utilizaron 5 machos de 5 a 7 días post-eclosión por réplica. Luego, se sintetizó una cadena de ADN copia (ADNc) utilizando un cebador oligo(dT)<sub>18</sub> y la retrotranscriptasa RevertAid reverse

transcriptase (ThermoFisher) siguiendo el protocolo del proveedor. Se realizó PCR cuantitativa usando una alícuota del ADNc con los siguientes cebadores específicos:

**Tabla 2. Cebadores utilizados en determinaciones por RT-PCR cuantitativa.**

Gen	Cebador Izquierdo	Cebador Derecho
actin	CAAGTGCGAGTGGTGGGAAGTT	GCAGGTGGTTCCGCTCTTT
unk	GCCCATGTGGAACCTTGC	GCGCCGAGGAACGTGTTA
InR	GCTGTCAAGCAAGCAGTGAA	TCTTTTTACCCGTCGTCTCC
4EBP	AACCCTCTACTCCACCACTC	CAATCTTCAGCGACTTGG
dilp2	GTATGGTGTGCGAGGAGTAT	TGAGTACACCCCAAGATAG
dilp5	AGTTCTCCTGTTCTGATCC	CAGTGAGTTCATGTGGTGAG
Upd2	CGGAACATCACGATGAGCGAAT	TCGGCAGGAACTTGTACTCG
ccha2	AAACAGCAACAGCAGCAAAC	AGGACCACGGTGCAGATAAC
ccha1	AGTGCAGTTGGACTTTGGTAGTGT	AGGGATGCTGTTTAGCATCTATGAC
gbp1	ATCCTACCGCTGGTCTTCCTC	CTCCAGCAATATTCGGTTGTC
gbp2	CGCCTCCTTCGTATTATCCAG	CCAGATGGTTGTGGTCTATTG
GFP	CCCGACAACCACTACCTGA	CGGTCACGAACTCCAGCA
Sesn	TTCACCAGATACGGACACTGA	TCCGCTGCCTAACGATTACAG
TSC2	GAGCCGTTTATAGAAGCTCAAGG	GCTGCACAACCTCAATCTGGA
sun	ATGACTGCCTGGAGAGCTG	GTGAACTTCACATGGCTCGC

Para las determinaciones se utilizó el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System. Los valores de expresión fueron normalizados respecto a los niveles de transcripto de actina. En todos los casos, se colectaron tres muestras independientes para cada genotipo y condición.

## 10. Niveles de dILP2 en hemolinfa

Los niveles circulantes de dILP2 en la hemolinfa de larvas dILP2HF en condiciones WF o STV fueron cuantificadas por ELISA sándwich como descrito anteriormente (Park et al., 2014). Dos µl de hemolinfa fueron obtenidos cortando la carcasa de larvas previamente lavadas con PBS y mantenidas en hielo. La hemolinfa se recolectó en tubos con 55 µL de PBS frío. Para realizar el experimento de ELISA, se utilizaron los sobrenadantes de muestras centrifugadas a 1,000 g por 1 minuto. Placas recubiertas (Greiner 655061) fueron incubadas ON a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG (2.5 µg/ml, Sigma-Aldrich F1804) diluido en la solución buffer 0.2M carbonato de sodio/bicarbonato, pH 9.4. Las placas fueron lavadas con PBTw (0,2% Tween-20 en PBS) y bloqueadas con PBS con 2% BSA (Albúmina de suero bovino) ON a 4°C. Luego de una serie de lavados con PBTw, se adicionaron las hemolinfas diluidas. Las muestras fueron mezcladas con el anticuerpo anti-HA-Peroxidasa (Roche #12013819001) a una dilución de 1:350 en PBS-Tween-20 2%.

Las mezclas de anticuerpo y hemolinfa fueron incubadas ON a 4°C. Luego de otra serie de lavados, las placas se incubaron con el sustrato 1-Step Ultra TMB-ELISA (ThermoFisher #34029) por 25 min a RT. La reacción se detuvo adicionando ácido sulfúrico 2M y se midió la absorbancia a 450 nm de forma inmediata.

### **11. Determinaciones de metabolitos**

El contenido de triacilglicéridos (TAG), glucógeno y niveles de glucosa se determinaron como previamente descripto (Barrio et al., 2014). Larvas L3 (96h AEL) o adultos de 5 a 7 días pasada su eclosión fueron congelados en nitrógeno líquido y homogenizados en 200 µl de PBS. Las muestras se incubaron a 70°C por 10 minutos con el objetivo de inactivar enzimas endógenas que puedan degradar los distintos analitos. Para la cuantificación de glucosa en circulación, la hemolinfa de 15 larvas fue diluida 1:100 e incubada a 70°C por 5 minutos. Los niveles de TAG fueron determinados utilizando un kit de determinación de triacilglicéridos en suero (Sigma, TR0100), siguiendo el protocolo del fabricante. Para las determinaciones de glucógeno, 40 µl de los homogenatos fueron incubados en presencia y ausencia de 1 unidad de Amiloglucosidasa (Sigma-Aldrich, A7420) por 2h a 55°C y ensayadas utilizando un kit para determinación de glucosa (Glucose (GO) Assay Kit, Sigma GAGO-20).

La cantidad de glucógeno fue inferida de la diferencia del total de glucosa presente en muestras tratadas con amiloglucosidasa y en las muestras no tratadas. Los niveles de metabolitos fueron normalizados a la concentración de proteína (BioRad Protein Assay). Se realizaron 5 réplicas para cada genotipo y condición, y los resultados fueron representados como porcentaje de los niveles en la condición control de cada genotipo. En el caso de pretratamientos con cicloheximida (CXM), individuos adultos fueron transferidos entre 15h previas a los tratamientos de hambreado a tubos con papel de filtro empapado ya sea, con una solución al 5% de sacarosa para individuos control, o 5% de sacarosa y 35mM de CXM para individuos experimentales. Se realizaron análisis de t de Student para analizar la significancia estadística de los resultados.

### **12. Tiempo de desarrollo y tamaño de pupa**

En cuanto al tiempo de desarrollo, se recolectaron huevos por el lapso de 4h y larvas L1 fueron transferidas a tubos nuevos conteniendo tanto comida estándar (4% sacarosa) o comida rica en sacarosa (34% sacarosa) a una densidad de 50 larvas por tubo. Las larvas fueron crecidas a 25°C y se contabilizo el número de pupas

desarrolladas a diferentes tiempos. Se realizaron 5 tubos replica para cada genotipo y condición y se analizaron los porcentajes de animales capaces de entrar en el estadio de pupariación.

En cuanto a la medición de tamaño de pupa, una vez alcanzado ese estadio, al menos 30 individuos para cada genotipo y condición se transfirieron a placas de Petri con la ayuda de un pincel húmedo y obtuvieron imágenes utilizando el estereoscopio Leica MZ10F Stereoscope. Los diámetros de Feret de las pupas fueron obtenidos a partir del procesamiento de imágenes utilizando Fiji software, utilizando un macro desarrollado exclusivamente para tal fin (Figura 16).

```
input = getDirectory("Input");

function processFolder(input) {
    list = getFileList(input);
    open(input+list[1]);
    Dialog.create("Escala");
        Dialog.addNumber("1 cm =",0,0,0,"pixeles");
    Dialog.show();
        n = Dialog.getNumber();
    run("Set Scale...", "distance=&n known=1 unit=cm global");
    //setBatchMode(true);
    run("ROI Manager...");
    t = roiManager("count");
    if (t>=0)
        roiManager("Delete");
    for (i = 0; i < list.length; i++)
    action(input, list[i]);
    //setBatchMode(false);
    run("Clear Results");
    selectWindow("ROI Manager");
    e = roiManager("count");
    for (i=0; i<e; i++) {
        roiManager("select", i);
        run("Convex Hull");
            roiManager("Update");
            roiManager("Measure");
    }
}

function action(input, filename) {
    open(input+filename);
    // Color Thresholder 2.0.0-rc-49/1.51f
    // Autogenerated macro, single images only!
    min=newArray(3);
    max=newArray(3);
    filter=newArray(3);
    a=getTitle();
    run("HSB Stack");
    run("Convert Stack to Images");
    selectWindow("Hue");
    rename("0");
    selectWindow("Saturation");
```

```

rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]= XX;
max[0]= XX;
filter[0]="pass";
min[1]= XX;
max[1]= XX;
filter[1]="pass";
min[2]= XX;
max[2]= XX;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
// Colour Thresholding-----
//setThreshold(255, 255);
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
run("Close-");
run("Fill Holes");
run("Analyze Particles...", "size=0.01-Infinity
show=Outlines display exclude add");
}

close();

```

**Figura 16.** Macro utilizado para la cuantificación de tamaño de pupa. Los campos marcados con "XX" deben ser reemplazados manualmente por aquellos valores obtenidos de la configuración del fondo en color (*Color background*).

Este macro consiste en el procesamiento automático de todas las imágenes dentro de una misma carpeta, y el resultado son una lista de selecciones, cada una correspondiendo a una pupa individual. Los diámetros de Feret máximos y mínimos obtenidos en la ventana de resultados de esas selecciones son luego utilizados en el cálculo de volumen de pupa según la fórmula  $4/3p(L/2)(l/2)^2$  (L, largo o "Feret Máximo"; l, diámetro a lo ancho o "Feret mínimo"). Los valores de tamaños de pupa se muestran en relación a aquel de animales control.

### 13. Secuenciación masiva de ARN, agrupamientos y análisis de enriquecimiento de genes

Se prepararon muestras independientes de FBs de 10 larvas L3 control (*cg-Gal4/+*) y aquellas expresando una versión dominante negativa para P53 (*cg-Gal4/UAS-P53<sup>H159.N</sup>*). Esto se realizó por duplicado para condiciones WF y por triplicado para condiciones STV. Las extracciones de ARN se llevaron a cabo utilizando el kit Direct-zol RNA Miniprep (ZYMO Research). La preparación de la biblioteca, amplificación y secuenciación fueron llevadas a cabo por las Instalaciones Biopolymers de la escuela de medicina de Harvard utilizando una plataforma NextSeq 500.

Las lecturas fueron recortadas utilizando Trimmomatic (versión 0.36, (Bolger et al., 2014)) y mapeadas contra el genoma de *Drosophila melanogaster* (*dmel\_r6.27*) obtenido de la base de datos FlyBase (Thurmond et al., 2019), utilizando STAR (versión 2.5.2b, (Dobin et al., 2013)) con la anotación correspondiente (*dmel-all-r6.27*) y una longitud máxima de intrones de 50000. Luego, los conteos en cada gen fueron calculados con featureCounts (versión 1.6.2, (Liao et al., 2014)) y utilizados para identificar genes expresados diferencialmente con DESeq2 (versión 1.20.0, (Love et al., 2014)) filtrando genes con un conteo menor a 10.

En cuanto al agrupamiento de genes, aquellos diferencialmente expresados en cada genotipo y condición fueron comparados entre sí y cada set de genes intersección fue subdividido en grupos jerárquicos. La subdivisión en estos grupos se llevó a cabo inspeccionando el dendograma de agrupamiento y el *heatmap* de los distintos perfiles de expresión correspondiente a cada grupo. La jerarquización fue realizada basándose en el perfil de expresión en cuatro contrastes utilizando 1 correlación como medida de distancia.

El análisis de enriquecimiento por ontología de genes o *Gene ontology* (GO) de los transcritos significativamente inducidos o reprimidos fue llevada a cabo a través de topGO (Alexa et al., 2006) en R (R Development Core Team 3.0.1., 2013). La significancia fue determinada de manera clásica, utilizando test de Fisher, y un valor de *p* de corte de 0.01. FlyMine v49 (<https://www.flymine.org>) y DAVID v6.7 (<https://david.ncifcrf.gov/>) fueron también utilizadas para el análisis GO y de enriquecimiento de vías (KEGG).

Los datos de la secuenciación de ARN fueron depositados en el Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA; <https://www.ebi.ac.uk/ena>) bajo el número de acceso PRJEB37654.

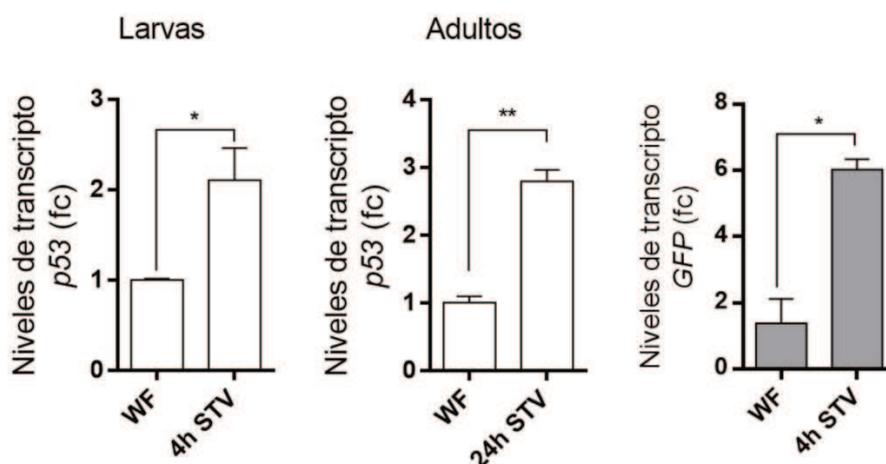
## **RESULTADOS**

## 1. Relevancia de p53 para la adaptación a distintas condiciones nutricionales

En pos de cumplir con el objetivo general y el primer objetivo particular de esta tesis, y antes de sumergirse en el proceso de autofagia *per se*, se propone inicialmente corroborar que el gen *p53* es capaz de responder a las condiciones de hambreado a nivel molecular. Luego, se analizarán los efectos metabólicos generados por la depleción de este gen específicamente en el FB, entre ellos la inhibición del proceso de autofagia.

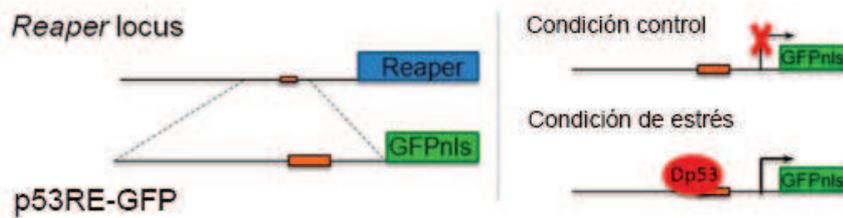
### 1.1 Regulación transcripcional y de la actividad de p53 en el FB bajo condiciones de hambreado

Como mencionado en la introducción de esta tesis, anteriormente se ha observado que p53 juega un papel importante en el metabolismo y en la respuesta a estrés nutricional. Dado estos antecedentes, se propuso evaluar en larvas y adultos de *Drosophila* sometidos a falta de nutrientes tanto la regulación a nivel transcripcional como los niveles de actividad transactivacional del factor de transcripción p53. Para evaluar la regulación transcripcional de este gen, se midieron los niveles de transcritpo en animales *w<sup>1118</sup>* en condiciones control y frente a la falta de nutrientes. Se observó un aumento claro de los niveles de transcritpo de p53 en larvas luego de 4 h de hambreado y en adultos luego de 24 h de hambreado (Figura 18). La inducción de este gen en condiciones de hambreado sugiere que p53 forma parte de la respuesta transcripcional a la privación de nutrientes.

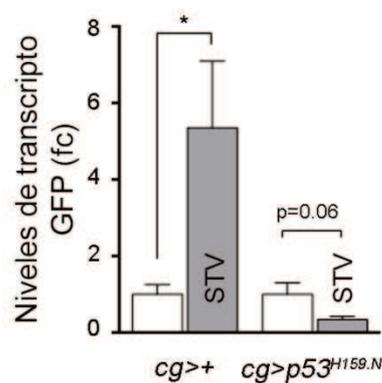


**Figura 17.** Inducción en los niveles de transcritpo y actividad de p53 frente a periodos de hambreado. En barras blancas, niveles de transcritpo de p53 en cuerpos grasos de larvas y adultos completos sometidos a 4 y 24 horas de hambreado (4h STV y 24h STV, respectivamente). En barras grises, niveles de GFP en FBs de larvas pRE-GFP en condiciones control y a 4h STV. Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$ .

Con el fin de corroborar que la inducción a nivel transcripcional de p53 en respuesta a periodos de hambreado es acompañada de un aumento en la actividad de este factor de transcripción, se utilizó la herramienta p53RE-GFP (Wylie et al., 2014). Esta herramienta contiene la secuencia de GFP precedida por un fragmento conteniendo un sitio de unión consenso para p53 (Figura 18). Animales portando esta construcción fueron sometidos a periodos de hambreado y los niveles de GFP fueron medidos mediante RT-qPCR. El aumento de transcritos de GFP en condiciones de privación de nutrientes indica que un aumento en la actividad de p53 acompaña la inducción de este gen observada anteriormente. Asimismo, este aumento en los transcritos de GFP es específico de p53 en el FB, dado que no se observa inducción del reportero luego de la expresión de una versión dominante negativa de p53 en ese órgano (Figura 19).



**Figura 18.** Esquema de la construcción de ADN presente en el reportero p53RE-GFP; modificado de Wylie et al., 2014. Un fragmento de 150 bp, proveniente del locus del gen *reaper* y conteniendo un sitio de unión consenso de p53 (caja en color anaranjado), se ubicó corriente arriba de una secuencia de GFP con una señal de localización nuclear (nls). El estímulo o condiciones de estrés que activen el factor de transcripción p53 inducen la expresión de la proteína GFP (Wylie et al., 2014).



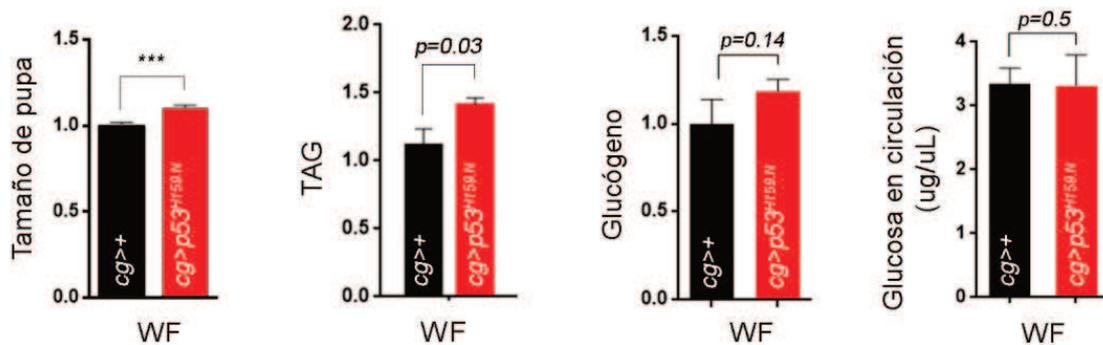
**Figura 19.** Inducción del reportero p53RE-GFP en adultos en condiciones control y sometidos a 24 h de hambreado. La inducción observada del reportero se revierte al expresar en el FB una versión dominante negativa de p53 (p53<sup>H159.N</sup>) bajo el control de *cg-GAL4*. Las barras de error representan SEM. \* p<0.05.

## 1.2 Implicancias metabólicas de la depleción de la actividad p53 en el FB

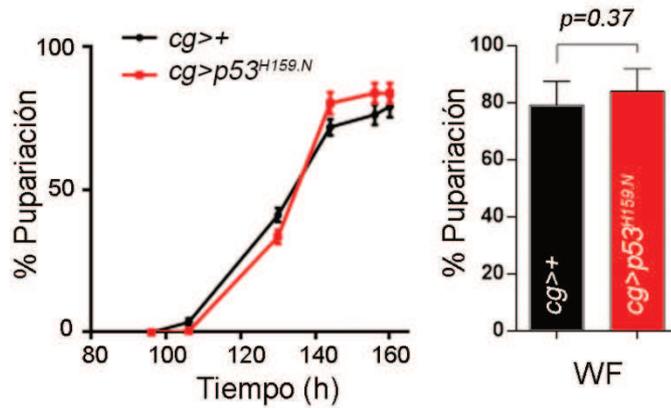
A partir de la modulación observada a nivel molecular de p53 frente a condiciones nutricionales adversas, se analizaron las consecuencias metabólicas de restringir la actividad de este gen específicamente en el FB frente a diferentes condiciones nutricionales. Esto se realizó mediante la utilización de su versión dominante negativa p53<sup>H159.N</sup>, cuya mutación en el residuo número 159 interfiere con su estructura tridimensional y no permite su unión al ADN.

### 1.2.1 Depleción de p53 en condiciones control

En principio se analizó si la expresión del transgen p53<sup>H159.N</sup> genera alteraciones metabólicas en condiciones de alimentación óptima. Crecidas bajo una dieta normal, larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* mostraron diferencias con respecto al tamaño de pupa y nivel de triacilglicéridos. Sin embargo, estos individuos no mostraron diferencias respecto del contenido de glucógeno y concentraciones de glucosa en circulación (Figura 20, (Barrio et al., 2014)). Tampoco presentaron diferencias en el tiempo de desarrollo ni en el nivel de pupariación con respecto al genotipo control (Figura 21). Estos resultados sugieren que, principalmente en lo que respecta al metabolismo de azúcares, la falta de actividad p53 en el FB no afecta la homeostasis metabólica de forma significativa en condiciones óptimas de alimentación.



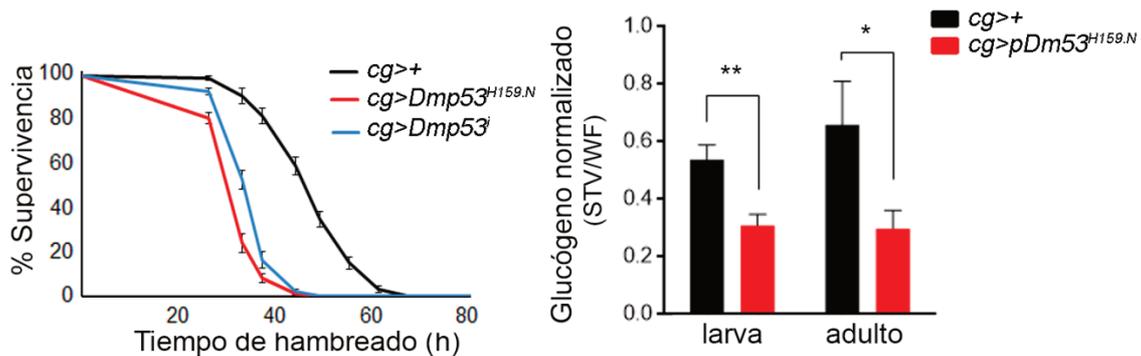
**Figura 20.** Medidas metabólicas luego de la depleción de la actividad de p53 en el FB de individuos crecidos en condiciones control. Todos los valores fueron normalizados al genotipo control. Las barras de error representan SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 21.** Tiempo de desarrollo hasta alcanzar el estadio de pupa y niveles de pupariación en individuos sin actividad de p53 en el FB. Las barras de error representan SEM.

### 1.2.2 Depleción de P53 frente a condiciones de hambreado

El análisis del rol de p53 frente a la falta de nutrientes se realizó utilizando moscas adultas carentes de actividad p53 en el FB ya sea por expresión de la versión P53<sup>H159.N</sup> o la expresión de un ARN de interferencia (p53<sup>i</sup>). En línea con reportes previos (Barrio et al., 2014), estos individuos exhibieron una clara reducción en la tasa de supervivencia, acompañada de un consumo acelerado de reservas de glucógeno (Figura 22). Asimismo, el mismo comportamiento se observó en larvas L3 sometidas a un tratamiento de hambreado de 4 horas, indicando que, tanto en estadios de larva como adulto, p53 juega un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis metabólica frente a la falta de nutrientes.

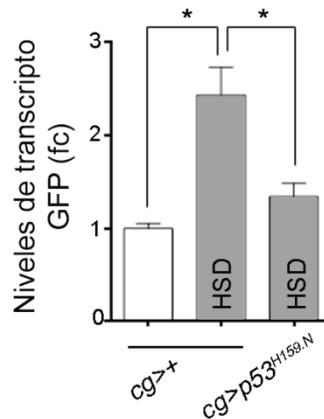


**Figura 22.** Curva de supervivencia y niveles de glucógeno en larvas y adultos *cg>+* y *cg>P53<sup>H159.N</sup>*. Las medidas de glucógeno se realizaron a las 24 y 4h en adultos y larvas, respectivamente. Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$ .

### 1.3 p53 en individuos crecidos bajo dieta rica en azúcares o HSD

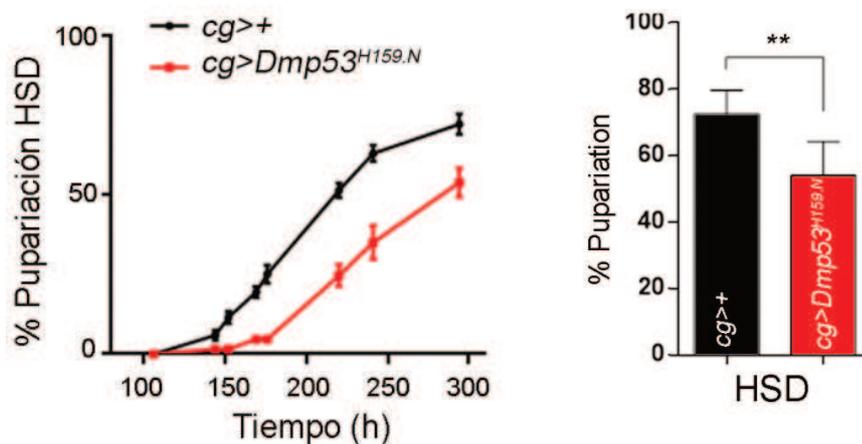
En pos de analizar un posible rol general de p53 en el mantenimiento de la homeostasis metabólica bajo distintos tipos de estrés nutricional, se analizó el

comportamiento de la actividad de este factor de transcripción en individuos crecidos en dietas ricas en sacarosa (*High-Sugar Diet*, HSD). El tratamiento con altas concentraciones de azúcar, de forma análoga a lo observado en condiciones de hambreado, derivó en una inducción del reportero p53RE-GFP que, a su vez, se ve revertida por la expresión de p53<sup>H159.N</sup> (Figura 23).



**Figura 23.** Actividad de p53 en individuos adultos crecidos en dietas ricas en sacarosa. Las barras de error representan SEM. \* p<0.05.

Dado que condiciones HSD inducen la actividad de p53, se analizaron posibles efectos en el tiempo de desarrollo para individuos crecidos en este tipo de dieta en relación a aquellos crecidos en condiciones control. Se observó que la falta de actividad p53 en el FB de individuos crecidos en HSD deriva en una menor viabilidad (medida como el número de individuos capaces de alcanzar el estadio de pupa o % de pupariación) y tiempos de desarrollo más largos (Figura 24). Estos resultados sugieren que p53 se encuentra involucrado en la respuesta no sólo al hambreado sino a otros tipos de estrés nutricional.

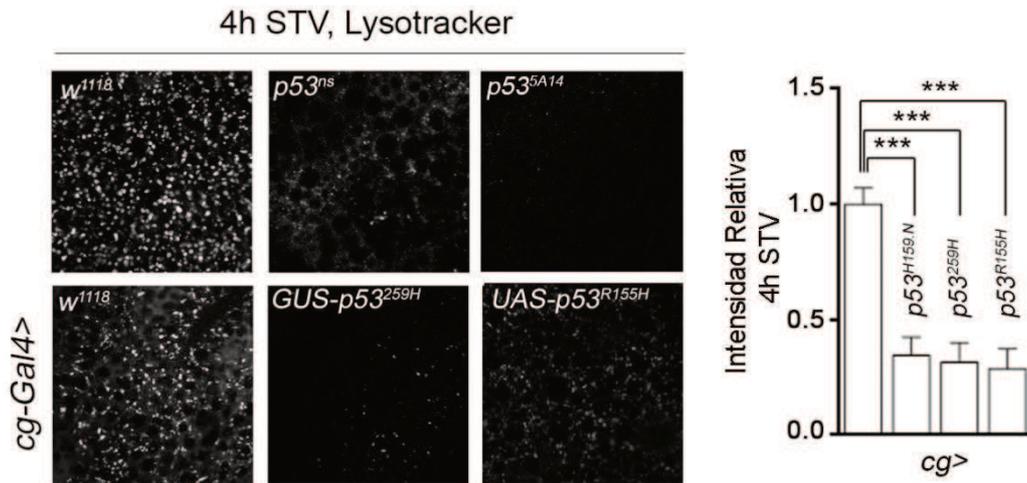


**Figura 24.** Tiempos de desarrollo y niveles de pupariación en individuos sin actividad P53 en el FB crecidos en dieta control y rica en sacarosa (HSD). Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$ .

## **2. p53 y la inducción de autofagia frente a la falta de nutrientes**

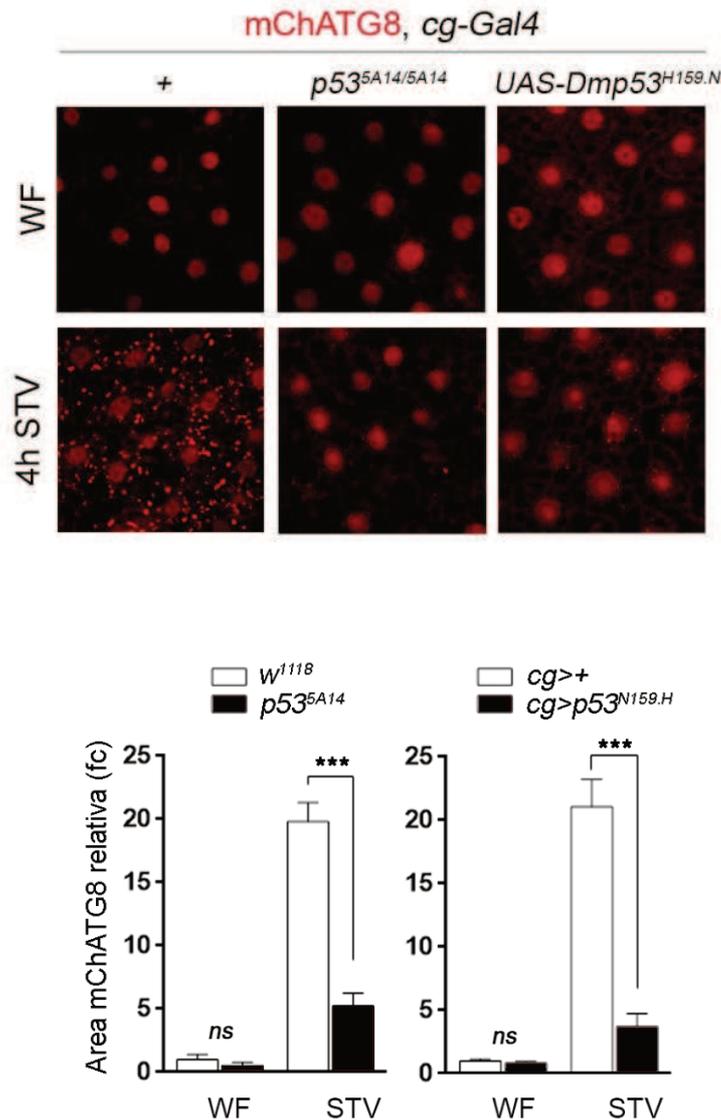
La correcta inducción de autofagia es necesaria para la movilización de reservas y para la supervivencia frente a la falta de nutrientes. En ciertos contextos, p53 es capaz de regular este proceso metabólico (Levine & Abrams, 2008; Tasdemir et al., 2008) por lo que se propuso analizar el rol de esta proteína en la inducción de autofagia en respuesta al hambreado.

Por un lado, se realizaron tinciones con LysoTracker, un marcador químico de vesículas ácidas. Se evaluó la intensidad de este marcador como medida de la inducción de autofagia en FBs de larvas hambreadas por un periodo de 4h (4h STV) de genotipos control y mutantes para p53 ( $p53^{ns}$ ,  $p53^{5A14}$ ). Los niveles de intensidad de LysoTracker observados en larvas control fueron significativamente mayores a aquellos observados en líneas mutantes para p53 (Figura 25). Para analizar si este fenómeno era debido a la función de p53 específicamente a nivel del FB, se expresaron proteínas con actividad dominante negativa para este gen ( $p53^{H159N}$ ,  $p53^{259H}$ ,  $p53^{R155H}$ ) dirigidas específicamente al FB al combinarlas con la línea *cg-GAL4*. Efectivamente, la intensidad presentada en los animales control fue significativamente mayor a la observada en individuos carentes de actividad p53, sugiriendo un rol para esta proteína específico a nivel de FB en la inducción de autofagia frente a la falta de nutrientes.



**Figura 25.** Inhibición de la inducción de autofagia frente a la falta de nutrientes en el FB de larvas por alelos de pérdida de función para P53. El seguimiento de la inducción de autofagia se observa mediante la intensidad del marcador LysoTracker. La inducción de autofagia observada a 4h STV en individuos control ( $w^{1118}$ ) no se observa en la presencia de alelos que afectan la función de P53 (alelos mutantes  $p53^{ns}$  y  $p53^{5A14}$ ; y las versiones dominante-negativas  $p53^{259H}$  y  $p53^{R155H}$ ). Se muestran las cuantificaciones de intensidad relativa al genotipo control para  $p53^{H159.N}$  (ver Figura 27),  $p53^{259H}$  y  $p53^{R155H}$ . Las barras de error representan SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ .

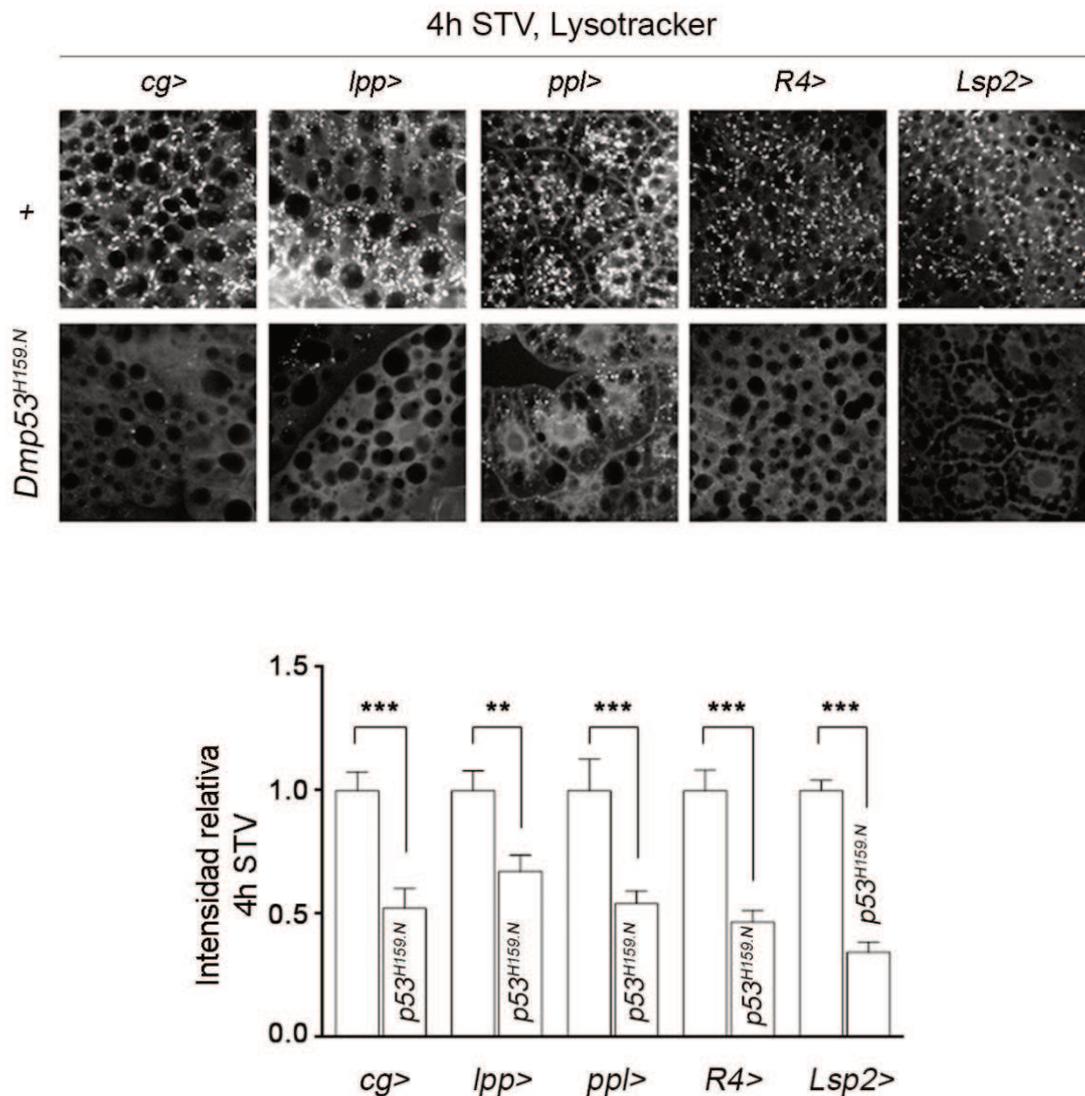
Dado que la tinción con LysoTracker alcanza a todo tipo de vesículas ácidas, se utilizó el marcador mCherryATG8, un marcador específico de vesículas autofágicas. ATG8 es una proteína ortóloga a LC3 en mamíferos y se encuentra involucrada en la formación de las membranas de los autofagosomas, constituyéndose así como marcador específico de autofagosomas y autofagolisosomas (Scott et al., 2004). De esta manera, esta proteína, en respuesta a estímulos que inducen el proceso de autofagia, es conjugada a las membranas de vesículas autofágicas. Líneas confeccionadas para la expresión específica de este marcador en el FB ( $cg > mCherryATG8$ ) resultaron en una marcación ubicua en condiciones control y en puntos distribuidos a lo largo del citoplasma de células del FB luego de 4h de hambreado (4h STV, Figura 26, ver paneles de línea control +) indicando la inducción de autofagia. Asimismo, larvas combinando esta línea con alelos  $p53^{5A14}$  presentaron una clara inhibición de autofagia luego del tratamiento de hambreado al ser comparadas con individuos control (+). Animales expresando  $p53^{H159.N}$  se comportaron de manera similar (Figura 26). A partir de estos resultados resulta evidente la existencia de un rol para p53 en la inducción de autofagia frente a la privación de nutrientes.



**Figura 26.** Inhibición de la inducción de autofagia frente a la falta de nutrientes en el FB de larvas por alelos de pérdida de función para p53. Inducción de autofagia mediante el seguimiento del marcador mCherryATG8. La inducción de autofagia observada a 4h STV en individuos control (+) no se observa en la presencia de alelos que afectan la función de P53 (alelo mutante  $p53^{5A14}$  y la versión dominante negativa  $p53^{H159.N}$ ). Las barras de error representan SEM. \*\*\*  $p<0.001$ .

En esta serie de experimentos, la utilización de forma única de la línea cg-GAL4 para dirigir la expresión de los distintos transgenes específicamente al FB da a lugar a que posibles artefactos asociados a esta línea deriven erróneamente en los resultados observados. En este sentido, uno de ellos podría ser la expresión no deseada en otros tejidos distintos al FB. Con el fin de descartar esta posibilidad se utilizaron líneas adicionales GAL4 que se expresan específicamente en este órgano (ppl-GAL4, lsp2-GAL4, R4-GAL4 y lpp-GAL4). En todos los casos se observó una

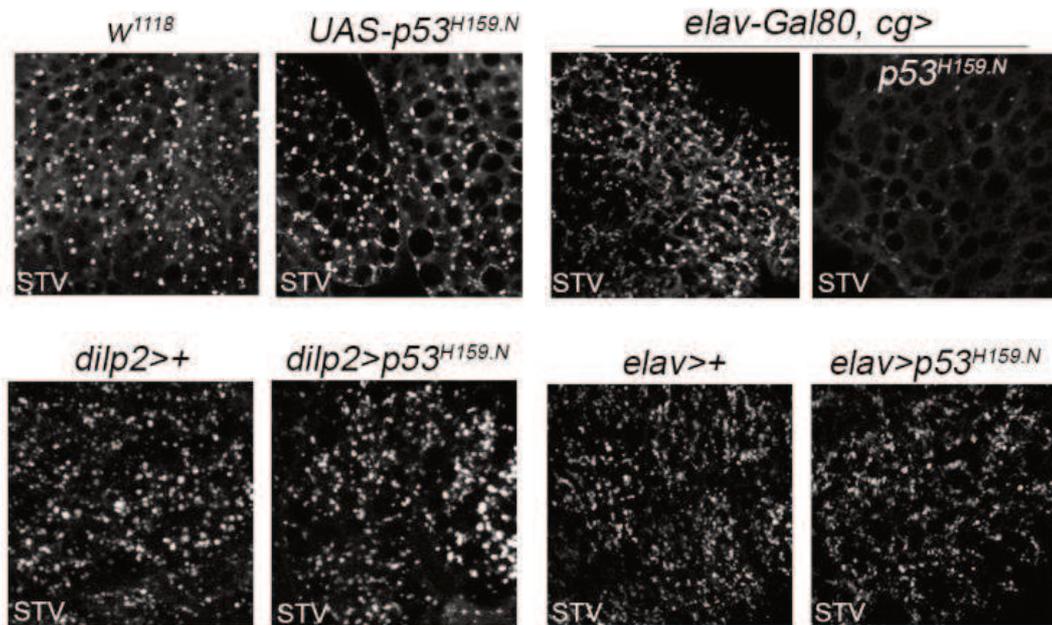
clara inhibición de autofagia, similar a lo obtenido con la línea GAL4 utilizada originalmente (Figura 27).



**Figura 27.** Inhibición de autofagia mediante la expresión del transgen p53<sup>H159.N</sup> utilizando diferentes líneas GAL4. El seguimiento de la inducción de autofagia se observa mediante la intensidad del marcador Lysotracker. Las barras de error representan SEM. \*\*\* p<0.001 y \*\* p<0.01.

En segundo lugar, podría existir una expresión no deseada o *leakage* proveniente, esta vez, de las líneas UAS utilizadas. Para descartar esta posibilidad se ensayaron larvas de la línea UAS-p53<sup>H159.N</sup> sin combinarlas con líneas GAL4. Esto se realizó con el fin de corroborar que el efecto observado en los experimentos anteriores proviene de la expresión en el FB, generada exclusivamente por su cruce con las líneas GAL4. Descartando esta posibilidad, la línea UAS-p53<sup>H159.N</sup> no presento ningún

fenotipo relacionado a autofagia, cuyos niveles en el FB fueron idénticos a los observados en larvas control (Figura 28).

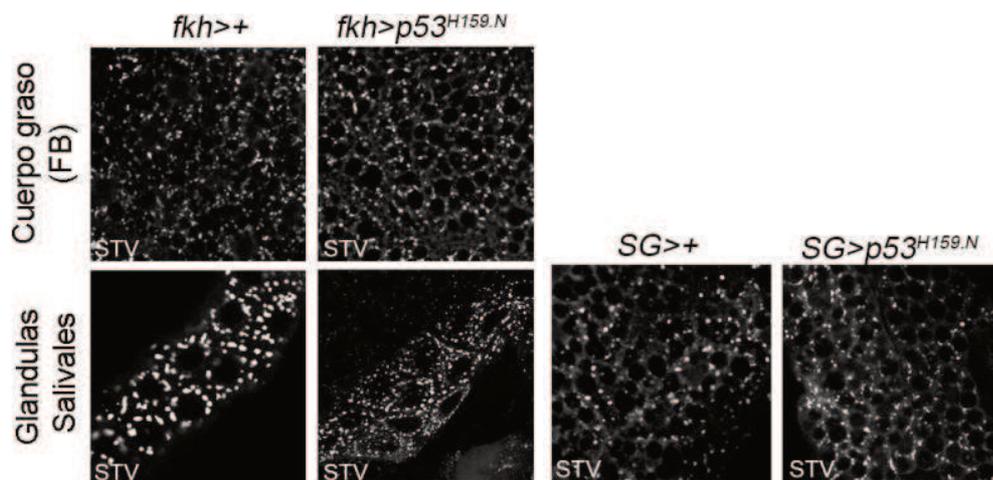


**Figura 28.** La actividad de p53 es necesaria específicamente en el FB para la inhibición de autofagia frente a la privación de nutrientes. **(A)** Los niveles de autofagia en la línea  $UAS-p53^{H159.N}$  son equivalentes al control, descartando que los resultados se deriven de artefactos en esta línea **(B)** La expresión de Gal80 en el cerebro no altera la inhibición de autofagia en larvas  $cg>p53^{H159.N}$  **(C)** La expresión de  $p53^{H159.N}$  específicamente en las IPCs ( $dilp2>p53^{H159.N}$ ) o en el cerebro ( $elav>p53^{H159.N}$ ) no altera los niveles de autofagia en el FB.

Por otro lado, se ha reportado que p53 es capaz de regular la secreción desde las IPCs de péptidos dILPs, los cuales, a su vez, son capaces de regular el proceso de autofagia (Hasygar & Hietakangas, 2014). Para descartar un rol en nuestro contexto de este mecanismo ya descrito, se dirigió la expresión del transgen  $p53^{H159.N}$  específicamente a las neuronas IPCs ( $dilp2-GAL4$ ). En este caso tampoco se observó ningún efecto en la inducción de autofagia en el FB (Figura 28), eliminando la posibilidad de que la actividad de p53 en las IPCs sea relevante en este contexto. También se utilizaron otros GAL4 abarcando el cerebro completo ( $Elav-GAL4$ ) y las glándulas salivales ( $SG-GAL4$  y  $fhk-GAL4$ ). La expresión de  $p53^{H159.N}$  en cada uno de estos tejidos no afectó la intensidad de LysoTracker observada en el FB con respecto a individuos control (Figura 28). Finalmente se realizó un último experimento expresando  $p53^{H159.N}$  en el FB y proteína GAL80 en el cerebro ( $elav-Gal80$ ), de forma simultánea. La proteína GAL80 es capaz de unir la proteína GAL4 e inhibir su unión al sitio UAS, en este caso, impidiendo la expresión no intencionada de  $p53^{H159.N}$  en el cerebro. Como resultado, se observó que larvas  $cg>p53^{H159.N}$  no eran capaces de inducir autofagia incluso frente a la expresión simultánea de  $elav-Gal80$  (Figura

29.Figura 29). Una vez más, los resultados indicaron que la actividad de p53 específicamente en el FB es relevante para la inducción de autofagia en este órgano.

Sabiendo que la actividad de p53 regula la inducción de autofagia en el FB, sería importante dilucidar si, de forma análoga, la actividad de p53 en otros órganos distintos del FB podría regular autofagia en esos mismos órganos. Para evaluar esta posibilidad se expresó p53<sup>H159.N</sup> en las glándulas salivales (fkh-GAL4 y SG-GAL4), y se ensayó la inducción de autofagia tanto en FB como en las mismas glándulas salivales. Los niveles de autofagia en las glándulas salivales de individuos *fkh-p53<sup>H159.N</sup>* fueron equiparables al control confirmando un rol de p53 que sólo se observa a nivel del FB (Figura 29). A su vez, la expresión de p53<sup>H159.N</sup> dirigida por fkh-GAL4 y SG-GAL4 tampoco afecto la inducción de autofagia en el FB (Figura 29) descartando a su vez un efecto sistémico proveniente de la perdida de actividad de p53 en las glándulas salivales.

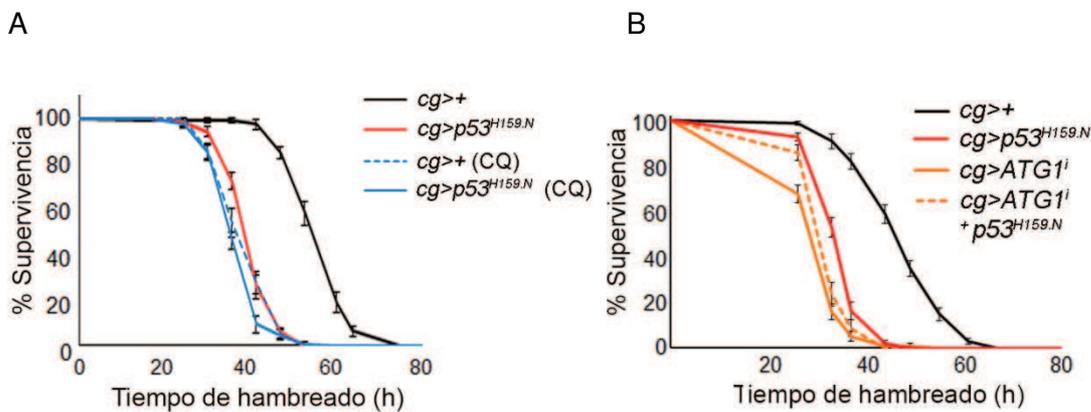


**Figura 29.** La expresión de p53<sup>H159.N</sup> en glándulas salivales no altera los niveles de autofagia en este órgano ni en el FB. Los niveles de autofagia se monitorearon mediante tinciones con LysoTracker.

### 3. Rol de autofagia y p53 en la supervivencia a la falta de nutrientes

Como mencionado anteriormente, tanto el proceso de autofagia como la proteína p53 son importantes para la supervivencia a periodos de hambre. A su vez, gran parte de los resultados anteriores indican que, al menos en nuestro contexto, estos elementos se encuentran interrelacionados. La posibilidad de que las mayores tasas de supervivencia conferidas por p53 ocurran a través de su participación en el proceso de autofagia se exploró mediante la realización de varios experimentos. En primer instancia, se utilizó la droga hidroxicloroquina (CQ), la cual inhibe la fusión de autofagosomas con lisosomas impidiendo la correcta inducción de autofagia. Luego de

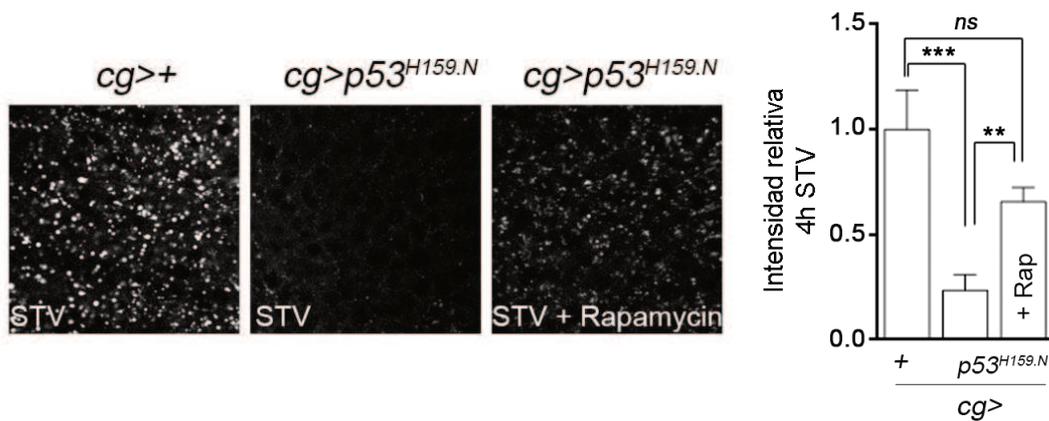
pretratamientos con esta droga, se sometieron individuos de distintos genotipos a la privación total de nutrientes y se evaluó su tasa de supervivencia. En el caso de que p53 actúe vía otros mecanismos distintos de autofagia para conferir resistencia al hambre, se esperarían resultados aditivos entre la inhibición de autofagia y la disminución de la actividad de p53. Sin embargo, estos efectos aditivos no se observaron al ensayar individuos de dichas características (Figura 30). Asimismo, las curvas de supervivencia de individuos carentes de actividad de p53 en el FB fueron altamente similares a curvas de individuos tratados con CQ. Resultados semejantes fueron obtenidos mediante el uso de un ARN de interferencia expresado en el FB para el gen *ATG1*, un gen esencial para la inducción de autofagia (Figura 30, B). Todos estos datos sugieren que p53 y autofagia formarían parte de un mismo mecanismo de resistencia a la privación de nutrientes.



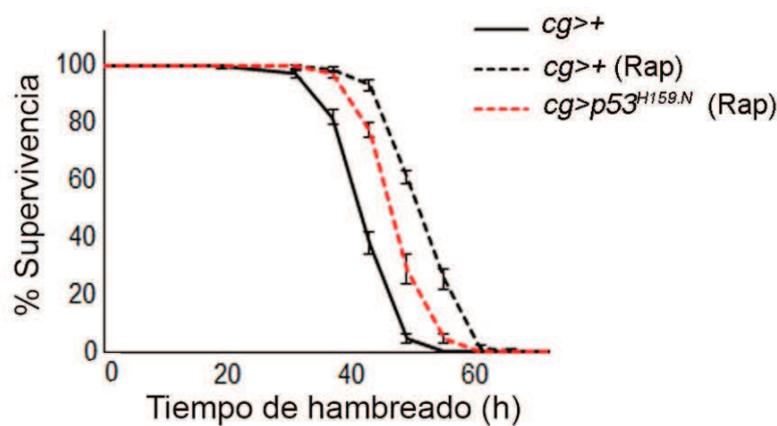
**Figura 30.** Supervivencia a la falta de nutrientes de individuos control y *cg>p53<sup>H159.N</sup>* al inhibir la vía de la autofagia. Tanto el tratamiento con la droga inhibitoria de autofagia Hidroxicloroquina (CQ, **(A)**) como la expresión del ARN de interferencia contra el gen *ATG1* necesario para autofagia (**(B)**) generan sensibilidad al tratamiento de hambre de forma similar a lo observado en animales *cg>p53<sup>H159.N</sup>* y, además, no presentan efectos aditivos en cuanto a la supervivencia de estos animales.

Estudios previos han demostrado que pretratamientos con rapamicina en *Drosophila* incrementan significativamente la tasa de supervivencia al hambre (Bjedov et al., 2010). Estos datos, junto a los rescates de autofagia en larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>*, llevaron a proponer un posible rescate de la supervivencia al hambre comprometida en estos mismos animales. El pretratamiento con rapamicina, a pesar de incrementar en gran medida la tasa de supervivencia al hambre en individuos control, sólo generó un rescate parcial en el caso de individuos *cg>p53<sup>H159.N</sup>* (Figura 31, B). Estos resultados, consistentes con los experimentos de autofagia, indican un rol parcial para la vía TOR en la inducción de autofagia mediada por p53.

A

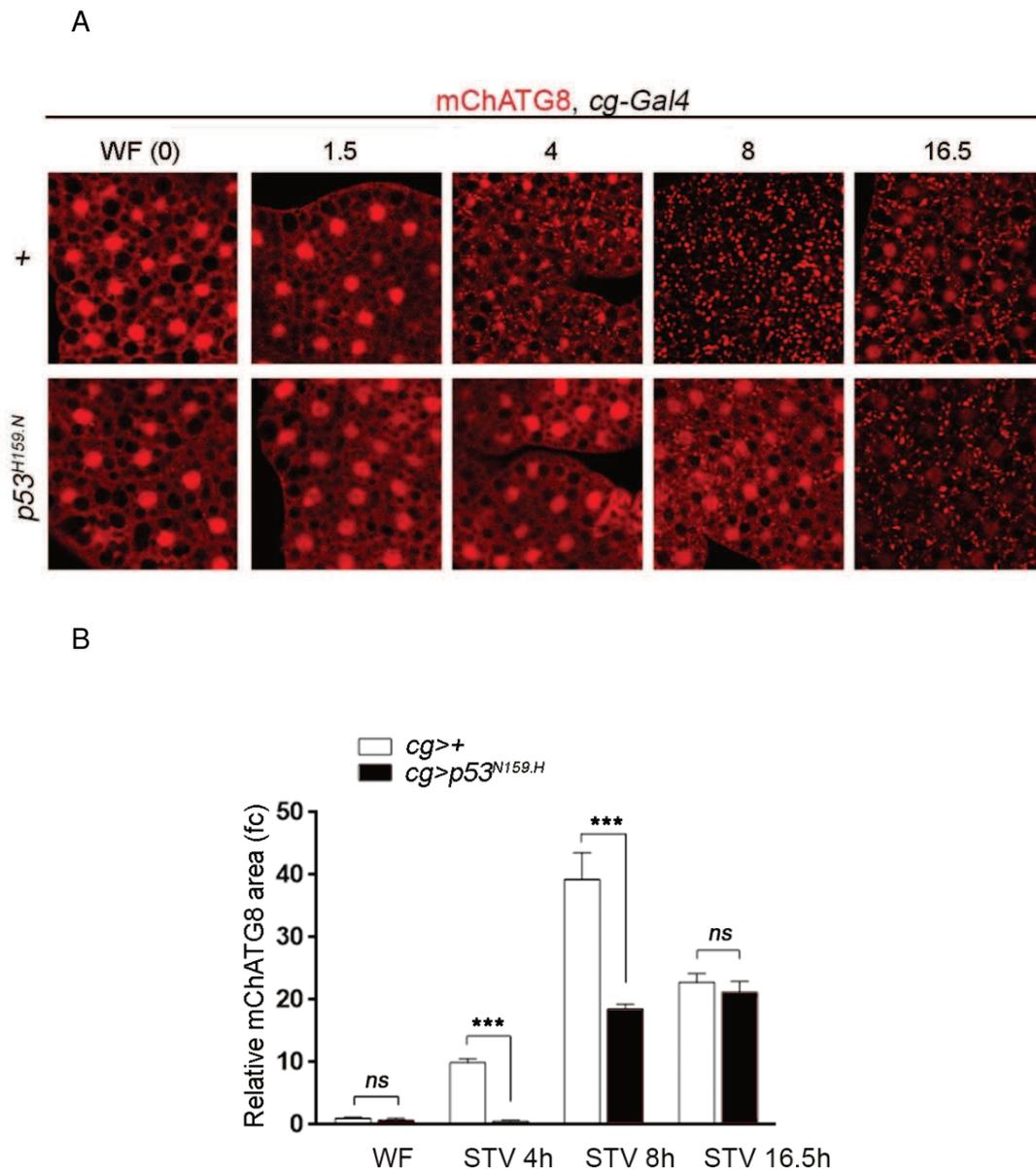


B



**Figura 31.** Inducción de autofagia y cuantificación respectiva **(A)** y curva de supervivencia de adultos **(B)** frente a la privación de nutrientes de individuos control y carentes de actividad de p53 en el FB sin y con pretratamiento con Rapamicina. Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

Todos estos resultados evidencian un rol claro para p53 en la inducción de autofagia frente a la falta de nutrientes. Para corroborar hasta qué punto autofagia depende de p53, se realizaron determinaciones a distintos tiempos analizando la cinética del proceso. Teniendo en cuenta que el nivel de autofagia en el FB de larvas control alcanza un máximo luego de las 4h de hambreado (Scott et al., 2004), se observó un claro retraso de aproximadamente 4h en la inducción de este proceso en animales  $cg > p53^{H159.N}$  (Figura 32). La capacidad de animales  $cg > p53^{H159.N}$  de inducir autofagia, a pesar de ocurrir a destiempo, indica que p53 no forma parte de la maquinaria autofágica sino que sugiere un rol, más bien, en la regulación de este proceso. En este sentido, la actividad de p53 podría ser necesaria para mecanismos relacionados al *sensado* de nutrientes, los cuales actúan como desencadenantes de la respuesta autofágica.

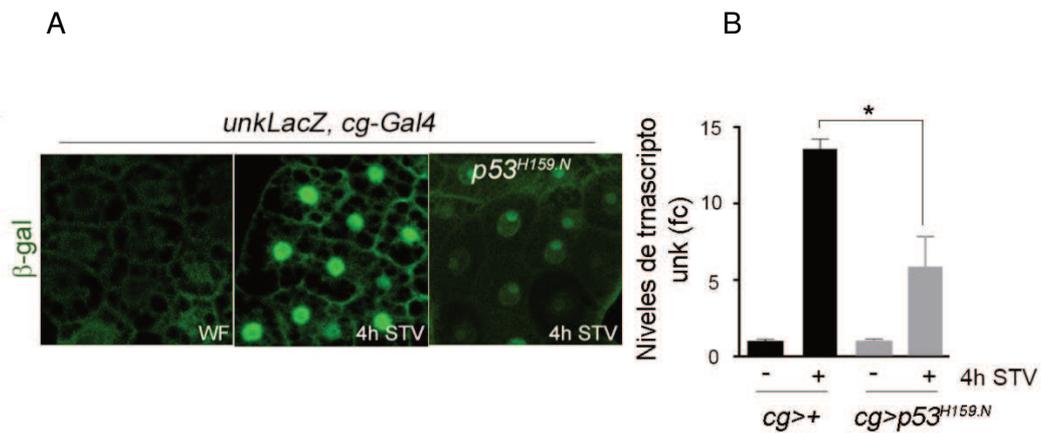


**Figura 32. (A)** Inducción de autofagia monitoreada con el marcador mCherryATG8 en FB de larvas sometidas a distintos tiempos de hambreado en FBs de larvas control (*cg>w<sup>1118</sup>*) y expresando p53<sup>H159.N</sup> en el FB. **(B)** Cuantificación de autofagia medida por el área de los puntos de mCherryATG8 en un mismo campo observado a distintos tiempos de hambreado en FBs de larvas de los genotipos indicados. Las barras de error representan SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4. p53 y la regulación de la vía TOR por falta de nutrientes

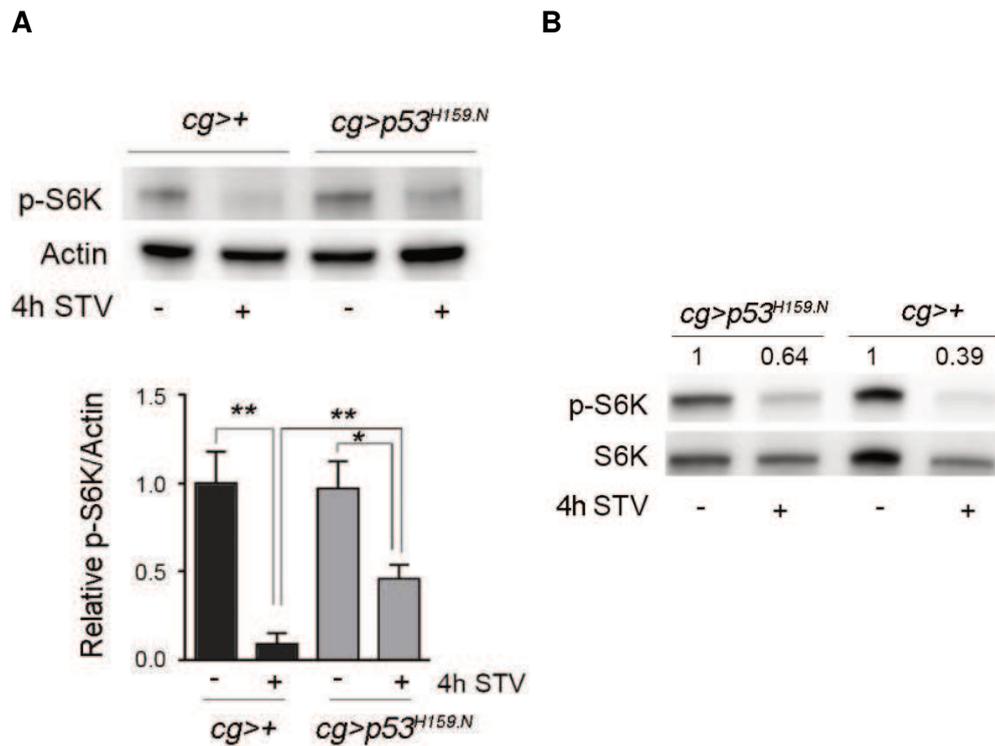
Al ser la vía TOR un regulador común del metabolismo energético y autofagia y una de las principales vías encargada del *sensado* de nutrientes, se prosiguió a ahondar en el efecto de la falta de actividad p53 sobre esta vía. En primer instancia, se utilizó un reportero transcripcional de *unk*, *unk-lacZ*. Este reportero posee una región *enhancer* dimerizada presente en el intrón 2 del gen *unk*, la cual es fuertemente inducida por inhibición de TORC1 (Tiebe et al., 2015). Como de esperar, luego del tratamiento de hambreado se observó una clara inducción de la expresión de *unk-lacZ*

en células del FB, la cual es drásticamente reducida al bloquear la actividad de p53 (Figura 33, A). A su vez, se evaluaron por RT-qPCR los niveles endógenos del gen *unk*, cuya inducción responde a la inhibición de TORC1 por las condiciones de hambreado. La inducción de *unk* es significativamente menor en animales p53<sup>H159.N</sup> (Figura 16, B). Estos resultados demuestran la capacidad de p53 en respuesta al hambreado de modular la vía TOR en el FB.



**Figura 33.** Afectación de la actividad del gen *unk* por p53. **(A)** Inmunotinción en individuos portando el reportero *unk-lacZ* con y sin actividad de p53 en el FB **(B)** Inducción diferencial del gen endógeno *unk* en respuesta a la privación de nutrientes en larvas con y sin actividad de p53 en el FB. Las barras de error representan SEM. \*  $p < 0.05$ .

Dado que las determinaciones basadas en el comportamiento del gen *unk* son medidas indirectas de la actividad de la vía TOR, se analizó una medida más directa como lo son los niveles de fosforilación de la quinasa S6 (S6K). S6K es sustrato directo de la quinasa TOR y los niveles de fosforilación de la misma pueden ser evaluados cuantitativamente mediante *Western Blot*. Los niveles de fosforilación de S6K en animales carentes en actividad de p53 en el FB fueron significativamente menores a aquellos correspondientes a individuos control, en ausencia de variaciones en los niveles totales de S6K. Estos resultados evidencian un claro rol de p53 en la inactivación de la vía TOR en respuesta al hambreado.

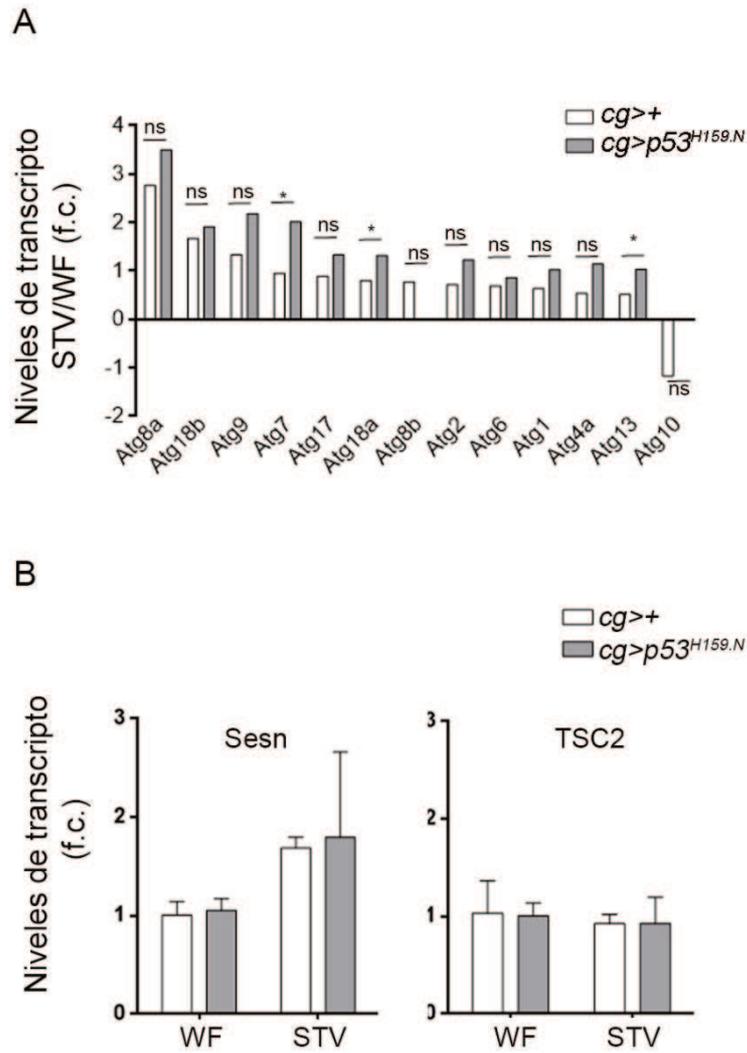


**Figura 34.** Niveles de fosforilación de S6K medido por Western Blot. **(A)** Niveles de fosforilación de S6K relativos a actina y su respectiva cuantificación **(B)** Niveles de fosforilación de S6K en relación a niveles de S6K total. Las barras de error representan SEM. \*\* p<0.01 y \* p<0.05.

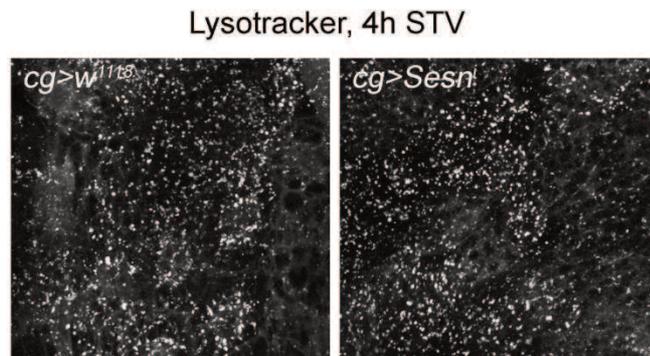
## 5. Carácter sistémico del rol de p53 frente a condiciones de hambre

En estudios previos se ha reportado que p53 es capaz de regular la vía TOR y la inducción de autofagia mediante la modulación directa de genes ATG o de elementos corriente arriba de estas vías como *TSC2* y *Sesn*. A pesar de esto, en el contexto de este trabajo, los niveles de expresión de estos genes no se encontraron afectados (Figura 35). Además, la expresión de un ARN de interferencia contra *Sesn* no afectó los niveles de autofagia frente a la privación de nutrientes (Figura 36). Todos estos resultados sugieren la presencia de un mecanismo adicional por el cual p53 es capaz de modular la vía de TOR y autofagia.

Ante la ausencia en este contexto de una regulación directa de genes involucrados en las vías TOR y autofagia, se vio la necesidad de distinguir si la regulación de autofagia por parte de p53 ocurre mediante mecanismos autónomos celulares o mediante mecanismos no-autónomo celulares.

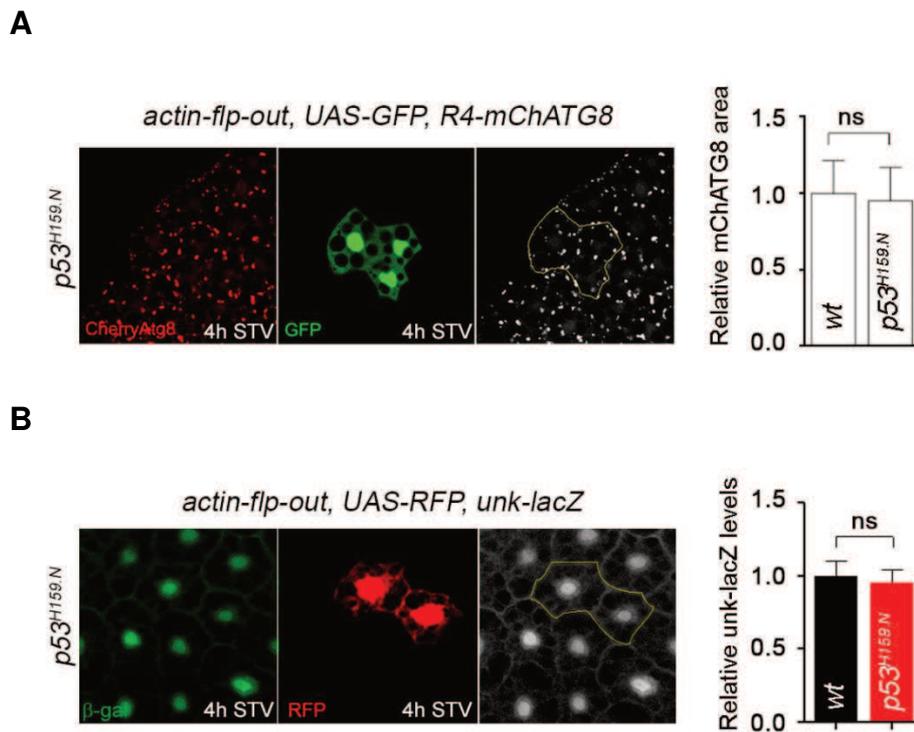


**Figura 35.** Niveles de transcritpo de genes ATG (**A**) y genes objetivo (**B**) de p53 relacionados a la regulación de autofagia tanto en larvas control como larvas carentes de actividad p53 en el FB. Las barras de error representan SEM. \*  $p < 0.05$ .



**Figura 36.** Autofagia en larvas control y luego de la expresión de un ARN de interferencia para el gen *Sesn* (*Sesn*<sup>i</sup>) en el FB luego de 4h de periodo de hambre.

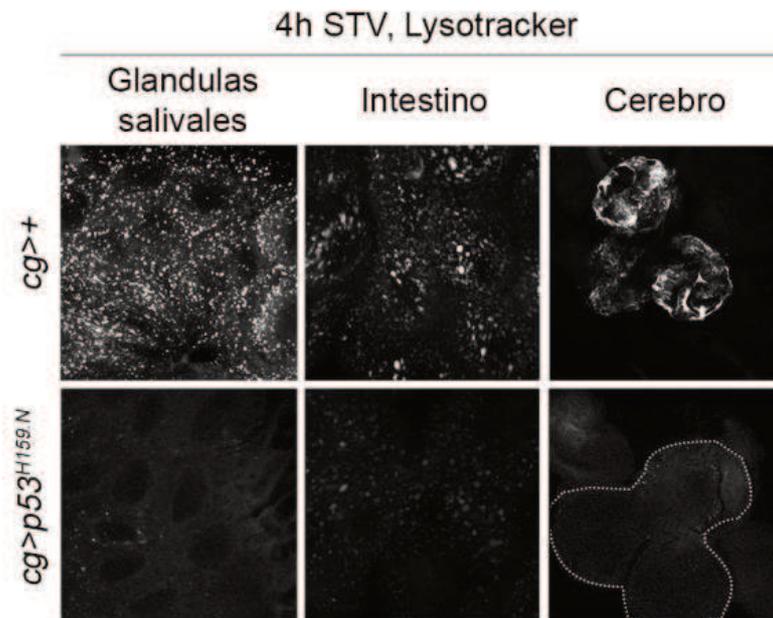
Para responder este interrogante se llevaron a cabo experimentos de mosaicos genéticos utilizando el marcador mCherryATG8 bajo el control del promotor *R4*. Sorprendentemente, la expresión de la proteína  $p53^{H159.N}$  en células individuales del FB de larvas sometidas a 4 horas de hambreado no alteró la distribución de mCherryATG8 en estas células con respecto a células vecinas (Figura 37, A). De la misma manera, la inducción de *unk-lacZ* por privación de nutrientes tampoco se vio afectada al bloquear la actividad de p53 en células individuales del FB (Figura 37, B), sugiriendo que la modulación de TOR y autofagia por parte de p53 ocurre mediante mecanismos no-autónomos celulares.



**Figura 37.** FB de larvas sometidas a la falta de nutrientes. **(A)** Células expresando GFP y  $p53^{H159.N}$  (en verde) presentan niveles de autofagia equivalentes a células control vecinas. Los niveles de autofagia se cuantificaron midiendo el área de puntos mCherryATG8 positivos (Rojo/Blanco). **(B)** Inmuntinciones mostrando la expresión de *unk-LacZ* (en Verde/Blanco) en FBs conteniendo células expresando RFP y  $p53^{H159.N}$  (en rojo) donde los niveles relativos de *unk-LacZ* equivalentes a células vecinas control. Las barras de error representan SEM.

A partir de los resultados anteriores, se evaluó la posibilidad de que la actividad de p53 en el FB afecte la inducción de autofagia a nivel sistémico. Para analizar esta posibilidad, se evaluaron los niveles de autofagia en varios órganos de animales  $cg>p53^{H159.N}$  sometidos a la falta de nutrientes mediante el uso de LysoTracker. Bajo estas condiciones de hambreado, tanto el cerebro, las glándulas salivales y el intestino mostraron bajos niveles de autofagia al inhibir la actividad de p53 en el FB (Figura

38). Estos resultados sugieren un nuevo rol de p53 tejido-específico y a nivel sistémico en la regulación de autofagia y la vía TOR frente a la falta de nutrientes.



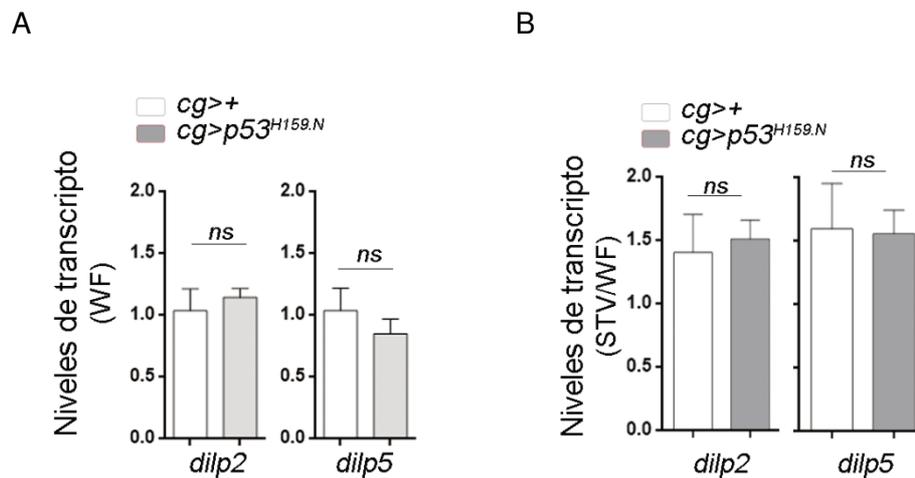
**Figura 38.** Inducción de autofagia monitoreada por tinción con Lysotracker en glándulas salivales, intestino y cerebro de larvas control y expresando p53<sup>H159.N</sup> luego de un tratamiento de 4h de hambreado.

## **6. Rol de p53 en la modulación de la vía de la insulina (IIS) frente a estrés nutricional**

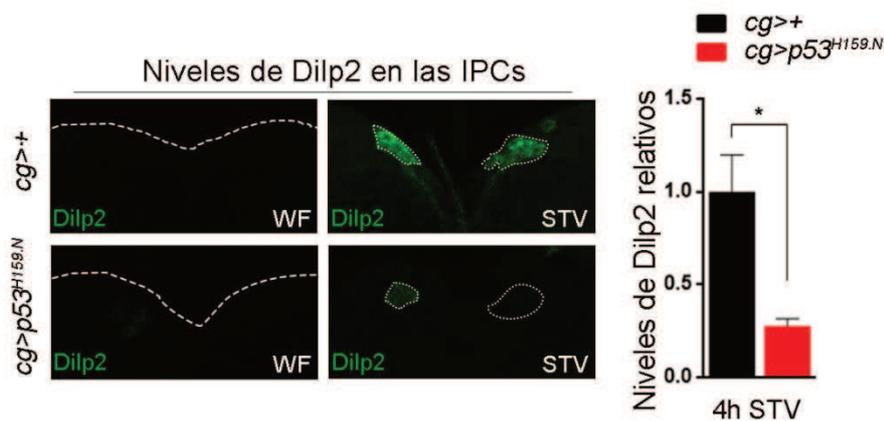
### **6.1 Regulación de dILP2 por p53 frente a la falta de nutrientes**

Como mencionado anteriormente, los péptidos dILPs son capaces de regular el proceso de autofagia a nivel sistémico. Por otro lado, el FB regula la homeostasis metabólica mediante la integración del *sensado* de nutrientes con la secreción de péptidos dILPs desde las IPCs en el cerebro (Géminard et al., 2009). Para estudiar una posible función de p53 controlando desde el FB de forma remota la secreción de insulina en las IPCs y autofagia, analizamos la transcripción y secreción de dILPs luego de tratamientos de hambreado. A nivel transcripcional y en las condiciones analizadas, no se encontraron diferencias en la expresión de *dILP2* ni *dILP5* entre larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* y animales control (Figura 39). Sin embargo, estudios previos han demostrado que la regulación de los péptidos dILPs se da principalmente a nivel de su secreción desde las IPCs (Nässel et al., 2013). Para evaluar la existencia de variaciones a este nivel de regulación, se realizaron inmunotinciones en estas neuronas utilizando anticuerpos anti-dILP2, tanto en larvas bien alimentadas como en

individuos sometidos a tratamientos de hambre. Como descrito anteriormente, este tratamiento indujo una rápida acumulación de dILP2 en las células IPCs de animales control. Sin embargo, larvas expresando  $p53^{H159.N}$  en el FB mostraron una menor acumulación de dILP2 en estas células (Figura 40). Estos resultados sugieren que la actividad de p53 en el FB es importante para la correcta regulación de la secreción de dILP2 desde las IPCs frente a la falta de nutrientes.

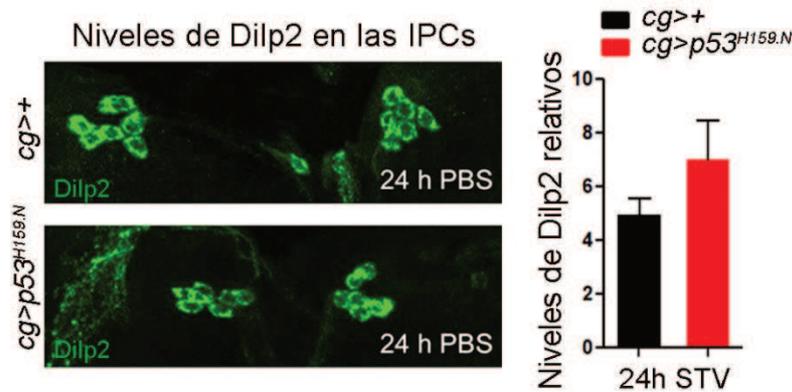


**Figura 39.** Niveles de transcritos de *dilp2* y *dilp5* medidos por RT-qPCR obtenidos de larvas control ( $cg>+$ ) y larvas  $cg>p53^{H159.N}$  en condiciones WF y STV. No se observaron diferencias entre los genotipos analizados en ninguna de las dos condiciones. Los resultados están normalizados a la condición (WF, **A**) o al genotipo control ( $cg>+$ , **B**). Las barras de error representan SEM.



**Figura 40.** Inmunotinción anti-dILP2 de las IPCs en el cerebro de larvas control o expresando  $p53^{H159.N}$  en el FB ( $cg>p53^{H159.N}$ ) luego de 4h de hambre junto a la correspondiente cuantificación de la intensidad de fluorescencia observada. Las barras de error representan SEM. \*  $p<0.05$ .

Cabe destacar que, de forma similar a lo observado en relación a la inducción de autofagia, la diferencia observada entre genotipos de acumulación de dILP2 disminuye luego de tratamientos de hambreado de mayor duración (Figura 41).

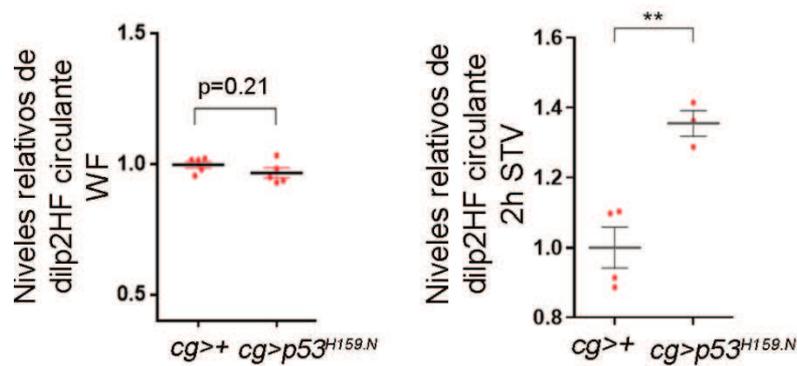


**Figura 41.** Inmunotinción anti-dILP2 de las IPCs en el cerebro de larvas control o expresando p53<sup>H159.N</sup> en el FB (*cg>p53<sup>H159.N</sup>*) luego de 24h de hambreado junto a la correspondiente cuantificación de la intensidad de fluorescencia observada. Las barras de error representan SEM.

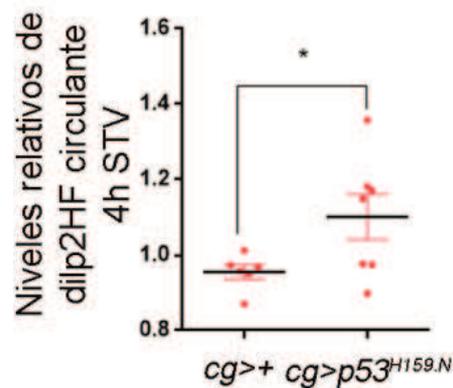
La presencia de variaciones en la acumulación de dILP2 dentro de las IPCs entre los distintos genotipos analizados no implica necesariamente que las concentraciones de este péptido en hemolinfa se vean afectadas. Para distinguir diferencias en los niveles de dILP2 en circulación se empleó un alelo de este gen fusionado a las proteínas FLAG y HA, denominado dILP2HF (Park et al., 2014). Mediante ensayos de ELISA sándwich, las determinaciones de dILP2HF en hemolinfa de larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* sometidas a periodos de hambreado mostraron diferencias significativas con respecto a larvas control (Figura 42). Asimismo, y de forma consistente con lo observado respecto a autofagia y la acumulación de dILP2 en las IPCs, las diferencias entre los distintos genotipos ensayados se ve disminuida conforme aumenta la duración de los tratamientos de hambreado (4 horas, Figura 43). En condiciones control, larvas bien alimentadas no mostraron diferencias en las concentraciones de dILP2HF en circulación. Estos resultados implican que p53 en el FB regula de forma remota la secreción del péptido dILP2 en las IPCs en respuesta a periodos de hambreado.

Para corroborar que los altos niveles de dILP2 en hemolinfa de animales *cg>p53<sup>H159.N</sup>* efectivamente se traducen en una mayor señalización de insulina, se midió la actividad del factor de transcripción FOXO, el cual se activa en respuesta a la disminución de dILP2 en circulación. (Puig et al., 2003; Teleman et al., 2005). La actividad de FOXO se determinó de forma indirecta midiendo la inducción

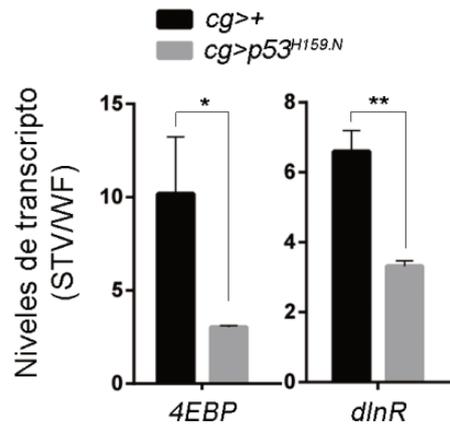
transcripcional de sus genes blanco *InR* y *4EBP* por RT-qPCR. De forma consistente con la rápida disminución en los niveles circulantes de dILP2, los niveles de *InR* y *4EBP* se vieron fuertemente inducidos en FBs de larvas control luego del tratamiento de hambreado (Figura 44). A su vez, la inducción de ambos genes fue significativamente menor en larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* en comparación a las larvas control (Figura 44). Estos resultados indican que, frente a la falta de nutrientes, la regulación de la secreción de dILP2 por parte de p53 se traduce en una regulación de la señalización de insulina.



**Figura 42.** Inmunoensayos por ELISA mostrando los niveles circulantes de Dilp2HF en la hemolinfa de larvas de los genotipos indicados en condiciones control y sometidas a 2h de hambreado. Las barras de error representan SEM. \*\* p<0.01.



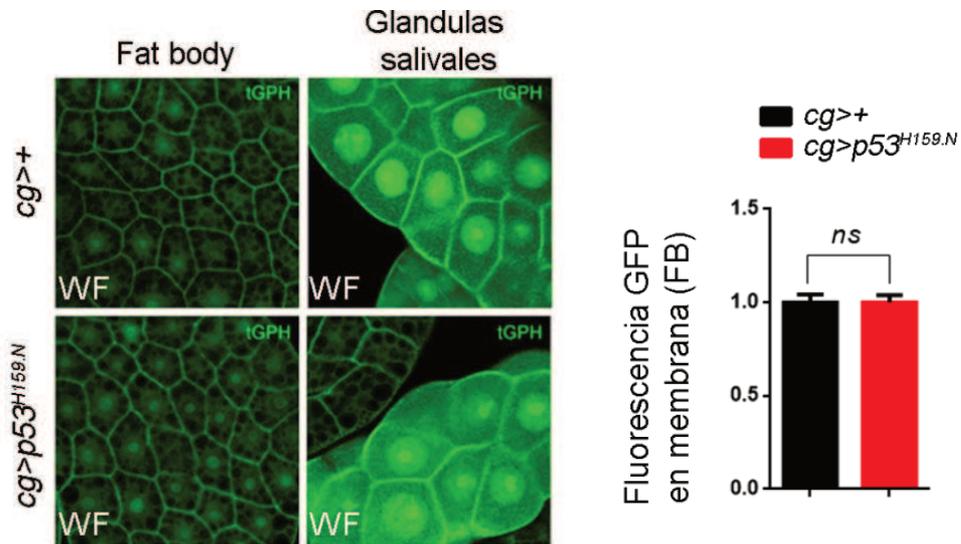
**Figura 43.** Inmunoensayos por ELISA mostrando los niveles circulantes de Dilp2HF en la hemolinfa de larvas de los genotipos indicados sometidas a 4h de hambreado. Las barras de error representan SEM. \*\* p<0.01.



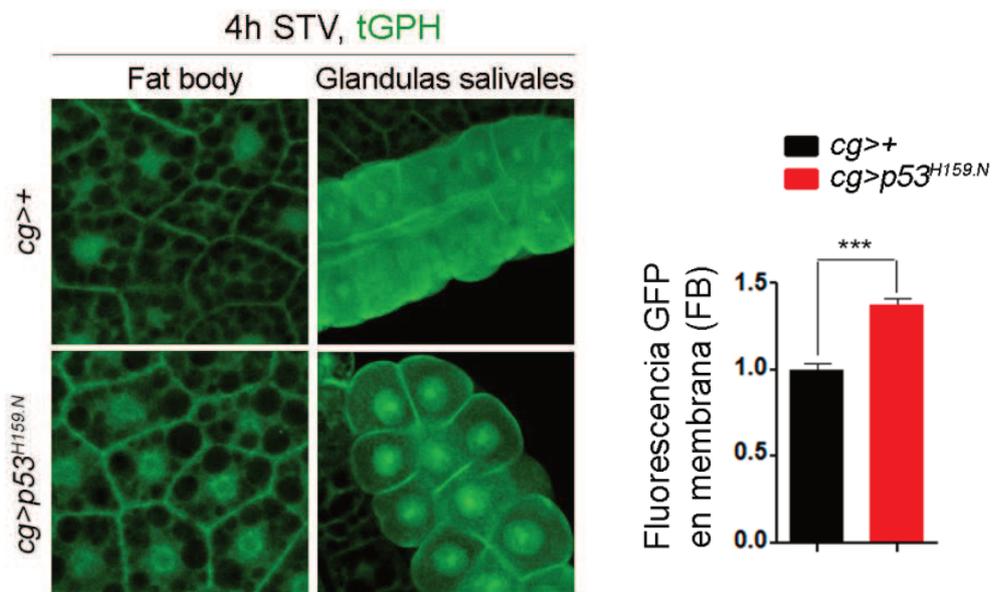
**Figura 44.** Niveles de transcritos medidos por RT-qPCR de genes de respuesta a insulina *4EBP* e *InR* en FB de larvas control y expresando p53<sup>H159.N</sup> en el mismo órgano. Los resultados se encuentran normalizados a la condición control correspondiente a cada genotipo. Las barras de error representan SEM. \* p<0.05 y \*\* p<0.01.

Como enfoque alternativo a determinaciones basadas en la actividad de FOXO, se empleó el reportero tGPH (*tubulin GFP-Pleckstrin Homology domain*) para medir la señalización de insulina. Esta cascada de señalización involucra la actividad de la quinasa PI3K, la cual puede monitorearse a partir de la localización subcelular de este reportero. A nivel molecular, el reportero tGPH se basa en la expresión ubicua de la proteína GFP fusionada a un dominio homólogo a la plekstrina (PH), dominio que une fosfoinositoles con gran afinidad. Tanto en el FB como en otros tejidos, la unión de dILP2 al receptor de insulina deriva en actividad de la quinasa PI3K y en la consecuente producción de fosfoinositoles. Éstos últimos reclutan el reportero con dominio PH a la membrana plasmática (Britton et al., 2002), un fenómeno observable de forma clara en tejidos de larvas en condiciones control (WF) (Figura 45). De forma contraria, en condiciones de privación de nutrientes, la actividad PI3K disminuye interrumpiendo la producción de fosfoinositoles y disminuyendo el reclutamiento a membrana de proteínas con dominio PH. De esta forma, en animales portando el reportero tGPH sometidos a periodos de hambreado la señal GFP previamente observada en membrana en condiciones óptimas de alimentación se distribuye de forma uniforme a lo largo de la célula (Britton et al., 2002) (Figura 45). El análisis de la ubicación subcelular de este reportero en larvas control y sin actividad para p53 en el FB, mostraron mayores niveles de reportero asociado a membrana que los observados en larvas control, tanto en células del FB como en glándulas salivales (Figura 46). Estos resultados sugieren que las concentraciones elevadas de dILP2 generadas por pérdida de la actividad de p53 en el FB efectivamente se traducen en un mayor nivel de señalización de insulina a nivel sistémico. En este sentido,

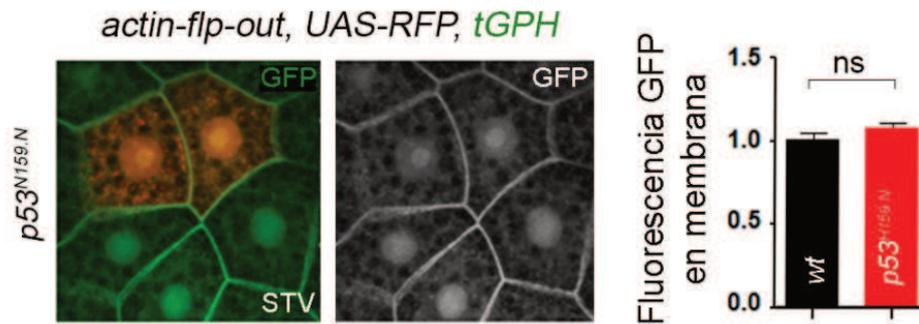
experimentos realizados a partir de la generación de mosaicos genéticos y la utilización de este reportero acentuaron el rol sistémico de p53 al no observarse diferencias entre células expresando p53<sup>H159.N</sup> y células control (Figura 47).



**Figura 45.** Niveles del marcador tGPH (GFP de expresión ubicua fusionada a dominio PH) en membranas de FB y glándulas salivales de larvas bien alimentadas control y expresando p53<sup>H159.N</sup> en el FB. Las barras de error representan SEM.

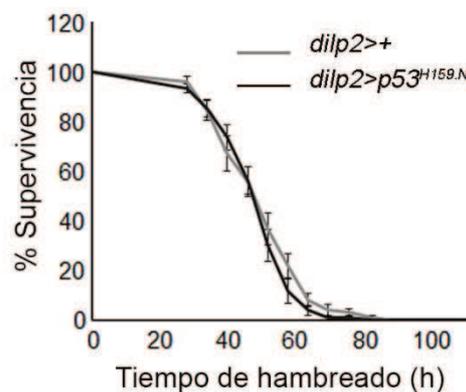


**Figura 46.** Niveles del marcador tGPH (GFP de expresión ubicua fusionada a dominio PH) en membranas de FB y glándulas salivales de larvas control y expresando p53<sup>H159.N</sup> en el FB luego de 4h de hambreado. Las barras de error representan SEM. \*\*\* p<0.001.



**Figura 47.** Niveles del marcador tGPH (GFP de expresión ubicua fusionada a dominio PH) en membranas de FB y glándulas salivales de larvas control y expresando  $p53^{H159.N}$  en células individuales del FB luego de 4h de hambreado. Las barras de error representan SEM.

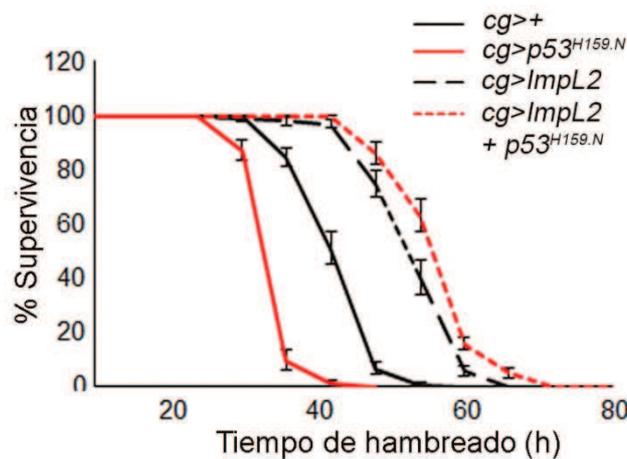
Frente a la falta de nutrientes, la actividad de p53 en el FB es importante para la correcta regulación de la secreción de insulina. Previamente se ha reportado que afectaciones en la secreción de dILP2 como en la señalización de insulina derivan en distintas tasas de supervivencia a periodos de hambreado. A partir de esta información se esgrime la posibilidad de que p53 desde el FB confiera resistencia al hambreado mediante la rápida inhibición de la secreción de dILP2. Previo a la evaluación de esta hipótesis, y dado que la actividad de p53 en las IPCs puede regular la secreción de dILP2 (Hasygar & Hietakangas, 2014), se descartó de forma previa la posibilidad de que sea la actividad de p53 en estas células la responsable de la menor tasa de supervivencia característica de animales  $cg>p53^{H159.N}$  (Figura 48).



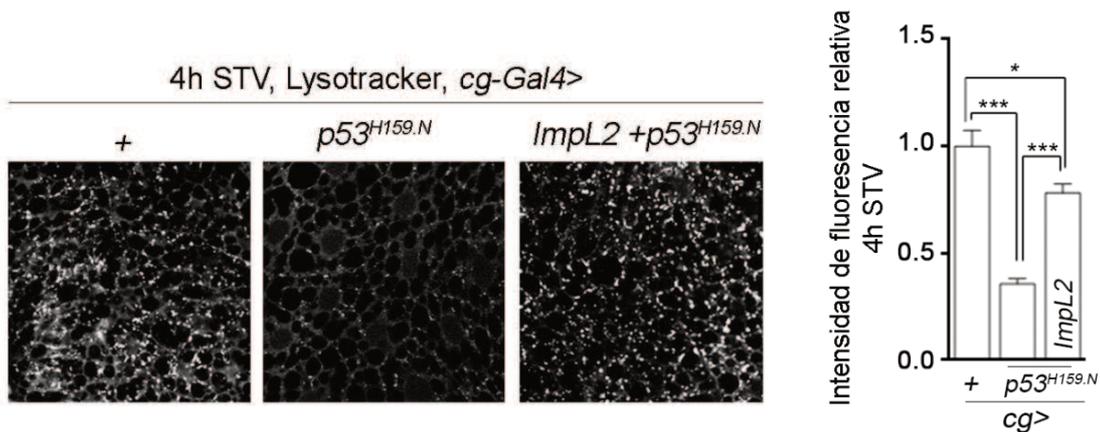
**Figura 48.** Curva de supervivencia a periodos de hambreado de adultos control y expresando  $p53^{H159.N}$  en las IPCs bajo el control de  $dilp2-GAL4$ . Las barras de error representan SEM.

Para evaluar la posibilidad de que p53 confiera resistencia al hambreado mediante la regulación de dILP2, se realizaron experimentos de supervivencia sobre-

expresando ImpL2, una proteína secretable capaz de unir e inhibir la actividad de dILP2 de forma no autónoma celular (Okamoto et al., 2013). Sorprendentemente, la sobreexpresión de ImpL2 revirtió de forma total la sensibilidad causada por falta de actividad p53 en el FB (Figura 49). Adicionalmente, la sobreexpresión de ImpL2 restauró por completo la cinética de la inducción de autofagia en larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* sometidas a tratamientos de hambreado (Figura 50). En conjunto, estos resultados indican que, en *Drosophila*, la rápida inhibición de la secreción de dILP2 por p53 en el FB es necesaria para la correcta inducción de autofagia y para la supervivencia a periodos de hambreado.



**Figura 49.** Curva de supervivencia a periodos de hambreado de adultos control y expresando *p53<sup>H159.N</sup>* y/o *ImpL2* en el FB. Las barras de error representan SEM.



**Figura 50.** Niveles de autofagia en FBs de larvas sometidas a periodos de hambreado monitoreada por tinción con lisotracker y la respectiva cuantificación de la intensidad de fluorescencia observada en los distintos genotipos. Las barras de error representan SEM. \*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

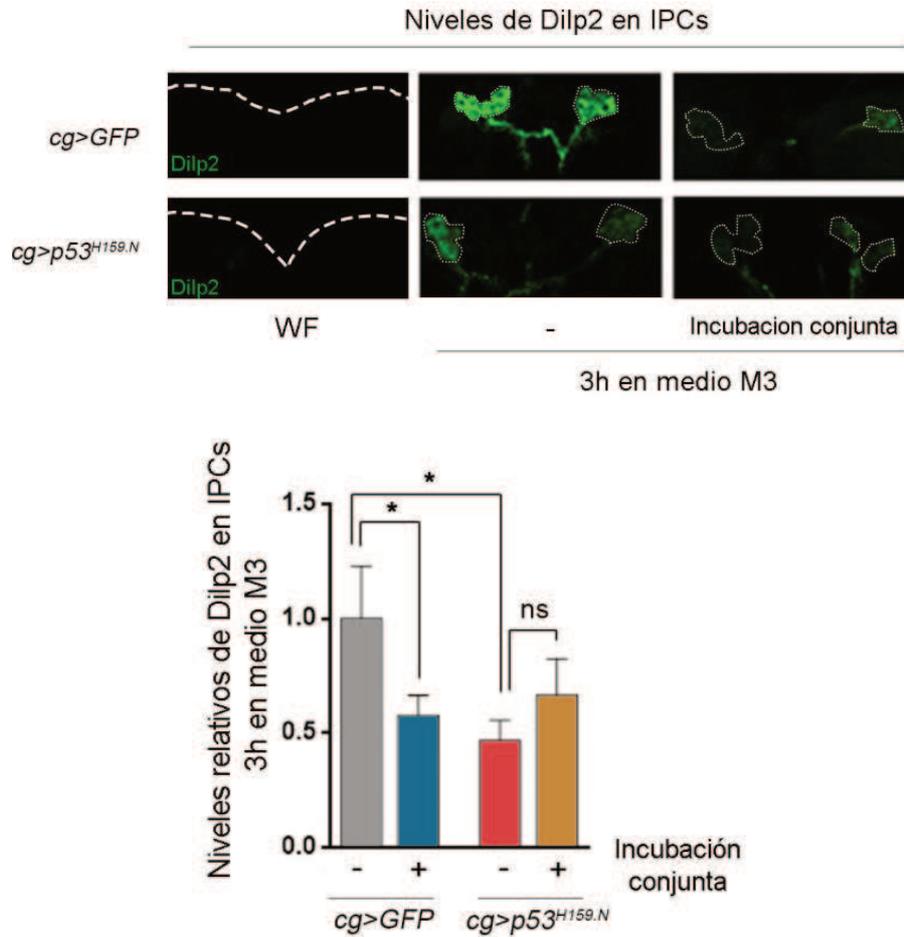
## 6.2 Rol de p53 en la comunicación inter-órgano entre el FB y las IPCs frente a la falta de nutrientes

De acuerdo a las condiciones nutricionales, las células del FB secretan señales humorales que son detectadas en el cerebro (Britton & Edgar, 1998; Géminard et al., 2009). Para entender el rol de p53 en la comunicación FB-cerebro y la naturaleza de las señales involucradas en ella, se realizaron experimentos *ex vivo* incubando distintos tejidos en medio M3 de insectos, el cual carece de trehalosa y simula condiciones de hambre. Inicialmente, se realizó una incubación conjunta de larvas cuyos órganos internos fueron expuestos hacia el medio exterior (larvas invertidas) de manera de que cualquier cambio o señal secretada a la hemolinfa afecte a todos los individuos incubados por igual. La recapitulación en estos experimentos de los resultados obtenidos *in vivo* fue evidenciada por un rápido incremento de los niveles de dILP2 en las IPCs luego de la incubación de larvas invertidas de genotipo control. Asimismo, se reprodujeron los resultados obtenidos en animales expresando p53<sup>H159.N</sup> en el FB, cuyos cerebros mostraron niveles significativamente menores de acumulación de dILP2 (Figura 51). Estos resultados confirman la regulación sistémica de la actividad de p53 en el FB sobre los niveles de dILP2 en las IPCs.

Existen muchas moléculas secretadas desde el FB que se han descrito capaces de modular la secreción de dILP2 en las IPCs. Estas moléculas se dividen en dos grandes grupos, aquellas insulínótropas, es decir, que estimulan la producción y/o actividad de la insulina, y aquellas que la inhiben. Para distinguir el grupo de moléculas asociadas a la actividad de p53 en el FB de animales hambreados, se realizó una incubación conjunta de larvas control con aquellas expresando p53<sup>H159.N</sup> en este órgano. Interesantemente, los cerebros de larvas control incubadas conjuntamente con larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* mostraron bajos niveles de acumulación de dILP2, similares a los observados en larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* incubadas por sí solas (Figura 51). Estos resultados sugieren que, frente a la falta de nutrientes, la actividad p53 en el FB actuaría inhibiendo una señal insulínótropa.

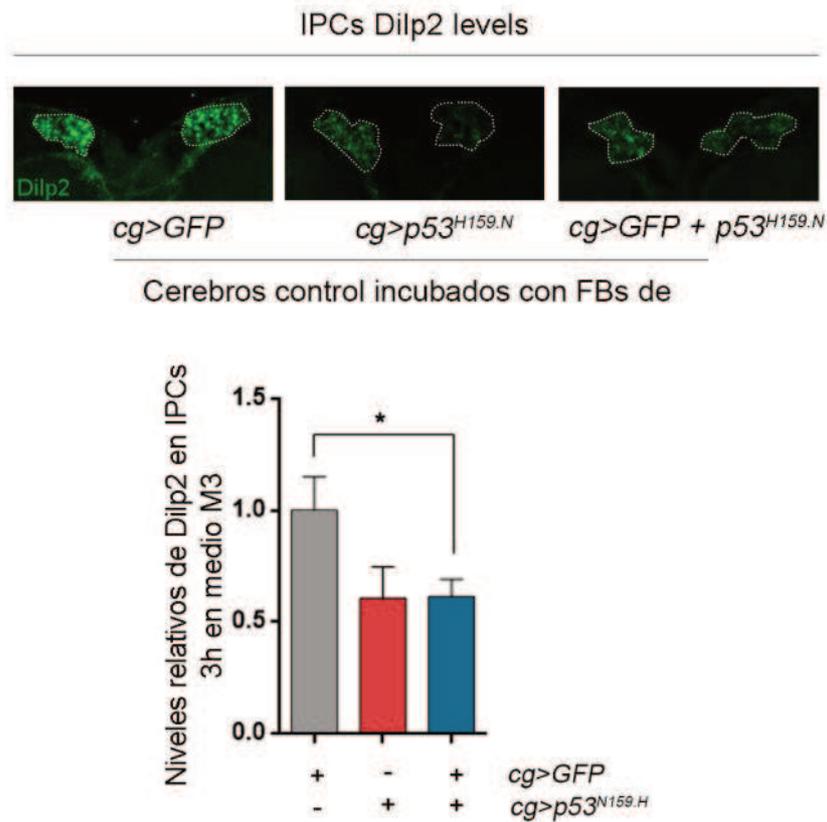
Para corroborar que la modulación de dILP2 en el cerebro por la actividad de p53 en el FB ocurre a partir de la comunicación directa entre estos dos tejidos, se incubaron cerebros de larvas L3 control en la presencia de FBs proveniente de larvas de distintos genotipos, siguiendo una lógica similar al experimento realizado con larvas invertidas. Resultados similares a los anteriormente obtenidos confirmaron que la falta de actividad de p53 en el FB resultaría en mayores niveles de una señal

insulinotrópica producida en este mismo órgano que retrasaría la acumulación de dILP2 en el cerebro (Figura 52).

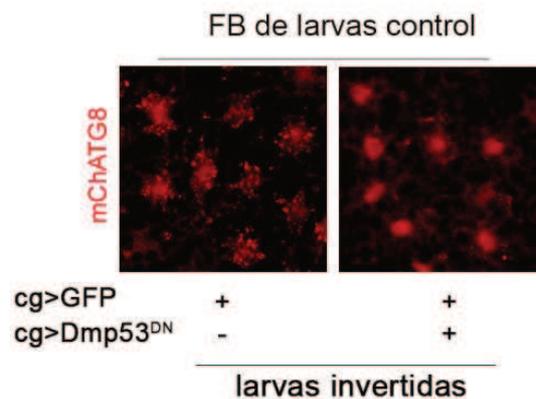


**Figura 51.** Tinción anti-dilp2, y su respectiva cuantificación, en IPCs en cerebros de larvas control (*cg>GFP*) y/o expresando *p53<sup>H159.N</sup>* en el FB y diseccionadas e incubadas en medio M3 (*ex vivo*). Las barras de error representan SEM. \*  $p < 0.05$ .

En pos de corroborar que los resultados de los experimentos *ex vivo* sobre la acumulación diferencial de dILP2 en las IPCs se corresponde con una inducción diferencial de la vía de la autofagia, se realizaron experimentos *ex vivo* de larvas invertidas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* y larvas control portando el reportero *mCherryATG8* (*cg>GFP*, *mCherryATG8*). La inhibición de autofagia en el FB por incubación conjunta de larvas control con larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* evidencia que la regulación remota de los niveles de dILP2 por actividad *p53* en este órgano es responsable de las alteraciones observadas en la vía de autofagia (Figura 53).



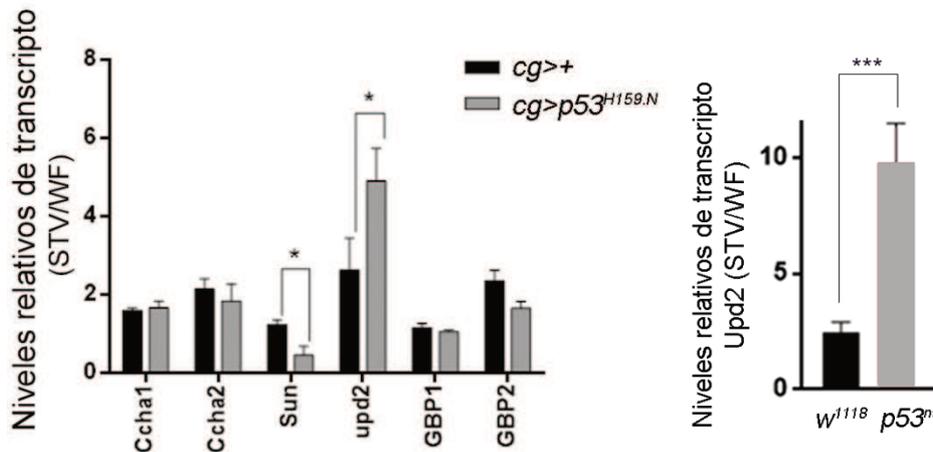
**Figura 52.** Tinción anti-dilp2, y su respectiva cuantificación, en IPCs en cerebros de larvas control (*cg>GFP*) incubados en medio M3 (*ex vivo*) con FBs de larvas control y/o expresando p53<sup>H159.N</sup>. Las barras de error representan SEM. \* p<0.05.



**Figura 53.** Monitoreo de Autofagia mediante la expresión y visualización de mCherryATG8 en FBs de larvas control diseccionadas e incubadas o no con larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* (*cg>Dmp53<sup>DN</sup>*). Las barras de error representan SEM. \* p<0.05.

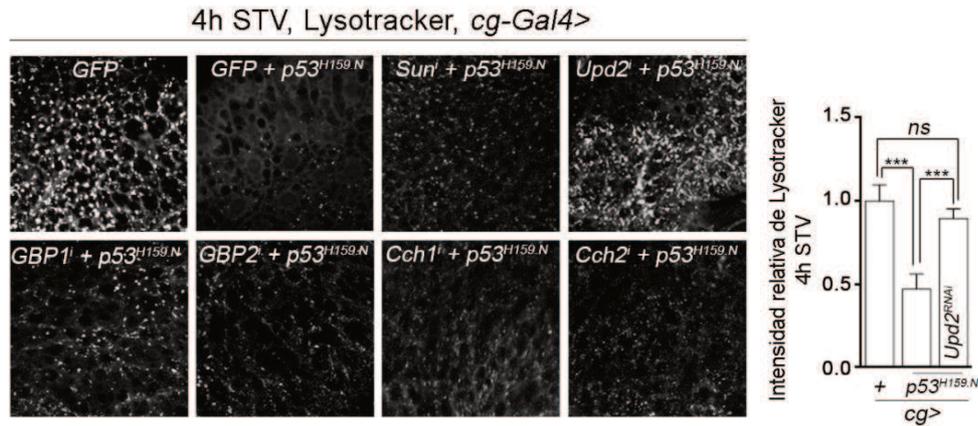
Experimentos *ex vivo* mostraron que p53 actúa en el FB regulando una señal de naturaleza insulínica. Para descubrir la identidad de esta señal, se midieron por RT-qPCR los niveles de transcripto en respuesta al hambreado de péptidos insulínicos reportados en la bibliografía en larvas control y larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>*.

Los niveles de transcripto de dos de los péptidos incluidos en el análisis mostraron diferencias significativas; aquellos correspondientes a los genes *Sun* (Stunted) y al gen *Upd2* (Unpaired-2) (Figura 54). Asimismo, luego de periodos de hambreado, larvas mutantes para p53 también presentaron niveles de transcripto elevados de *Upd2* (Figura 54).

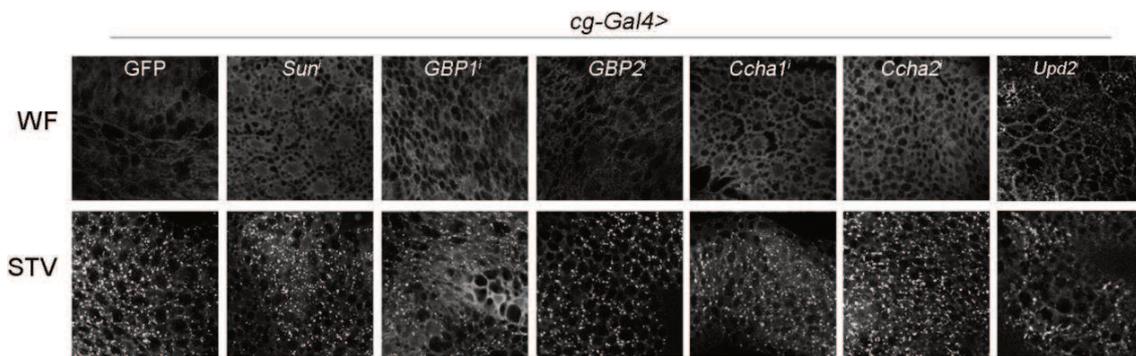


**Figura 54.** Niveles de transcripto de péptidos insulíntrópicos reportados en la bibliografía medidos por RT-qPCR en FB de (A) larvas control y expresando *p53<sup>H159.N</sup>* y (B) larvas mutantes para *p53* (*p53<sup>ns</sup>*). Los resultados se encuentran normalizados a la condición control correspondiente a cada genotipo. Las barras de error representan SEM. \*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

Alternativamente, para definir cuál de estas moléculas de señalización es responsable de los fenotipos asociados a *p53*, se expresaron ARNs de interferencia (ARN<sup>i</sup>) para cada una de estas y se analizó su capacidad para revertir los niveles de autofagia de larvas *cg<p53<sup>H159.N</sup>*. Como se puede apreciar en los resultados, frente a la privación de nutrientes, la disminución en la expresión de *Upd2* en larvas *cg>p53<sup>H159.N</sup>* deriva en niveles de autofagia equiparables a aquellos observados en larvas control (Figura 55). Como dato adicional, el silenciamiento de ninguno de estos péptidos alteró los niveles de autofagia en el FB de larvas en condiciones óptimas de alimentación, con excepción de *Upd2* el cual mostró apenas algunos puntos LysoTracker-positivos (Figura 56). En conjunto, estos resultados sugieren que alteraciones en la expresión del gen *Upd2* en el FB podrían mediar la modulación de autofagia por parte de *p53* en respuesta a periodos de hambreado.



**Figura 55.** Niveles de autofagia monitoreados por tinción con Lysotracker de larvas sometidas a tratamientos de hambreado expresando en el FB de forma conjunta *p53<sup>H159.N</sup>* y ARN de interferencia para distintos péptidos insulíntrópicos reportados en la bibliografía. Se muestra la cuantificación de la intensidad de Lysotracker para el caso particular de *Upd2*. Las barras de error representan SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ .

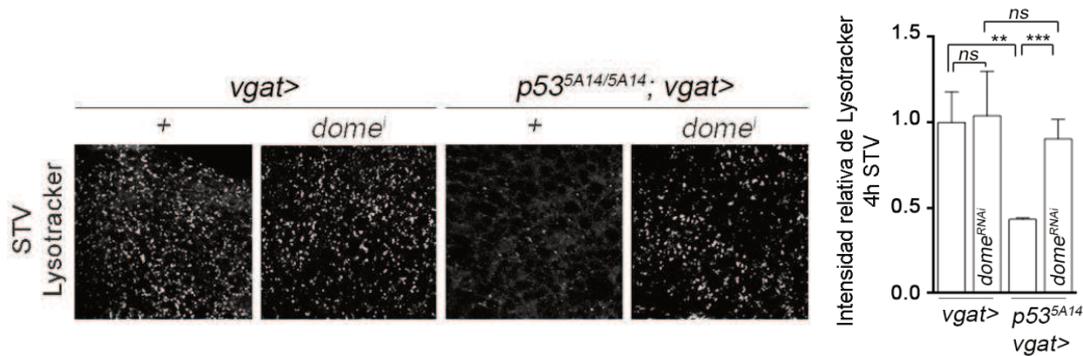


**Figura 56.** Niveles de autofagia monitoreados por tinción con Lysotracker de larvas en condiciones control y después de tratamientos de hambreado expresando ARN de interferencia específicamente en el FB contra distintos péptidos insulíntrópicos reportados en la bibliografía.

### 6.3 Regulación de *Upd2* por *p53* en la respuesta a la privación de nutrientes

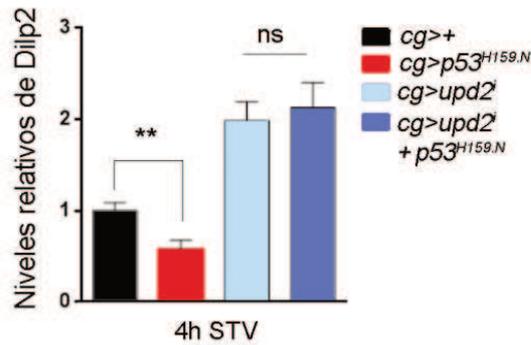
La citoquina *Upd2* ha sido descrita como un factor de secreción producido por las células del FB en animales bajo condiciones óptimas de alimentación, principalmente respondiendo a grasas y azúcares presentes en la dieta (Rajan & Perrimon, 2012). Según la bibliografía, la expresión de *Upd2* en el FB promueve la secreción de *dILP2* y el crecimiento sistémico mediante la activación de la quinasa Janus (JAK) y la vía de señalización mediada por STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) en un circuito de neuronas GABAérgicas que se proyectan sobre las IPCs (Rajan & Perrimon, 2012). Con el fin de establecer si es *Upd2* a través de la vía JAK-STAT en células GABAérgicas el mecanismo a partir del cual *p53* en el

FB regula autofagia, se realizaron determinaciones con Lysotracker luego de la depleción del receptor y activador de esta vía en *Drosophila* denominado *Domeless* (*Dome*). El silenciamiento de *Dome* en neuronas GABAérgicas se logró utilizando la línea *vgat*-GAL4, la cual dirige la expresión de la proteína GAL4 específicamente a estas neuronas (Rajan & Perrimon, 2012). En este experimento se utilizaron larvas mutantes para *p53* ( $p53^{5A14}$ ), las cuales, de manera similar a larvas que expresan  $p53^{H159.N}$  en el FB (Figura 25), presentan pocos o nulos puntos positivos para Lysotracker en respuesta a 4 horas de hambreado (Figura 57). Por su parte, la simple expresión de *Dome*<sup>i</sup> no alteró los niveles de autofagia inducidos por falta de nutrientes en larvas control. Sin embargo, esto sí genero un aumento en la autofagia de larvas mutantes para *p53* (Figura 57). El aumento en la intensidad de Lysotracker en larvas *vgat>dome<sup>i</sup>*,  $p53^{5A14}$  con respecto a larvas  $p53^{5A14}$  indica que la regulación de autofagia por *p53* involucra *Upd2* y su señalización en el cerebro vía el receptor *Domeless*.

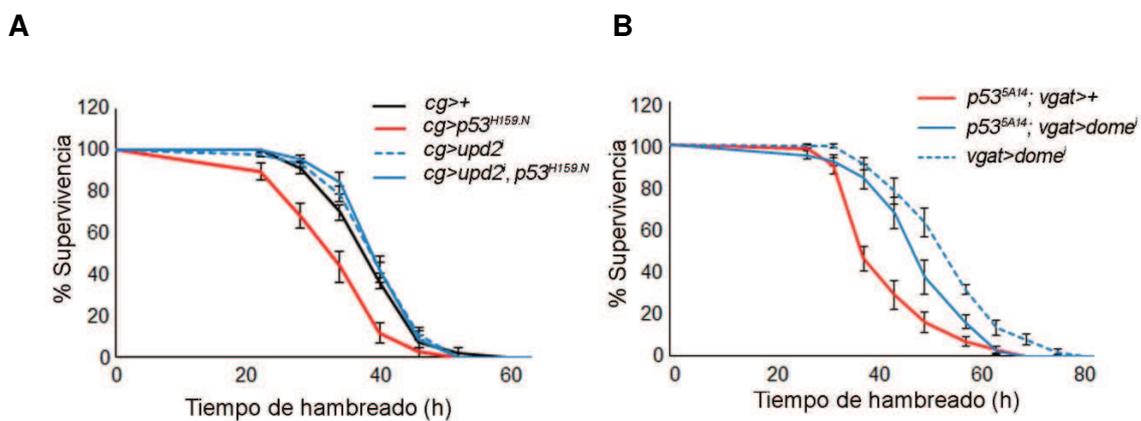


**Figura 57.** Niveles de autofagia monitoreados por tinción con Lysotracker de larvas control y mutantes para *p53* ( $p53^{5A14}$ ) sometidas a tratamientos de hambreado y expresando en neuronas GABAérgicas un ARN de interferencia contra el receptor de *Upd2* en estas células denominado *dome*. Se muestra la cuantificación correspondiente de la intensidad de Lysotracker observado en estos tejidos. Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

Para corroborar que los mayores niveles de *Upd2* en larvas carentes de actividad *p53* son los responsables tanto de las bajas tasas de supervivencia al hambreado e inhibición de autofagia como de los defectos en la acumulación de *dILP2*, se realizaron inmunotinciones anti-*dILP2* en las IPCs de larvas control y  $cg>p53^{H159.N}$  expresando o no *Upd2*<sup>i</sup> en el FB. Interesantemente, la diferencia en la acumulación de *dILP2* observada entre larvas control y  $cg>p53^{H159.N}$  no se observó al silenciar *Upd2* en el FB (Figura 58), sugiriendo que *p53* actúa reprimiendo esta adipocina para regular la secreción de insulina en respuesta al hambreado.



**Figura 58.** Cuantificación de inmunotinciones anti-Dilp2 en las IPCs de larvas control y expresando  $p53^{H159.N}$  en el FB junto a la expresión de un ARN de interferencia contra Upd2. Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$ .

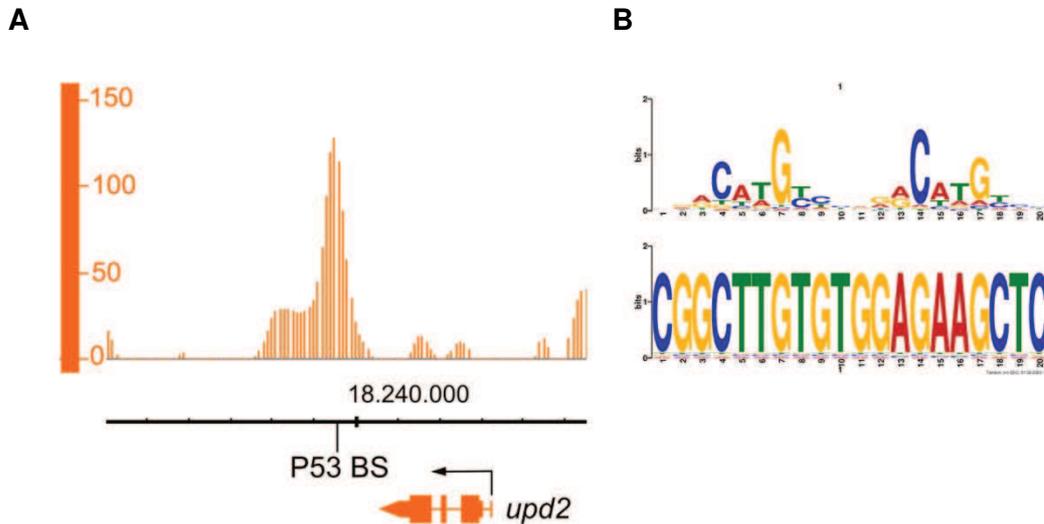


**Figura 59.** Curvas de supervivencia a periodos de hambreado de **(A)** adultos control y expresando  $p53^{H159.N}$  y/o un ARN de interferencia para Upd2 en el FB. **(B)** adultos mutantes para p53 y/o expresando o no un ARN de interferencia para Dome en neuronas GABAérgicas. Las barras de error representan SEM.

Notablemente, el silenciamiento de Upd2 en el FB logró restituir la resistencia al hambreado de larvas expresando  $p53^{H159.N}$  (Figura 59). De manera similar, se restituyeron las tasas de supervivencia de individuos mutantes para p53 al silenciar Dome en neuronas GABAérgicas (Figura 59). En su conjunto, estos resultados indican que p53 actúa reprimiendo la expresión de Upd2 en el FB y su actividad vía el receptor Dome en el cerebro para disminuir los niveles sistémicos de dILP2, inducir autofagia y conferir resistencia frente a periodos de hambreado.

Como punto adicional, cabe destacar que la unión de p53 al locus de Upd2 ha sido recientemente evidenciada en dos análisis independientes de ChIP-Seq (Inmunoprecipitación de Cromatina seguido de Secuenciación masiva de ADN) desarrollados en embriones y cabezas de adultos de *Drosophila* (Figura 60) (Kudron et al., 2018; Kurtz et al., 2019). A su vez, al analizar la secuencia de la zona de unión de p53 propuesta por los estudios de ChIP-Seq se identificó un sitio de unión

consenso y conservado de p53 (Figura 60). El hecho de que la unión de p53 en esta zona haya sido demostrada experimentalmente en tejidos de *Drosophila* y que exista un sitio consenso en la misma localización indica que p53 podría estar regulando la expresión de Upd2 en el FB de animales hambreados de forma directa.

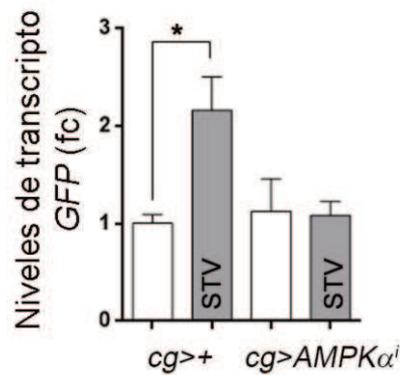


**Figura 60.** (A) Histograma mostrando la unión de p53 a la región genómica de Upd2 en un estudio público de ChIP-Seq denominado ModERN (Kudron et al., 2018) utilizando el visualizador IGB (Freese et al., 2016). (B) Sitio consenso para p53 (arriba) y putativo presente en la región genómica de Upd2 (abajo).

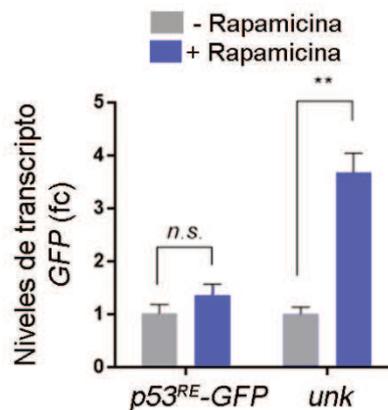
## 7. Regulación de p53 por AMPK en respuesta al estrés nutricional

Las quinasas TOR y AMPK tienen roles esenciales en el *sensado* de nutrientes y son reguladores importantes del crecimiento y metabolismo celular (Grewal, 2009; Hietakangas & Cohen, 2009). Mientras TOR es regulado en respuesta a la disponibilidad de aminoácidos, AMPK se modula por cambios en la relación ATP:AMP presente en la célula. En respuesta al hambre, AMPK se activa y contribuye a la inactivación de la quina TOR. Dado el rol de estas vías en el *sensado* de nutrientes, resulta interesante investigar su relación con la activación de p53 en el FB observada en respuesta al hambre. Con el fin de ahondar en este interrogante, se hizo uso del reportero de actividad de p53 p53RE-GFP junto al silenciamiento del gen AMPK $\alpha$  o luego de tratamientos con Rapamicina, una droga ampliamente utilizada como inhibidor de la vía TOR. El análisis del comportamiento de p53RE-GFP durante el desarrollo de estos experimentos es una manera de corroborar si la activación de p53 es dependiente de AMPK, y en ese caso, si esto ocurriría meramente a través de su capacidad de inhibir la vía TOR o mediante mecanismos adicionales. Al analizar los experimentos de silenciamiento en el FB del gen AMPK $\alpha$ , se observó una clara inhibición de la inducción del reportero p53RE-GFP frente a condiciones de

hambreando (Figura 61). Estos resultados indican que la actividad de AMPK es necesaria para la activación de p53 en respuesta a la falta de nutrientes. Por su parte, los tratamientos con Rapamicina de larvas L3 derivaron en la represión de la vía TOR (evidenciado por la inducción del gen *unk*) pero no alteraron el nivel del reportero p53RE-GFP (Figura 62). Estos resultados indican que la represión de la vía TOR no es suficiente para la activación del factor de transcripción p53 y que, a su vez, existen mecanismos alternativos o adicionales por los cuales AMPK modula la actividad de p53 en respuesta al hambre.



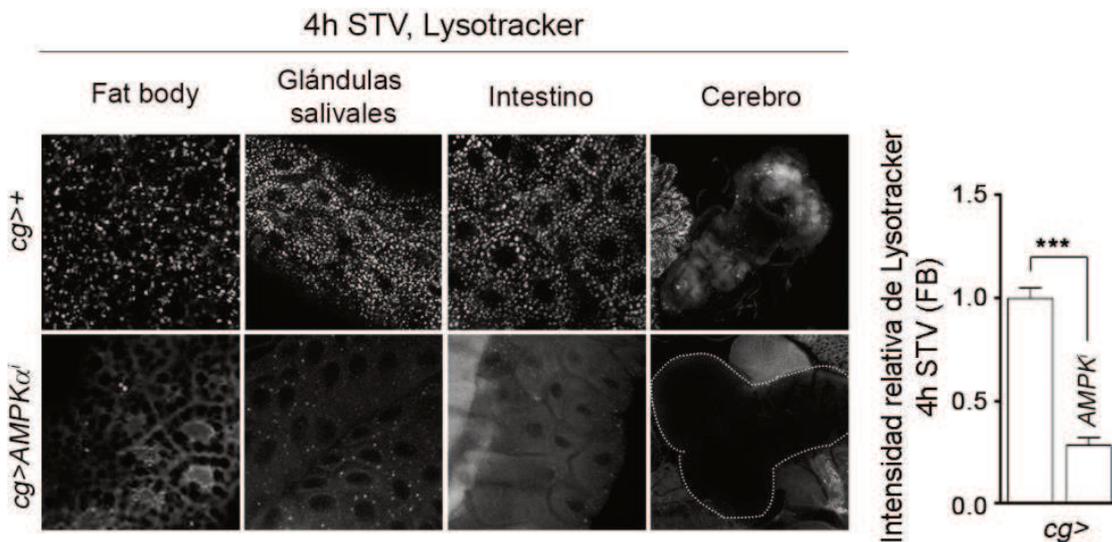
**Figura 61.** Niveles de transcritpo medidos por RT-qPCR del gen *GFP* en larvas expresando el reportero p53RE-GFP y un ARN de interferencia contra el gen AMPK $\alpha$  (*AMPK $\alpha^i$* ). Las barras de error representan SEM. \*  $p < 0.05$ .



**Figura 62.** Niveles de transcritpo medidos por RT-qPCR de los genes *GFP* y *unk* en larvas expresando el reportero p53RE-GFP y tratadas o no con Rapamicina. Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$ .

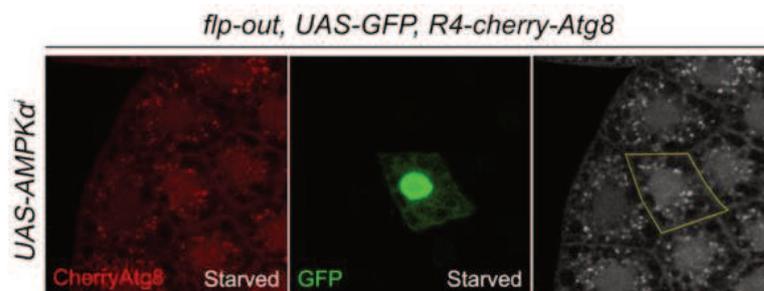
Un interrogante que se desprende de los resultados observados anteriormente es si la regulación de la actividad de p53 por AMPK es necesaria para la modulación de autofagia frente a periodos de hambre. Con el fin de responder esta pregunta, se determinó el impacto del silenciamiento de AMPK $\alpha$  en el FB en la inducción de

autofagia. Tinciones con Lysotracker del FB, glándulas salivales, cerebro e intestino de larvas sometidas a 4 horas de hambreado mostraron menores niveles de autofagia en ausencia de AMPK, indicando que este gen es necesario en el FB para la inducción de autofagia a nivel sistémico.



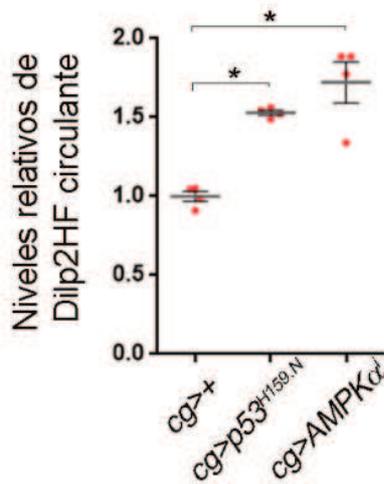
**Figura 63.** Inducción de autofagia monitoreada por tinción con Lysotracker en glándulas salivales, intestino y cerebro de larvas control y expresando un ARN de interferencia contra el gen AMPK $\alpha$  (AMPK $\alpha^i$  o AMPK $\alpha^i$ ) luego de un tratamiento de 4h de hambreado. Las barras de error representan SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Experimentos de mosaicos genéticos acompañan los resultados anteriores donde el silenciamiento de AMPK en células individuales no afecta los niveles de autofagia observados en esas mismas células ni en células vecinas (Figura 64). Esto refuerza la idea de que, al igual que p53, AMPK utiliza mecanismos no autónomos celulares para ejercer su rol regulatorio con respecto a la inducción de autofagia a nivel sistémico.



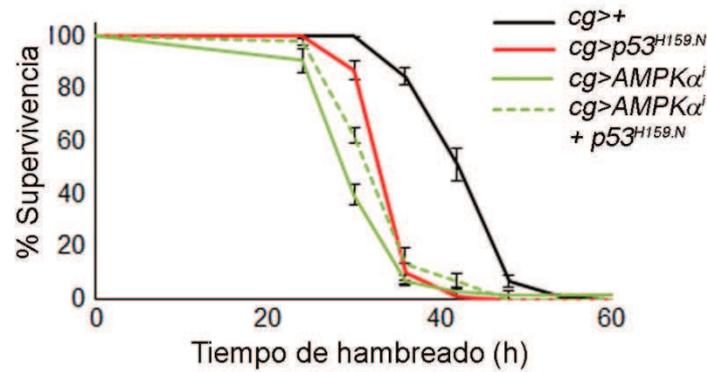
**Figura 64.** Células del FB de larvas sometidas a la falta de nutrientes expresando GFP y un ARN de interferencia contra AMPK $\alpha$  (en verde) presentan niveles de autofagia equivalentes a células control vecinas. Los niveles de autofagia se cuantificaron midiendo el área de puntos mCherryATG8 positivos (Rojo/Blanco).

Con el fin de responder si AMPK y p53 regulan autofagia mediante los mismos mecanismos moleculares, se midieron los niveles de Dilp2HF en hemolinfas de animales silenciados para AMPK $\alpha$  en el FB y sometidos a la privación de nutrientes. Estos animales mostraron mayores niveles de dILP2 en circulación comparados con animales control (Figura 65), sugiriendo que AMPK en el FB, al igual que p53, regula de forma remota la secreción de dILP2 desde las IPCs.



**Figura 65.** Inmunoensayos por ELISA mostrando los niveles circulantes de Dilp2HF en la hemolinfa de larvas de los genotipos indicados en condiciones control y sometidas a 2h de hambreado. Las barras de error representan SEM. \*  $p < 0.05$ .

Trabajos anteriores han mostrado que moscas mutantes para AMPK poseen una menor supervivencia frente a la falta de nutrientes (Johnson et al., 2010). En consecuencia, es posible que sea el rol de AMPK a nivel del FB el responsable de conferir resistencia al hambreado. Interesantemente, moscas adultas *cg>AMPK <sup>$\alpha$</sup>*  se comportan de forma análoga a las mutantes para este gen, mostrando menores niveles de supervivencia frente a la privación de nutrientes (Figura 66). Por otro lado, y favoreciendo la hipótesis de que p53 y AMPK comparten mecanismos moleculares de acción frente al hambreado, el fenotipo observado expresando AMPK<sup>*i*</sup> no se ve exacerbado por la expresión de p53<sup>H159.N</sup>. De forma complementaria con experimentos anteriores, la ausencia de un efecto aditivo en la supervivencia de moscas portando alelos de pérdida de función para estos genes indica que ambos forman parte de un mismo mecanismo molecular donde AMPK actuaría corriente arriba de p53 en la modulación de la resistencia al hambreado.



**Figura 66.** Curvas de supervivencia a periodos de hambreado de adultos control y expresando p53<sup>H159.N</sup> y/o un ARN de interferencia para AMPK $\alpha$  en el FB. Las barras de error representan SEM.

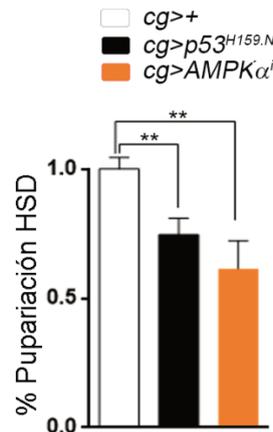
### 8. Rol de p53 en la adaptación al exceso de nutrientes

Trabajos anteriores han observado distintos roles de la actividad de p53 en la adaptación de ratones a dietas HFD (dieta rica en grasas, High Fat Diet) y HFHS (dieta rica en azúcares y grasas; High fat, High sucrose), la mayoría de ellos con efectos deletéreos (Krstic et al., 2018a). La inhibición de p53 en ratones alimentados con HFHS muestran menor ganancia de peso corporal, menor nivel de adiposidad, menor inflamación del tejido adiposo y mejores niveles de resistencia a insulina y tolerancia a glucosa en comparación con animales control (Yokoyama et al., 2014). A su vez, en apartados anteriores de esta tesis, se observó la activación de p53 en moscas crecidas en HSD (Figura 23). Ante estos datos, se propuso analizar la contribución del eje AMPK-p53 en la adaptación a esta clase particular de estrés nutricional.

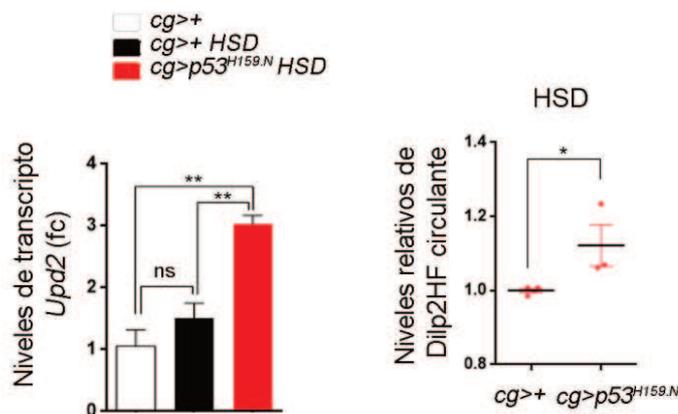
Como mencionado anteriormente, animales crecidos bajo HSD muestran menores niveles de viabilidad y un retraso en los tiempos de desarrollo (Figura 24). Curiosamente y en contraposición con estudios realizados en vertebrados, la expresión de p53<sup>H159.N</sup> en el FB exacerbó los fenotipos deletéreos observados en HSD, sugiriendo un rol protector para p53 en animales crecidos bajo este particular tipo de dieta. Fenotipos similares en la viabilidad fueron observados en individuos expresando AMPK<sup>i</sup> en el FB, sugiriendo que p53 ejerce su rol junto a AMPK en este contexto (Figura 67).

En pos de corroborar si el eje AMPK-p53 actúa a través de Upd2 y la regulación de la secreción de dILP2, se midieron los niveles transcripcionales de Upd2 por RT-qPCR y de dILP2HF en circulación. Notablemente, animales *cg>p53<sup>H159.N</sup>* crecidos en HSD mostraron mayores niveles de transcritos Upd2 y mayores niveles de

dILP2HF en circulación. Estos resultados sugieren que el eje AMPK-p53 controlaría la expresión de *Upd2* y la secreción de dILP2 como parte de un mecanismo de adaptación no sólo al hambre sino a otros tipos de estrés nutricional como lo son las dietas ricas en sacarosa.



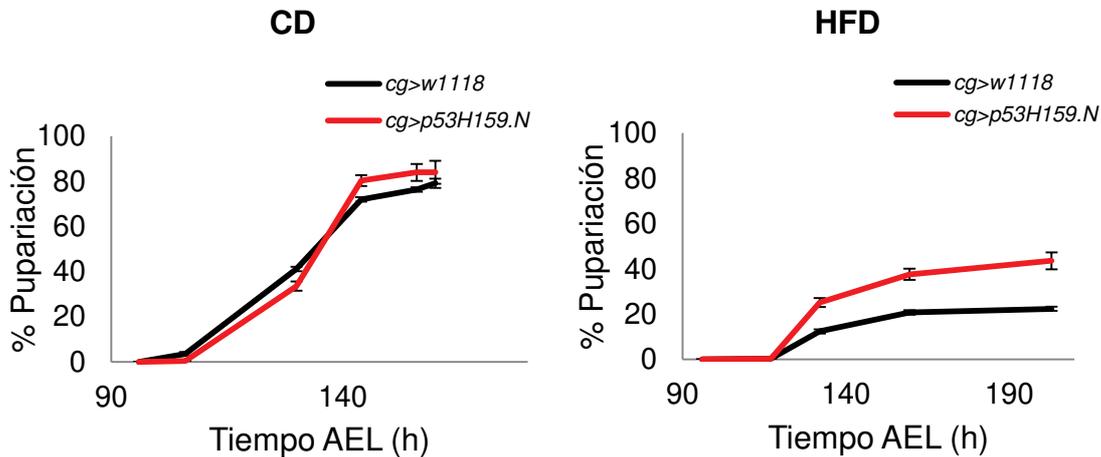
**Figura 67.** Niveles de pupariación en individuos sin actividad P53 en el FB crecidos en dieta control y rica en sacarosa (HSD). Los datos se encuentran normalizados al genotipo control. Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$ .



**Figura 68. (A)** Niveles de transcritpo medidos por RT-qPCR de *Upd2* en larvas crecidas en dietas control y HSD. **(B)** Inmunoensayos por ELISA mostrando los niveles circulantes de Dilp2HF en la hemolinfa de larvas de los genotipos indicados en condiciones control y crecidas en HSD. Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$ .

Dado la contraposición del rol observado para p53 en moscas crecidas bajo HSD con los resultados previos obtenidos en vertebrados alimentados con dietas ricas en grasas (Krstic et al., 2018a), nos propusimos analizar el rol de p53 frente a la exposición a dietas ricas en grasas (HFD, High Fat Diet) en *Drosophila*. Interesantemente, y de forma contraria a lo observado para HSD, la restricción de la actividad p53 en el FB resultó en mayores tasas de viabilidad (medida como

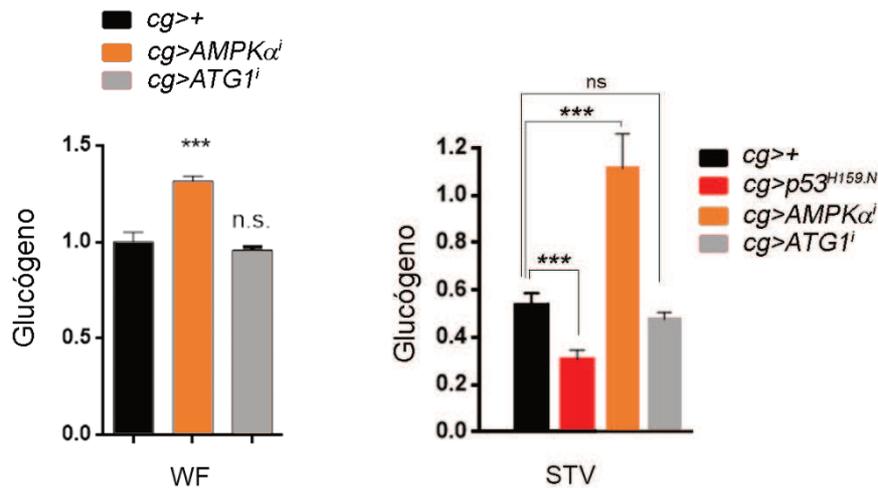
porcentaje de pupariación) con respecto a individuos control (Figura 69). Esto sugeriría la existencia de distintos roles para p53 dependiendo del tipo específico de estrés nutricional. Mientras que p53 es necesario para la adaptación a condiciones de hambreado o HSD, al igual que lo observado en vertebrados, la actividad de este gen resulta deletérea frente a dietas ricas en grasas.



**Figura 69.** Porcentaje de pupariación durante el desarrollo en individuos control y sin actividad de p53 en el FB crecidos bajo dietas control (CD) y rica en grasas (HFD). El tiempo se representa en horas a partir del momento de la puesta de huevos (AEL). Las barras de error representan SEM.

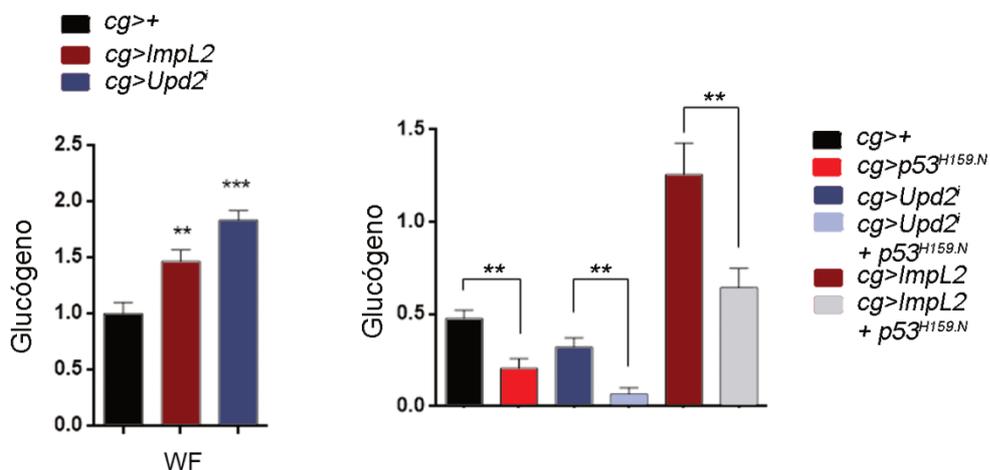
## 9. Rol de p53 en el metabolismo energético en periodos de hambreado

Como descrito anteriormente, animales carentes de actividad p53 en el FB muestran un mayor consumo de glucógeno frente a la privación de nutrientes en comparación a animales control (Figura 22). Esto sugiere que p53 actuaría como freno metabólico en el consumo de reservas energéticas, posiblemente favoreciendo un uso más eficiente de las mismas (Barrio et al., 2014). Sin embargo, larvas que expresan AMPK<sup>i</sup> en el FB mostraron altos niveles de glucógeno tanto en condiciones WF como luego de 4 horas de hambreado (Figura 70). Esto sugiere que AMPK es necesario para la movilización de glucógeno y actuaría de manera opuesta a p53, hecho que desacopla las funciones de p53 y AMPK relacionadas al metabolismo energético. Más aun, la expresión de ATG1<sup>i</sup>, a diferencia de la expresión de p53<sup>H159.N</sup>, no afectó los niveles de glucógeno luego de tratamientos de hambreado. Estos resultados indican que la sensibilidad y supervivencia al hambreado no necesariamente se encuentran ligadas a los niveles de glucógeno y que la función de p53 en el metabolismo energético no depende de AMPK ni del proceso de autofagia.



**Figura 70.** Niveles de glucógeno en larvas en condiciones óptimas de alimentación y luego de 4 h de hambreado. Las barras de error representan SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Para corroborar la idea de que p53 regula de forma independiente el metabolismo energético y la señalización de insulina, se llevaron a cabo determinaciones de glucógeno en animales expresando *Upd2<sup>i</sup>* y sobre expresando *Impl2*. Mientras que ambas de estas manipulaciones genéticas rescatan la supervivencia de adultos *cg>p53<sup>H159.N</sup>* frente a periodos de hambreado, tanto el silenciamiento de *Upd2* como la sobreexpresión de *Impl2* fueron incapaces de aumentar los niveles de glucógeno luego del tratamiento de hambreado al nivel de aquellos observados en animales control (Figura 71). Estos resultados indican que p53 en el FB regula el consumo de glucógeno de forma independiente de *Upd2* y los niveles de *dILP2* en circulación



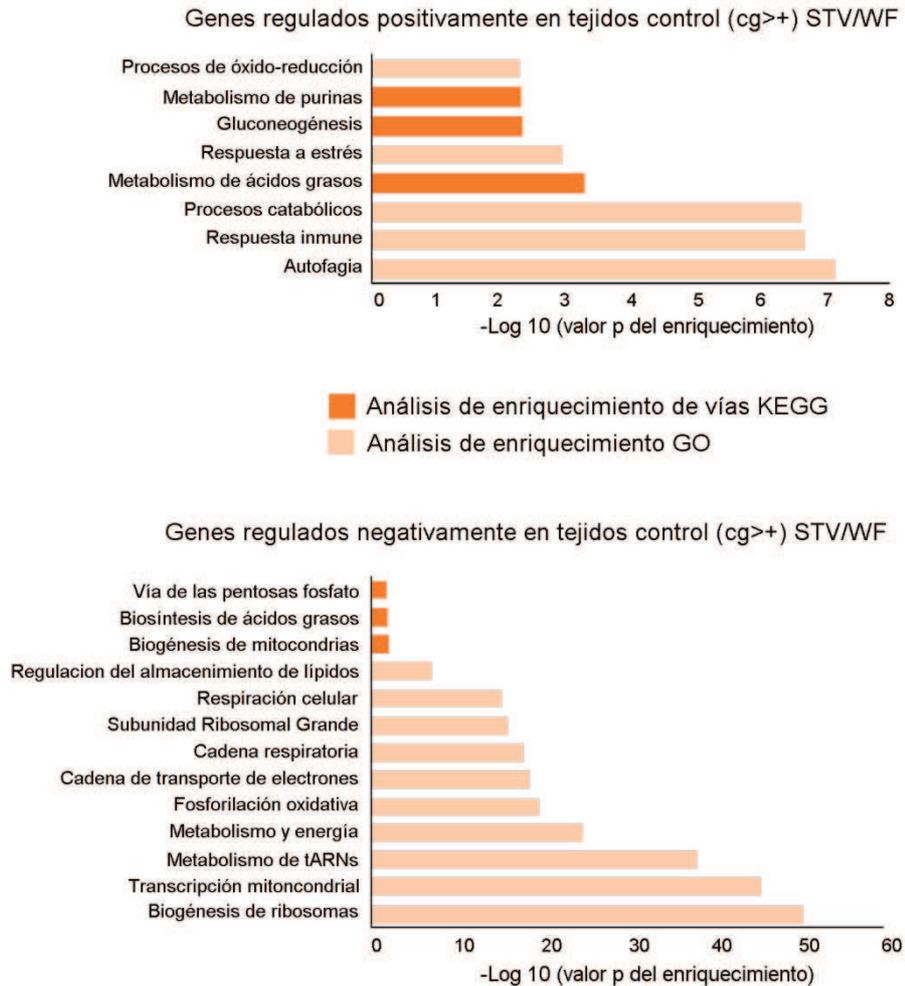
**Figura 71.** Niveles de glucógeno en adultos en condiciones óptimas de alimentación y luego de 24 h de hambreado. Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 10. Respuestas transcripcionales mediadas por p53 en respuesta al estrés nutricional

### 10.1 Respuesta transcripcional dependiente de p53 en respuesta al estrés nutricional

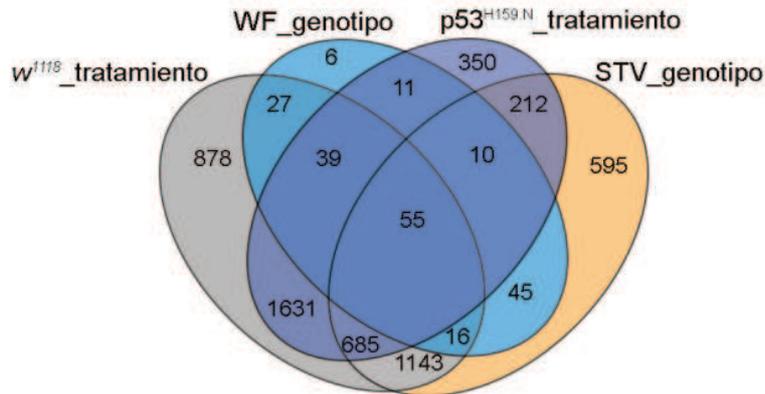
Con el fin de entender en mayor profundidad los mecanismos por los cuales p53 regula la homeostasis metabólica y el metabolismo energético, llevamos a cabo un análisis de secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) a partir de muestras de FB obtenidas de larvas *cg>w<sup>1118</sup>* y expresando la versión dominante negativa de p53 (*cg>p53<sup>H159.N</sup>*), tanto en condiciones control (WF) como luego de 4 horas de hambreado (STV). El análisis de los datos obtenidos de larvas *cg>w<sup>1118</sup>* mostraron la modulación de 3440 genes en respuesta al hambreado (parámetros utilizados: log2FoldChange absoluto >0.5; valor p ajustado <0.01), de los cuales 1272 se encuentran regulados positivamente y 2168 negativamente con respecto a condiciones control (WF). En línea con estudios anteriores (Chatterjee et al., 2014; Zinke et al., 2002), el análisis de vías utilizando la base de datos KEGG mostró que muchos de los genes regulados positivamente se encuentran relacionados a los procesos de gluconeogénesis, lipólisis y oxidación de ácidos grasos, todos procesos metabólicos que se saben necesarios para la adaptación al hambreado (Figura 72). El análisis de *Gene Ontology* (GO) de estos mismos genes mostró enriquecimientos en procesos biológicos como la regulación de autofagia, procesos de óxido-reducción, de respuesta a estrés y respuesta inmune (Figura 72). Por otro lado, entre los regulados negativamente, se observaron genes relacionados a la vía de las pentosas fosfato, lipogénesis y biogénesis de mitocondrias. El análisis de GO de esta misma lista de genes, a su vez, mostró que muchos se encuentran asociados a la biogénesis de ribosomas, el procesamiento de ARNr y ARNt, la transcripción mitocondrial, fosforilación oxidativa y respiración celular.

Favoreciendo un rol específico para p53 en la regulación transcripcional de genes como parte de una respuesta al estrés nutricional, el número de genes diferencialmente expresados entre los distintos genotipos en condiciones control (WF, *cg>w<sup>1118</sup>* vs *cg>p53<sup>H159.N</sup>*) fue de sólo 151. Este número se ve fuertemente contrastado con los 1968 genes regulados diferencialmente entre FB de larvas de los distintos genotipos sometidas a tratamientos de hambreado (STV, *cg>w<sup>1118</sup>* vs *cg>p53<sup>H159.N</sup>*). En este tejido, 815 genes se vieron regulados positivamente y 1153 negativamente, de cuyo total la mayoría (83%) se encuentran diferencialmente expresados también entre las distintas condiciones en animales control (*cg>w<sup>1118</sup>*, WF vs STV).



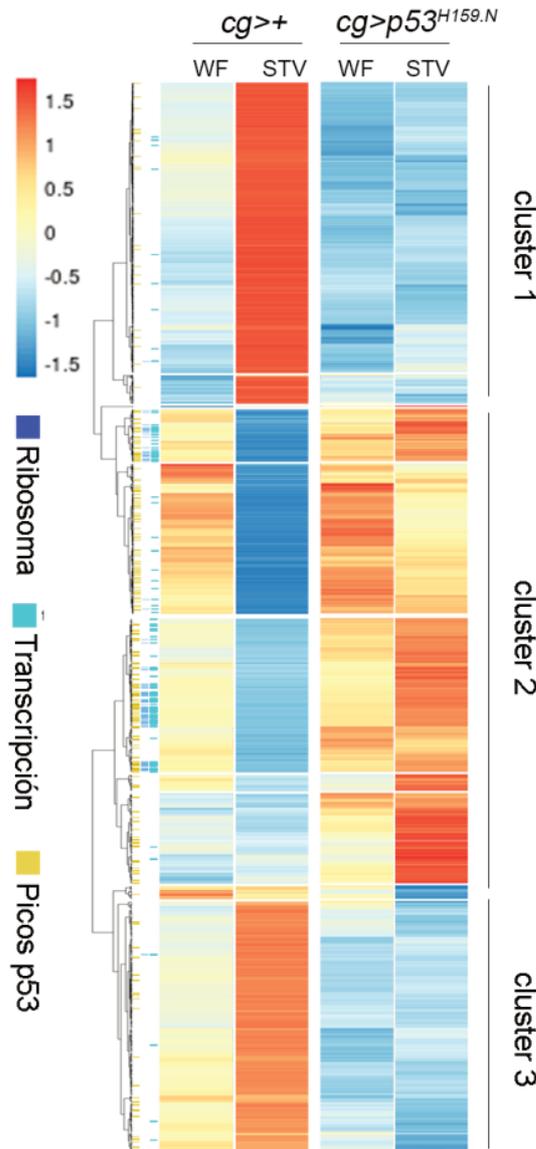
**Figura 72.** Análisis de GO y KEGG de genes diferencialmente expresados en FBs de larvas control en respuesta al hambreado.

En pos de analizar más profundamente los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis de agrupamiento o *clustering*. Para ello, genes diferencialmente expresados en cada genotipo y condición fueron comparados ente sí definiendo grupos de genes y sus respectivas intersecciones (Figura 73), y agrupándolos posteriormente en *clusters* jerárquicos en base a su número y perfil de expresión.



**Figura 73.** Número de genes en intersecciones de los distintos grupos comparando genotipos ( $cg>w^{1118}$  vs  $cg>p53^{H159.N}$ ) y tratamientos (WF vs STV).  $w^{1118}$ \_tratamiento: genes regulados diferencialmente en respuesta al hambre en animales control. WF\_genotipo: genes regulados diferencialmente en los distintos genotipos en condiciones WF.  $p53^{H159.N}$ \_tratamiento: genes regulados diferencialmente en animales  $cg>p53^{H159.N}$  en respuesta al hambre. STV\_genotipo: genes regulados diferencialmente en los distintos genotipos en condiciones STV.

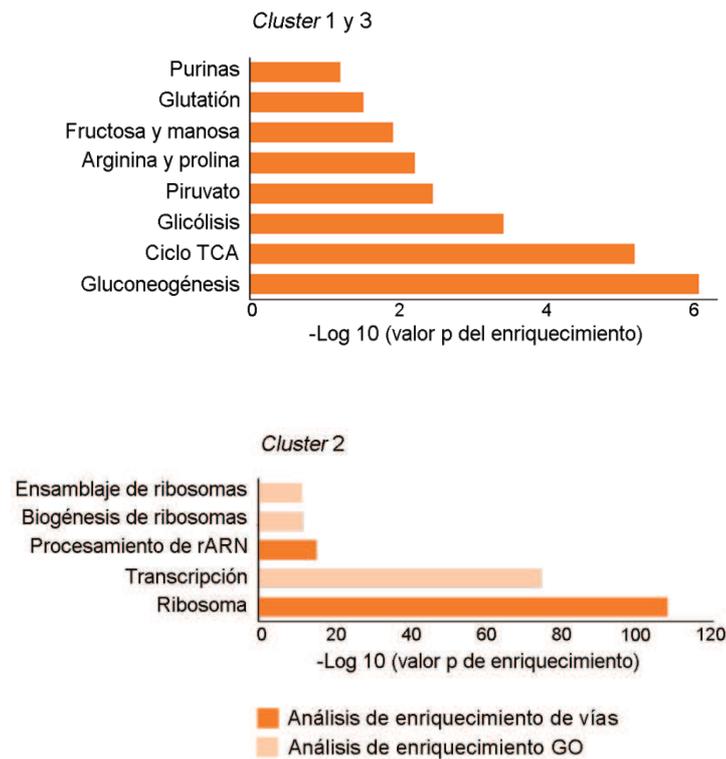
Particularmente interesante es el caso de los genes diferencialmente expresados entre los distintos genotipos en condiciones de STV y que no responden al hambre en animales  $cg>p53^{H159.N}$  (en la Figura 73: 595 exclusivos del grupo STV\_genotipo y 1143 en la intersección de éste con el grupo  $w^{1118}$ \_tratamiento), parámetros que excluyen genes que se vean afectados en condiciones WF y que respondan al hambre aún en ausencia de actividad p53. El análisis de *clusters* dividió estos genes en principalmente dos tipos de perfiles: genes que se inducen en respuesta al hambre en larvas control pero no en larvas  $cg>p53^{H159.N}$  (*clusters* 1 y 3), y genes cuya transcripción se inhibe en respuesta al hambre en animales control y se mantienen activos en larvas  $cg>p53^{H159.N}$  (*cluster* 2). El análisis de GO y KEGG para el *cluster* 1 y 3 mostró genes metabólicos asociados al metabolismo de purinas, glutatión, fructosa, manosa, arginina, prolina y piruvato; y genes asociados a la vía de la glicólisis, al ciclo de TCA y a la gluconeogénesis (Figura 75). Por el contrario, el *cluster* 2 mostró genes principalmente asociados a la transcripción y biogénesis de ribosomas (Figura 75), procesos celulares energéticamente demandantes reducidos frente a la privación de nutrientes.



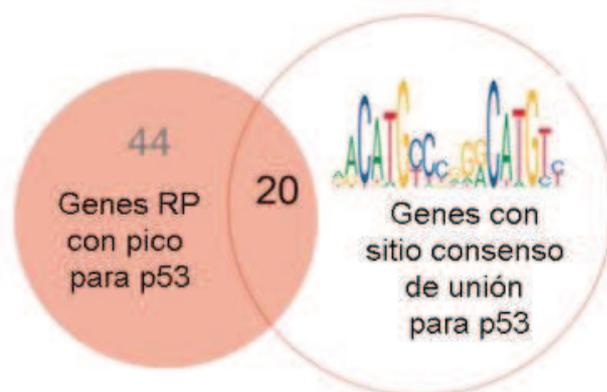
**Figura 74.** Gráfico *Heatmap* del comportamiento de un grupo de genes diferencialmente expresados entre *cg>+* y *cg>p53<sup>H159.N</sup>* en STV. El cluster 2 muestra un enriquecimiento de genes relacionados a traducción y biogénesis de ribosomas (líneas azules y celestes). También se señalan aquellos genes que presentan picos de unión de Dmp53 según datos de CHIP-Seq (líneas amarillas).

Con el fin de evaluar si los genes asociados a los distintos clusters podrían ser genes blanco de p53, se compararon los datos obtenidos en el análisis de RNA-seq con datos de CHIP-Seq previamente publicados para p53 en *Drosophila* (Kudron et al., 2018; Kurtz et al., 2019) Dicho análisis mostró un enriquecimiento significativo de picos de unión de p53 presentes en genes del *cluster 2* (Figura 74,  $p=2.457e-12$ , test de Fisher). Sorprendentemente, de los 94 genes que codifican para proteínas ribosomales (RP) en el genoma de *Drosophila*, 76 genes se encuentran regulados en STV de manera dependiente de p53 y 64 de estos genes presentan picos de unión

para este factor de transcripción (Figura 74). Adicionalmente, 20 de estos genes RP con pico de unión para p53 contienen la secuencia consenso de unión de p53 al ADN en su región promotora (Figura 76). Estos resultados sugieren que p53 se une a los promotores de genes RP y regula negativamente su transcripción en respuesta al hambreado.



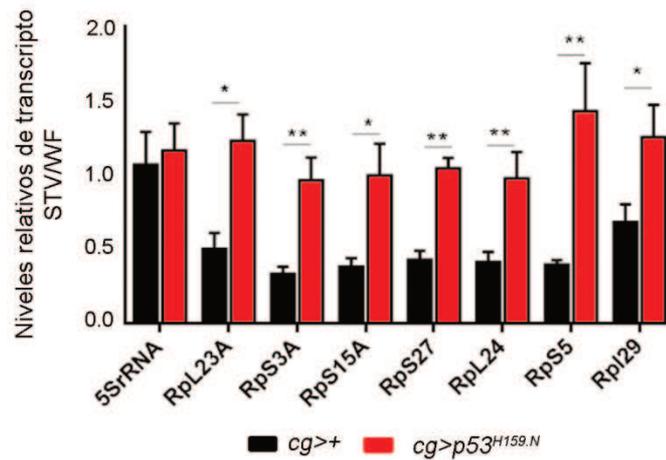
**Figura 75.** Análisis de GO y KEGG para los *clusters* 1,2 y 3 obtenidos en el análisis de datos del RNA-seq.



**Figura 76.** Genes RP que presentan la secuencia consenso de unión de p53 al ADN.

Como criterio de validación de los resultados transcriptómicos, se midieron por qRT-PCR los niveles de mRNA de siete RP a partir de muestras independientes

obtenidas de FB de larvas control y  $cg>p53^{H159.N}$  en WF y STV. Los niveles de expresión de los 7 genes RP analizados se reducen en respuesta a STV en animales control, sin embargo, la bajada en los niveles de expresión de dichos genes se rescata cuando se bloquea la activación de p53 en el FB. En el caso de los niveles del 5SrRNA, no observamos cambios en respuesta a STV al menos en los tiempos analizados (Figura 77).



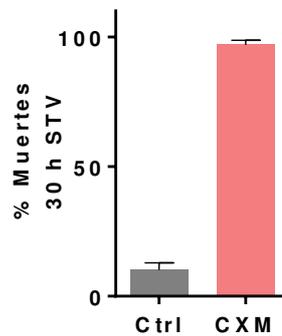
**Figura 77.** Medida de los niveles de transcripto para diversos genes RP y 5SrRNA en el FB de larvas control ( $cg>+$ ) y  $cg>p53^{H159.N}$  sometidas a 24 h de hambreado (STV). Las barras de error representan SEM. \*\*  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$ .

## 10.2 Rol de la traducción y biogénesis de ribosomas en el consumo acelerado de glucógeno en ausencia de p53

Como mencionado en apartados anteriores, el consumo acelerado de glucógeno en animales que carecen de actividad p53 en el FB no parece estar ligado a la regulación de la señalización de insulina por parte de esta proteína. Otra alternativa que podría explicar este fenotipo se desprende de resultados obtenidos de la secuenciación masiva de ARN, donde p53 regula la expresión de genes RP y por consiguiente, los niveles de traducción y biogénesis de ribosomas, ambos procesos altamente demandantes en términos energéticos. De esta manera, las altas tasas de traducción y síntesis de ribosomas durante periodos de hambreado generadas por la falta de p53 podría explicar un consumo acelerado de reservas energéticas en estos individuos. Con el fin de analizar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos modulando la traducción y la biogénesis de ribosomas.

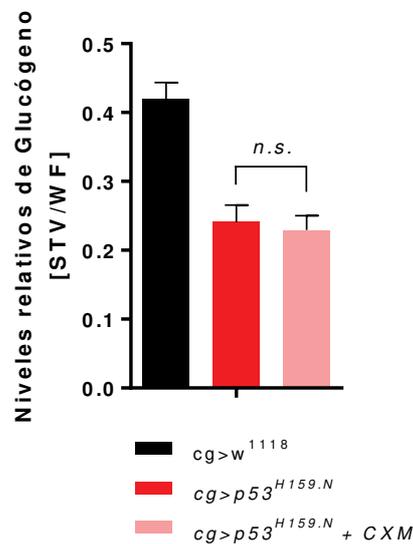
Para modular los niveles de traducción, se empleó la droga cicloheximida (CXM), que inhibe la síntesis de proteínas *de novo* bloqueando la elongación de la traducción. El efecto de este tratamiento puede corroborarse a partir de las altas tasas

de mortalidad a largos periodos de hambreado, posiblemente por la falta de traducción de proteínas necesarias para hacerle frente a este tipo de estrés (Figura 78).



**Figura 78.** Porcentaje de individuos muertos luego de 30 h de hambreado habiendo sido sometidos a un pretratamiento con solución al 5% de sacarosa (Ctrl) y una solución de 5% de sacarosa y 35 mM de CXM (CXM). Las barras de error representan SEM.

El tratamiento con CXM de animales carentes de actividad p53 en el FB no afectó los niveles de glucógeno luego de la privación de nutrientes. Eso sugiere que los niveles de la traducción de proteínas no estarían relacionados al consumo de glucógeno luego de periodos de hambreado.

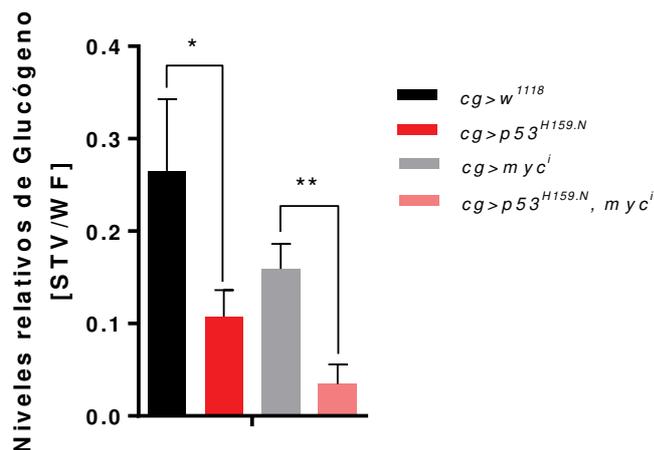


**Figura 79.** Niveles de glucógeno relativos a condiciones control (WF) en adultos *cg>+* y *cg>P53<sup>H159.N</sup>* luego de 24 h de hambreado pretratados o no con cicloheximida. Las barras de error representan SEM.

Con el fin de llevar a cabo un análisis similar respecto a la biogénesis de ribosomas, se utilizó una herramienta de silenciamiento del gen Myc de *Drosophila* (*Myc<sup>i</sup>*). Myc, un factor de transcripción altamente conservado, es un regulador central

de la biogénesis de ribosomas y la traducción de proteínas tanto en *Drosophila* como en mamíferos (Gallant, 2013; van Riggelen et al., 2010). Estudios en células de mamíferos han demostrado que Myc regula directamente la expresión de proteínas y ARN ribosomales, cofactores necesarios para el procesamiento y ensamblado de los diferentes componentes del ribosoma, así como también factores que controlan la iniciación de la traducción. Específicamente en lo que respecta a las proteínas ribosomales, Myc regula su transcripción por unión directa a secuencias E-box ubicadas en la región regulatoria de dichos genes (van Riggelen et al., 2010). Si bien en *Drosophila* no se ha estudiado el rol de Myc en la regulación de la biogénesis de ribosomas con el mismo nivel de detalle, dado su grado de conservación, es esperable que actúe a través de mecanismos similares.

Para evaluar si la biogénesis de ribosomas dependiente de Myc afecta los niveles de glucógeno en individuos sin actividad de p53 en el FB se expresó Myc<sup>i</sup> en el FB de larvas control y expresando la versión dominante negativa de p53 en este mismo órgano. Resultados preliminares mostraron que, si bien la expresión de Myc<sup>i</sup> resultó en individuos con menor contenido de glucógeno luego de un periodo de hambre, las diferencias en las tasas de consumo entre animales control y expresando p53<sup>H159.N</sup> no se vieron afectadas (Figura 80). Estos resultados preliminares sugieren que la función de p53 en la regulación de reservas energéticas no estaría asociada a la modulación de la traducción ni tampoco a la regulación de la biogénesis de ribosomas.

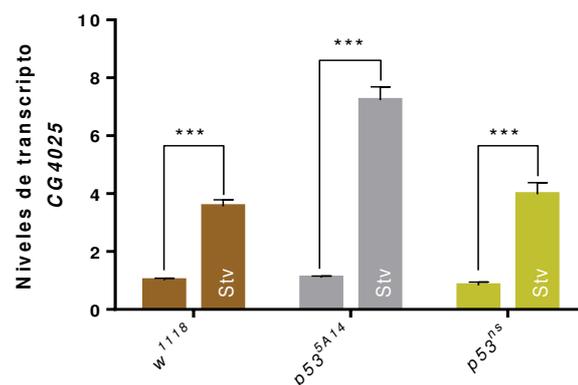


**Figura 80.** Niveles de glucógeno relativos a condiciones control (WF) en adultos *cg>+* y *cg>P53<sup>H159.N</sup>* luego de 24 h de hambre expresando o no un ARN de interferencia contra el gen Myc (Myc<sup>i</sup>) específicamente en el FB. Las barras de error representan SEM. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

## 11. CG4025 y p53

### 11.1 CG4025 se induce en respuesta a la falta de nutrientes de forma independiente de p53

Dentro de los objetivos de esta tesis se propuso analizar el gen relacionado a autofagia *CG4025/dDRAM* como un posible blanco transcripcional de p53 inducible frente a la falta de nutrientes. Para analizar este punto, se midieron por RT-qPCR los niveles del gen *CG4025* en larvas L3 crecidas en condiciones control y luego de 4 horas de hambreado. De forma consistente con trabajos anteriores, se observó una contundente inducción de este gen frente a la falta de nutrientes. A su vez, para corroborar si la inducción de este gen en estas condiciones depende de p53 se llevaron a cabo las mismas determinaciones en larvas mutantes para p53 (*p53<sup>ns</sup>* y *p53<sup>5A14</sup>*). La inducción de *CG2045* en individuos mutantes para p53 fue similar a la observada en animales control, hecho que sugiere que este gen en este contexto particular se regula de forma independiente de p53 (Figura 81).

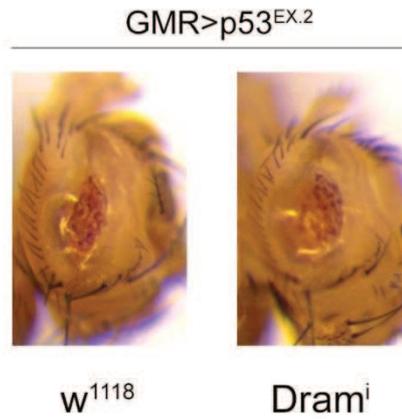


**Figura 81.** Niveles de transcripto medidos por RT-qPCR del gen *CG4025* en animales control (*w<sup>1118</sup>*) y mutantes para p53 (*p53<sup>5A14</sup>* y *p53<sup>ns</sup>*) en condiciones óptimas de alimentación y luego de 4h de hambreado (Stv).

### 11.2 CG4025 no es necesario para apoptosis dependiente de p53

Con el fin de complementar los resultados anteriores donde se mostró que la inducción del gen *CG4025* en respuesta al hambreado no parece depender de p53, se propuso indagar sobre el rol de *DRAM* en otras respuestas mediadas por este factor de transcripción. Trabajos previos han mostrado que al menos *DRAM1* en vertebrados es requerido para la respuesta apoptótica de p53 (Guan et al., 2015). En este sentido, se propuso analizar el efecto de la expresión de *CG4025<sup>i</sup>* en la apoptosis generada por la sobreexpresión de p53 de *Drosophila* en el primordio de ojo de adultos *GMR>p53Ex.2*. De forma análoga a lo observado luego de tratamientos de

hambreado, la apoptosis generada por la sobreexpresión de p53 no parece verse afectada por el silenciamiento del gen *CG4025* (Figura 82). Estos resultados sugieren que, al menos en este contexto, el gen *CG4025/DRAM* no sería necesario para la inducción de apoptosis mediada por p53.



**Figura 82.** Apoptosis en el ojo de *Drosophila* generada por la sobreexpresión de p53 y su co-expresión con un ARNi contra el gen *DRAM* de *Drosophila*.

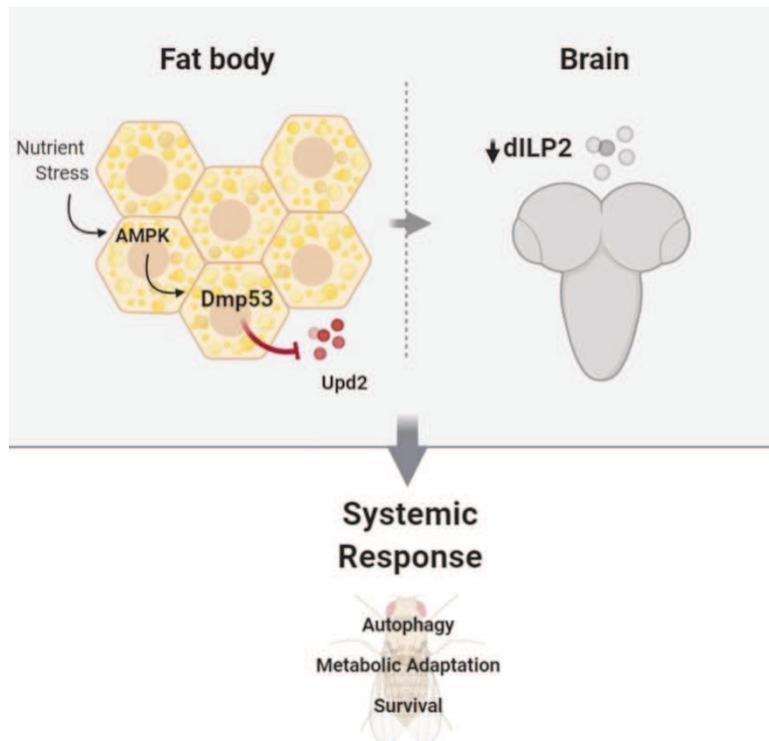
**DISCUSSION**

## 1. Discusión

La disponibilidad de nutrientes en entornos naturales raramente se encuentra asegurada. Debido a esto, la capacidad del organismo de mantener la homeostasis metabólica frente a diversas condiciones nutricionales es de vital importancia para su supervivencia. Las distintas respuestas fisiológicas generadas por variaciones medioambientales en las fuentes de alimento requieren una fina coordinación entre mecanismos de señalización celulares y a nivel hormonal. La coordinación de estos mecanismos genera así efectos diferenciales en distintos tejidos en pos de mantener la homeostasis metabólica. Todos éstos son procesos complejos y su desregulación puede derivar tanto en el desarrollo de desórdenes metabólicos, entre ellos, la obesidad y diabetes, como también inducir la muerte prematura al atravesar largos periodos de hambre. En este contexto, se ha reportado que el gen supresor de tumores p53 es capaz de mediar cambios metabólicos en distintos tejidos y de promover la supervivencia celular frente a la privación de nutrientes (Berkers et al., 2013; Vousden & Ryan, 2009). A pesar de la minuciosa y detallada descripción hecha a lo largo de los años de las funciones celulares canónicas y no canónicas de p53, muchos de estos aspectos metabólicos y el rol en la comunicación inter-órgano aún no han sido dilucidados por completo. Curiosamente, y desde una óptica evolutiva, la presencia de p53 en organismos primitivos (Belyi et al., 2010) sugiere que la función tumor supresora de este gen puede no haber sido su función original y que su capacidad de suprimir el crecimiento de tumores puede haber surgido como consecuencia de funciones metabólicas más antiguas. En este sentido, es posible que la regulación de la homeostasis metabólica sea posicionada en un futuro como una de las principales funciones de p53, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Este trabajo de tesis muestra un rol para p53 de *Drosophila* en el *sensado* de nutrientes y la organización de una respuesta al estrés nutricional a nivel de organismo completo. Interesantemente, esta función de p53 ocurre a nivel del tejido adiposo de *Drosophila*, órgano clave en la adaptación del metabolismo a nivel local y sistémico en función del estado nutricional del individuo. De forma dependiente de AMPK, la activación de p53 en el tejido adiposo es requerida en respuesta al estrés nutricional para la correcta comunicación entre el FB y el cerebro. La represión por parte de p53 de la expresión en el FB de Upd2, homólogo en *Drosophila* de la hormona Leptina, y la activación de la vía JAK/STAT en el cerebro de animales privados de nutrientes son cruciales para la disminución rápida tanto de los niveles de dILP2 en hemolinfa como de la señalización de insulina, y por ende, para la inducción de autofagia a nivel sistémico. Estos efectos son parte de mecanismos de resistencia al hambre,

posicionando al eje AMPK-p53 como una parte esencial del *sensado* de nutrientes y de la regulación de la respuesta fisiológica adaptativa a condiciones nutricionales adversas (Figura 83). Adicionalmente, dada la gran conservación entre *Drosophila* y vertebrados de vías de señalización metabólicas, endocrinas y de *sensado* de nutrientes, los descubrimientos detallados en este trabajo podrían ciertamente contribuir, tanto en contextos patológicos como fisiológicos, al mayor entendimiento del rol de p53 de humanos.



**Figura 83.** Rol esencial de p53 en el tejido adiposo de *Drosophila melanogaster* en el sentido del estrés nutricional y mantenimiento de homeostasis metabólica. Ante la privación de nutrientes y dietas ricas en sacarosa, p53 es activado en el FB y reprime la expresión de Upd2. Esta activación es dependiente de AMPK y conduce a la modulación de los niveles de dilp2, la señalización de TOR/Insulina y la inducción de autofagia.

### 1.1 Regulación de p53 en respuesta a la privación de nutrientes

Las quinasas TOR y AMPK, esenciales en el *sensado* de nutrientes, son reguladores centrales del balance energético tanto a nivel celular como del organismo completo. Previamente, se ha demostrado que ambas quinasas interaccionan con el factor de transcripción p53 (Grewal, 2009; Hietakangas & Cohen, 2009; Jones et al., 2005). Por un lado, en respuesta al daño al DNA, p53 reprime la vía TOR mediante la activación de AMPK (Feng et al., 2005). Asimismo, en células humanas sometidas a privación de glucosa, se ha reportado que AMPK se activa y fosforila p53 en su residuo Ser-15 (Jones et al., 2005; Okoshi et al., 2008). Mutantes de p53 en la serina

15 son incapaces de dirigir la respuesta transcripcional dependiente de p53 ni inducir arresto del ciclo celular en respuesta al estrés nutricional (Loughery et al., 2014). Interesantemente, en células humanas, la fosforilación de este residuo se da de forma rápida (15 minutos luego de la privación de glucosa) y puede ser revertida por la fosfatasa PP2A dependiente de TOR (Feng et al., 2005). AMPK también es capaz de estabilizar p53 mediante otros mecanismos como la fosforilación e inhibición de MDMX o inhibición de la deacetilasa Sirt1 (He et al., 2014; Lee et al., 2012). En este trabajo, se demostró que la activación rápida de p53 a tiempos cortos de hambreado (4 horas) en el FB es dependiente de AMPK y es absolutamente requerida para los cambios metabólicos y fisiológicos que promueven la resistencia a la privación de nutrientes en *Drosophila*. De forma consistente, trabajos posteriores observaron fosforilación y activación de p53 de forma dependiente de AMPK en adipocitos maduros de ratón sometidos a la falta de nutrientes (H. Wang et al., 2020a). De esta manera, sería útil demostrar y caracterizar la fosforilación de p53 por AMPK en *Drosophila* con el fin tanto de validar los estudios desarrollados en este trabajo de tesis como también de identificar nuevos elementos o mecanismos de retroalimentación involucrados en dicha interacción. En este sentido, sería interesante evaluar el rol de Sir2 (homólogo a Sirt1 en *Drosophila*) en la modulación de la actividad p53 por AMPK. Sir2 es particularmente relevante en este contexto dado que su silenciamiento en el FB tiene efectos no autónomos celulares en la señalización de insulina y afecta la movilización de lípidos y la supervivencia a la falta de nutrientes (Banerjee et al., 2012). Sería interesante analizar el rol de la inhibición de Sir2 por AMPK frente a la falta de nutrientes y hasta qué punto los efectos metabólicos observados tras su silenciamiento o represión, en especial los que respectan a la movilización de reservas, dependen de p53.

En trabajos anteriores desarrollados en el laboratorio, se demostró en larvas de *Drosophila* que la inhibición de TOR luego de periodos largos de hambreado (24-48 h) contribuye a la activación de p53 en el FB, principalmente disminuyendo el silenciamiento de este gen mediado por miARNs (Barrio et al., 2014). Sabiendo esto, la activación a corto plazo de p53 por parte de AMPK podría ser parte de un mecanismo dual actuando junto con la activación mediada por inhibición de TOR frente a periodos de hambreado de mayor duración. Ambos mecanismos de regulación pueden ser importantes para establecer respuestas específicas según el tipo de estrés; una respuesta rápida frente a un estrés nutricional transitorio que, a su vez, pueda derivar en una adaptación sostenida al permanecer la situación de estrés por periodos más largos. Adicionalmente, el hecho de que la activación de p53 reprima la

expresión de Upd2, la señalización de insulina y la señalización TOR a nivel sistémico permite especular que dicha inhibición de TOR (dependiente de p53) constituye un mecanismo de retroalimentación positiva para mantener la activación de p53 frente a periodos de hambre de larga duración. Más allá de estas hipótesis sobre la cooperación de los mecanismos de activación de p53 frente a la falta de nutrientes, nuestros resultados ubican a este factor de transcripción en una posición clave coordinando las vías de *sensado* de nutrientes con mecanismos endócrinos, como parte de un posible mecanismo fisiológico de retroalimentación y control ante el estrés nutricional.

## **1.2 Nexo entre AMPK y autofagia**

AMPK es un regulador central de múltiples vías metabólicas y su actividad se encuentra afectada en enfermedades como la obesidad, inflamación, diabetes y cáncer (Jeon, 2016). Esta serina/treonina quinasa responde a bajos niveles en el estado energético celular y una vez activa, en el intento de recuperar la homeostasis energética, promueve procesos catabólicos relacionados a la generación de ATP e inhibe aquellos anabólicos que consumen ATP (Day et al., 2017). De esta manera, frente a situaciones de estrés nutricional, AMPK favorece procesos como la captación de glucosa, oxidación de ácidos grasos, biogénesis de mitocondrias y autofagia, y limita la síntesis de ácidos grasos, colesterol y proteínas (Day et al., 2017). Particularmente en el caso de autofagia, a pesar de que se ha reportado que AMPK activa este proceso de forma autónoma celular por fosforilación y activación directa de ULK1/ATG1 e indirectamente por inhibición de mTORC1 (Joungmok Kim et al., 2011), nuestros resultados indican que, en el FB de larvas sometidas a 4 horas de hambre, AMPK regula autofagia a nivel sistémico. De forma previa y consistente con estos resultados, se ha demostrado que esta quinasa es capaz de modular características complejas a nivel del organismo completo, como el tiempo de vida, el envejecimiento y la resistencia a insulina (Entezari et al., 2022). Interesantemente, uno de estos estudios ha reportado que AMPK de *Drosophila* promueve la proteostásis de tejido a través de la regulación no autónoma celular de autofagia (Stenesen et al., 2013; Ulgherait et al., 2014), influenciando así el envejecimiento y el tiempo de vida de los individuos analizados. De manera análoga, en este trabajo se evidencia un rol de la quinasa AMPK a nivel del FB al conferir resistencia a la falta de nutrientes mediante la regulación de autofagia a nivel sistémico y afectación del organismo completo. Interesantemente, la regulación de autofagia en este contexto ocurre de forma inversamente proporcional a los niveles de dILP2 en circulación, sugiriendo que éste podría ser el mecanismo por el cual AMPK confiere resistencia al hambre. La

realización de experimentos de rescate silenciando AMPK y sobre-expresando Impl2 para modular los niveles de dILP2 en circulación podrían corroborar esta hipótesis. Finalmente, es necesario recalcar que la regulación sistémica de autofagia descrita en este trabajo no quita que otros mecanismos dependientes de AMPK, posiblemente a nivel autónomo celular, tengan un rol relevante en otros contextos o frente a periodos de hambre de mayor duración.

### **1.3 Rol de p53 frente al exceso de nutrientes**

La exposición a dietas ricas en nutrientes genera un desbalance en el organismo entre el consumo de calorías y el gasto energético que eventualmente deriva en el aumento de peso corporal y el desarrollo de obesidad. La obesidad, caracterizada por un exceso de tejido adiposo, predispone a pacientes a desarrollar resistencia a insulina y es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de patologías como el síndrome metabólico, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Krstic et al., 2018b). A pesar de que las funciones del factor de transcripción p53 en el tejido adiposo han sido previamente exploradas, su rol en el desarrollo de patologías como la obesidad y diabetes aún no se encuentra claro. La inducción transcripcional y/o de la proteína p53 han sido observados tanto en el tejido adiposo de ratones genéticamente obesos ob/ob (Yahagi et al., 2003) como en el tejido adiposo de ratones y ratas sometidos a dietas altamente calóricas. Asimismo, se ha observado un incremento en la expresión de p53 en el tejido adiposo de pacientes humanos con obesidad (S. Liu et al., 2017a; Ortega et al., 2013; Zand et al., 2016). Los niveles de p53 en estos contextos patológicos han sido relacionados al desarrollo de resistencia a insulina y a los niveles de inflamación en los tejidos analizados (Strycharz et al., 2017). Asimismo, se ha reportado que la inhibición genética o farmacológica de p53 en ratones con fenotipos similares a diabetes tipo 2 previene la acumulación de grasa excesiva (Derdak et al., 2013; Yokoyama et al., 2014), resulta en una menor expresión de citoquinas proinflamatorias y mejora los niveles de resistencia a insulina (Minamino et al., 2009; H. Wang et al., 2020a). Estos efectos detrimentales se contraponen a los efectos adaptativos que se observan frente a periodos de hambre, confiriéndole a la activación de este gen en condiciones de abundancia de nutrientes un carácter patológico y no deseable. Trabajos previos han propuesto que los efectos nocivos de la actividad de p53 en estos contextos son resultado de la represión del gasto energético y la captación de glucosa como parte de su respuesta transcripcional (S. Liu et al., 2017b). En este trabajo se determinó que la actividad de p53 en el FB resulta detrimental frente a dietas ricas en grasas (HFD) señalando que este organismo modelo puede ser de especial utilidad para esclarecer

las interacciones genéticas y mecanismos moleculares que median las funciones nocivas de p53 en este contexto. En este sentido, sería interesante determinar si, además de su rol transcripcional, la regulación no autónoma celular de Upd2/Leptina por parte de p53 juega algún papel en la sensibilidad a dietas HFD.

Sumando un nivel de complejidad al análisis de la función de p53 en condiciones nutricionales adversas, experimentos de viabilidad realizados en dietas HSD o ricas en azúcares mostraron resultados disímiles. En contraposición con lo observado bajo dietas HFD, el crecimiento de individuos bajo HSD reflejaron un rol de p53 de carácter adaptativo y beneficioso frente a dicha condición de estrés. Estos resultados sugieren distintos roles de p53 dependiendo la naturaleza específica del estrés nutricional. En el caso particular del metabolismo de azúcares, se sabe que en condiciones fisiológicas normales p53 es necesario para la homeostasis en el metabolismo de glucosa. Por otro lado, se ha reportado que la pérdida de actividad p53 en ratones disminuye la tolerancia a glucosa (Armata et al., 2010; Franck et al., 2013; Ortega et al., 2013) mientras que los niveles de expresión de este factor de transcripción se encuentran inversamente relacionados a la intolerancia a glucosa en humanos (Ortega et al., 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que la droga Metformina, ampliamente utilizada para tratar la diabetes, actúa de forma dependiente de p53 (H. Wang et al., 2020b). Todos estos datos podrían sugerir que p53 es necesario para el correcto metabolismo de azúcares a nivel del tejido adiposo y que estas vías metabólicas son requeridas frente a dietas HSD pero no estrictamente necesarias en animales crecidos bajo HFD. De esta manera, un mayor entendimiento del rol de p53 y su contribución al mantenimiento de la homeostasis metabólica en distintos contextos nutricionales ayudarían a esclarecer la naturaleza compleja de p53 y sus roles específicos en distintas patologías de índole metabólica.

#### **1.4 Leptina/Upd2 como molécula efectora de p53**

##### *1.4.1 Upd2 como homólogo de Leptina*

En esta tesis se ha mostrado que la activación de p53 en el tejido adiposo de *Drosophila* impacta la señalización de insulina y la inducción de autofagia a nivel sistémico en respuesta a la falta de nutrientes. Notablemente, los efectos deletéreos de la falta de p53 en el tejido adiposo durante periodos de hambreado fueron ampliamente revertidos mediante inhibición ya sea de la expresión del péptido Upd2 en el FB o la señalización JAK/STAT mediada por éste en neuronas GABAérgicas del cerebro. Trabajos previos han mostrado que múltiples fenotipos observados en mutantes de Upd2 son rescatados por expresión de la hormona de mamíferos Leptina,

señalando a Upd2 como su homólogo en *Drosophila* (Rajan & Perrimon, 2012). De forma similar a Upd2, Leptina regula el apetito, el gasto energético y el metabolismo principalmente modulando la vía JAK/STAT de blancos neuronales presentes en el cerebro (Mullen & Gonzalez-Perez, 2016; Picó et al., 2022a). Los niveles de Leptina en circulación declinan frente al hambre y se encuentran aumentados en animales crecidos bajo una dieta de alto contenido calórico (Ahima et al., 1996; Frederich et al., 1995). Bajos niveles de Leptina durante el hambre desencadenan respuestas metabólicas y hormonales, como el aumento en el apetito y la reducción del gasto energético (Ahima et al., 1996; Sano et al., 2015). De forma contraria, los altos niveles de Leptina bajo dietas altamente calóricas actúan en el CNS para reducir la ingesta de alimentos y favorecer el gasto energético, limitado la obesidad en tiempos de abundancia de nutrientes (Ahima et al., 1996). Ratones *ob/ob*, mutantes para el gen que codifica esta hormona, resultan en el desarrollo temprano de obesidad mórbida, hiperfagia, baja temperatura corporal, baja tasa metabólica, inmunodeficiencia y resistencia a insulina (Picó et al., 2022b). Por el contrario, en mutantes Upd2 no se ve alterado el nivel absoluto de ingesta resultando en moscas más pequeñas y delgadas. A pesar de mostrar fenotipos divergentes en relación al peso corporal, la falta de tanto Upd2 en *Drosophila* como Leptina en vertebrados deriva en deficiencias metabólicas, principalmente relacionadas al metabolismo de lípidos y grasas.

#### 1.4.2 Relevancia fisiológica de la interacción entre Upd2/Leptina y p53

En este trabajo de tesis se ha reportado la modulación de Upd2 por parte del factor de transcripción p53. Estudios anteriores en vertebrados, a su vez, observaron la regulación de p53 dependiente de Leptina principalmente en contextos relacionados al cáncer (J. Wang et al., 2021; Zahid et al., 2017). La integración de toda esta información desprende múltiples interrogantes. En primer lugar, la capacidad de Leptina de inhibir la actividad de p53 en contextos patológicos podría a su vez tener un rol fisiológico en el control de los niveles basales de p53 bajo condiciones óptimas de alimentación mediante mecanismos de retroalimentación negativa. De esta manera, sería interesante evaluar si Upd2 es capaz de inhibir la actividad de p53 en *Drosophila*. En segundo lugar, múltiples estudios epidemiológicos llevados a cabo en las últimas décadas señalan a la obesidad como un factor de riesgo en cáncer (Zvezdaryk et al., 2018), haciendo particularmente interesante la interrelación entre un gen modulador del metabolismo como lo es la Leptina y un gen supresor de tumores como p53. De esta manera, futuros análisis en vertebrados podrán dilucidar el nivel de relevancia de los mecanismos de regulación entre p53 y Leptina en el desarrollo de cáncer.

### 1.4.3 Rol de la hormona Leptina en el desarrollo de cáncer

A partir de estudios utilizando modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha mostrado que la producción de Leptina en el tejido adiposo es relevante en muchos aspectos de la biología del cáncer, desde etapas iniciales en la tumorigénesis hasta la progresión metastásica (Herrera-Vargas et al., 2021; Maroni, 2020). En este sentido, se ha demostrado que los elevados niveles de Leptina presentes en pacientes obesos tienen funciones hormonales capaces de afectar el desarrollo de tumores. Resultados similares se observaron en ratones, donde los altos niveles de Leptina presentes en ratones obesos contribuyeron al desarrollo de pólipos de colon inducidos por carcinógenos (S. Singh et al., 2020). De forma adicional a su rol sistémico, la Leptina secretada por adipocitos y fibroblastos residentes en el microambiente de tumores de mama pueden inducir el desarrollo de las células cancerígenas de forma parácrina mediante la activación de la vía JAK/STAT y otras vías canónicas (Andò et al., 2019; Lin & Hsiao, 2021). Muchas de estas vías de señalización comparten elementos con vías oncogénicas, favoreciendo aún más la proliferación de tumores (Mullen & Gonzalez-Perez, 2016). Interesantemente, esta hormona no sólo es secretada por células vecinas, sino también por las mismas células cancerígenas, apoyando la proliferación e invasión del tumor dentro del tejido lindante a través de un corto mecanismo de retroalimentación autócrino (Andò et al., 2019; Maroni, 2020; Y. Xu et al., 2019). En conclusión, la íntima relación entre la hormona Leptina y el desarrollo de cáncer indica que los resultados obtenidos en esta tesis, además de su aporte al entendimiento del rol fisiológico de p53, son sumamente relevantes en condiciones patológicas al sugerir un rol para p53 en la supresión de tumores vía represión de Upd2/Leptina actuando tanto a nivel local como del organismo completo.

## 1.5 Eje AMPK-p53 en la regulación del metabolismo energético

La respuesta de un organismo al estrés metabólico como la privación de nutrientes, es ampliamente dependiente de su capacidad de extraer energía desde reservas almacenadas principalmente en forma de glucógeno y TAGs (Arrese & Soulages, 2010; Leopold & Perrimon, 2007). En *Drosophila*, la homeostasis energética es mantenida mediante la acción combinada de las hormonas dILPs y Akh. En animales bien alimentados, la señalización de insulina promueve el almacenamiento de reservas mientras que, frente a la falta de nutrientes, Akh y los bajos niveles de dILP2 contribuyen a su movilización (Bharucha et al., 2008; Géminard et al., 2009; Rulifson et al., 2002). A su vez, como dicho anteriormente, el péptido hormona Upd2/Leptina estimula el gasto energético en condiciones óptimas de alimentación mientras que lo inhibe frente a la escasez de nutrientes. En un estudio previo, se ha

sugerido que p53 participa en la adaptación a la falta de nutrientes mediante la modulación del metabolismo de reservas energéticas (Barrio et al., 2014). Sin embargo, en este trabajo se demostró que p53 confiere resistencia al hambreado exclusivamente mediante la modulación de la vía de la insulina y la represión de Upd2. A pesar de que se ha demostrado que la activación sostenida de la vía de la insulina durante periodos de hambreado bloquean parcialmente la movilización de glucógeno (T. Yamada et al., 2018), el consumo acelerado de éste en ausencia de p53 persiste en animales que a su vez expresan Impl2 o silencian Upd2. Sorprendentemente, a pesar de las diferencias en los niveles de glucógeno, estos animales muestran una resistencia al hambreado semejante a individuos control. De esta manera, la resistencia al hambreado se ve dissociada de los niveles de reservas energéticas, al menos en el contexto analizado y en lo que respecta a p53. Experimentos adicionales serán necesarios para llegar a conclusiones similares respecto de AMPK, dado que el silenciamiento en el FB de esta quinasa resulta en la inhibición total del consumo de glucógeno. Estos resultados son consistentes con estudios en ratón mostrando un rol para AMPK en la regulación del metabolismo de glucógeno por inhibición de la enzima Glucógeno Sintasa (GS) y activación de la Glucógeno Fosforilasa (GP), enzima limitante en la degradación de glucógeno (Hasenour et al., 2017; Hughey et al., 2017). Aunque no es posible excluir la influencia de mecanismos endocrinos distintos de dILP2, estos resultados sugieren una función a nivel autónomo celular concertada de AMPK y p53, involucrando tanto la regulación de la movilización de glucógeno por AMPK como el control del consumo del mismo regulado por p53. Interesantemente, un rol análogo para el eje AMPK-p53 ha sido descrito en el tejido adiposo de ratones en relación al consumo y movilización de lípidos (H. Wang et al., 2020b). En este sentido, corroborar que el consumo acelerado de glucógeno en animales sin actividad p53 ocurre a nivel autónomo celular, y que AMPK actúa a este nivel vía p53 para regular el metabolismo de glucógeno complementaría los estudios del eje AMPK-p53 en la regulación de reservas energéticas en mamíferos.

Trabajos anteriores han postulado que el proceso de autofagia se encuentra involucrado en la degradación de glucógeno en respuesta al hambreado (Zirin et al., 2013). Sin embargo, según los autores, su rol en este contexto es parcial y puede ser compensado por mecanismos de degradación enzimática independientes. En efecto, esto es corroborado en nuestro trabajo ya que no se observan cambios en la movilización de glucógeno luego de la inhibición del proceso de autofagia. De esta manera, el consumo acelerado de glucógeno en animales sin actividad p53 en el FB podría ser atribuido a funciones metabólicas de p53 diferentes de aquellas que regulan

la señalización de insulina, Upd2 y autofagia. Interesantemente, mediante el análisis de datos de RNA-seq, se identificaron procesos regulados por p53 y energéticamente demandantes que podrían influir en el consumo diferencial de reservas energéticas como la biogénesis de ribosomas y el proceso de traducción. A pesar de que estudios preliminares han mostrado que la modulación de estos procesos no revierte el consumo acelerado de glucógeno por falta de actividad p53, experimentos adicionales serán necesarios para descartar el rol de estos procesos en la modulación del metabolismo de glucógeno por parte de p53. A su vez, se realizará una exploración de los datos obtenidos en el estudio de RNA-seq más detallada y focalizada en el comportamiento de genes metabólicos que, con la ayuda de futuros estudios metabolómicos, pueda identificar procesos metabólicos adicionales que expliquen la relevancia de la actividad de p53 frente al hambreado.

### **1.6 P53 y biogénesis de ribosomas**

Resultados obtenidos en este trabajo muestran que p53 es requerido frente al hambreado para la represión de genes involucrados en el ensamblado de ribosomas, maduración de ARN ribosomal e iniciación de la traducción. Adicionalmente, estudios de ChIP-seq sugieren que p53 reprime genes de proteínas ribosomales (RP) de forma directa. Aun así, el rol de p53 como represor transcripcional mediante mecanismos directos es controversial (Fischer et al., 2014; Peugeot & Selivanova, 2021). Se ha postulado que la represión transcripcional mediada por p53 sólo ocurre mediante la vía p53-p21-DREAM. En esta vía, p53 induce la expresión de p21 quien a su vez activa el complejo represor DREAM formado por múltiples proteínas entre las que se destacan el factor de transcripción heterodimérico DP/E2F4. Si bien este mecanismo de acción no se ha estudiado en *Drosophila*, según estudios de ChIP-seq la región regulatoria de 68 de las 76 RP candidatas son capaces de unir DP. Investigaciones adicionales con el fin de esclarecer el mecanismo exacto por el cual p53 reprime las RP se están llevando a cabo actualmente en el laboratorio.

Sumando complejidad al análisis de esta función de p53, se ha reportado previamente que la privación de nutrientes altera la biogénesis de ribosomas y causa estrés ribosomal, el cual activa p53. Ante defectos en la biogénesis de ribosomas, la acumulación de RP libres, principalmente RPL5 y RPL11, inhibe la función de MDM2 permitiendo la acumulación y activación de p53. Si bien este mecanismo regulatorio se ha estudiado principalmente en células tumorales en cultivo, evidencias recientes mostraron que la activación de p53 vía RPL5/11 es clave para mantener la homeostasis metabólica frente a la privación de nutrientes en ratones (Y. Liu et al.,

2014; Yanping Zhang & Lu, 2009). La activación de p53 en respuesta al estrés ribosomal ha sido también descrita en *Drosophila* (Hasygar & Hietakangas, 2014; D. Mesquita et al., 2010; Sanchez et al., 2019). Como postulado anteriormente, esta función de p53 en conectar el estrés nutricional y la biogénesis de ribosomas puede ser necesaria para facilitar la homeostasis energética frente a la privación de nutrientes. En qué medida una reducción en la biogénesis de ribosomas mediada por p53 es relevante en la respuesta adaptativa de un organismo ante un estrés nutricional no se conoce. A su vez, las implicancias de un mecanismo limitante para la proliferación celular como lo es la regulación de la biogénesis de ribosomas podrían representar una nueva faceta para la función tumor-supresora de p53. El análisis del rol de estos procesos altamente necesarios para el crecimiento celular en contextos relacionados al cáncer y su modulación por p53 podría representar un claro avance en el entendimiento de este factor de transcripción y su función tumor-supresora en contextos patológicos.

**CONCLUSIONES**

## **1. Conclusiones**

- La actividad de p53 en el Fat body o tejido graso de Drosophila juega un rol fundamental en la adaptación metabólica del organismo al estrés nutricional
- p53 se induce transcripcionalmente y es activado por la quinasa AMPK en respuesta a la privación de nutrientes
- El eje AMPK-p53 es necesario en el FB para la supervivencia al hambre y a dietas ricas en sacarosa
- La actividad de p53 frente a la falta de nutrientes es necesaria para una correcta inactivación de TOR e inducción de autofagia a nivel sistémico
- La actividad de p53 en el FB reprime la expresión de Upd2/Leptina, la cual controla de forma remota la secreción de dILP2 desde las IPCs
- La represión de Upd2 en el FB por p53 es necesaria para una correcta regulación de la secreción de dILP2 frente a la falta de nutrientes
- La rápida regulación de los niveles circulantes de dILP2 por p53 en el FB son necesarios para la supervivencia al hambre
- p53 en el FB regula el uso eficiente de reservas de glucógeno de forma independiente a su rol en la señalización de insulina
- p53 es necesario en el FB para el uso eficiente de glucógeno frente a la privación de nutrientes mientras que AMPK es necesario para su movilización
- Autofagia en el FB no es necesario para el uso eficiente de reservas de glucógeno ni tampoco su movilización frente a periodos de hambre
- La actividad de p53 es necesaria en el FB para una correcta regulación a nivel transcripcional de múltiples procesos biológicos de respuesta al hambre
- La actividad de p53 es necesaria en respuesta al hambre para la inhibición directa de un gran porcentaje de las proteínas ribosomales presentes en Drosophila
- p53 en el FB regula el uso eficiente de reservas de glucógeno de forma independiente a su rol en la regulación de la traducción y de la biogénesis de ribosomas
- El gen CG4025 se induce en respuesta a la falta de nutrientes pero su inducción es independiente de p53
- El gen CG4025 no es necesario para la inducción de apoptosis en el ojo de Drosophila

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Craig Venter, J. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5461), 2185–2195. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5461.2185>
- Agrawal, N., Delanoue, R., Mauri, A., Basco, D., Pasco, M., Thorens, B., & Léopold, P. (2016). The *Drosophila* TNF Eiger Is an Adipokine that Acts on Insulin-Producing Cells to Mediate Nutrient Response. *Cell Metabolism*, *23*(4), 675–684. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.003>
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., & Flier, J. S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, *382*(6588), 250–252. <https://doi.org/10.1038/382250a0>
- Akdemir, F., Christich, A., Sogame, N., Chapo, J., & Abrams, J. M. (2007). p53 directs focused genomic responses in *Drosophila*. *Oncogene*, *26*(36), 5184–5193. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1210328>
- Alexa, A., Rahnenführer, J., & Lengauer, T. (2006). Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *22*(13), 1600–1607. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl140>
- Amanda Lee, J. E., Cranna, N. J., Chahal, A. S., & Quinn, L. M. (2012). Genetic systems to investigate regulation of oncogenes and tumour suppressor genes in *Drosophila*. *Cells*, *1*(4), 1183–1196. <https://doi.org/10.3390/CELLS1041182>
- Andersen, D. S., Colombani, J., & Léopold, P. (2013). Coordination of organ growth: principles and outstanding questions from the world of insects. *Trends in cell biology*, *23*(7), 336–344. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2013.03.005>
- Andò, S., Gelsomino, L., Panza, S., Giordano, C., Bonofiglio, D., Barone, I., & Catalano, S. (2019). Obesity, Leptin and Breast Cancer: Epidemiological Evidence and Proposed Mechanisms. *Cancers*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/cancers11010062>
- Armata, H. L., Golebiowski, D., Jung, D. Y., Ko, H. J., Kim, J. K., & Sluss, H. K. (2010). Requirement of the ATM/p53 Tumor Suppressor Pathway for Glucose Homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(24), 5787–5794. <https://doi.org/10.1128/MCB.00347-10/ASSET/29FAA6C1-4C66-483B-97A7-A640985440D8/ASSETS/GRAPHIC/ZMB9991088720005.JPEG>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual review of entomology*, *55*, 207–225. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-112408-085356>
- Arsham, A. M., & Neufeld, T. P. (2009). A Genetic Screen in *Drosophila* Reveals Novel Cytoprotective Functions of the Autophagy-Lysosome Pathway. *PLOS ONE*, *4*(6), e6068. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006068>
- Bai, H., Kang, P., Hernandez, A. M., & Tatar, M. (2013). Activin Signaling Targeted by Insulin/dFOXO Regulates Aging and Muscle Proteostasis in *Drosophila*. *PLOS Genetics*, *9*(11), e1003941. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003941>

- Bai, H., Kang, P., & Tatar, M. (2012). Drosophila insulin-like peptide-6 (dilp6) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of Drosophila insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell*, *11*(6), 978. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12000>
- Banerjee, K. K., Ayyub, C., Sengupta, S., & Kolthur-Seetharam, U. (2012). dSir2 deficiency in the fatbody, but not muscles, affects systemic insulin signaling, fat mobilization and starvation survival in flies. *Aging*, *4*(3), 206–223. <https://doi.org/10.18632/AGING.100435>
- Barrio, L., Dekanty, A., & Milán, M. (2014). MicroRNA-Mediated Regulation of Dp53 in the Drosophila Fat Body Contributes to Metabolic Adaptation to Nutrient Deprivation. *Cell Reports*, *8*(2), 528–541. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.020>
- Barthet, V. J. A., Mrschtik, M., Kania, E., McEwan, D. G., Croft, D., O'Prey, J., Long, J. S., & Ryan, K. M. (2022). DRAM-4 and DRAM-5 are compensatory regulators of autophagy and cell survival in nutrient-deprived conditions. *The FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/FEBS.16365>
- Bauer, J. H., Chang, C., Morris, S. N. S., Hozier, S., Andersen, S., Waitzman, J. S., & Helfand, S. L. (2007). Expression of dominant-negative Dmp53 in the adult fly brain inhibits insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(33), 13355–13360. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0706121104>
- Bauer, J. H., & Helfand, S. L. (2009). Sir2 and longevity: the p53 connection. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *8*(12), 1818–1822. <https://doi.org/10.4161/CC.8.12.9010>
- Beller, M., Thiel, K., Thul, P. J., & Jäckle, H. (2010). Lipid droplets: A dynamic organelle moves into focus. *FEBS Letters*, *584*(11), 2176–2182. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.03.022>
- Belyi, V. A., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., & Levine, A. J. (2010). The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(6). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A001198>
- Berkers, C. R., Maddocks, O. D. K., Cheung, E. C., Mor, I., & Vousden, K. H. (2013). Metabolic Regulation by p53 Family Members. *Cell Metabolism*, *18*(5), 617–633. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2013.06.019>
- Bharucha, K. N., Tarr, P., & Zipursky, S. L. (2008). A glucagon-like endocrine pathway in Drosophila modulates both lipid and carbohydrate homeostasis. *The Journal of experimental biology*, *211*(Pt 19), 3103–3110. <https://doi.org/10.1242/JEB.016451>
- Birgisdottir, Å. B., Lamark, T., & Johansen, T. (2013). The LIR motif - crucial for selective autophagy. *Journal of cell science*, *126*(Pt 15), 3237–3247. <https://doi.org/10.1242/JCS.126128>
- 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 metabolism*, *11*(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2009.11.010>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bondar, T., & Medzhitov, R. (2010). p53-mediated hematopoietic stem and progenitor

- cell competition. *Cell stem cell*, 6(4), 309–322.  
<https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.03.002>
- Boulay, J. L., O'Shea, J. J., & Paul, W. E. (2003). Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity*, 19(2), 159–163.  
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00211-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00211-5)
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401–415.  
<https://doi.org/10.1242/DEV.118.2.401>
- Britton, J. S., & Edgar, B. A. (1998). Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development*, 125(11), 2149–2158.  
<https://doi.org/10.1242/DEV.125.11.2149>
- Britton, J. S., Lockwood, W. K., Li, L., Cohen, S. M., & Edgar, B. A. (2002). *Drosophila* 's Insulin / PI3-Kinase Pathway Coordinates Cellular Metabolism with Nutritional Conditions. 2, 239–249.
- Brodsky, M H, Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M., & Abrams, J. M. (2000). *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell*, 101(1), 103–113. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80627-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80627-3)
- Brodsky, Michael H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M., & Abrams, J. M. (2000). *Drosophila* p53 Binds a Damage Response Element at the reaper Locus. *Cell*, 101(1), 103–113. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80627-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80627-3)
- Brodsky, Michael H., Weinert, B. T., Tsang, G., Rong, Y. S., McGinnis, N. M., Golic, K. G., Rio, D. C., & Rubin, G. M. (2004). *Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 24(3), 1219–1231.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.24.3.1219-1231.2004>
- Brogio, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., & Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current biology: CB*, 11(4), 213–221.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00068-9)
- Budanov, A. V., & Karin, M. (2008). p53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and mTOR Signaling. *Cell*, 134(3), 451–460.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.028>
- Chakravarti, A., Thirimanne, H. N., Brown, S., & Calvi, B. R. (2022). *Drosophila* p53 isoforms have overlapping and distinct functions in germline genome integrity and oocyte quality control. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.61389>
- Chang, Y. Y., & Neufeld, T. P. (2010). Autophagy takes flight in *Drosophila*. *FEBS letters*, 584(7), 1342–1349. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.01.006>
- Chatterjee, D., Katewa, S. D., Qi, Y., Jackson, S. A., Kapahi, P., & Jasper, H. (2014). Control of metabolic adaptation to fasting by dILP6-induced insulin signaling in *Drosophila* oenocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(50), 17959–17964.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1409241111>
- Chen, C. Y., Abell, A. M., Moon, Y. S., & Kim, K. H. (2012). An advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGEs (RAGE) axis restores adipogenic potential of

- senescent preadipocytes through modulation of p53 protein function. *The Journal of biological chemistry*, 287(53), 44498–44507.  
<https://doi.org/10.1074/JBC.M112.399790>
- Chien, S., Reiter, L. T., Bier, E., & Gribskov, M. (2002). Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 149–151.  
<https://doi.org/10.1093/NAR/30.1.149>
- Chintapalli, V. R., Wang, J., & Dow, J. A. T. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature Genetics* 2007 39:6, 39(6), 715–720. <https://doi.org/10.1038/ng2049>
- Chng, W. bin A., Hietakangas, V., & Lemaitre, B. (2017). Physiological Adaptations to Sugar Intake: New Paradigms from *Drosophila melanogaster*. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28(2), 131–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.11.003>
- Chng, W. bin A., Sleiman, M. S. B., Schüpfer, F., & Lemaitre, B. (2014). Transforming growth factor  $\beta$ /activin signaling functions as a sugar-sensing feedback loop to regulate digestive enzyme expression. *Cell reports*, 9(1), 336–348.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.08.064>
- 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(5514), 104–106.  
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1057991>
- Colombani, J., Andersen, D. S., & Léopol, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6081), 582–585. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1216689>
- Colombani, J., Polesello, C., Josué, F., & Tapon, N. (2006). Dmp53 activates the Hippo pathway to promote cell death in response to DNA damage. *Current biology : CB*, 16(14), 1453–1458. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2006.05.059>
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., & Léopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell*, 114(6), 739–749. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00713-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00713-X)
- Crighton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P. R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., & Ryan, K. M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*, 126(1), 121–134.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.05.034>
- Criollo, A., Dessen, P., & Kroemer, G. (2009). DRAM: a phylogenetically ancient regulator of autophagy. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(15), 2319–2323.  
<https://doi.org/10.4161/CC.8.15.9153>
- Cvejic, S., Zhu, Z., Felice, S. J., Berman, Y., & Huang, X. Y. (2004). The endogenous ligand Stunted of the GPCR Methuselah extends lifespan in *Drosophila*. *Nature cell biology*, 6(6), 540–546. <https://doi.org/10.1038/NCB1133>
- Dai, C., & Gu, W. (2010). p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends in molecular medicine*, 16(11), 528.  
<https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2010.09.002>
- Day, E. A., Ford, R. J., & Steinberg, G. R. (2017). AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*,

28(8), 545–560. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2017.05.004>

- De La Cova, C., Senoo-Matsuda, N., Ziosi, M., Wu, D. C., Bellosta, P., Quinzii, C. M., & Johnston, L. A. (2014). Super-competitor status of *Drosophila* Myc cells requires p53 as a fitness sensor to reprogram metabolism and promote viability. *Cell metabolism*, 19(3), 470. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2014.01.012>
- Delanoue, R., Meschi, E., Agrawal, N., Mauri, A., Tsatskis, Y., McNeill, H., & Léopold, P. (2016). *Drosophila* insulin release is triggered by adipose Stunted ligand to brain Methuselah receptor. *Science*, 353(6307), 1553–1556. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF8430/SUPPL\\_FILE/AAF8430\\_DELANOUE.SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF8430/SUPPL_FILE/AAF8430_DELANOUE.SM.PDF)
- Derdak, Z., Villegas, K. A., Harb, R., Wu, A. M., Sousa, A., & Wands, J. R. (2013). Inhibition of p53 attenuates steatosis and liver injury in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 58(4), 785–791. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.11.042>
- Di Gregorio, A., Bowling, S., & Rodriguez, T. A. (2016). Cell Competition and Its Role in the Regulation of Cell Fitness from Development to Cancer. *Developmental Cell*, 38(6), 621–634. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2016.08.012>
- Dibble, C. C., & Cantley, L. C. (2015). Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends in Cell Biology*, 25(9), 545–555. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.06.002>
- Dichtel-Danjoy, M. L., Ma, D., Dourlen, P., Chatelain, G., Napoletano, F., Robin, M., Corbet, M., Levet, C., Hafsi, H., Hainaut, P., Ryoo, H. D., Bourdon, J. C., & Mollereau, B. (2012a). *Drosophila* p53 isoforms differentially regulate apoptosis and apoptosis-induced proliferation. *Cell Death & Differentiation* 2013 20:1, 20(1), 108–116. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.100>
- Dichtel-Danjoy, M. L., Ma, D., Dourlen, P., Chatelain, G., Napoletano, F., Robin, M., Corbet, M., Levet, C., Hafsi, H., Hainaut, P., Ryoo, H. D., Bourdon, J. C., & Mollereau, B. (2012b). *Drosophila* p53 isoforms differentially regulate apoptosis and apoptosis-induced proliferation. *Cell Death & Differentiation* 2013 20:1, 20(1), 108–116. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.100>
- Dikic, I. (2017). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annual review of biochemistry*, 86, 193–224. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-061516-044908>
- Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(6), 349–364. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0003-4>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dötsch, V., Bernassola, F., Coutandin, D., Candi, E., & Melino, G. (2010). p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A004887>
- Droujinine, I. A., & Perrimon, N. (2016). Interorgan Communication Pathways in Physiology: Focus on *Drosophila*. *Annual review of genetics*, 50, 539. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-121415-122024>

- Eby, K. G., Rosenbluth, J. M., Mays, D. J., Marshall, C. B., Barton, C. E., Sinha, S., Johnson, K. N., Tang, L., & Pietenpol, J. A. (2010). ISG20L1 is a p53 family target gene that modulates genotoxic stress-induced autophagy. *Molecular Cancer*, *9*, 95. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-95>
- Emlen, D. J., Warren, I. A., Johns, A., Dworkin, I., & Lavine, L. C. (2012). A mechanism of extreme growth and reliable signaling in sexually selected ornaments and weapons. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6096), 860–864. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1224286>
- Entezari, M., Hashemi, D., Taheriazam, A., Zabolian, A., Mohammadi, S., Fakhri, F., Hashemi, M., Hushmandi, K., Ashrafizadeh, M., Zarrabi, A., Ertas, Y. N., Mirzaei, S., & Samarghandian, S. (2022). AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: A pre-clinical and clinical investigation. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *146*. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112563>
- Ertekin, D., Kirszenblat, L., Faville, R., & Van Swinderen, B. (2020). Down-regulation of a cytokine secreted from peripheral fat bodies improves visual attention while reducing sleep in *Drosophila*. *PLOS Biology*, *18*(8), e3000548. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3000548>
- Feng, Z., Hu, W., De Stanchina, E., Teresky, A. K., Jin, S., Lowe, S., & Levine, A. J. (2007). The Regulation of AMPK  $\beta$ 1, TSC2, and PTEN Expression by p53: Stress, Cell and Tissue Specificity, and the Role of These Gene Products in Modulating the IGF-1-AKT-mTOR Pathways. *Cancer Research*, *67*(7), 3043–3053. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4149>
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J., & Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(23), 8204–8209. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0502857102>
- Fischer, M., Steiner, L., & Engeland, K. (2014). The transcription factor p53: not a repressor, solely an activator. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *13*(19), 3037–3058. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.949083>
- Fleming, A., & Rubinsztein, D. C. (2020). Autophagy in Neuronal Development and Plasticity. *Trends in Neurosciences*, *43*(10), 767–779. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2020.07.003>
- Franck, D., Tracy, L., Armata, H. L., Delaney, C. L., Jung, D. Y., Ko, H. J., Ong, H., Kim, J. K., Scrable, H., & Sluss, H. K. (2013). Glucose Tolerance in Mice is Linked to the Dose of the p53 Transactivation Domain. *Endocrine Research*, *38*(3), 139–150. <https://doi.org/10.3109/07435800.2012.735735>
- Freboung, T., Bajalica Lagercrantz, S., Oliveira, C., Magenheim, R., Evans, D. G., Hoogerbrugge, N., Ligtenberg, M., Kets, M., Oostenbrink, R., Sijmons, R., Woodward, E., Tischkowitz, M., Maher, E., Ferner, R. E., Aretz, S., Spier, I., Steinke-Lange, V., Holinski-Feder, E., Schröck, E., ... Hietala, M. (2020). Guidelines for the Li–Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes. *European Journal of Human Genetics* *2020* *28*:10, *28*(10), 1379–1386. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0638-4>
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., & Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature medicine*, *1*(12), 1311–1314.

<https://doi.org/10.1038/nm1295-1311>

- Freese, N. H., Norris, D. C., & Loraine, A. E. (2016). Integrated genome browser: visual analytics platform for genomics. *Bioinformatics*, *32*(14), 2089–2095. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW069>
- Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y., & Noda, N. N. (2014). Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nature structural & molecular biology*, *21*(6), 513–521. <https://doi.org/10.1038/NSMB.2822>
- Gallant, P. (2013). Myc Function in Drosophila. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(10), a014324–a014324. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014324>
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Pedro, J. M. B., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., ... Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, *36*(13), 1811. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201796697>
- Gao, X., & Pan, D. (2001). TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes & Development*, *15*(11), 1383–1392. <https://doi.org/10.1101/GAD.901101>
- Garelli, A., Gontijo, A. M., Miguela, V., Caparros, E., & Dominguez, M. (2012). Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science (New York, N.Y.)*, *336*(6081), 579–582. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1216735>
- Géminard, C., Rulifson, E. J., & Léopold, P. (2009). Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in Drosophila. *Cell Metabolism*, *10*(3), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.08.002>
- Germani, F., Bergantinos, C., & Johnston, L. A. (2018). Mosaic Analysis in Drosophila. *Genetics*, *208*(2), 473. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.117.300256>
- Ghosh, A. C., & O'Connor, M. B. (2014). Systemic Activin signaling independently regulates sugar homeostasis, cellular metabolism, and pH balance in Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(15), 5729–5734. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319116111>
- Ghosh, A. C., Tattikota, S. G., Liu, Y., Comjean, A., Hu, Y., Barrera, V., Ho Sui, S. J., & Perrimon, N. (2020). Drosophila pdgf/vegf signaling from muscles to hepatocyte-like cells protects against obesity. *eLife*, *9*, 1–61. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.56969>
- Golic, K. G., & Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome. *Cell*, *59*(3), 499–509. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90033-0)
- Grewal, S. S. (2009). Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: a view from the fly world. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *41*(5), 1006–1010. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.10.010>
- Griffin, R., Binari, R., & Perrimon, N. (2014). Genetic odyssey to generate marked clones in Drosophila mosaics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(13), 4756–4763. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1403218111>

- Grönke, S., Clarke, D. F., Broughton, S., Andrews, T. D., & Partridge, L. (2010). Molecular Evolution and Functional Characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. *PLOS Genetics*, *6*(2), e1000857. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000857>
- Guan, J. J., Zhang, X. D., Sun, W., Qi, L., Wu, J. C., & Qin, Z. H. (2015). DRAM1 regulates apoptosis through increasing protein levels and lysosomal localization of BAX. *Cell Death and Disease*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.546>
- Gutierrez, E., Wiggins, D., Fielding, B., & Gould, A. P. (2006). Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature* *2006* *445*:7125, *445*(7125), 275–280. <https://doi.org/10.1038/nature05382>
- Hasenour, C. M., Ridley, D. E., James, F. D., Hughey, C. C., Donahue, E. P., Viollet, B., Foretz, M., Young, J. D., & Wasserman, D. H. (2017). Liver AMP-Activated Protein Kinase Is Unnecessary for Gluconeogenesis but Protects Energy State during Nutrient Deprivation. *PloS one*, *12*(1), e0170382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170382>
- Hasygar, K., & Hietakangas, V. (2014). p53- and ERK7-Dependent Ribosome Surveillance Response Regulates *Drosophila* Insulin-Like Peptide Secretion. *PLoS Genetics*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004764>
- He, G., Zhang, Y.-W., Lee, J.-H., Zeng, S. X., Wang, Y. V., Luo, Z., Dong, X. C., Viollet, B., Wahl, G. M., & Lu, H. (2014). AMP-Activated Protein Kinase Induces p53 by Phosphorylating MDMX and Inhibiting Its Activity. *Molecular and Cellular Biology*, *34*(2), 148. <https://doi.org/10.1128/MCB.00670-13>
- Herrera-Vargas, A. K., García-Rodríguez, E., Olea-Flores, M., Mendoza-Catalán, M. A., Flores-Alfaro, E., & Navarro-Tito, N. (2021). Pro-angiogenic activity and vasculogenic mimicry in the tumor microenvironment by leptin in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, *62*, 23–41. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2021.10.006>
- Herzog, G., Joerger, A. C., Shmueli, M. D., Fersht, A. R., Gazit, E., & Segal, D. (2012). Evaluating *Drosophila* p53 as a model system for studying cancer mutations. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(53), 44330–44337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.417980>
- Hietakangas, V., & Cohen, S. M. (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annual review of genetics*, *43*, 389–410. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134815>
- Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., ... Matsuzawa, Y. (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *20*(6), 1595–1599. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.6.1595>
- Hughey, C. C., James, F. D., Bracy, D. P., Donahue, E. P., Young, J. D., Viollet, B., Foretz, M., & Wasserman, D. H. (2017). Loss of hepatic AMP-activated protein kinase impedes the rate of glycogenolysis but not gluconeogenic fluxes in exercising mice. *The Journal of biological chemistry*, *292*(49), 20125–20140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.811547>

- Hull-Thompson, J., Muffat, J., Sanchez, D., Walker, D. W., Benzer, S., Ganfornina, M. D., & Jasper, H. (2009). Control of Metabolic Homeostasis by Stress Signaling Is Mediated by the Lipocalin NLaz. *PLoS Genetics*, *5*(4).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000460>
- Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., & Hafen, E. (2002). Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Current biology : CB*, *12*(15), 1293–1300.
- Ingaramo, M. C., Sánchez, J. A., & Dekanty, A. (2018). Regulation and function of p53: A perspective from *Drosophila* studies. *Mechanisms of Development*.  
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.05.007>
- Jaklevic, B. R., & Su, T. T. (2004). Relative Contribution of DNA Repair, Cell Cycle Checkpoints, and Cell Death to Survival after DNA Damage in *Drosophila* Larvae. *Current Biology*, *14*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2003.12.032>
- Jassim, O. W., Fink, J. L., & Cagan, R. L. (2003). Dmp53 protects the *Drosophila* retina during a developmentally regulated DNA damage response. *The EMBO Journal*, *22*(20), 5622. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG543>
- Jeon, S. M. (2016). Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Experimental & Molecular Medicine* *2016* *48*:7, *48*(7), e245–e245.  
<https://doi.org/10.1038/emm.2016.81>
- Jin, S., Martinek, S., Joo, W. S., Wortman, J. R., Mirkovic, N., Sali, A., Yandell, M. D., Pavletich, N. P., Young, M. W., & Levine, A. J. (2000). Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(13), 7301–7306.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.97.13.7301>
- Johnson, E. C., Kazgan, N., Bretz, C. A., Forsberg, L. J., Hector, C. E., Worthen, R. J., Onyenwoke, R., & Brenman, J. E. (2010). Altered Metabolism and Persistent Starvation Behaviors Caused by Reduced AMPK Function in *Drosophila*. *PLOS ONE*, *5*(9), e12799. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0012799>
- Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M. J., & Thompson, C. B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, *18*(3), 283–293.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.027>
- Joruiz, S. M., & Bourdon, J. C. (2016). P53 isoforms: Key regulators of the cell fate decision. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(8).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026039>
- Jung, Y., Witek, R. P., Syn, W. K., Choi, S. S., Omenetti, A., Premont, R., Guy, C. D., & Diehl, A. M. (2010). Signals from Dying Hepatocytes Trigger Growth of Liver Progenitors. *Gut*, *59*(5), 655. <https://doi.org/10.1136/GUT.2009.204354>
- Kale, A., Li, W., Lee, C. H., & Baker, N. E. (2015). Apoptotic mechanisms during competition of ribosomal protein mutant cells: roles of the initiator caspases Dronc and Dream/Strica. *Cell Death & Differentiation* *2015* *22*:8, *22*(8), 1300–1312.  
<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.218>
- Kannan, K., & Fridell, Y.-W. C. (2013). Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. *Frontiers in Physiology*, *4*.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00288>

- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, *170*(6), 1062–1078. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.08.028>
- Kenzelmann Broz, D., Mello, S. S., Biegging, K. T., Jiang, D., Dusek, R. L., Brady, C. A., Sidow, A., & Attardi, L. D. (2013). Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes & development*, *27*(9), 1016–1031. <https://doi.org/10.1101/GAD.212282.112>
- Kerley-Hamilton, J. S., Pike, A. M., Hutchinson, J. A., Freemantle, S. J., & Spinella, M. J. (2007). The direct p53 target gene, FLJ11259/DRAM, is a member of a novel family of transmembrane proteins. *Biochimica et biophysica acta*, *1769*(4), 209–219. <https://doi.org/10.1016/J.BBAEXP.2007.02.002>
- Khezri, R., & Rusten, T. E. (2019). Autophagy and Tumorigenesis in *Drosophila*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1167*, 113–127. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23629-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23629-8_7)
- Kim, Joungmok, Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology* *2011 13:2*, *13*(2), 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kim, Jung, & Neufeld, T. P. (2015). Dietary sugar promotes systemic TOR activation in *Drosophila* through AKH-dependent selective secretion of Dilp3. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms7846>
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J. I., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., & Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, *441*(7095), 880–884. <https://doi.org/10.1038/NATURE04723>
- Koyama, T., & Mirth, C. K. (2016). Growth-Blocking Peptides As Nutrition-Sensitive Signals for Insulin Secretion and Body Size Regulation. *PLoS Biology*, *14*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002392>
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., & Lowe, S. W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, *134*(4), 657–667. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.06.049>
- Krstic, J., Reinisch, I., Schupp, M., Schulz, T. J., & Prokesch, A. (2018a). P53 functions in adipose tissue metabolism and homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092622>
- Krstic, J., Reinisch, I., Schupp, M., Schulz, T. J., & Prokesch, A. (2018b). p53 Functions in Adipose Tissue Metabolism and Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2622. <https://doi.org/10.3390/IJMS19092622>
- Kucinski, I., Dinan, M., Kolahgar, G., & Piddini, E. (2017). Chronic activation of JNK JAK/STAT and oxidative stress signalling causes the loser cell status. *Nature Communications* *2017 8:1*, *8*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00145-y>
- Kudron, M. M., Victorsen, A., Gevirtzman, L., Hillier, L. W., Fisher, W. W., Vafeados, D., Kirkey, M., Hammonds, A. S., Gersch, J., Ammouri, H., Wall, M. L., Moran, J., Steffen, D., Szynekarek, M., Seabrook-Sturgis, S., Jameel, N., Kadaba, M., Patton, J., Terrell, R., ... Waterston, R. H. (2018). The ModERN Resource: Genome-Wide Binding Profiles for Hundreds of *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*

Transcription Factors. *Genetics*, 208(3), 937–949.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.117.300657>

- Kurtz, P., Jones, A. E., Tiwari, B., Link, N., Wylie, A., Tracy, C., Krämer, H., & Abrams, J. M. (2019). *Drosophila* p53 directs non-apoptotic programs in postmitotic tissue. *Molecular Biology of the Cell*, mbc.E18-12-0791. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-12-0791>
- Kwak, S. J., Hong, S. H., Bajracharya, R., Yang, S. Y., Lee, K. S., & Yu, K. (2013). *Drosophila* Adiponectin Receptor in Insulin Producing Cells Regulates Glucose and Lipid Metabolism by Controlling Insulin Secretion. *PLoS ONE*, 8(7).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068641>
- L.Omonosova, E., & C.Hinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 27 Suppl 1(Suppl 1), S2–S19.  
<https://doi.org/10.1038/ONC.2009.39>
- Lee, C. W., Wong, L. L. Y., Tse, E. Y. T., Liu, H. F., Leong, V. Y. L., Lee, J. M. F., Hardie, D. G., Ng, I. O. L., & Ching, Y. P. (2012). AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells. *Cancer research*, 72(17), 4394–4404. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0429>
- Leopold, P., & Perrimon, N. (2007). *Drosophila* and the genetics of the internal milieu. *Nature* 2007 450:7167, 450(7167), 186–188. <https://doi.org/10.1038/nature06286>
- Levine, B., & Abrams, J. (2008). p53: The Janus of autophagy? *Nature cell biology*, 10(6), 637. <https://doi.org/10.1038/NCB0608-637>
- Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D. R., Bedford, J. S., & Li, C. Y. (2010). Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Science signaling*, 3(110).  
<https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2000634>
- Li, S., Yu, X., & Feng, Q. (2019). Fat Body Biology in the Last Decade. *Annual review of entomology*, 64, 315–333. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-011118-112007>
- Liang, Y., Liu, J., & Feng, Z. (2013). The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell and Bioscience*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-9/FIGURES/3>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Lin, T. C., & Hsiao, M. (2021). Leptin and Cancer: Updated Functional Roles in Carcinogenesis, Therapeutic Niches, and Developments. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/IJMS22062870>
- Liu, Jian, Zhu, Z., Liu, Y., Wei, L., Li, B., Mao, F., Zhang, J., Wang, Y., & Liu, Y. (2020). MDM2 inhibition-mediated autophagy contributes to the pro-apoptotic effect of berberine in p53-null leukemic cells. *Life sciences*, 242.  
<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.117228>
- Liu, Juan, Zhang, C., Zhao, Y., & Feng, Z. (2017). MicroRNA Control of p53. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(1), 7–14. <https://doi.org/10.1002/jcb.25609>
- Liu, S., Kim, T. H., Franklin, D. A., & Zhang, Y. (2017a). Protection against High-Fat-

- Diet-Induced Obesity in MDM2C305F Mice Due to Reduced p53 Activity and Enhanced Energy Expenditure. *Cell Reports*, 18(4), 1005–1018. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.086>
- Liu, S., Kim, T. H., Franklin, D. A., & Zhang, Y. (2017b). Protection against High-Fat-Diet-Induced Obesity in MDM2 C305F Mice Due to Reduced p53 Activity and Enhanced Energy Expenditure. *Cell reports*, 18(4), 1005–1018. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.12.086>
- Liu, Y., He, Y., Jin, A., Tikunov, A. P., Zhou, L., Tollini, L. A., Leslie, P., Kim, T.-H., Li, L. O., Coleman, R. A., Gu, Z., Chen, Y. Q., Macdonald, J. M., Graves, L. M., & Zhang, Y. (2014). Ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway coordinates nutrient stress with lipid metabolism by regulating MCD and promoting fatty acid oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23), E2414–E2422. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315605111>
- Liu, Yiting, Liao, S., Veenstra, J. A., & Nässel, D. R. (2016). Drosophila insulin-like peptide 1 (DILP1) is transiently expressed during non-feeding stages and reproductive dormancy. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep26620>
- Lőrincz, P., Mauvezin, C., & Juhász, G. (2017). Exploring Autophagy in Drosophila. *Cells*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS6030022>
- Loughery, J., Cox, M., Smith, L. M., & Meek, D. W. (2014). Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7666. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU501>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, W.-J., Chapo, J., Roig, I., & Abrams, J. M. (2010). Meiotic Recombination Provokes Functional Activation of the p53 Regulatory Network. *Science*, 328(5983), 1278–1281. <https://doi.org/10.1126/science.1185640>
- Lu, W. J., Amatruda, J. F., & Abrams, J. M. (2009). p53 ancestry: gazing through an evolutionary lens. *Nature reviews. Cancer*, 9(10), 758–762. <https://doi.org/10.1038/NRC2732>
- Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D. F., Bolden, J. E., Zhao, Z., Thapar, V., Joyce, J. A., Krizhanovskiy, V., & Lowe, S. W. (2013). Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell*, 153(2), 449–460. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.03.020>
- Mah, L. Y., O'Prey, J., Baudot, A. D., Hoekstra, A., & Ryan, K. M. (2012). DRAM-1 encodes multiple isoforms that regulate autophagy. *Autophagy*, 8(1), 18–28. <https://doi.org/10.4161/auto.8.1.18077>
- Maiuri, M. C., Ciriollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J. M., Tajeddine, N., Hickman, J. A., Geneste, O., & Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy*, 3(4), 374–376. <https://doi.org/10.4161/AUTO.4237>
- Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S. A., & Kroemer, G. (2010). Autophagy regulation by p53. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 181–185. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2009.12.001>

- Maiuri, M. C., Malik, S. A., Morselli, E., Kepp, O., Criollo, A., Mouchel, P. L., Carnuccio, R., & Kroemer, G. (2009). Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *8*(10), 1571–1576. <https://doi.org/10.4161/CC.8.10.8498>
- Makki, R., Cinnamon, E., & Gould, A. P. (2014). The development and functions of oenocytes. *Annual review of entomology*, *59*, 405–425. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-011613-162056>
- Mandal, S., Freije, W. a, Guptan, P., & Banerjee, U. (2010). Metabolic control of G1-S transition: cyclin E degradation by p53-induced activation of the ubiquitin-proteasome system. *The Journal of cell biology*, *188*(4), 473–479. <https://doi.org/10.1083/jcb.200912024>
- Marcel, V., Dichtel-Danjoy, M. L., Sagne, C., Hafsi, H., Ma, D., Ortiz-Cuaran, S., Olivier, M., Hall, J., Mollereau, B., Hainaut, P., & Bourdon, J. C. (2011). Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell death and differentiation*, *18*(12), 1815–1824. <https://doi.org/10.1038/CDD.2011.120>
- Maroni, P. (2020). Leptin, Adiponectin, and Sam68 in Bone Metastasis from Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3), 1051. <https://doi.org/10.3390/ijms21031051>
- Mauri, F., McNamee, L. M., Lunardi, A., Chiacchiera, F., Del Sal, G., Brodsky, M. H., & Collavin, L. (2008). Modification of Drosophila p53 by SUMO modulates its transactivation and pro-apoptotic functions. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(30), 20848–20856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710186200>
- Meschi, E., & Delanoue, R. (2021). Adipokine and fat body in flies: Connecting organs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *533*, 111339. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2021.111339>
- Meschi, E., Léopold, P., & Delanoue, R. (2019). An EGF-Responsive Neural Circuit Couples Insulin Secretion with Nutrition in Drosophila. *Developmental Cell*, *48*(1), 76-86.e5. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2018.11.029/ATTACHMENT/528D742E-BDF5-42C7-B5E4-80A9DADB1AF8/MMC1.PDF>
- Mesquita, D., Dekanty, A., & Milán, M. (2010). A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in Drosophila. *PLoS Biology*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000566>
- Mesquita, Duarte, Dekanty, A., & Milán, M. (2010). A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in Drosophila. *PLoS biology*, *8*(12), e1000566. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000566>
- Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R., & Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, *398*(6729), 708–713. <https://doi.org/10.1038/19531>
- Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., Ishikawa, F., & Komuro, I. (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nature Medicine*, *15*(9), 1082–1087. <https://doi.org/10.1038/nm.2014>
- Miron, M., Lasko, P., & Sonenberg, N. (2003). Signaling from Akt to FRAP/TOR

Targets both 4E-BP and S6K in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24), 9117–9126. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9117-9126.2003/ASSET/B966ABAD-38B6-4E40-8A94-D1740ACC7830/ASSETS/GRAPHIC/MB2430944006.JPEG>

Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728–741. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.10.026>

Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The role of atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>

Morata, G., & Ripoll, P. (1975). Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Developmental Biology*, 42(2), 211–221. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90330-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90330-9)

Morgan, T. H. (1910). SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA. *Science (New York, N.Y.)*, 32(812), 120–122. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.32.812.120>

Morselli, E., Shen, S., Ruckenstuhl, C., Bauer, M. A., Mariño, G., Galluzzi, L., Criollo, A., Michaud, M., Maiuri, M. C., Chano, T., Madeo, F., & Kroemer, G. (2011). p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(16), 2763–2769. <https://doi.org/10.4161/CC.10.16.16868>

Mrschik, M., O'Prey, J., Lao, L. Y., Long, J. S., Beaumatin, F., Strachan, D., O'Prey, M., Skommer, J., & Ryan, K. M. (2015). DRAM-3 modulates autophagy and promotes cell survival in the absence of glucose. *Cell Death and Differentiation*, 22(10), 1714–1726. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.26>

Mukherjee, A., Patel, B., Koga, H., Cuervo, A. M., & Jenny, A. (2016). Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in *Drosophila*. *Autophagy*, 12(11), 1984–1999. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1208887>

Mullen, M., & Gonzalez-Perez, R. R. (2016). Leptin-Induced JAK/STAT Signaling and Cancer Growth. *Vaccines*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/VACCINES4030026>

Murray-Zmijewski, F., Lane, D. P., & Bourdon, J. C. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell death and differentiation*, 13(6), 962–972. <https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4401914>

Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., & Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of Biomedical Research*, 27(4), 254. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20130030>

Napoletano, F., Gibert, B., Yacobi-Sharon, K., Vincent, S., Favrot, C., Mehlen, P., Girard, V., Teil, M., Chatelain, G., Walter, L., Arama, E., & Mollereau, B. (2017). p53-dependent programmed necrosis controls germ cell homeostasis during spermatogenesis. *PLoS genetics*, 13(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1007024>

Nascimbeni, A. C., Codogno, P., & Morel, E. (2017). Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics. *The FEBS journal*, 284(9), 1267–1278. <https://doi.org/10.1111/FEBS.13987>

Nässel, D. R., Kubrak, O. I., Liu, Y., Luo, J., & Lushchak, O. V. (2013). Factors that regulate insulin producing cells and their output in *Drosophila*. *Frontiers in*

*Physiology*, 4 SEP. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00252>

O'Prey, J., Skommer, J., Wilkinson, S., & Ryan, K. M. (2009). Analysis of DRAM-related proteins reveals evolutionarily conserved and divergent roles in the control of autophagy. *Cell Cycle*, 8(14), 2260–2265. <https://doi.org/10.4161/cc.8.14.9050>

Okamoto, N., Nakamori, R., Murai, T., Yamauchi, Y., Masuda, A., & Nishimura, T. (2013). A secreted decoy of InR antagonizes insulin/IGF signaling to restrict body growth in drosophila. *Genes and Development*, 27(1), 87–97. <https://doi.org/10.1101/gad.204479.112>

Okoshi, R., Ozaki, T., Yamamoto, H., Ando, K., Koida, N., Ono, S., Koda, T., Kamiyo, T., Nakagawara, A., & Kizaki, H. (2008). Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 3979–3987. <https://doi.org/10.1074/JBC.M705232200/ATTACHMENT/4B28FD0B-6F23-4284-96D2-95FF4436D9C2/MMC1.PDF>

Olivares-Illana, V., & Fåhræus, R. (2010). p53 isoforms gain functions. *Oncogene* 2010 29:37, 29(37), 5113–5119. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.266>

Ollmann, M., Young, L. M., Di Como, C. J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W. W., Buchman, A., Duyk, G., Friedman, L., Prives, C., & Kopczynski, C. (2000). Drosophila p53 Is a Structural and Functional Homolog of the Tumor Suppressor p53. *Cell*, 101(1), 91–101. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80626-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80626-1)

Olofsson, S. O., Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., & Borén, J. (2009). Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(6), 448–458. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2008.08.001>

Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), 396–403. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>

Ortega, F. J., Moreno-Navarrete, J. M., Mayas, D., Serino, M., Rodriguez-Hermosa, J. I., Ricart, W., Luche, E., Burcelin, R., Tinahones, F. J., Frühbeck, G., Mingrone, G., & Fernández-Real, J. M. (2013). Inflammation and insulin resistance exert dual effects on adipose tissue tumor protein 53 expression. *International Journal of Obesity* 2014 38:5, 38(5), 737–745. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.163>

Ouyang, Y., Song, Y., & Lu, B. (2011). dp53 Restrains ectopic neural stem cell formation in the Drosophila brain in a non-apoptotic mechanism involving Archipelago and cyclin E. *PLoS one*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0028098>

Padmanabha, D., & Baker, K. D. (2014). Drosophila gains traction as a repurposed tool to investigate metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(10), 518–527. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2014.03.011>

Park, S., Alfa, R. W., Topper, S. M., Kim, G. E. S., Kockel, L., & Kim, S. K. (2014). A Genetic Strategy to Measure Circulating Drosophila Insulin Reveals Genes Regulating Insulin Production and Secretion. *PLoS Genetics*, 10(8), e1004555. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004555>

Parra-Peralbo, E., Talamillo, A., & Barrio, R. (2021). Origin and Development of the

- Adipose Tissue, a Key Organ in Physiology and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 3636.  
<https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.786129/BIBTEX>
- Pérez-Garijo, A., Fuchs, Y., & Steller, H. (2013). Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. *eLife*, 2013(2).  
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.01004>
- Perri, F., Pisconti, S., & Vittoria Scarpati, G. Della. (2016). P53 mutations and cancer: a tight linkage. *Annals of translational medicine*, 4(24).  
<https://doi.org/10.21037/ATM.2016.12.40>
- Peters, M., DeLuca, C., Hirao, A., Stambolic, V., Potter, J., Zhou, L., Liepa, J., Snow, B., Arya, S., Wong, J., Bouchard, D., Binari, R., Manoukian, A. S., & Mak, T. W. (s. f.). *Chk2 regulates irradiation-induced, p53-mediated apoptosis in Drosophila*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.172382899](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.172382899)
- Peuget, S., & Selivanova, G. (2021). p53-Dependent Repression: DREAM or Reality? *Cancers*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13194850>
- Picó, C., Palou, M., Pomar, C. A., Rodríguez, A. M., & Palou, A. (2022a). Leptin as a key regulator of the adipose organ. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 23(1), 13–30. <https://doi.org/10.1007/S11154-021-09687-5/FIGURES/5>
- Picó, C., Palou, M., Pomar, C. A., Rodríguez, A. M., & Palou, A. (2022b). Leptin as a key regulator of the adipose organ. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 23(1), 13–30. <https://doi.org/10.1007/S11154-021-09687-5/FIGURES/5>
- Pimkina, J., & Murphy, M. E. (2009). ARF, autophagy and tumor suppression. *Autophagy*, 5(3), 397. <https://doi.org/10.4161/AUTO.5.3.7782>
- Post, S., Karashchuk, G., Wade, J. D., Sajid, W., De Meyts, P., & Tatar, M. (2018). *Drosophila* insulin-like peptides DILP2 and DILP5 differentially stimulate cell signaling and glycogen phosphorylase to regulate longevity. *Frontiers in Endocrinology*, 9(MAY), 28. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00245/FULL>
- Prince, E., Kretschmar, J., Trautenberg, L. C., Broschk, S., & Brankatschk, M. (2021). Dllp7-Producing Neurons Regulate Insulin-Producing Cells in *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*, 12, 630390.  
<https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.630390/FULL>
- Puig, O., Marr, M. T., Ruhf, M. L., & Tjian, R. (2003). Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & Development*, 17(16), 2006.  
<https://doi.org/10.1101/GAD.1098703>
- R Development Core Team 3.0.1. (2013). *A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Rajan, A., Housden, B. E., Wirtz-Peitz, F., Holderbaum, L., & Perrimon, N. (2017). A Mechanism Coupling Systemic Energy Sensing to Adipokine Secretion. *Developmental Cell*, 43(1), 83-98.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.09.007>
- Rajan, A., & Perrimon, N. (2012). *Drosophila* cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion. *Cell*, 151(1), 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.019>
- Ruan, H., & Dong, L. Q. (2016). Adiponectin signaling and function in insulin target

- tissues. *Journal of molecular cell biology*, 8(2), 101–109.  
<https://doi.org/10.1093/JMCB/MJW014>
- Ruiz-Losada, M., González, R., Peropadre, A., Gil-Gálvez, A., Tena, J. J., Baonza, A., & Estella, C. (2022). Coordination between cell proliferation and apoptosis after DNA damage in *Drosophila*. *Cell death and differentiation*, 29(4).  
<https://doi.org/10.1038/S41418-021-00898-6>
- Rulifson, E. J., Kim, S. K., & Nusse, R. (2002). Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5570), 1118–1120. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1070058>
- Ryoo, H. D., Gorenc, T., & Steller, H. (2004). Apoptotic Cells Can Induce Compensatory Cell Proliferation through the JNK and the Wingless Signaling Pathways. *Developmental Cell*, 7(4), 491–501.  
<https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2004.08.019>
- S, L., & DR, N. (2020). *Drosophila* Insulin-Like Peptide 8 (DILP8) in Ovarian Follicle Cells Regulates Ovulation and Metabolism. *Frontiers in endocrinology*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.00461>
- Sanchez, J. A., Mesquita, D., Ingaramo, M. C., Ariel, F., Milán, M., & Dekanty, A. (2019). Eiger/TNF $\alpha$ -mediated Dilp8 and ROS production coordinate intra-organ growth in *Drosophila*. *PLOS Genetics*, 15(8), e1008133.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008133>
- Sano, H., Nakamura, A., Texada, M. J., Truman, J. W., Ishimoto, H., Kamikouchi, A., Nibu, Y., Kume, K., Ida, T., & Kojima, M. (2015). The Nutrient-Responsive Hormone CCHamide-2 Controls Growth by Regulating Insulin-like Peptides in the Brain of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 11(5).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005209>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712), 1098–1101.  
[https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1106148/SUPPL\\_FILE/SARBASSOV.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1106148/SUPPL_FILE/SARBASSOV.SOM.PDF)
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schwartz, L. M. (2021). Autophagic Cell Death During Development – Ancient and Mysterious. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 813.  
<https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.656370/BIBTEX>
- Scott, R. C., Schuldiner, O., & Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental cell*, 7(2), 167–178.  
<https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2004.07.009>
- Semaniuk, U., Strilbytska, O., Malinowska, K., Storey, K. B., Vaiserman, A., Lushchak, V., & Lushchak, O. (2021). Factors that regulate expression patterns of insulin-like peptides and their association with physiological and metabolic traits in *Drosophila*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 135.  
<https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2021.103609>

- Shlevkov, E., & Morata, G. (2012). A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. *Cell death and differentiation*, *19*(3), 451–460. <https://doi.org/10.1038/CDD.2011.113>
- Singh, P., Ravanan, P., & Talwar, P. (2016). Death associated protein kinase 1 (DAPK1): A regulator of apoptosis and autophagy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *9*(JUNE), 46. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2016.00046/BIBTEX>
- Singh, S., Mayengbam, S. S., Chouhan, S., Deshmukh, B., Ramteke, P., Athavale, D., & Bhat, M. K. (2020). Role of TNF $\alpha$  and leptin signaling in colon cancer incidence and tumor growth under obese phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1866*(5), 165660. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165660>
- Stenesen, D., Suh, J. M., Seo, J., Yu, K., Lee, K.-S., Kim, J.-S., Min, K.-J., & Graff, J. M. (2013). Adenosine nucleotide biosynthesis and AMPK regulate adult life span and mediate the longevity benefit of caloric restriction in flies. *Cell metabolism*, *17*(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.006>
- Strycharz, J., Drzewoski, J., Szemraj, J., & Sliwinska, A. (2017). Is p53 Involved in Tissue-Specific Insulin Resistance Formation? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/9270549>
- Takahashi, M., Kakudo, Y., Takahashi, S., Sakamoto, Y., Kato, S., & Ishioka, C. (2013). Overexpression of DRAM enhances p53-dependent apoptosis. *Cancer Medicine*, *2*(1), 1. <https://doi.org/10.1002/CAM4.39>
- Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., Nannmark, U., Samara, C., Pinton, P., Vicencio, J. M., Carnuccio, R., Moll, U. M., Madeo, F., Paterlini-Brechot, P., Rizzuto, R., ... Kroemer, G. (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature Cell Biology*, *10*(6), 676–687. <https://doi.org/10.1038/ncb1730>
- Tekirdag, K., & Cuervo, A. M. (2018). Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Jointed by a chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(15), 5414–5424. <https://doi.org/10.1074/JBC.R117.818237>
- Teleman, A. A., Chen, Y. W., & Cohen, S. M. (2005). 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes & Development*, *19*(16), 1844–1848. <https://doi.org/10.1101/GAD.341505>
- Thiam, A. R., & Beller, M. (2017). The why, when and how of lipid droplet diversity. *Journal of cell science*, *130*(2), 315–324. <https://doi.org/10.1242/JCS.192021>
- Thurmond, J., Goodman, J. L., Strelets, V. B., Attrill, H., Gramates, L. S., Marygold, S. J., Matthews, B. B., Millburn, G., Antonazzo, G., Trovisco, V., Kaufman, T. C., Calvi, B. R., Perrimon, N., Gelbart, S. R., Agapite, J., Broll, K., Crosby, L., Santos, G. dos, Emmert, D., ... Baker, P. (2019). FlyBase 2.0: the next generation. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D759–D765. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1003>
- Tiebe, M., Lutz, M., De La Garza, A., Buechling, T., Boutros, M., & Teleman, A. A. (2015). REPTOR and REPTOR-BP Regulate Organismal Metabolism and Transcription Downstream of TORC1. *Developmental Cell*, *33*(3), 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.013>
- Toprak, U., Hegedus, D., Doğan, C., & Güney, G. (2020). A journey into the world of insect lipid metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *104*(2),

e21682. <https://doi.org/10.1002/ARCH.21682>

- Tschopp, P., & Tabin, C. J. (2017). Deep homology in the age of next-generation sequencing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1713). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2015.0475>
- Tsukada, M., & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 333(1–2), 169–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-E](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E)
- Tsuzuki, S., Ochiai, M., Matsumoto, H., Kurata, S., Ohnishi, A., & Hayakawa, Y. (2012). *Drosophila* growth-blocking peptide-like factor mediates acute immune reactions during infectious and non-infectious stress. *Scientific Reports 2012 2:1*, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep00210>
- Ugur, B., Chen, K., & Bellen, H. J. (2016). *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Disease Models & Mechanisms*, 9(3), 235–244. <https://doi.org/10.1242/DMM.023762>
- Ulgherait, M., Rana, A., Rera, M., Graniel, J., & Walker, D. W. (2014). AMPK modulates tissue and organismal aging in a non-cell-autonomous manner. *Cell Reports*, 8(6), 1767–1780. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.006>
- van Riggelen, J., Yetil, A., & Felsher, D. W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nature reviews. Cancer*, 10(4), 301–309. <https://doi.org/10.1038/nrc2819>
- Vousden, K. H., & Ryan, K. M. (2009). P53 and Metabolism. *Nature reviews. Cancer*, 9(10), 691–700. <https://doi.org/10.1038/nrc2715>
- Wang, H., Wan, X., Pilch, P. F., Ellisen, L. W., Fried, S. K., & Liu, L. (2020a). An ampk-dependent, non-canonical p53 pathway plays a key role in adipocyte metabolic reprogramming. *eLife*, 9, 1–23. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.63665>
- Wang, H., Wan, X., Pilch, P. F., Ellisen, L. W., Fried, S. K., & Liu, L. (2020b). An ampk-dependent, non-canonical p53 pathway plays a key role in adipocyte metabolic reprogramming. *eLife*, 9, 1–23. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.63665>
- Wang, J., Zhou, F., Li, F., Wang, B., Hu, Y., & Li, X. (2021). Autocrined leptin promotes proliferation of non-small cell lung cancer (NSCLC) via PI3K/AKT and p53 pathways. *Annals of Translational Medicine*, 9(7), 568–568. <https://doi.org/10.21037/ATM-20-7482>
- Wang, S., Tulina, N., Carlin, D. L., & Rulifson, E. J. (2007). The origin of islet-like cells in *Drosophila* identifies parallels to the vertebrate endocrine axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), 19873–19878. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0707465104>
- Wells, B. S., & Johnston, L. A. (2012). Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in *Drosophila* by p53. *Developmental biology*, 361(2), 263–276. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2011.10.012>
- Wells, B. S., Yoshida, E., & Johnston, L. A. (2006). Compensatory proliferation in *Drosophila* imaginal discs requires Dronc-dependent p53 activity. *Current biology : CB*, 16(16), 1606–1615. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2006.07.046>
- Wesselborg, S., & Stork, B. (2015). Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cellular and Molecular Life Sciences 2015 72:24*,

72(24), 4721–4757. <https://doi.org/10.1007/S00018-015-2034-8>

- Wong, P. M., Puente, C., Ganley, I. G., & Jiang, X. (2013). The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy*, *9*(2), 124–137. <https://doi.org/10.4161/AUTO.23323>
- Wylie, A., Lu, W. J., D'Brot, A., Buszczak, M., & Abrams, J. M. (2014). p53 activity is selectively licensed in the *Drosophila* stem cell compartment. *eLife*, *2014*(3). <https://doi.org/10.7554/eLife.01530>
- Xie, H. B., & Golic, K. G. (2004). Gene Deletions by Ends-In Targeting in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *168*(3), 1477–1489. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.104.030882>
- Xu, D., Woodfield, S. E., Lee, T. V., Fan, Y., Antonio, C., & Bergmann, A. (2009). Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in *Drosophila*. *Fly*, *3*(1), 78–90. <https://doi.org/10.4161/FLY.3.1.7800>
- Xu, Y., Tan, M., Tian, X., Zhang, J., Zhang, J., Chen, J., Xu, W., & Sheng, H. (2019). Leptin receptor mediates the proliferation and glucose metabolism of pancreatic cancer cells via AKT pathway activation. *Molecular Medicine Reports*, *21*(2), 945–952. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10855>
- Yahagi, N., Shimano, H., Matsuzaka, T., Najima, Y., Sekiya, M., Nakagawa, Y., Ide, T., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Gotoda, T., Nagai, R., Kimura, S., Ishibashi, S., Osuga, J. I., & Yamada, N. (2003). p53 Activation in adipocytes of obese mice. *The Journal of biological chemistry*, *278*(28), 25395–25400. <https://doi.org/10.1074/JBC.M302364200>
- Yamada, T., Habara, O., Kubo, H., & Nishimura, T. (2018). Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in *Drosophila*. *Development*, *145*(6), dev158865. <https://doi.org/10.1242/dev.158865>
- Yamada, Y., Davis, K. D., & Coffman, C. R. (2008). Programmed cell death of primordial germ cells in *Drosophila* is regulated by p53 and the Outsiders monocarboxylate transporter. *Development (Cambridge, England)*, *135*(2), 207–216. <https://doi.org/10.1242/DEV.010389>
- Yamamoto, S., Jaiswal, M., Charng, W. L., Gambin, T., Karaca, E., Mirzaa, G., Wiszniewski, W., Sandoval, H., Haelterman, N. A., Xiong, B., Zhang, K., Bayat, V., David, G., Li, T., Chen, K., Gala, U., Harel, T., Pehlivan, D., Penney, S., ... Bellen, H. J. (2014). A *Drosophila* Genetic Resource of Mutants to Study Mechanisms Underlying Human Genetic Diseases. *Cell*, *159*(1), 200–214. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.09.002>
- Yamasaki, S., Yagishita, N., Sasaki, T., Nakazawa, M., Kato, Y., Yamadera, T., Bae, E., Toriyama, S., Ikeda, R., Zhang, L., Fujitani, K., Yoo, E., Tsuchimochi, K., Ohta, T., Araya, N., Fujita, H., Aratani, S., Eguchi, K., Komiyama, S., ... Nakajima, T. (2007). Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase “Synoviolin”. *The EMBO journal*, *26*(1), 113–122. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601490>
- Yang, A., & McKeon, F. (2000). P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *1*(3), 199–207. <https://doi.org/10.1038/35043127>
- Yee, K. S., Wilkinson, S., James, J., Ryan, K. M., & Vousden, K. H. (2009). PUMA- and Bax-induced autophagy contributes to apoptosis. *Cell Death & Differentiation* *2009*

16:8, 16(8), 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.28>

- Yin, Z., Pascual, C., & Klionsky, D. J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microbial Cell*, 3(12), 588. <https://doi.org/10.15698/MIC2016.12.546>
- Yokoyama, M., Okada, S., Nakagomi, A., Moriya, J., Shimizu, I., Nojima, A., Yoshida, Y., Ichimiya, H., Kamimura, N., Kobayashi, Y., Ohta, S., Fruttiger, M., Lozano, G., & Minamino, T. (2014). Inhibition of endothelial p53 improves metabolic abnormalities related to dietary obesity. *Cell reports*, 7(5), 1691–1703. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.046>
- Yoon, J. H., Her, S., Kim, M., Jang, I. S., & Park, J. (2012). The expression of damage-regulated autophagy modulator 2 (DRAM2) contributes to autophagy induction. *Molecular biology reports*, 39(2), 1087–1093. <https://doi.org/10.1007/S11033-011-0835-X>
- Yu-Yun Chang, & Thomas P. Neufeld. (2009). An Atg1/Atg13 Complex with Multiple Roles in TOR-mediated Autophagy Regulation. *Molecular biology of the cell*, 20, 2004–2014. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Zahid, H., Subbaramaiah, K., Iyengar, N. M., Zhou, X. K., Chen, I. C., Bhardwaj, P., Gucalp, A., Morrow, M., Hudis, C. A., Dannenberg, A. J., & Brown, K. A. (2017). Leptin regulation of the p53-HIF1 $\alpha$ /PKM2-aromatase axis in breast adipose stromal cells: a novel mechanism for the obesity–breast cancer link. *International Journal of Obesity* 2018 42:4, 42(4), 711–720. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.273>
- Zand, H., Homayounfar, R., Cheraghpour, M., Jeddi-Tehrani, M., Ghorbani, A., Pourvali, K., & Soltani, S. R. (2016). Obesity-induced p53 activation in insulin-dependent and independent tissues is inhibited by beta-adrenergic agonist in diet-induced obese rats. *Life sciences*, 147, 103–109. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2016.01.040>
- Zhang, B., Rotelli, M., Dixon, M., & Calvi, B. R. (2015). The function of Drosophila p53 isoforms in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 22(12), 2058–2067. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.40>
- Zhang, G., Xie, Y., Zhou, Y., Xiang, C., Chen, L., Zhang, C., Hou, X., Chen, J., Zong, H., & Liu, G. (2017). p53 pathway is involved in cell competition during mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(3), 498–503. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1617414114>
- Zhang, H., Liu, J., Li, C. R., Momen, B., Kohanski, R. A., & Pick, L. (2009). Deletion of Drosophila insulin-like peptides causes growth defects and metabolic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(46), 19617–19622. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0905083106>
- Zhang, J., & Ney, P. A. (2009). Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death & Differentiation* 2009 16:7, 16(7), 939–946. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.16>
- Zhang, Yanping, & Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer cell*, 16(5), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.024>
- Zhang, Yiyang, & Chua, S. (2017). Leptin Function and Regulation. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 351–369. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C160041>
- Zinke, I., Schu, C. S., Katzenberger, È. D., Bauer, M., & Pankratz, M. J. (2002).

*Nutrient control of gene expression in Drosophila : microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. 21(22).*

Zirin, J., Nieuwenhuis, J., & Perrimon, N. (2013). Role of Autophagy in Glycogen Breakdown and Its Relevance to Chloroquine Myopathy. *PLoS Biology*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001708>

Zwezdaryk, K., Sullivan, D., & Saifudeen, Z. (2018). The p53/adipose-tissue/cancer nexus. *Frontiers in Endocrinology*, 9(AUG), 457. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00457/BIBTEX>

**ANEXO**

Tabla detallando el número de individuos (n), valores de p de acuerdo a tests Mantel-Cox, mediana y máximos de valores de supervivencia (h) correspondiendo a los diferentes genotipos de todos los experimentos presentados de supervivencia a tratamientos de hambreado.

		n	Supervivencia media	Supervivencia máxima	Mantel-Cox Test					
Machos adultos	<b>Figure 1A</b>				cg>w <sup>1118</sup>	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	cg>p53i			
	cg>w <sup>1118</sup>	100	49h	67h	-	-	-			
	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	98	37h	49h	<0.0001	-	-			
	cg>p53i	99	33h	49h	<0.0001	<b>0.0002</b>	-			
Machos adultos	<b>Figure 2G (CQ)</b>				cg>w <sup>1118</sup>	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	Tratado cg>w <sup>1118</sup>	Tratado cg>p53 <sup>H159.N</sup>		
	cg>w <sup>1118</sup>	97	64h	80h	-	-	-	-		
	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	50	44h	56h	<0.0001	-	-	-		
	Tratado cg>w <sup>1118</sup>	90	44h	56h	<0.0001	0.3971	-	-		
	Tratado cg>p53 <sup>H159.N</sup>	103	38h	64h	<0.0001	0.0123	0.117	-		
Machos adultos	<b>Figure 2I (Rapamicina)</b>				cg>w <sup>1118</sup>	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	Tratado cg>w <sup>1118</sup>	Tratado cg>p53 <sup>H159.N</sup>		
	cg>w <sup>1118</sup>	171	43h	55h	-	-	-	-		
	Tratado cg>w <sup>1118</sup>	193	55h	71h	<0.0001	-	-	-		
	Tratado cg>p53 <sup>H159.N</sup>	198	49h	61h	<0.0001	<0.0001	-	-		
Machos adultos	<b>Figure 4F and 7D</b>				cg>w <sup>1118</sup>	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	cg>Impl2	cg>Impl2, p53 <sup>H159.N</sup>	cg>AMPKi	cg>AMPKi, p53 <sup>H159.N</sup>
	cg>w <sup>1118</sup>	99	48h	60h	-	-	-	-	-	-
	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	70	36h	48h	<0.0001	-	-	-	-	-
	cg>Impl2	99	54h	66h	<0.0001	<0.0001	-	-	-	-
	cg>Impl2, p53 <sup>H159.N</sup>	99	60h	66h	<0.0001	<0.0001	0.044	-	-	-
	cg>AMPKi	65	30h	48h	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	-	-
	cg>AMPKi, p53 <sup>H159.N</sup>	40	36h	48h	<0.0001	0.2678	<0.0001	<0.0001	0.701	-
Hembras adultas	<b>Figure 6E</b>				cg>w <sup>1118</sup>	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	cg>Upd2i	cg>Upd2i, p53 <sup>H159.N</sup>		
	cg>w <sup>1118</sup>	104	40h	60h	-	-	-	-		
	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	76	34h	52h	<0.0001	-	-	-		
	cg>Upd2i	99	40h	52h	0.4608	<0.0001	-	-		

	cg>Upd2i, p53 <sup>H159.N</sup>	98	40h	52h	0.4681	<0.0001	<0.0001	-
Hembras adultas	<b>Figure 6F</b>				VGAT>Domei	VGAT>, p53 <sup>5a14</sup>	VGAT>Domei, p53 <sup>5a14</sup>	
	VGAT>Domei	101	58h	82h	-	-	-	
	VGAT>, p53 <sup>5a14</sup>	100	38h	70h	<0.0001	-	-	
	VGAT>Domei, p53 <sup>5a14</sup>	70	50h	70h	0.0005	<0.0001	-	
Hembras adultas	<b>Figure S1E</b>				w <sup>1118</sup>	UAS-p53 <sup>H159.N</sup> /w <sup>1118</sup>	UAS-p53i/w <sup>1118</sup>	
	w <sup>1118</sup>	102	44h	56h	-	-	-	
	UAS-p53 <sup>H159.N</sup> /w <sup>1118</sup>	75	44h	50h	0.5424	-	-	
	UAS-p53i/w <sup>1118</sup>	98	50h	60h	0.2083	0.1139	-	
Machos adultos	<b>Figure S2K</b>				cg>w <sup>1118</sup>	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	cg>Atg1i	cg>Atg1i, p53 <sup>H159.N</sup>
	cg>w <sup>1118</sup>	100	49h	67h	-	-	-	-
	cg>p53 <sup>H159.N</sup>	98	37h	49h	<0.0001	-	-	-
	cg>Atg1i	100	33h	55h	<0.0001	<0.0001	-	-
	cg>Atg1i, p53 <sup>H159.N</sup>	100	33h	44h	<0.0001	<0.0001	0.0046	-
Machos adultos	<b>Figure S4F</b>				dilp2>w <sup>111</sup> <sub>8</sub>	dilp2>p53 <sup>H1</sup> <sub>59.N</sub>		
	dilp2>w <sup>1118</sup>	97	52h	88h	-	-		
	dilp2>p53 <sup>H159.N</sup>	104	52h	83h	0.4205	-		