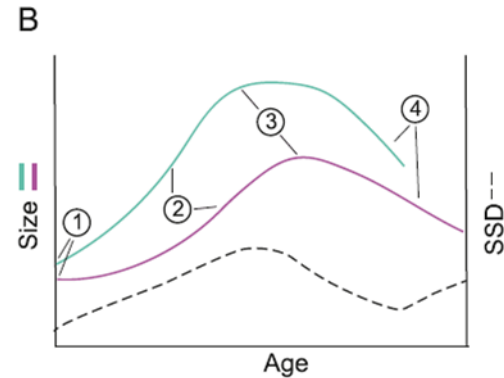
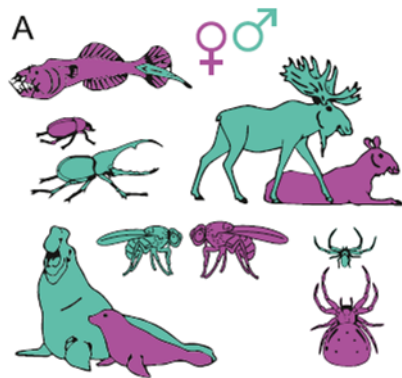


GENÉTICA Y EVOLUCIÓN

Rol evolutivo de la vía IIS sobre el dimorfismo sexual del tamaño (SSD) en *Drosophila melanogaster*

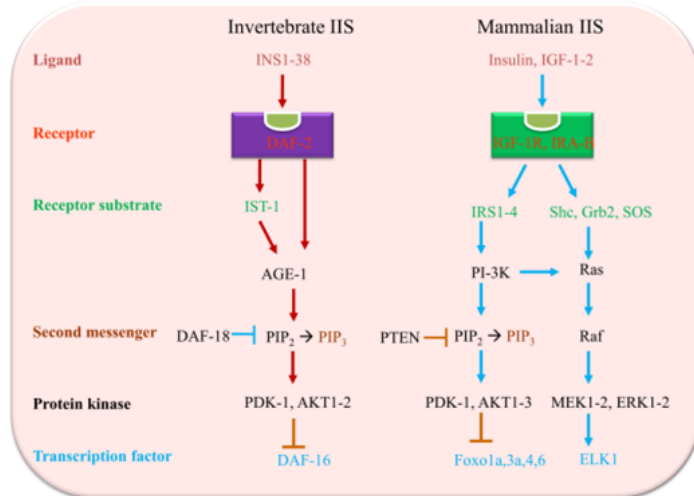
2022

- Las diferencias de número y tamaño en las gametas entre machos y hembras dan lugar a diferencias fundamentales en las estrategias reproductivas que optimizan la aptitud en cada sexo y que son favorecidas por la selección. Esto, a su vez, influye en la biología general del individuo y da lugar a diferencias específicas de cada sexo en la morfología, el comportamiento y la fisiología de los adultos.
- Quizás la diferencia fenotípica más obvia entre hembras y machos es el tamaño del cuerpo, un fenómeno conocido como dimorfismo de tamaño sexual (o SSD por sus siglas en inglés).
- La SSD puede ser generada por diferencias en (1) el tamaño corporal inicial, (2) la tasa de crecimiento, (3) la duración del crecimiento y (4) la pérdida de masa.

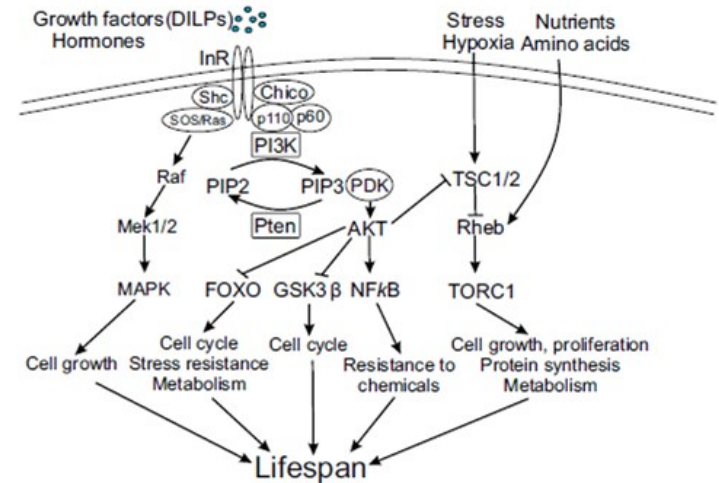


- Las diferencias en el crecimiento entre hembras y machos inevitablemente afectan a sus requerimientos metabólicos durante el desarrollo y continúan hasta la edad adulta a medida que los dos sexos siguen diferentes estrategias para asegurar el éxito reproductivo.

Descripción simplificada de la vía de transducción de señales de la insulina(IIS) en invertebrados y mamíferos



Vía de señalización de la insulina en *D. melanogaster*

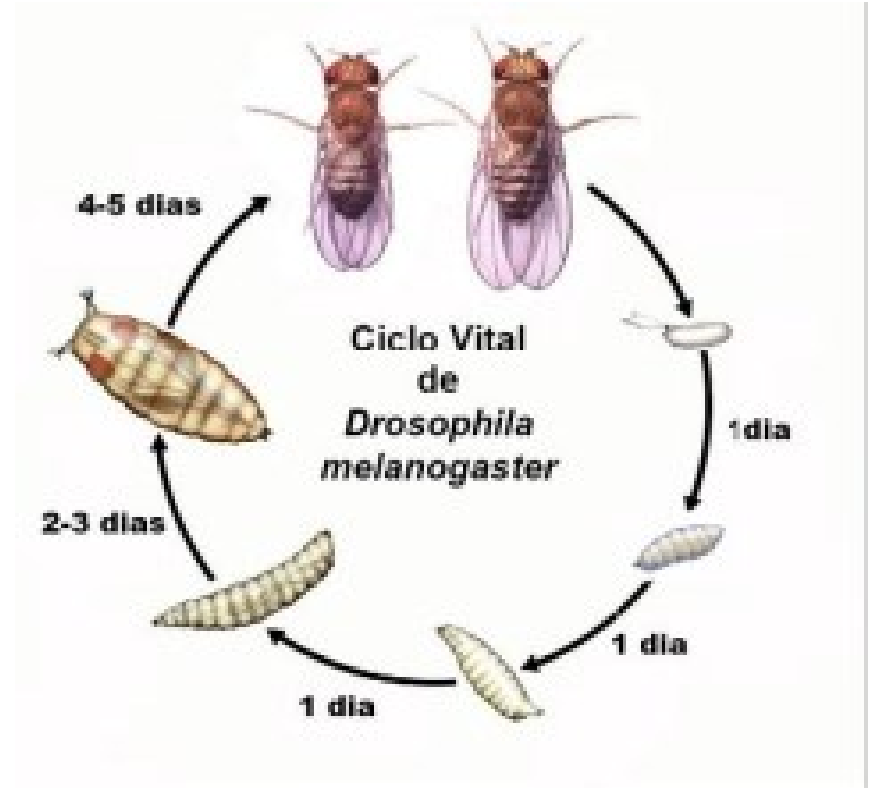


En el presente trabajo nos preguntamos ¿La regulación del dimorfismo sexual del tamaño, por parte de las vías IIS afecta el fitness en *Drosophila melanogaster*? e hipotetizamos que durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* la vía IIS que regula el dimorfismo sexual del tamaño, ocupa un papel fundamental en el fitness de la especie.

Ciclo de vida

Factores que determinan el tamaño final adulto (4):

- Tamaño crítico (larva): hasta inicio de la síntesis de Ecdisona.
- Tiempo TGP (período de crecimiento terminal): hasta que alcanza el umbral de Ecdisona.
- Tasa de crecimiento durante TGP.
- Fase de no alimentación (reducción de masa corporal).



Procedimiento experimental:

- 1) Knock out del gen dilp2 en las células productoras de insulina
- 2) Evaluamos en *D. melanogaster*:
 - a) Tamaño corporal
 - b) Receptividad (“atractividad”)
 - c) Duración de la cópula.
 - d) Fertilidad.
 - e) Fecundidad.
 - f) Longevidad
 - g) Supervivencia.
 - h) Fitness relativo

Materiales y métodos

Generación de moscas *dilp2*-mutadas.

-Cepa Henna (mutante recesivo, marrón oscuro),
obtenidas de Bloomington Drosophila Stock Center
(Indiana University)



 INDIANA UNIVERSITY BLOOMINGTON 

Bloomington Drosophila Stock Center [SIGN UP](#) / [CART](#) / [LOG IN](#)

[HOME](#) | [ABOUT US](#) | [STOCKS](#) | [ORDERING & ACCOUNTS](#) | [CARE & INFORMATION](#) | [CONTACT](#)

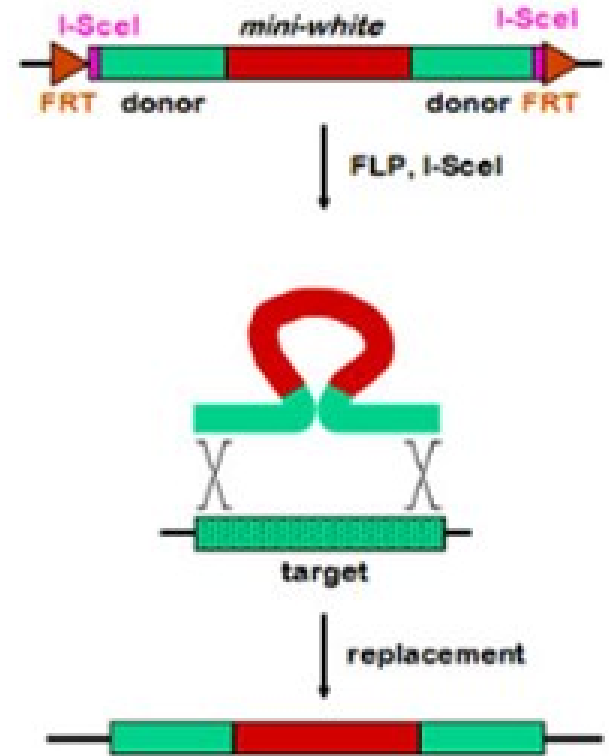
The BDSC collects, maintains and distributes
Drosophila melanogaster strains for research.



Materiales y métodos

Los mutantes dilp se generaron por el método tradicional de gene targeting: en la fase S/G2 de la célula se utiliza tecnología CRISPR con un vector “donante” que porta un gen reportero. Mediante *ends-out homologous recombination* se inserta sobre el locus del gen de interés dicho gen reportero.

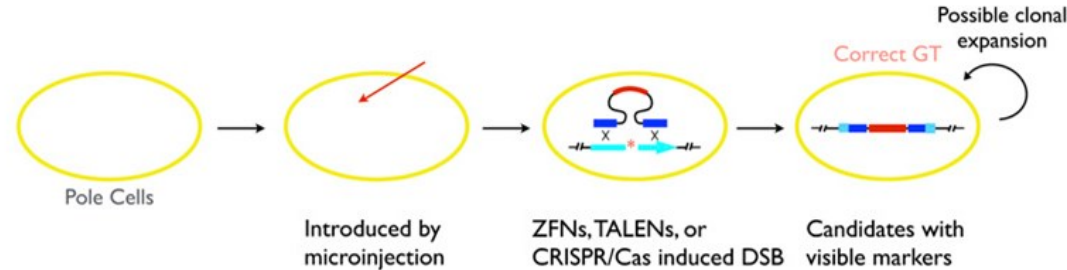
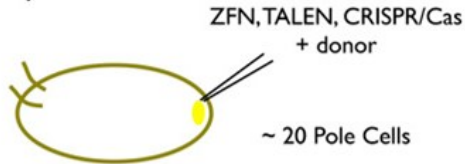
Se trabajó con el vector donante pw25, obtenido de Drosophila Genomics Resource Center, (Bloomington, Indiana, USA)



Materiales y métodos

Las construcciones de ADN se transformaron en la línea germinal de *Drosophila melanogaster* acudiendo a Best Gene *Drosophila* Embryo Injection Services, (Chino Hills, California, USA).

Embryo Microinjection



Materiales y métodos

Condiciones de crecimiento:

- 70% de humedad relativa
- ciclo de luz: oscuridad de 12h:12h
- Alimento :harina de maíz, dextrosa, levadura, agar y Nipagin (Metil p-hidroxibenzoato)
- Cambio de medio cada 3 días



Variables a medir:

- Tamaño corporal
- receptividad
- Duración de la cópula
- Fertilidad
- Fecundidad
- Longevidad
- Supervivencia
- Fitness relativo

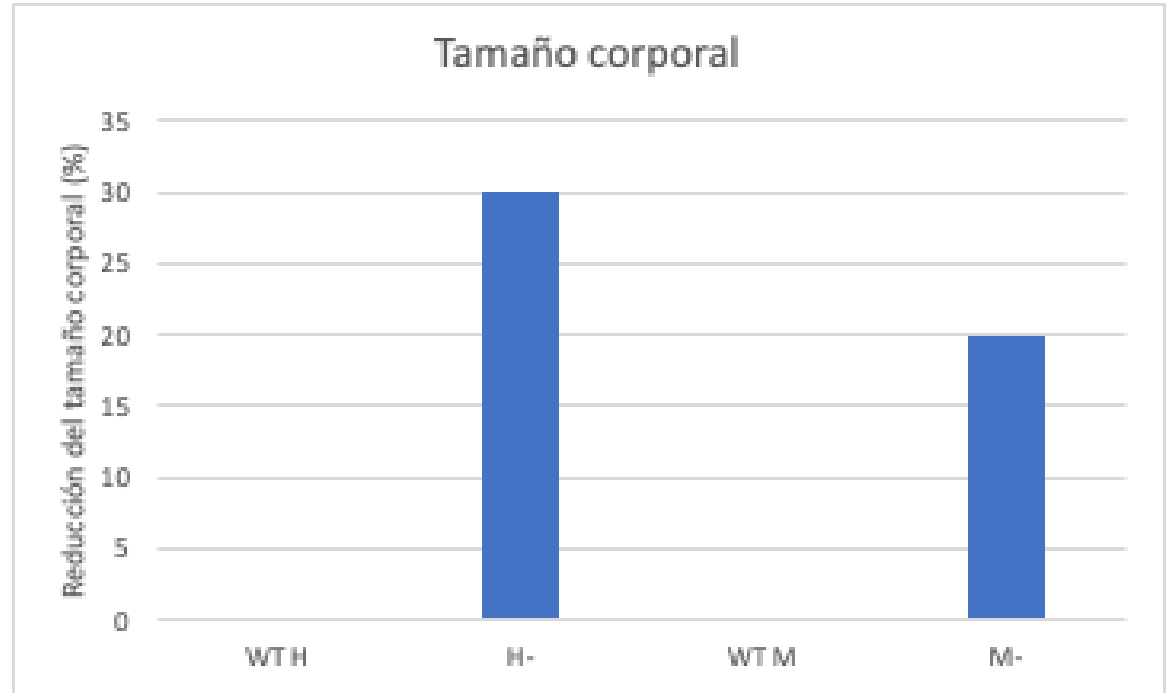
Tamaño corporal

- N= 25 WT M
 - 25 WT H
 - 25 H-
 - 25 M-
- Larva, pupa y Adulto
- Software Image J



Resultado esperado:

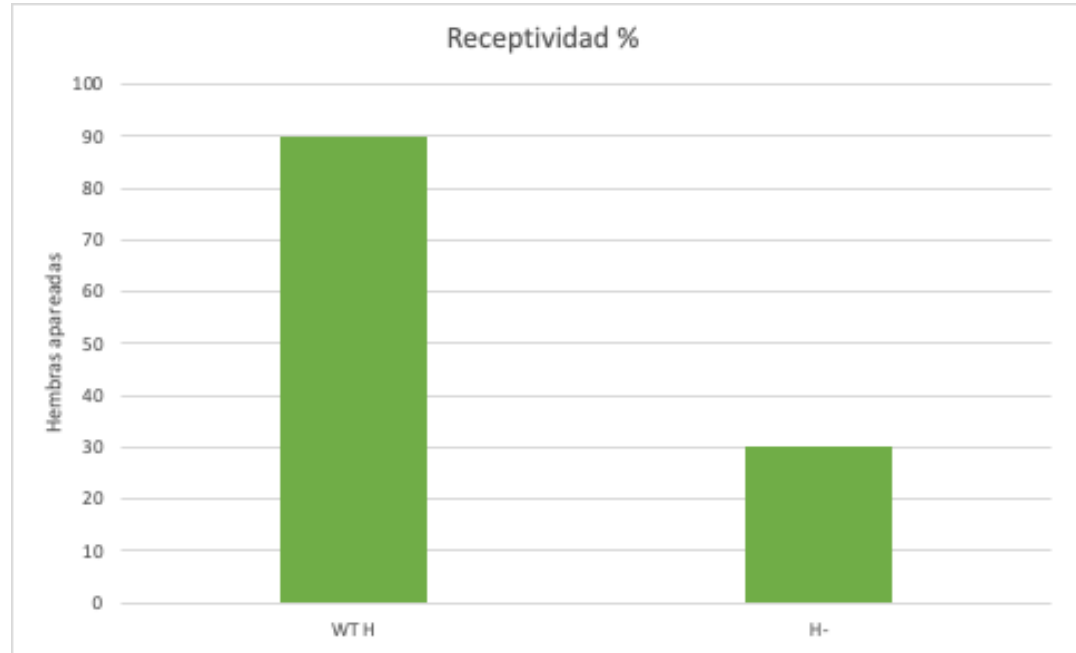
- tamaño H- = M-



Receptividad

- N= 50 WT H
 - 50 H-
- 1 Hembra y 2 machos WT: se les permitió aparearse 1 vez (se descartan machos).
- Se mantuvieron en grupos de 10 hembras apareadas.
- 5 hs después del primer apareamiento: Hembras con 2 machos WT
- Registro n° de hembras que se vuelven a aparear o no dentro de las 2hs
- Hasta que al menos el 30 % se aparee.

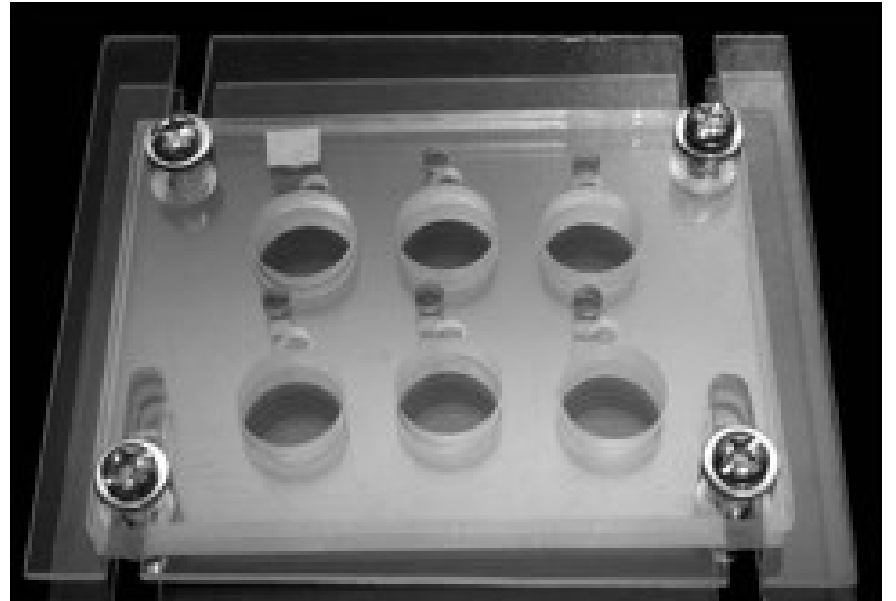
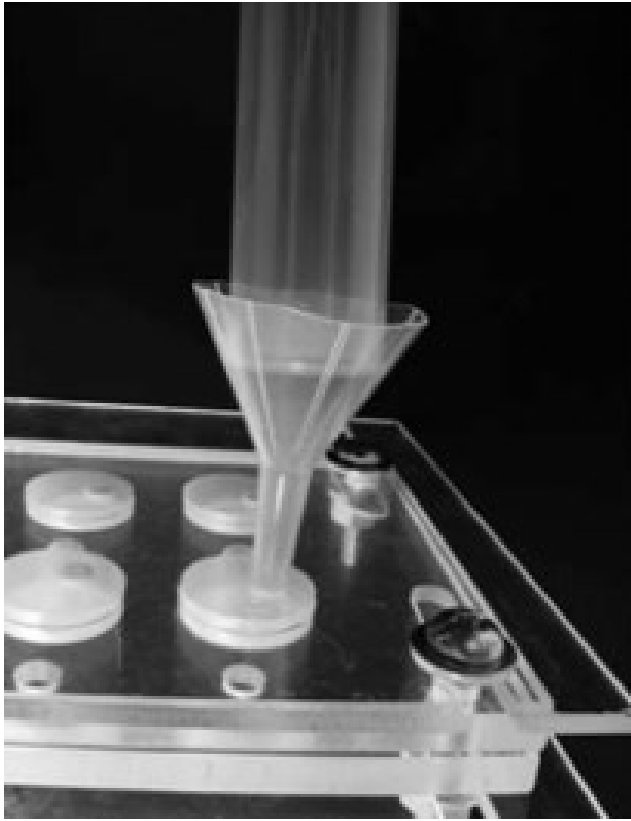
Resultado esperado:



Duración de la cópula:

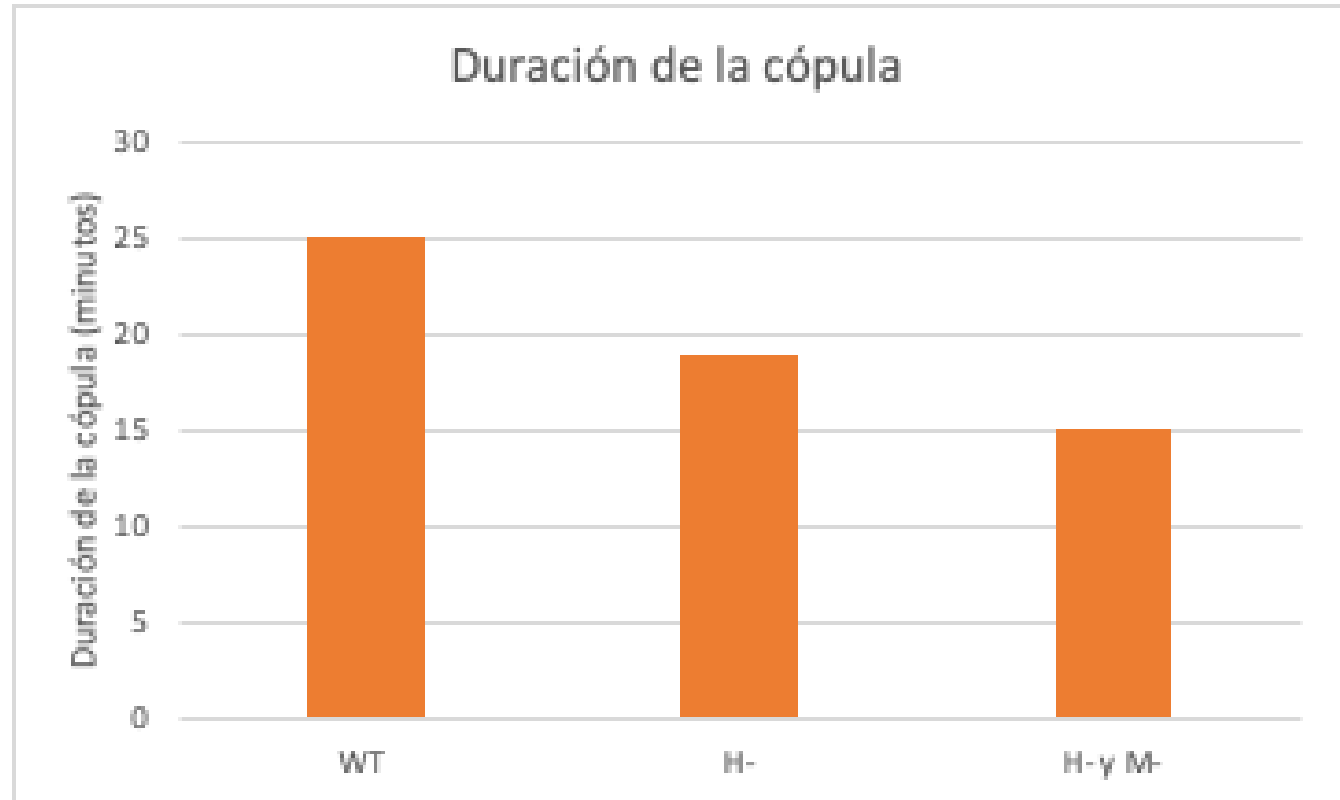
- N= 50 WT
 - 50 H- y M- vírgenes.
 - 50 H-
- Separados a las 3 horas posteriores a la eclosión.
- Se las mantuvo separadas por 2 días.
- Observación: cámara de apareamiento Elens Wattiaux
- Apareamiento máximo: De 7 a 11 am.





Aparato multi cámara para observar los comportamientos de cortejo de *Drosophila*.

Resultado esperado:



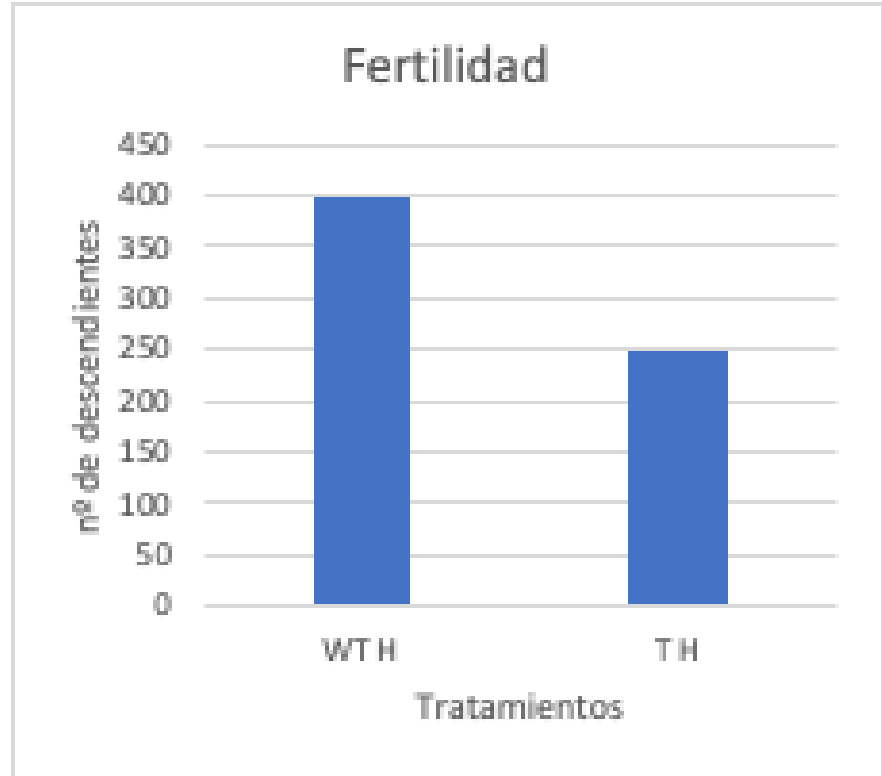
Fertilidad

- N° de descendientes x hembra apareada
- N=
 - 50 WT H
 - 50 H-
- P, F1 y F2
- Hembra apareada por recipiente (1D)
- Cambio de recipiente x día.
- x10 D



Resultado esperado:

Decrecimiento en P, F1 y F2



Fecundidad

- N° de puesta por 1 hembra

N= 50 WT

- 50 H-

- N° de huevos puestos por 1 hembra x 10 D
- Microscopio estereoscópico
- Se cambió de medio todos los días.



Resultados esperados:



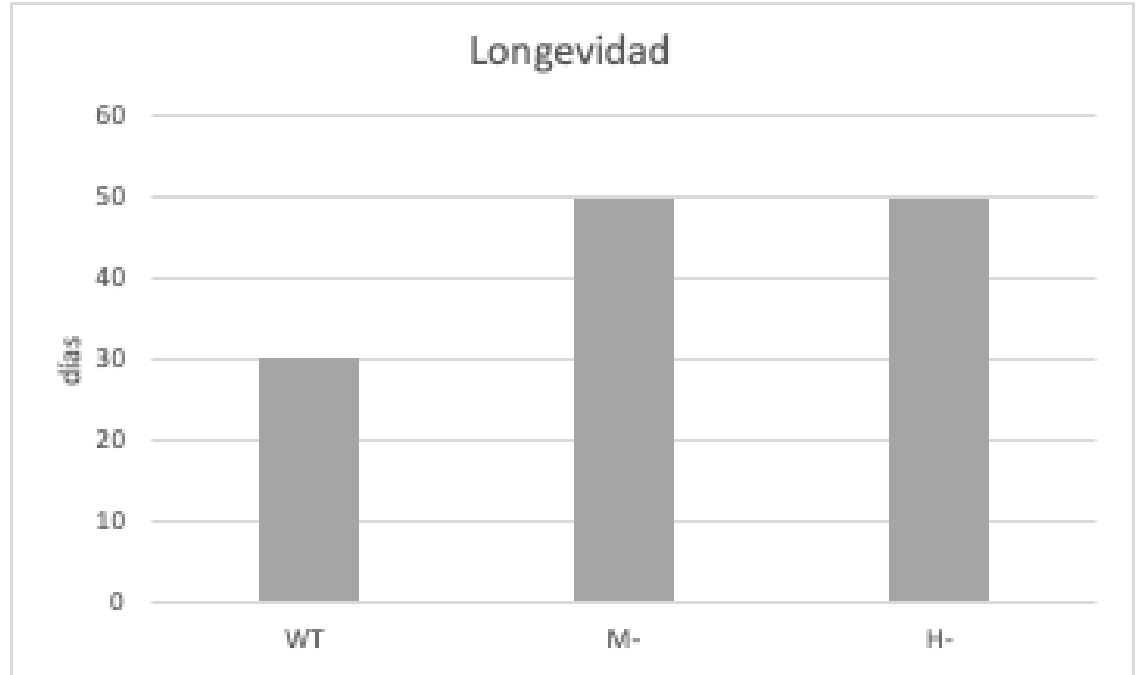
Longevidad

- Expectativa de vida WT: 30- 40 días
- N = 50 WT
50 H-
50 M-
- Anotamos en una planilla los números de muertes diarias.
- Sacamos una media
- Tomamos las medias de WT y el tratamiento



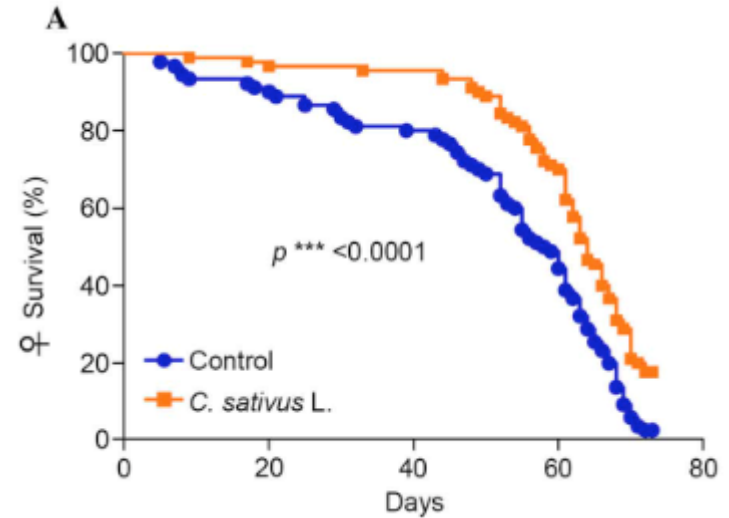
Resultado esperado:

Disminución del metabolismo



Supervivencia:

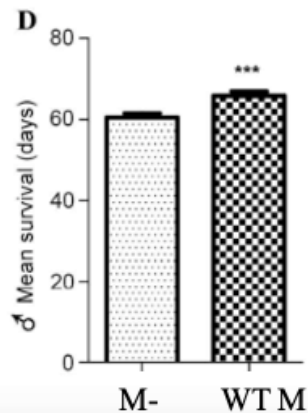
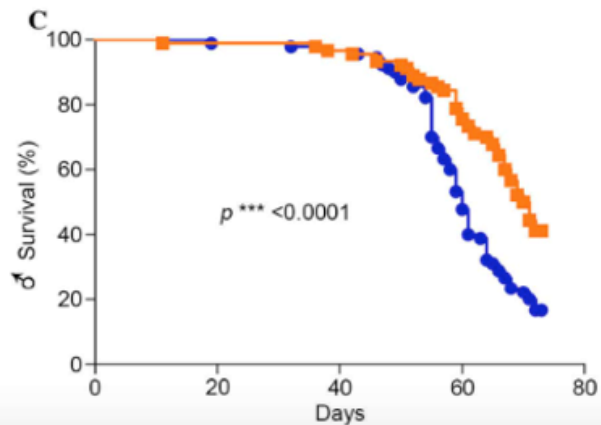
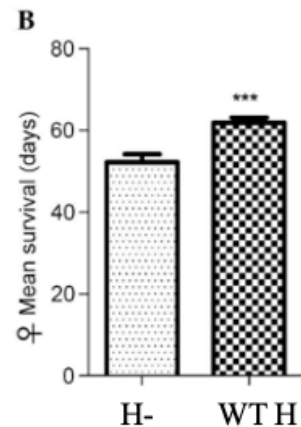
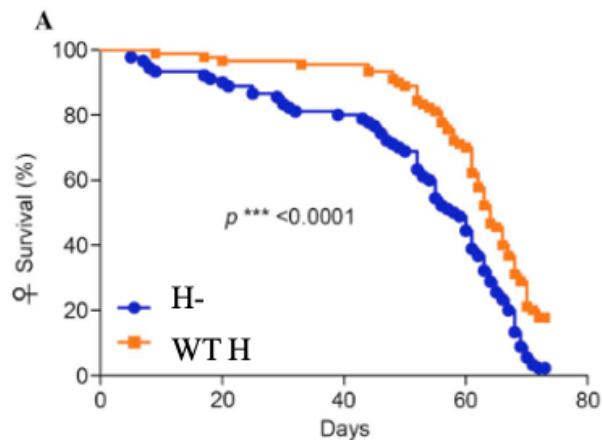
- N= 25 WT H
25 WT M
25 H-
25 M-
- Todos los días se cambia de recipiente.
- P, F1 y F2



Resultado esperado:

P, F1 y F2

Aumenta o disminuye la supervivencia?



Fitness relativo:

Éxito reproductivo en cada clase genotípica en relación a aquella clase genotípica que mayor número de descendientes aporta.

Genotipo	WT	Mutado
Fitness relativo	$0.9/0.9 = 1$	$0.5/0.9 = 0.55$

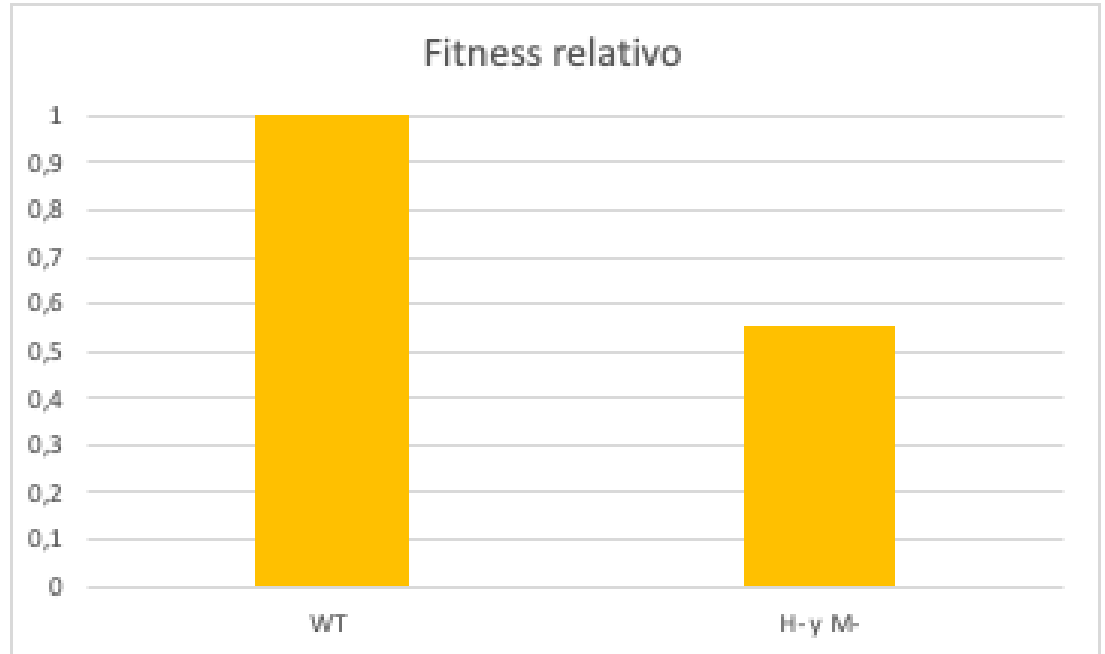
Valor adaptativo:

$$S = 1 - W$$

A < VALOR ADAPTATIVO, > EFECTO DE LA SELECCIÓN EN CONTRA DE ESE GENOTIPO.

Resultado esperado:

S genotipo mutado < S WT



Perspectivas futuras

¿Cómo es la regulación y la sinergia entre los distintos Dilp?

¿ Qué ventaja le genera tener 8 Dilp?

- Evaluar el fitness absoluto de genes homólogos en especies emparentadas y compararlo.
- Enfocar las investigaciones en estudios poblacionales.



Muchas gracias!

Bibliografía

- Alexander W. Shingleton, Isabelle M. Veà, Seminars in Cell and Developmental Biology, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.04.017>
- Semaniuk et al., *Drosophila* insulin-like peptides: from expression to functions (2020) The Netherlands Entomological Society *Entomologia Experimentalis et Applicata* 169: 195–208.
- Rideout EJ, Narsaiya MS, Grewal SS (2015) The Sex Determination Gene transformer Regulates Male-Female Differences in *Drosophila* Body Size. *PLoS Genet* 11(12): e1005683. doi:10.1371/journal.pgen.1005683
- Gronke S, Clarke D-F, Broughton S, Andrews TD, Partridge L (2010) Molecular Evolution and Functional Characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. *PLoS Genet* 6(2): e1000857. doi:10.1371/journal.pgen.1000857
- Zhang H, Liu J, Li CR, Momen B, Kohanski RA et al. (2009) Deletion of *Drosophila* insulin-like peptides causes growth defects and metabolic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 19617–19622.
- Lin WS, Yeh SR, Fan SZ, Chen LY, Yen JH et al. (2018) Insulin signaling in female *Drosophila* links diet and sexual attractiveness. *FASEB Journal* 32: 3870–3877.
- Cavaliere V, Donati A, Hsouna A, Hsu T & Gargiulo G (2005) dAkt kinase controls follicle cell size during *Drosophila* oogenesis. *Developmental Dynamics* 232: 845–854.
- D.V. Heemst, IIS and Longevity (2010) *Agign and disease*, Volume 1, Number 2; 147-157.
- Chen, H., Huang, Y., Pfeiffer, B.D., Yao, X., & Lee, T. (2015). An Enhanced Gene Targeting Toolkit for *Drosophila*: Golic+. *Genetics*, 199, 683 - 694.