



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Licenciatura en Ciencias Biológicas

## Función del ácido láctico en la activación de la autofagia en *Drosophila melanogaster*

Agustina Borrat

Director de Tesis: **Dr. Pablo Wappner**   
Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética y Fisiología Molecular  
Fundación Instituto Leloir  
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires

# Resumen

---

La autofagia es un proceso catabólico, altamente conservado en organismos eucariotas, en el cual se degradan componentes citoplasmáticos. Se trata de un proceso fundamental en la biología celular y del desarrollo, y es requerida para mantener la homeostasis celular. Hemos demostrado en el laboratorio que, en *Drosophila melanogaster*, la autofagia se induce como parte de la respuesta adaptativa a hipoxia, y que es necesaria para la supervivencia de las larvas a condiciones de baja disponibilidad de oxígeno. En este contexto, hemos investigado el rol del lactato en la activación de la autofagia en *Drosophila*. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la sobreexpresión de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) bajo el control del inductor *ppl*-Gal4 induce fuertemente la autofagia en el cuerpo graso y el intestino de larvas de 3<sup>er</sup> estadío. Sin embargo, la sobreexpresión de LDH con inductores de mayor fuerza y especificidad por el cuerpo graso no logró gatillar la autofagia. Restaba establecer cuál es el tejido en el que la sobreexpresión de LDH mediada por *ppl*-Gal4 induce la autofagia a distancia en diversos tejidos larvales. En esta Tesis encontramos que la sobreexpresión de LDH en las células traqueales (del sistema respiratorio) de las larvas induce la autofagia en el cuerpo graso, sugiriendo que estas células liberan una señal que actúa a distancia sobre el cuerpo graso. Observamos, además, que la autofagia no se induce en el sistema digestivo tras sobreexpresar LDH en las tráqueas, lo cual sugiere que hay otros órganos involucrados en la respuesta observada previamente. Por otro lado, detectamos que tras la sobreexpresión de LDH en las tráqueas se produce una fuerte acumulación de Atg8 en un grupo específico de células del cerebro larval. Análisis por qRT-PCR revelaron que dicho aumento no estaría regulado a nivel transcripcional. Estos resultados sugieren que la señal generada en las tráqueas tras la acumulación de lactato dispara la autofagia en otros órganos, aportando nueva información sobre los mecanismos de comunicación entre tejidos en *Drosophila*. Los resultados de esta Tesis contribuyen a la comprensión de los mecanismos de señalización que regulan la autofagia, aportando nueva información sobre cómo la acumulación de lactato puede inducir procesos catabólicos esenciales en *Drosophila melanogaster*.

# **Role of lactic acid in the activation of autophagy in *Drosophila melanogaster***

## **Abstract**

---

Autophagy is a catabolic process, highly conserved in eukaryotic organisms, in which cytoplasmic components are self-degraded. Autophagy is a fundamental process in cell and developmental biology, required to maintain cellular homeostasis. We have previously found in our laboratory that in *Drosophila melanogaster* autophagy is induced as part of the adaptive response to hypoxia, and it is necessary for the survival of larvae under low oxygen conditions. In this context, we investigated the role of lactate in the activation of autophagy in *Drosophila*. We found that overexpression of Lactate Dehydrogenase (LDH) under the control of the *ppl*-Gal4 driver strongly induces autophagy in the fat body and gut of 3<sup>rd</sup> instar larvae. However, overexpression of LDH with stronger fat body-specific drivers does not trigger autophagy in those tissues. Thus, it was necessary to define in what tissue did *ppl*-Gal4 dependent expression of LDH provoke induction of autophagy in other larval tissues. In this Thesis, we found that overexpression of LDH in larval tracheal cells induces autophagy in the fat body, suggesting that these cells release a signal that acts remotely on this tissue. Additionally, we observed that upon overexpression of LDH in the tracheae, autophagy was not induced in the larval gut, suggesting that other organs are involved in the response previously observed upon *ppl*-Gal4-driven expression of LDH. Furthermore, following expression of LDH in the tracheae, we detected strong accumulation of Atg8 in a specific group of cells of the larval brain. qRT-PCR analysis revealed that this accumulation of Atg8 is not transcriptionally regulated. These results suggest that upon lactate accumulation in the tracheal cells, a diffusible signal is released to the hemolymph, triggering autophagy in the fat body. The results of this Thesis contribute to the understanding of signaling mechanisms that regulate autophagy, providing new insights on how lactate accumulation can induce essential catabolic processes in *Drosophila melanogaster*.

# Agradecimientos

---

Quiero agradecer, en primer lugar, a Pablo y Mariana, por abrirme las puertas del laboratorio y guiarme en mi formación. Gracias también a todos los miembros del laboratorio, por su apoyo y buena disposición. Agradezco, en particular, a Sebastián, Sofía y a Felipe, por la paciencia y por responder todas mis preguntas por más básicas que pudieran parecerme.

También quiero expresar mi profundo agradecimiento al Instituto Leloir, por brindarme un espacio para desarrollar mi tesis y permitirme formar parte de un ambiente de investigación tan enriquecedor.

Gracias a la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por ser mi segunda casa durante la carrera. A la educación pública, que me llena de orgullo. A todos los docentes que conocí en estos años, por ayudarme a llenar mi caja de herramientas.

Este camino no habría sido el mismo sin todas las personas maravillosas que me crucé en los pasillos, en las aulas, en la biblioteca, en el comedor. Ustedes me hicieron reír durante estos 6 años, que son muchos pero pasaron como si fueran pocos. Y por muchos años más, juntos.

Gracias a mi familia, por su apoyo absoluto en toda la carrera y en momentos en los que reinó la exigencia y el estrés. Por aguantar el monotema.

*"I knew who I was this morning, but I've changed a few times since then."*

— Lewis Carroll, Las aventuras de Alicia en el país de las maravillas

# Índice

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumen.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>Abstract.....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>Agradecimientos.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1. Introducción.....</b>   | <b>6</b>  |
| 1.1. Metabolismo energético y Efecto Warburg.....                                 | 6         |
| 1.2. La autofagia.....  | 7         |
| 1.2.1. Generalidades.....   | 7         |
| 1.2.2. El proceso de autofagia en <i>Drosophila melanogaster</i> .....            | 8         |
| 1.2.3. Regulación de la autofagia.....  | 10        |
| 1.2.4. La autofagia en la adaptación a hipoxia.....                               | 11        |
| 1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio.....                   | 12        |
| 1.4. Resultados previos del laboratorio que sentaron las bases de esta Tesis..... | 14        |
| <b>2. Hipótesis y Objetivos.....</b>  | <b>18</b> |
| 2.1. Hipótesis.....   | 18        |
| 2.2. Objetivo.....  | 18        |
| <b>3. Materiales y Métodos.....</b>   | <b>19</b> |
| 3.1. Manipulación de <i>Drosophila melanogaster</i> .....                         | 19        |
| 3.1.1. Cría y mantenimiento de moscas.....  | 19        |
| 3.1.2. Genética de <i>Drosophila melanogaster</i> .....                           | 19        |
| 3.1.3. Cruzamientos.....  | 20        |
| 3.1.4. Tratamiento de ayuno.....  | 22        |
| 3.1.5. Líneas utilizadas.....   | 22        |
| 3.2. Herramientas genéticas.....  | 23        |
| 3.2.1. Sistema Gal4-UAS.....  | 23        |
| 3.2.2. Reportero de autofagia 3XmCherry-ATG8.....                                 | 23        |
| 3.3. Disección y procesamiento de tejidos.....                                    | 24        |
| 3.3.1. Disección de larvas.....   | 24        |
| 3.3.2. Tinciones.....   | 25        |
| 3.3.3. Montaje de tejidos.....  | 25        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.4. Adquisición y procesamiento de imágenes.....   | 25        |
| 3.5. RT-PCR cuantitativa.....   | 26        |
| 3.6. Análisis estadístico.....  | 26        |
| 3.7. Equipamiento, materiales y reactivos.....  | 27        |
| 3.7.1. Equipos.....   | 27        |
| 3.7.2. Materiales.....  | 27        |
| 3.7.3. Reactivos y soluciones.....  | 28        |
| <b>4. Resultados.....</b>   | <b>29</b> |
| 4.1. La sobreexpresión de LDH en el sistema traqueal gatilla la autofagia en el cuerpo graso.....                             | 29        |
| 4.2. La sobreexpresión de LDH en las tráqueas no induce la autofagia en el sistema digestivo.....                             | 33        |
| 4.3. La sobreexpresión de LDH en las tráqueas provoca la acumulación de Atg8 en el cerebro.....                               | 34        |
| 4.4. El aumento de Atg8 en el cerebro tras la sobreexpresión de LDH no se debería a la inducción transcripcional del gen..... | 36        |
| <b>5. Discusión.....</b>  | <b>38</b> |
| 5.1. Inducción de la autofagia por lactato.....   | 38        |
| 5.2. Localización de los foci del reportero 3mCh-ATG8.....  | 39        |
| 5.3. Comunicación entre tejidos.....  | 40        |
| 5.4. Autofagia basal y funciones no canónicas de Atg8.....  | 42        |
| <b>6. Conclusiones.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>7. Referencias Bibliográficas.....</b>   | <b>46</b> |

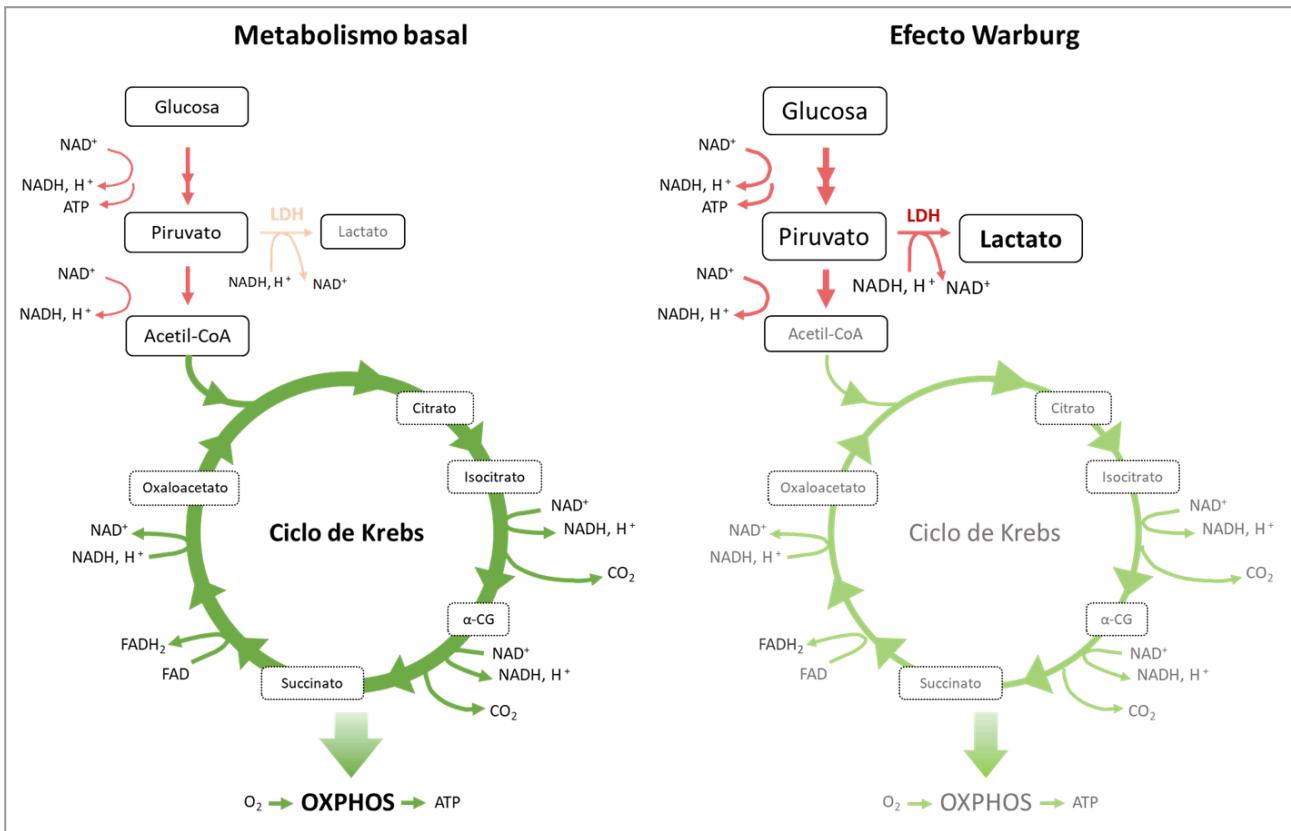
# 1. Introducción

---

## 1.1. Metabolismo energético y Efecto Warburg

Los seres vivos requieren del flujo constante de energía para llevar a cabo los procesos que constituyen su metabolismo. La mayoría de las células, en condiciones fisiológicas, dependen del catabolismo de hidratos de carbono como fuente principal de energía. Esta rama del metabolismo se compone de una serie de procesos acoplados y finamente regulados (Figura 1). Por un lado, en el proceso de glucólisis, la glucosa es oxidada parcialmente a piruvato, el cual, en la mitocondria, ingresa al ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) como acetil-CoA, donde es oxidado totalmente generando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (Voet et al., 2016). De forma complementaria a las reacciones de oxidación, se da la reducción de cofactores como el NAD o el FAD, los cuales ceden electrones a los complejos proteicos que componen la cadena mitocondrial de transporte de electrones, donde el aceptor final de electrones es el oxígeno ( $\text{O}_2$ ). Además, el gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  generado provee la fuerza motriz para la síntesis de ATP, mediada por ATPasas (Voet et al., 2016). La síntesis de ATP mitocondrial producida en este contexto enzimático se denomina fosforilación oxidativa (OXPHOS).

Como se mencionó, el  $\text{O}_2$  es requerido para la oxidación de glucosa acoplada a la síntesis mitocondrial de ATP. No obstante, algunos tipos celulares, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, son capaces de reprogramar su metabolismo energético frente a la baja disponibilidad de  $\text{O}_2$  (hipoxia), adoptando un perfil metabólico altamente glucolítico. En este contexto, el ATP se sintetiza a merced de la oxidación parcial de glucosa durante la glucólisis, generando lactato (Figura 1). Este fenómeno, descripto inicialmente en células tumorales, se denomina “efecto Warburg” en honor a su descubridor, Otto Warburg, quien en base a estas observaciones construyó una teoría metabólico-céntrica del origen del cáncer en la primera mitad del siglo XX (Warburg, 1956). El efecto Warburg ha inspirado recientemente un interés renovado por el metabolismo entre los biólogos celulares. La idea de que la adopción de un perfil glucolítico podría ser una característica de las células en condiciones fisiológicas determinadas, y no meramente una característica maligna de las células transformadas, ha comenzado a ser discutida por biólogos dedicados a disciplinas no necesariamente vinculadas al cáncer (Agathocleous et al., 2012; Agathocleous & Harris, 2013; DeBerardinis et al., 2008).



**Figura 1. Cambios en el metabolismo energético en el contexto del efecto Warburg.** Se esquematizan las reacciones principales del metabolismo energético celular, en condiciones “normales”, de metabolismo basal, y en condiciones en las que se produce el efecto Warburg. En condiciones basales, la glucosa se oxida de forma completa, consumiéndose O<sub>2</sub> en el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Frente a la hipoxia, las células pueden adoptar un metabolismo altamente glucolítico, en el que se desacopla la glucólisis del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

## 1.2. La autofagia

### 1.2.1. Generalidades

La autofagia es un proceso catabólico de autodigestión celular altamente conservado en células eucariotas, en el que diversos componentes citoplasmáticos son degradados en el lisosoma. La principal función de la autofagia es la eliminación de organelas dañadas y agregados proteicos, como así también el reciclado de macromoléculas para alimentar el anabolismo celular. Por otro lado, se sabe que la autofagia interviene en mecanismos de defensa contra patógenos, como así también en procesos de desarrollo y diferenciación celular, aunque los mecanismos por los que la autofagia los controla no son del todo conocidos (Hale et al., 2013; Yin et al., 2016). Si bien la autofagia está siempre activa en niveles basales, se induce fuertemente en respuesta a estímulos que incluyen el ayuno, el estrés oxidativo y la hipoxia (Hale et al., 2013).

Se ha reportado que defectos en el proceso de autofagia están estrechamente vinculados con el origen y desarrollo de diversas patologías humanas (Deretic et al., 2013; Kimmelman & White, 2017; Menzies et al., 2015), lo cual demuestra la importancia del proceso para el mantenimiento de la homeostasis tanto a nivel celular como a nivel sistémico.

Se distinguen tres tipos particulares de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia, y la autofagia mediada por chaperonas (*chaperone-mediated autophagy*, CMA). En el proceso de macroautofagia, componentes del citoplasma son secuestrados en organelas de doble membrana, los autofagosomas, los cuales se fusionan luego con lisosomas para la degradación de su contenido por parte de las hidrolasas ácidas lisosomales (Noda & Inagaki, 2015). Por otro lado, la microautofagia involucra la captación de componentes celulares por medio de la invaginación directa de la membrana de los endolisosomas, mientras que en la CMA, la actividad de chaperonas permite la entrada directa de proteínas a ser degradadas directamente al interior del lisosoma (Tekirdag & Cuervo, 2018). Asimismo, tanto la macroautofagia como la microautofagia pueden poseer cierta selectividad, captando componentes por medio de receptores específicos; o bien pueden ser no selectivas, degradando material en masa de forma totalmente inespecífica (Gatica et al., 2018; Lei et al., 2022; Mukherjee et al., 2016). En cambio, la CMA es un proceso de degradación únicamente selectivo, pero este proceso no ocurre en *Drosophila* (Chiang & Dice, 1988; Tekirdag & Cuervo, 2018). Esta Tesis está vinculada particularmente con el proceso de macroautofagia, al cual nos referiremos simplemente como “autofagia”.

### 1.2.2. El proceso de autofagia en *Drosophila melanogaster*

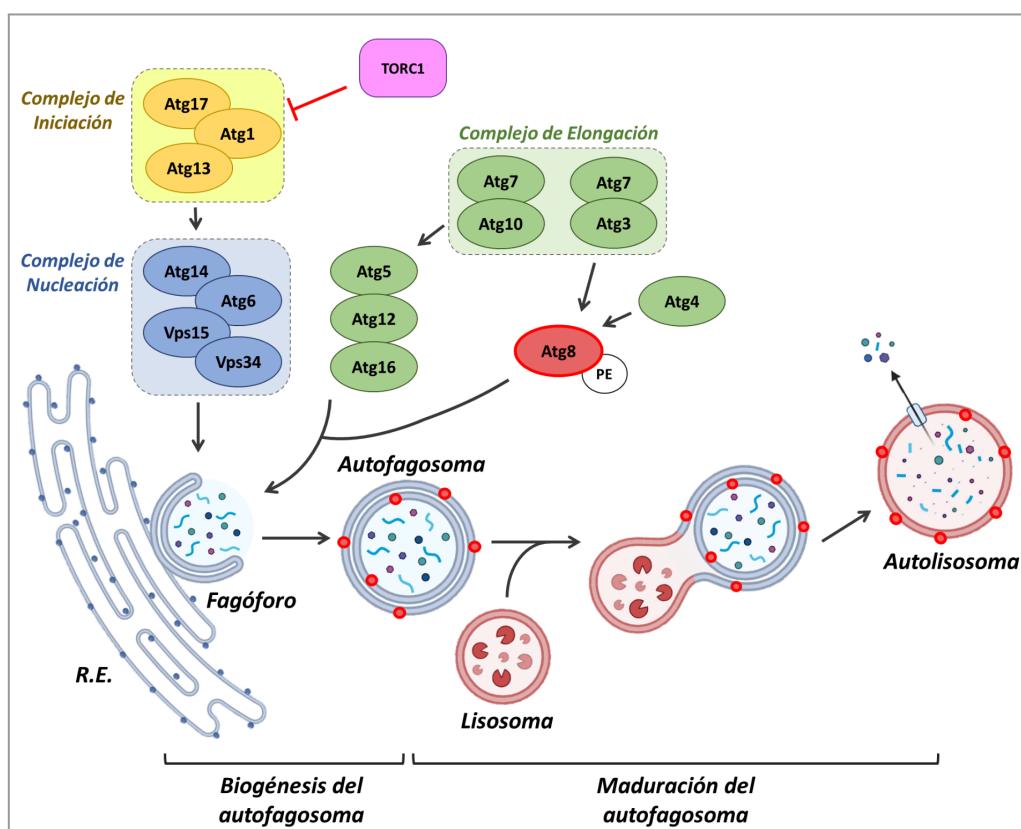
Como se mencionó, los distintos componentes involucrados en el proceso de autofagia se encuentran altamente conservados en células eucariotas. Estos genes, identificados inicialmente en levaduras, se denominan genes ATG (*autophagy-related genes*) y se agrupan en tres complejos: 1) complejo de iniciación, 2) complejo de nucleación, y 3) complejo de elongación (Chang & Neufeld, 2010; Yin et al., 2016).

El complejo de iniciación está conformado por la serina/treonina quinasa Atg1 (ULK1-2 en mamíferos), Atg17 (FIP200 en mamíferos) y Atg13 (Chang & Neufeld, 2010), además de un número variable de proteínas accesorias. En condiciones basales, Atg1 es parcialmente inhibida por fosforilación mediada por el complejo TORC1. En condiciones de restricción nutricional, TORC1 reduce su actividad, por lo cual la actividad de Atg1 se incrementa. Atg1 a su vez fosforila a Atg13 y Atg17 activando así el complejo de iniciación (Figura 2), el cual, como consecuencia puede fosforilar y activar al complejo de nucleación (Chang & Neufeld, 2010).

El complejo de nucleación se compone de la fosfatidilinositol 3 quinasa de clase 3 Vps34 y las proteínas Vps15 (PI3KR4/p150 en mamíferos), Atg6 (Beclin-1 en mamíferos) y Atg14 (Anding & Baehrecke, 2015; Juhász et al., 2008). El complejo de nucleación es reclutado y activado por el complejo de iniciación. Al activarse el complejo de nucleación, Vps34 fosforila el fosfatidilinositol (PI) para dar fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P). El dominio de membrana del retículo endoplasmático marcado con PI3P determina el sitio de formación del fagóforo o membrana de aislamiento (Nascimbeni et al., 2017), el cual se expande luego por acción del complejo de elongación (Figura 2).

El complejo de elongación incluye a Atg8 (LC3 en mamíferos), Atg5, Atg7, Atg12, Atg10, Atg16, Atg3 y Atg4 (Figura 2) (Chang & Neufeld, 2010). Este complejo actúa por mecanismos similares a los sistemas de conjugación de ubiquitina (Geng & Klionsky, 2008). Las ligasas Atg7 y Atg10 median la conjugación de Atg12 a Atg5, formando un complejo que, a su vez, interactúa con Atg16 (Kuma et al., 2002; Mizushima et al., 1998; Walczak & Martens, 2013). Por otro lado, Atg8, tras ser clivada en su extremo C-terminal por la proteasa Atg4, es reconocida por Atg7 y Atg3, y conjugada a fosfatidiletanolamina (PE) mediante la acción del complejo Atg12-Atg5 (Geng & Klionsky, 2008; Wesselborg & Stork, 2015). Este complejo, junto a Atg16, es reclutado al sitio de biogénesis del autofagosoma, en el cual Atg8-PE es incorporada a la membrana del fagóforo en expansión (Figura 2) (Wesselborg & Stork, 2015).

Con la expansión del fagóforo y la consecuente formación del autofagosoma, el material a degradar queda encerrado dentro del mismo, y es posteriormente degradado tras la fusión de esta organela con el lisosoma. Este proceso de fusión da lugar a una nueva estructura, el autolisosoma, donde las hidrolasas ácidas lisosomales degradan el contenido citoplasmático y la membrana interna del autofagosoma, lo que determina que el autolisosoma quede delimitado por una simple membrana (Figura 2) (Hale et al., 2013; Tsuboyama et al., 2016).



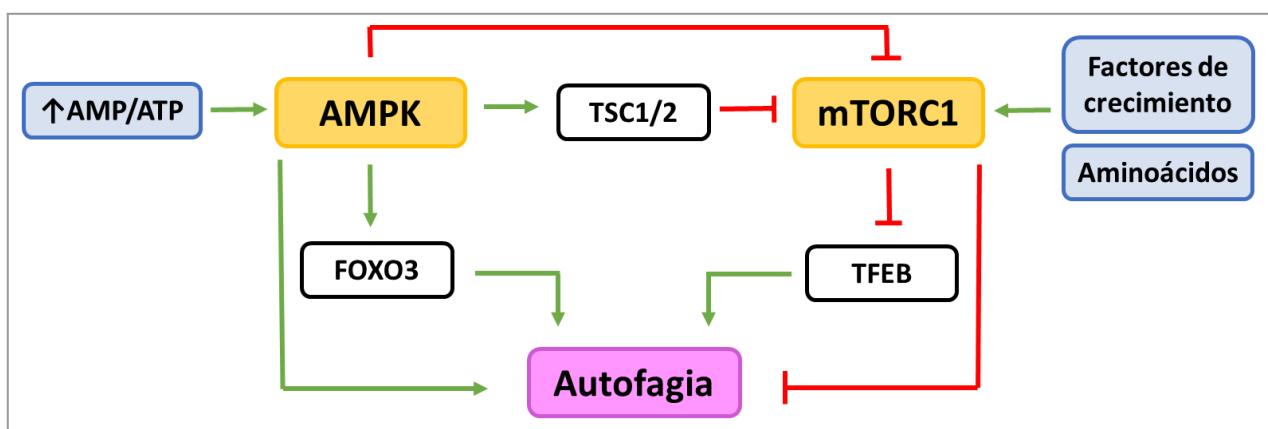
**Figura 2. Mecanismos moleculares involucrados en el proceso de autofagia en *Drosophila*.** El complejo de iniciación (Atg1-Atg13-Atg17) es regulado negativamente por la actividad de TORC1. El sitio de formación del fagóforo es definido por la ubicación del complejo de nucleación (Atg6-Vps34-Atg14-Vps15). El complejo Atg5-Atg12 se forma por acción de Atg7 y Atg10, reclutadas al fagóforo por Atg16. En conjunto, Atg5-Atg12-Atg16 median la incorporación de Atg8-PE a la membrana del fagóforo. Tras elongarse y cerrarse el fagóforo, se forma el autofagosoma, el cual dará lugar al autolisosoma tras su fusión con el lisosoma. En el autolisosoma se degradan componentes celulares de distinta naturaleza para alimentar el anabolismo de la célula. R.E.: retículo endoplasmático.

### 1.2.3. Regulación de la autofagia

La regulación de la autofagia se da principalmente por medio de la señalización de mTORC1 y AMPK, vías fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis celular y el balance entre procesos anabólicos y catabólicos (Figura 3) (Rabanal-Ruiz et al., 2017).

El complejo mTORC1 integra información de la disponibilidad de nutrientes y energía, como así también la de múltiples vías de transducción de señales, coordinando el metabolismo celular. En presencia de nutrientes, energía (ATP) y factores de crecimiento, mTORC1 inhibe la autofagia (Kim et al., 2011; Puente et al., 2016; Yuan et al., 2013) y promueve la síntesis de lípidos, proteínas y nucleótidos. Por otro lado, mTORC1 inhibe la autofagia a nivel transcripcional por medio del bloqueo de la actividad del factor de transcripción TFEB, que media la inducción transcripcional de genes lisosomales y autofágicos (Settembre et al., 2012).

La quinasa AMPK, por su parte, sensa el estado energético de la célula, activándose cuando la relación AMP/ATP aumenta frente a la deprivación de glucosa o la disminución de la fosforilación oxidativa (Mihaylova & Shaw, 2011). En su estado activo, AMPK estimula la autofagia, regulando negativamente a mTORC1 por fosforilación (y activación) de su inhibidor TSC1/2, como así también mediante la fosforilación inhibitoria de la proteína Raptor que forma parte del complejo mTORC1 (Gwinn et al., 2008; Inoki et al., 2003). A su vez, AMPK puede inducir la autofagia, fosforilando directamente componentes del complejo de iniciación (Kim et al., 2011). Además, AMPK activa la autofagia a nivel transcripcional, al fosforilar al factor de transcripción FOXO3, promoviendo así la transcripción de Atg4, Atg12, Beclin-1, LC3, y ULK1 (Greer et al., 2007; Lei et al., 2022; Tamargo-Gómez & Mariño, 2018).



**Figura 3. Regulación de la autofagia por las vías de señalización de mTORC1 y AMPK.** Se esquematizan los puntos principales de regulación de la autofagia por AMPK, la cual activa la autofagia en condiciones de falta de energía, y por el complejo mTORC1, el cual inhibe la actividad autofágica.

#### 1.2.4. La autofagia en la adaptación a hipoxia

La hipoxia constituye una condición adversa para la célula, en la que se inhibe la fosforilación oxidativa mitocondrial y se compromete la producción energética, a la vez que aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (Luo et al., 2022). Frente a hipoxia, los organismos responden de forma adaptativa, modificando tanto su metabolismo celular como otros procesos que tienen como fin reducir el consumo de oxígeno y favorecer su captación y transporte (Centanin et al., 2010; Kaelin & Ratcliffe, 2008; Romero et al., 2007). El regulador clave de la respuesta a hipoxia es el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), un heterodímero formado por una subunidad  $\beta$ , de expresión constitutiva, y una subunidad  $\alpha$ , la cual se degrada en presencia de  $O_2$  (Bruick, 2003; Gorr et al., 2006; Huang et al., 1998; Jiang et al., 1996; Wang et al., 1995; Wang & Semenza, 1995). En normoxia, HIF $\alpha$  es hidroxilada por una prolil-4-hidroxilasa (PHD), la cual utiliza al  $O_2$  como co-sustrato de reacción, y en consecuencia es poliubiquitinada y degradada en el proteasoma de 26S (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Masson et al., 2001). En hipoxia, la actividad catalítica de la PHD se ve reducida, HIF $\alpha$  se estabiliza, y el heterodímero HIF $\alpha/\beta$  puede translocar al núcleo, regulando la expresión de múltiples genes involucrados en la adaptación a hipoxia (Bruick & McKnight, 2001; Lavista-Llanos et al., 2002; Schofield & Ratcliffe, 2004).

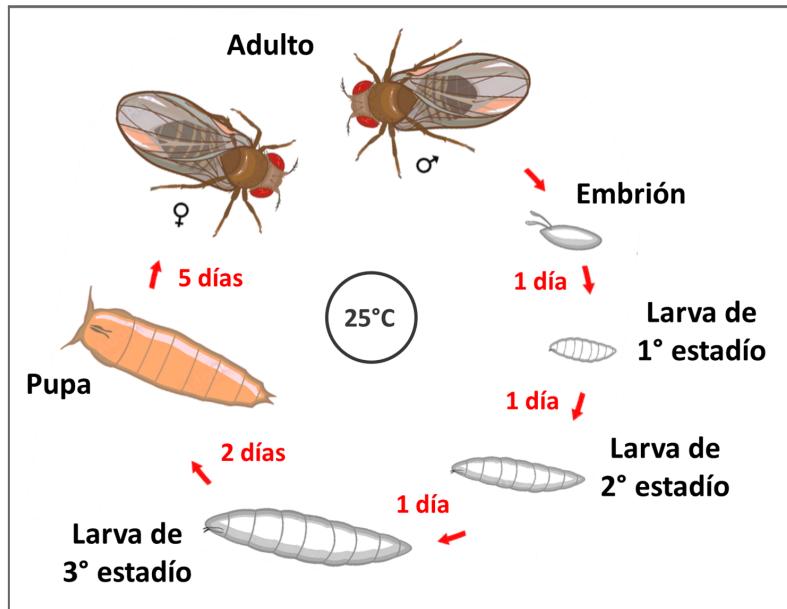
En hipoxia, así como también en otras condiciones altamente glucolíticas como el cáncer, en las cuales tiene lugar el efecto Warbug, aumenta la actividad de la Lactato Deshidrogenasa (LDH), la cual cataliza la conversión de piruvato a lactato (Figura 1) (Fan et al., 2011; Hong et al., 2004; Luo et al., 2022). En particular, se sabe que LDH es inducida transcripcionalmente por HIF1 $\alpha$  (Firth et al., 1995; Kocianova et al., 2022a; Miao et al., 2013). Concomitantemente, en nuestro laboratorio, en experimentos con órganos larvales de *Drosophila ex-vivo*, hemos observado que, tras unos pocos segundos de exposición a hipoxia, estos órganos experimentan una fuerte transición metabólica y comienzan a producir lactato (Gándara et al., 2019).

Nosotros y otros grupos hemos demostrado que la autofagia se induce por hipoxia, tanto en *Drosophila* como en otros organismos modelo (Bellot et al., 2009; Chen et al., 2015; Valko et al., 2022). Hemos encontrado en el laboratorio que en *Drosophila*, la inducción de la autofagia es esencial para la adaptación y supervivencia de las larvas a hipoxia, y demostrado que la autofagia se activa de manera independiente de sima/HIF1 $\alpha$  (Valko et al., 2022). En resumen, es evidente la interrelación entre la hipoxia y la acumulación de lactato producto del efecto Warburg, y la inducción de la autofagia por hipoxia. Cabe preguntarse, entonces, si el lactato en sí mismo puede ser un factor regulador de la respuesta autofágica, como parte de la adaptación metabólica a hipoxia. En este sentido, se ha reportado en células de mamíferos, un mecanismo de regulación de la autofagia por lactato. En este mecanismo, la Lactato Deshidrogenasa A (LDHA) es fosforilada por ULK1/Atg1, lo cual incrementa su actividad catalítica, estimulando la producción de lactato. El lactato, a su vez, media la lactoilación de la quinasa Vps34, incrementando su actividad y estimulando la autofagia (Jia et al., 2023).

### **1.3. *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio**

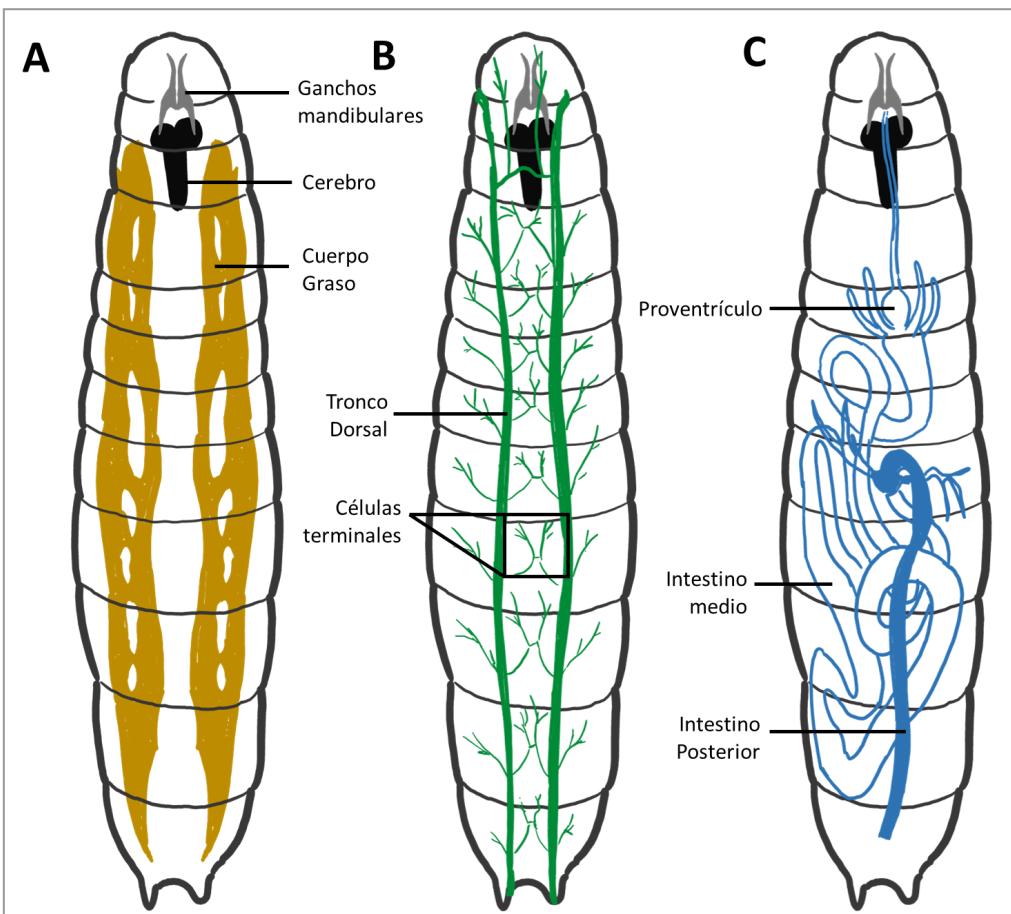
En nuestro laboratorio, utilizamos como organismo modelo a la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Este insecto es utilizado hace más de un siglo en investigación científica en el campo de la genética, la biología del desarrollo, las neurociencias, la biología celular y la fisiología, entre otros. *Drosophila* presenta múltiples ventajas para el trabajo experimental; en primer lugar, una gran proporción de los genes humanos, incluso aquellos vinculados a enfermedades genéticas, tienen ortólogos en *Drosophila* (Reiter et al., 2001). Además, *Drosophila* posee un genoma simple, conformado sólo por cuatro pares cromosómicos, en el cual la mayoría de los genes son de copia única, reduciendo problemas de redundancia funcional en estudios con mutantes. Existen en *Drosophila* numerosas herramientas genéticas disponibles para la manipulación de genes particulares, las cuales hacen de ella un modelo único para estudios *in vivo*. A su vez, numerosas cepas se encuentran disponibles en repositorios que contienen colecciones de acceso libre para la comunidad. Por otro lado, *Drosophila* presenta un ciclo de vida corto y una alta fertilidad, lo que permite obtener una gran cantidad de individuos en poco tiempo (Greenspan, 2004). Asimismo, su tamaño reducido y sus bajos requerimientos nutricionales hacen de *Drosophila* un animal que puede ser mantenido en poco espacio y a bajo costo.

El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, desde el inicio de su desarrollo hasta el estadío adulto, tiene una extensión de 12 días a 25°C en condiciones óptimas de alimentación (Greenspan, 2004). Posee un desarrollo holometábolo que comprende cuatro fases morfológica y fisiológicamente distintas (Figura 4) (Fernández-Moreno et al., 2007). Tras la cópula, las hembras depositan los huevos y se inicia la embriogénesis. Del huevo emergen las larvas de 1<sup>er</sup> estadío, las cuales empiezan a alimentarse y a ganar masa corporal. Las larvas atraviesan luego dos estadíos más entre los cuales mudan la cutícula para poder incrementar su tamaño corporal. Unos 5 días después de la ovipuesta, las larvas, ya en su 3<sup>er</sup> estadío, abandonan el alimento y buscan un sustrato sobre el cual formar el pupario (Fernández-Moreno et al., 2007). Dentro del pupario transcurre el estadío de pupa (Figura 4), durante el cual ocurre la metamorfosis, en la cual los tejidos larvales se disgregan casi totalmente y los órganos del adulto se forman *de novo*. Transcurridos 4 o 5 días de estadío pupal y de adulto farado, los adultos emergen del pupario (Figura 4). Los adultos alcanzan la madurez sexual unas 8 horas después de emerger, y tienen una expectativa de vida de unos 50 días (Chyb & Gompel, 2013).



**Figura 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** Se esquematizan las diferentes etapas del ciclo de vida de *Drosophila* y la duración de las mismas a 25°C. Transcurrido un día desde la ovipuesta, el embrión pasa al primer estadío larval, seguido del segundo y tercer estadío larval, los cuales duran uno y dos días, respectivamente. La larva de tercer estadío dará lugar a la pupa, etapa durante la cual tiene lugar el proceso de metamorfosis (5 días). Finalmente, el adulto emerge del pupario, completándose el ciclo de vida.

*Drosophila* es un organismo modelo muy utilizado en estudios sobre el proceso de autofagia. El cuerpo graso de la larva de tercer estadío, el cual es análogo al hígado y al tejido adiposo de los mamíferos, es utilizado frecuentemente en dichos estudios (Hegedűs et al., 2016; Jacomin et al., 2020; Juhász et al., 2008; Lőw et al., 2013). El cuerpo graso es el principal reservorio de lípidos y glucógeno del organismo, y es capaz de responder rápidamente a la restricción nutricional liberando lípidos, carbohidratos y aminoácidos a la hemolinfa (Arrese & Soulages, 2010). En este trabajo de Tesis realizamos disecciones de distintos tejidos larvales, esquematizados en la Figura 5. En particular, trabajamos con el cuerpo graso, el sistema digestivo y el cerebro. Por otro lado, indujimos la expresión genética específicamente en el sistema traqueal.

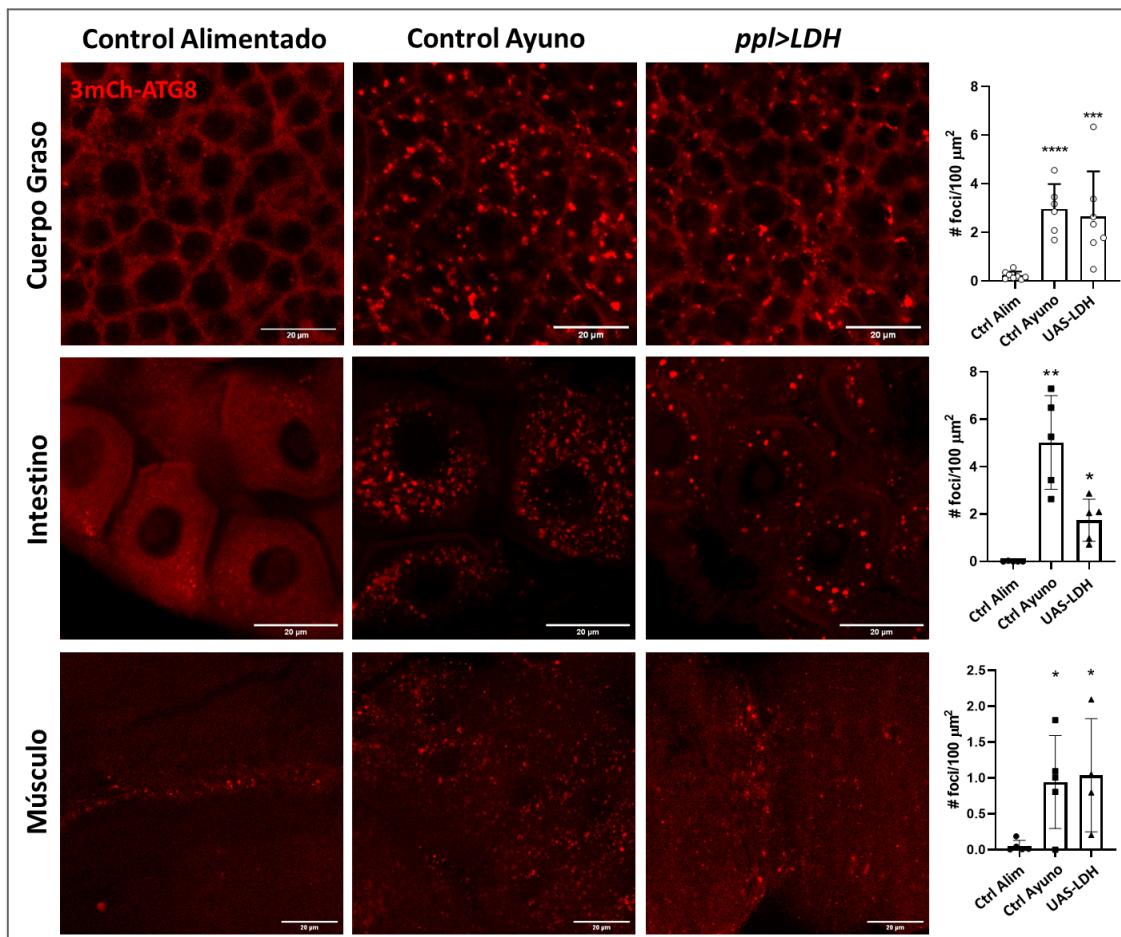


**Figura 5. Anatomía de la larva de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.** Se esquematizan en la larva los diferentes órganos a los que hacemos referencia en este trabajo de Tesis. Se señalan los ganchos mandibulares, el cerebro, el cuerpo graso (tejido adiposo, marrón, A) y regiones del sistema traqueal (sistema respiratorio, verde, B) y del sistema digestivo (azul, C).

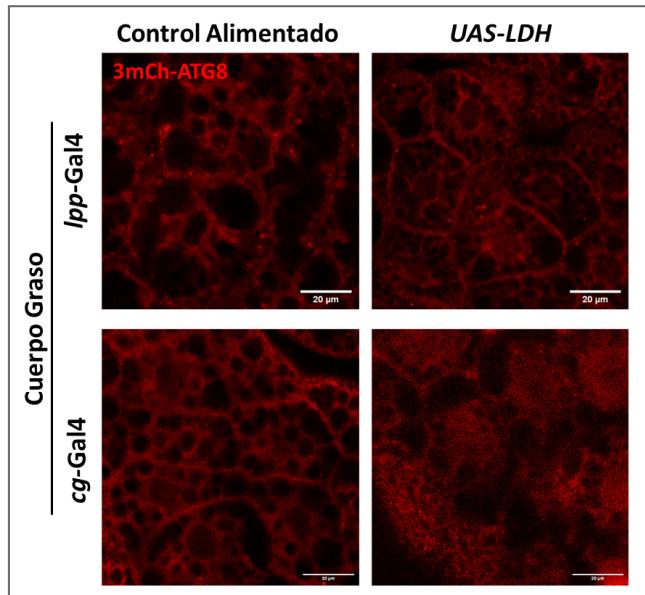
#### 1.4. Resultados previos del laboratorio que sentaron las bases de esta Tesis

Resultados previos de nuestro laboratorio (parte de la Tesis doctoral de Sebastián Pérez Pandolfo, (Pérez Pandolfo, 2023)) indican que tras sobreexpresar LDH en una línea de moscas transgénicas bajo el control del inductor *ppl*-Gal4, se induce fuertemente la autofagia en diversos tejidos de la larva de 3º estadio de *Drosophila*, los cuales incluyen el cuerpo graso, el intestino y los músculos (Figura 6). El inductor *ppl*-Gal4 está descripto en la literatura como un inductor específico del cuerpo graso. Sin embargo, el Dr. Pérez Pandolfo encontró que *ppl*-Gal4 confiere inducción en otros tejidos además del cuerpo graso, que incluyen el cerebro, el proventrículo, el intestino medio, los discos imaginarios, las glándulas salivales y las tráqueas (Pérez Pandolfo, 2023). La sobreexpresión de LDH, pero esta vez utilizando los inductores *lpp*-Gal4 o *cg*-Gal4, ambos con mayor fuerza de expresión que *ppl*-Gal4 y alta especificidad por el cuerpo graso, no provocan inducción alguna de la autofagia (Figura 7). El Dr. Pérez Pandolfo encontró que *ppl*-Gal4 confiere expresión, no sólo en el cuerpo graso, sino además en diversos tejidos larvales, lo cual no había sido reportado previamente. Por lo tanto, los resultados de Sebastián sugieren que hay al menos un tejido larval en el cual la sobreexpresión de LDH provoca la inducción sistémica de la autofagia, y que dicha inducción no es causada por el lactato actuando

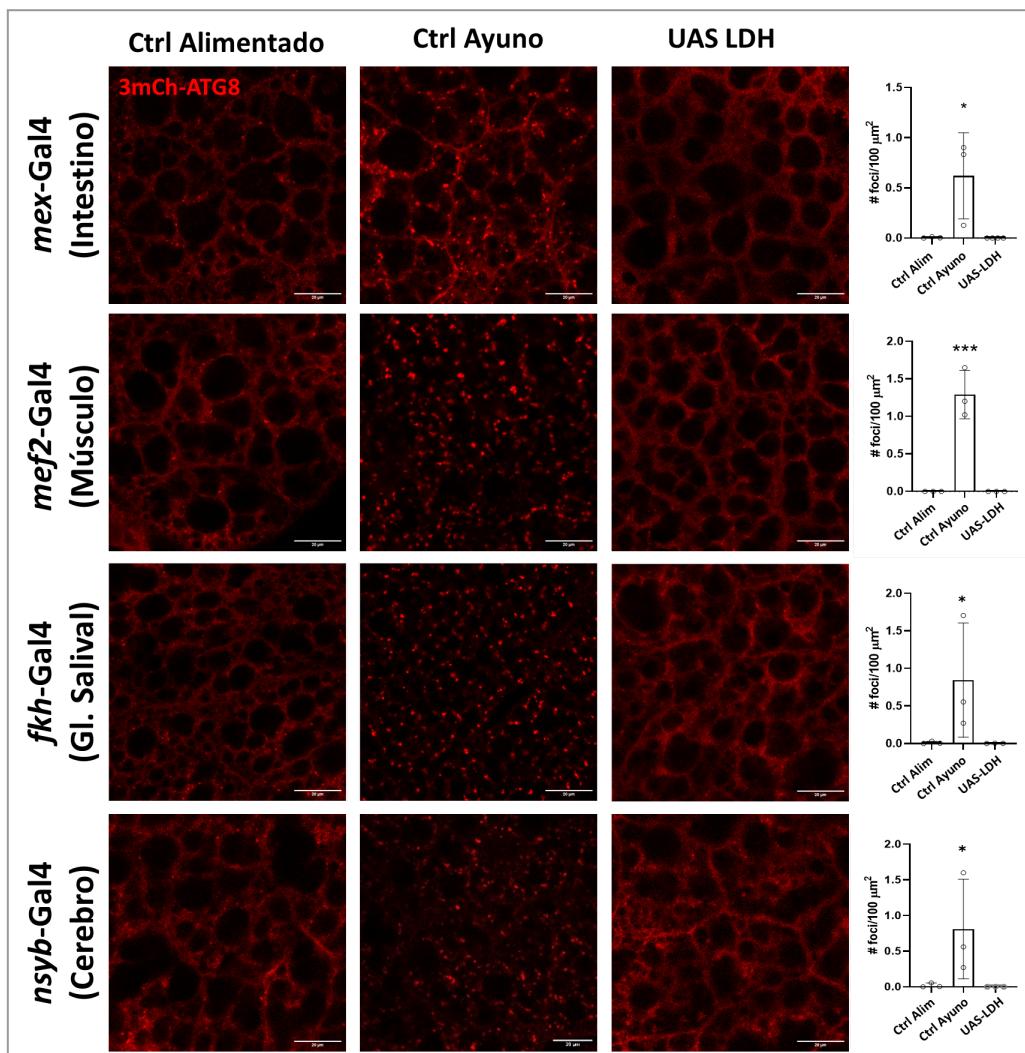
directamente sobre el cuerpo graso. El Dr. Sebastián Pérez Pandolfo observó, durante su Tesis doctoral, que la sobreexpresión de LDH en el intestino, músculos, glándula salival o el cerebro de larvas de tercer estadio no gatilla la autofagia en el cuerpo graso (Figura 8), lo que nos permitió descartar a estos órganos como los disparadores de la autofagia en respuesta a lactato. En el presente trabajo de Tesis de Licenciatura hemos logrado identificar el tejido en el cual la acumulación de lactato dispara la respuesta autófaga de manera remota en el cuerpo graso: el sistema traqueal (sistema respiratorio) (ver sección 4. Resultados).



**Figura 6. La sobreexpresión de LDH con el inductor *ppl*-Gal4 induce la autófaga en distintos tejidos larvales.** Tras sobreexpresar LDH con este inductor, se observa un aumento de la nucleación del reporter de autófaga 3XmCherry-ATG8 (3mCh-ATG8) en el cuerpo graso, intestino y músculos de larvas de tercer estadio, medida como cantidad de *foci* por  $100\mu\text{m}^2$  de tejido. N= 4-16. Barras de escala: 20μm. Prueba *t* de Student despareado a dos colas. \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001; \*\*\*\*: p<0,0001. Las imágenes y cuantificaciones son parte de la Tesis doctoral de Sebastián Pérez Pandolfo.



**Figura 7.** La sobreexpresión de LDH en el cuerpo graso con otros inductores no induce la autofagia. Tras sobreexpresar LDH con los inductores *lpp*-Gal4 o *cg*-Gal4, de mayor fuerza y especificidad por el cuerpo graso, no se observa nucleación de 3mCh-ATG8. Barras de escala: 20μm. Las imágenes son parte de la Tesis doctoral de Sebastián Pérez Pandolfo.



**Figura 8.** La sobreexpresión de LDH en distintos órganos larvales no induce la autofagia en el cuerpo graso. En experimentos llevados a cabo por el Dr. Sebastián Pérez Pandolfo en su Tesis doctoral, no se observó un aumento

de la nucleación del reportero 3mCh-ATG8 en el cuerpo graso tras sobreexpresar LDH en el intestino, músculos, glándula salival o cerebro de larvas de tercer estadío. Esto nos indica que el lactato en estos tejidos no dispara la respuesta autofágica observada previamente con el inductor *ppl*-Gal4. Se utilizó como control negativo a larvas UAS-mCD8-GFP alimentadas con medio de crecimiento enriquecido (Ctrl Alimentado) y como control positivo, a larvas sometidas a ayuno por 6 horas (Ctrl Ayuno). En cada caso, se cuantificó la cantidad de *foci* de 3mCh-ATG8 por 100 $\mu\text{m}^2$ . N= 4-8. Barras de escala: 20 $\mu\text{m}$ . Prueba *t* de Student desapareado a dos colas. \*: p<0,05; \*\*\*: p<0,001. Las imágenes y cuantificaciones son parte de la Tesis doctoral de Sebastián Pérez Pandolfo.

## **2. Hipótesis y Objetivos**

---

### **2.1. Hipótesis**

Habiéndose observado en nuestro laboratorio que la sobreexpresión de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) bajo el control del inductor *ppl-Gal4* induce fuertemente la autofagia en diversos tejidos de la larva de tercer estadío de *Drosophila*, y considerando que la sobreexpresión de LDH con inductores de mayor fuerza y especificidad por el cuerpo graso no logra la inducción de la autofagia en esos tejidos, en esta Tesis de Licenciatura hemos trabajado bajo la hipótesis de que existe uno o más órganos larvales (donde *ppl-Gal4* es activo) que, tras ser estimulados con ácido láctico, liberan una señal difusible a través de la hemolinfa que activa el proceso de autofagia a distancia en otros órganos del cuerpo.

### **2.2. Objetivo**

El objetivo de este proyecto fue determinar si la acumulación de ácido láctico en las tráqueas de la larva de 3<sup>er</sup> estadío de *Drosophila melanogaster* es capaz de activar el proceso de autofagia en otros órganos larvales, y caracterizar dicho proceso de autofagia.

### 3. Materiales y Métodos

---

#### 3.1. Manipulación de *Drosophila melanogaster*

##### 3.1.1. Cría y mantenimiento de moscas

Los animales se mantuvieron en viales de plástico cilíndricos de 50cm<sup>3</sup>, conteniendo aproximadamente 10ml de medio de crecimiento estándar. Este medio está compuesto de harina de maíz, agar-agar, levadura, sacarosa, y complementado con Nipagin (antimicótico) y ácido propiónico (ver 3.7.3 Reactivos y soluciones). Los viales se mantuvieron tapados con algodón con el fin de permitir el intercambio gaseoso.

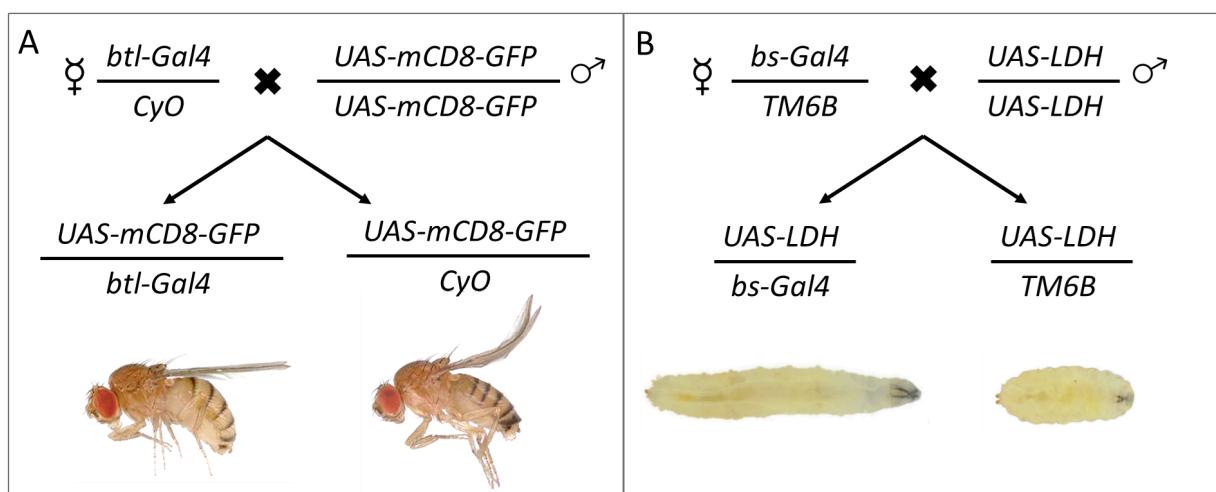
Dependiendo del experimento, incubamos los viales a temperaturas de 18°C o 25°C. Temperaturas más bajas permiten mantener los cultivos por más tiempo antes de que sea necesario repicar las moscas, es decir, transferirlas a un vial nuevo. Por otro lado, temperaturas más altas aceleran el desarrollo y contribuyen a lograr mayores rendimientos en el número de individuos. La cantidad de moscas en el cultivo puede aumentarse, también, utilizando botellas, las cuales tienen un volumen mayor al de los viales (250cm<sup>3</sup> vs. 50cm<sup>3</sup>), pero a diferencia de estos requieren ser cerrados con tapones de goma porosa.

Las moscas fueron manipuladas bajo lupa estereoscópica, con el uso de un pincel fino y adormecidas por exposición a dióxido de carbono. Para esto, se utilizaron bloques con cobertura porosa que permite la difusión del gas de manera continua durante toda la manipulación.

##### 3.1.2. Genética de *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster* es una especie que cuenta con cuatro pares de cromosomas. El cromosoma I compone el par sexual, el cual difiere entre hembras y machos (XX y XY, respectivamente) (Greenspan, 2004). Por otro lado, los pares II, III y IV son autosómicos. En *Drosophila* se utilizan cromosomas balanceadores, cromosomas manipulados genéticamente que contienen una serie de inversiones que impiden la recombinación homóloga durante la meiosis de las hembras. Así, durante la gametogénesis, dos *loci* que se encuentren en un mismo cromosoma segregarán juntos y se encontrarán siempre en la misma gameta, garantizando que ambos estarán juntos en un mismo individuo de la progenie. Por otro lado, los cromosomas balanceadores son letales en homocigosis, lo que permite asegurar que todos los individuos que los poseen sean heterocigotas para un dado transgen o mutación de interés. De este modo, los cromosomas balanceadores permiten mantener las líneas de interés a lo largo de las generaciones (Greenspan, 2004). La identificación de individuos que poseen cromosomas balanceadores se realiza en base a marcadores fenotípicos dominantes que estos codifican, los cuales pueden corresponder a rasgos morfológicos tanto larvales como adultos o a patrones de fluorescencia observables en las larvas (Chyb & Gompel, 2013).

En este trabajo de Tesis, utilizamos dos marcadores fenotípicos para identificar adultos que portan cromosomas balanceadores luego de cada cruzamiento. Se utilizó el marcador de balanceadores del cromosoma II, *Cy<sup>l</sup>*, mutación del gen *Curly*, el cual provoca en los adultos que las alas se curven hacia arriba (Figura 9A). Por otro lado, como marcador de balanceadores del cromosoma III se usó *Tb<sup>l</sup>*, mutación del gen *Tubby*, que provoca en larvas y pupas una disminución de la longitud corporal y un ligero aumento del ancho (Figura 9B). Por otro lado, la identificación de larvas que heredaron únicamente el gen de interés en un cruzamiento y no el cromosoma balanceador se llevó a cabo seleccionando las larvas que no expresaban la proteína fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), codificada en los cromosomas balanceadores utilizados, así como también visualizando la diferencia de longitud de las larvas *Tb<sup>l</sup>* en el caso del cromosoma III (Chyb & Gompel, 2013).



**Figura 9: Ejemplo de cruzamiento experimental y selección en la generación filial.** Se esquematizan cruzamientos entre hembras vírgenes de líneas que contienen inductores Gal4 y cromosomas balanceadores y machos de líneas UAS que permiten la expresión de un gen de interés. Hay dos genotipos posibles en la generación filial, sólo uno de los cuales es de nuestro interés, el cual ha recibido los elementos Gal4 y UAS. Los individuos que reciben el balanceador en lugar del inductor son descartados. A) El cromosoma balanceador CyO (*Curly of Oster*), del cromosoma II, contiene como marcador fenotípico a la mutación *Cy<sup>l</sup>*, fácilmente identificable en moscas adultas por la curvatura hacia arriba de las alas. Las moscas seleccionadas en este caso expresarán la proteína fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) bajo el control del inductor *bt1-Gal4*. B) El cromosoma balanceador TM6B (*Third Multiple 6B*), del cromosoma III, expresa como marcador a la mutación *Tb<sup>l</sup>*, la cual genera individuos más cortos y anchos fácilmente identificables en los estadios larval y pupal. Las larvas seleccionadas en este caso expresarán la Lactato Deshidrogenasa (LDH) bajo el control del inductor *bs-Gal4*.

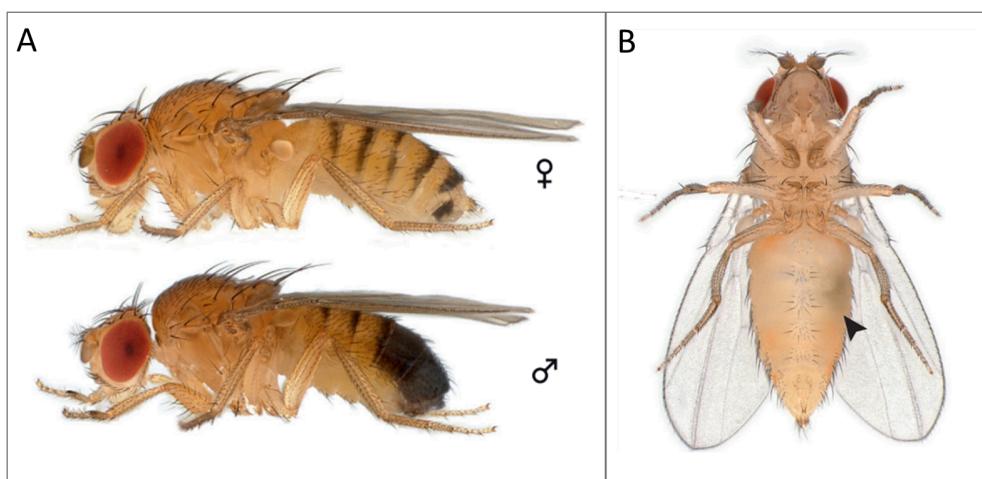
### 3.1.3. Cruzamientos

Usualmente los experimentos requieren la presencia de dos o más construcciones transgénicas o mutaciones en un mismo individuo. Cuando esto ocurre, es necesario realizar cruzamientos entre líneas de moscas que contienen cada uno de los elementos a combinar, obteniendo finalmente una generación filial en la que se encuentran las características deseadas.

El primer paso para realizar un cruzamiento entre dos cepas es separar machos de una de las cepas y hembras vírgenes de la otra. La identificación de los sexos es posible gracias al marcado dimorfismo

sexual que existe en *Drosophila*, donde el macho es de menor tamaño que la hembra, posee un abdomen curvado ventralmente y de cutícula más pigmentada posteriormente, como así también un aparato reproductor de color más oscuro que el de las hembras (Figura 10A) (Chyb & Gompel, 2013). Las moscas alcanzan la madurez sexual 8 horas luego de emerger del pupario, horas durante las cuales es posible reconocer y aislar a las hembras vírgenes por la observación del meconio, el cual se presenta como una mancha de color oscuro en la zona ventral-lateral del abdomen que se mantiene alrededor de 6 horas hasta su desaparición (Figura 10B) (Chyb & Gompel, 2013).

En nuestros experimentos, realizamos cruzamientos entre 30 hembras vírgenes y 15 machos, aproximadamente. Para estimular la cópula, mantuvimos a los animales en viales a los cuales agregamos unos pocos granos de levadura en polvo sobre el medio de crecimiento e incubamos a 25°C durante 48 horas. Tras este período, transferimos las moscas a vasos plásticos de 200cm<sup>3</sup>, los cuales tienen pequeños orificios que permiten el intercambio gaseoso. Los vasos se cubrieron con placas de ágar (“placas de ovipuesta”) a modo de tapa, a las cuales agregamos pasta de levadura para estimular la ovipuesta sobre las placas, facilitando la recolección de huevos. Cada 24 horas, reemplazamos las placas para obtener individuos sincronizados en el desarrollo. Seleccionamos, por la ausencia de marcadores de cromosomas balanceadores, a los individuos de la generación filial que portaban los genes de interés. Las larvas sincronizadas se transfirieron a placas con medio de crecimiento enriquecido con levadura (4%) durante el primer estadío larval, y fueron luego incubadas a 29°C hasta alcanzar el tercer estadío, en el que realizamos los experimentos de esta Tesis.



**Figura 10. Dimorfismo sexual y reconocimiento de moscas vírgenes.** A) Vista lateral de moscas hembra y macho. Se pueden apreciar las diferencias fenotípicas entre ambos sexos, siendo la más notoria de ellas el mayor grado de pigmentación en el abdomen del macho. B) Vista ventral de una hembra virgen, en la que se puede observar el meconio en la zona lateral del abdomen (punta de flecha), el cual permanece durante 2 a 6 horas tras emerger del pupario. Además, la cutícula de la hembra virgen es más clara que la de la hembra mostrada en A, siendo ésta otra característica útil para su identificación. Imágenes obtenidas del *Atlas of Drosophila Morphology* (Chyb & Gompel, 2013).

### 3.1.4. Tratamiento de ayuno

Se colocó a las larvas de primer estadio del genotipo de interés en placas con medio de cultivo enriquecido a 29 °C hasta alcanzar el tercer estadio (aproximadamente 56 horas). Una vez alcanzada esta etapa, se las sometió a ayuno colocando entre 10 y 15 larvas en placas con agar durante 6 horas. A diferencia del medio de crecimiento, las placas con agar carecen de levadura, la cual representa la principal fuente de proteínas en el alimento. De esta forma, se logra la restricción nutricional.

### 3.1.5. Líneas utilizadas

A continuación, se detallan las líneas de moscas utilizadas durante este trabajo de Tesis, tanto las obtenidas de los bancos de líneas de acceso público como las generadas en el laboratorio mediante cruzamientos.

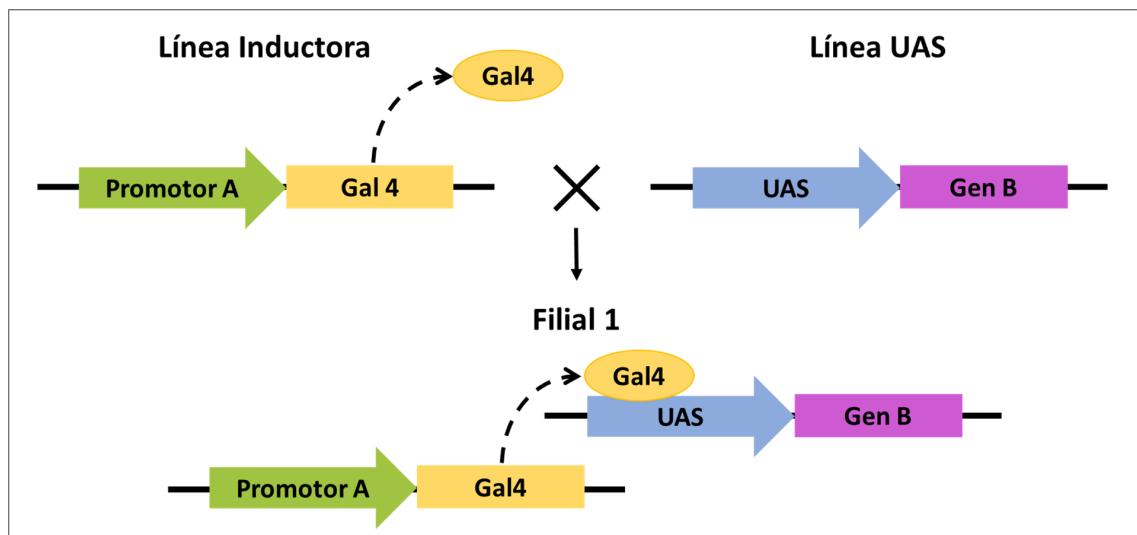
| Línea                               | ID/Ref                     | Adquisición   | Descripción  |
|-------------------------------------|----------------------------|---|--|
| <i>ppl</i> -Gal4                    | 58768                      | Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center (Indiana University, Bloomington, IN, USA) | Inductor que contiene el promotor del gen <i>pumpless</i> clonado río arriba de la secuencia codificante de Gal4       |
| <i>blt</i> -Gal4                    | (Ikeya & Hayashi, 1999)    | Provista por Shigeo Hayashi (Riken Center for Biosystems Dynamics Research, Japón)    | Inductor que contiene el promotor del gen <i>breathless</i> clonado río arriba de la secuencia codificante de Gal4     |
| <i>bs</i> -Gal4                     | (Gervais & Casanova, 2011) | Provista por Jordi Casanova (Institut de Biología Molecular de Barcelona, España)     | Inductor que contiene el promotor del gen <i>blistered</i> clonado río arriba de la secuencia codificante de Gal4      |
| UAS-mCD8-GFP (II)                   | 5137                       | Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center (Indiana University, Bloomington, IN, USA) | Expresa mCD8-GFP, una GFP de membrana plasmática, río abajo del elemento UAS   |
| UAS-LDH (III)                       | -                          | Zurich ORFeome Project, FlyORF  | Expresa el gen de LDH río abajo del elemento UAS   |
| 3mCherry-ATG8                       | (Hegedűs et al., 2016)     | Provista por Gabor Juhasz (Eotvos Lorand University, Budapest, Hungría)               | Expresa una construcción cuyo producto es ATG8 conjugada en su extremo N-terminal a tres copias del fluoróforo mCherry |
| <i>ppl</i> -Gal4; 3mCherry-ATG8     | -                          | Nuestro laboratorio   | -  |
| UAS-mCD8-GFP; 3mCherry-ATG8         | -                          | Nuestro laboratorio   | -  |
| 3mCherry-ATG8; UAS-LDH              | -                          | Nuestro laboratorio   | -  |
| 3mCherry-ATG8; <i>bs</i> -Gal4      | -                          | Nuestro laboratorio   | -  |
| <i>blt</i> -Gal4, UAS-mCD8-GFP (II) | -                          | Nuestro laboratorio   | -  |

**Tabla 1.** Líneas de moscas transgénicas empleadas en esta Tesis, incluyendo el lugar del que fueron obtenidas y una breve descripción del genotipo.

### 3.2. Herramientas genéticas

#### 3.2.1. Sistema Gal4-UAS

Durante este trabajo de Tesis, en todos los experimentos utilizamos el sistema binario de expresión Gal4-UAS (Brand & Perrimon, 1993). Este sistema, derivado de *Saccharomyces cerevisiae*, se basa en la expresión del factor de transcripción Gal4, el cual reconoce la secuencia promotora UAS (*Upstream Activation Sequence*) y permite la expresión dirigida de genes de interés a tejidos o tipos celulares específicos y en estadios del desarrollo particulares. Como Gal4 no existe naturalmente en *Drosophila*, este factor de transcripción no actúa sobre ningún gen endógeno. Cruzando una línea que expresa Gal4 con otra que posee el elemento UAS, se logra en la progenie la activación de los genes río abajo del promotor UAS, según el patrón de expresión conferido por el inductor que controla a Gal4 (Figura 11). Por otro lado, el sistema es modulable por temperatura ya que la actividad de Gal4 es máxima a 29°C y mínima a 18°C (Duffy, 2002).



**Figura 11. Esquema del sistema binario Gal4-UAS.** Una línea parental expresa el factor de transcripción Gal4 bajo el control de un promotor de interés, mientras que la otra línea parental posee en su genoma el promotor UAS, río arriba de la secuencia de un determinado gen. Tras el cruzamiento de ambas líneas, la generación filial adquiere ambas construcciones, permitiendo la expresión del gen B controlada por la actividad del promotor A.

#### 3.2.2. Reportero de autofagia 3XmCherry-ATG8

Al activarse el proceso de autofagia, la proteína ATG8 se cliva en su extremo C-terminal y se conjuga a una molécula de fosfatidiletanolamina, lo cual le permite asociarse a la membrana del autofagosoma en formación, cumpliendo el rol de reclutar a otros factores necesarios para el proceso de elongación (Figura 2) (Grasso et al., 2018). Cuando la autofagia no está activa, ATG8 no se conjuga con fosfatidiletanolamina, y, en consecuencia, se encuentra soluble en el citosol (He & Klionsky, 2009). Así, la observación del patrón de distribución intracelular de ATG8 permite evaluar el estado de activación de la autofagia en la célula. En este trabajo de Tesis, utilizamos a la proteína de fusión 3XmCherry-ATG8, en la cual tres copias del fluoróforo mCherry se encuentran unidas en tandem a la

región N-terminal de ATG8 (Hegedűs et al., 2016). Esta construcción nos permite observar al microscopio la distribución de ATG8 y, así, estimar el nivel de inducción de la autofagia (Valko et al., 2022). Con la autofagia inactiva y ATG8 soluble en el citosol, el patrón de fluorescencia es difuso y homogéneo en toda la célula. Por el contrario, tras la inducción de la autofagia, ATG8 se asocia a la membrana del autofagosoma, observándose puntos (*foci*) fluorescentes de mCherry. El grado de activación de la autofagia puede cuantificarse evaluando el grado de nucleación de 3XmCherry-ATG8, evidenciando la formación de vesículas autofágicas.

### **3.3. Disección y procesamiento de tejidos**

#### **3.3.1. Disección de larvas**

Durante esta Tesis, realizamos disecciones del cuerpo graso, cerebro y tubo digestivo larval (Figura 5). En todos los casos se disecaron animales que se encontraban en el estadio de larva 3 temprana, previo a la etapa de *wandering*, los cuales habían sido previamente seleccionados en base a la ausencia de marcadores de cromosomas balanceadores (ver 3.1.3. Cruzamientos). Utilizamos una placa de silicona rígida como soporte para la manipulación, sobre la cual colocamos a las larvas en una gota de PBS frío. Todo el proceso fue llevado a cabo bajo lupa binocular y utilizando pinzas de disección.

Para la disección del cuerpo graso, oprimimos la región posterior de la larva con una pinza de disección y realizamos un corte en la cutícula con una segunda pinza, dejando abierta la zona posterior de la larva. A continuación, sostuvimos a la larva suavemente con una pinza por su zona media, a la vez que, con la segunda pinza cerrada, empujamos los ganchos mandibulares hacia el interior del cuerpo. De esta forma, logramos “invertir” a la larva, consiguiendo que los órganos, aún unidos a la cutícula, queden expuestos. Tras la disección, transferimos entre 10 y 15 larvas a un tubo Eppendorf de 2ml con 700μl de paraformaldehído (PFA) 4% para su fijación por 90 minutos a temperatura ambiente y con agitación continua.

Para disecar el cerebro y el tubo digestivo, cortamos el extremo posterior de las larvas de la forma descripta previamente. Luego, empujamos suavemente con una pinza los ganchos mandibulares hacia el interior de la larva y cortamos la porción de cutícula anterior a estos. De esta forma, logramos que la cutícula de la larva quede abierta por ambos extremos, lo que nos permite empujar con delicadeza los órganos internos de la larva y extraerlos de adentro de la pared corporal. Procurando que los ganchos mandibulares no se separen del resto de los órganos, sostuvimos firmemente los ganchos mandibulares con una de las pinzas, mientras que con la otra separamos los órganos que no son de interés, dependiendo del caso. La unión del órgano de interés a los ganchos facilita su manipulación, evitando posibles daños provocados por las pinzas, y aumentando además la densidad de la preparación, lo cual evita que se pierda material durante el procesamiento. Así, transferimos a tubos Eppendorf los cerebros o tubos digestivos de 10 a 15 larvas, unidos a los ganchos mandibulares, para su fijación en 700μl de PFA 4% por 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación constante.

Tras la fijación, removimos la solución con pipeta Pasteur, dejando los tejidos en el fondo del tubo. Luego, realizamos 3 lavados de 15 minutos a temperatura ambiente, con 1ml de solución de lavado (PT 0,1%). Terminados los lavados, realizamos el protocolo de tinción y procedimos al montaje para la posterior observación de los tejidos bajo el microscopio.

### **3.3.2. Tinciones**

En todos los experimentos en los que observamos tejidos fijados, realizamos, tras los lavados, una tinción nuclear. Para la tinción con DAPI, la muestra se incubó en 100 $\mu$ l de DAPI 1:100 en PT 0,1% por 90 minutos. Pasado este tiempo, se realizaron 3 lavados de 15 minutos en 1ml de PT 0,1%. En los casos en los que utilizamos TO-PRO-3 para la tinción de núcleos, incubamos la muestra en 100 $\mu$ l del fluoróforo a una dilución de 1:1500 en PT 0,1% durante 30 minutos. Tras la tinción, se realizaron 4 lavados de 10 minutos en 1ml de PT 0,1%. En ambos casos la incubación se realizó a temperatura ambiente, con agitación constante.

Para la tinción de organelas ácidas, se disecó el cuerpo graso en PBS conteniendo 0.1 $\mu$ M del colorante acidotrópico Lysotracker, e inmediatamente, el tejido fue montado para la observación al microscopio.

### **3.3.3. Montaje de tejidos**

Para el montaje del cuerpo graso, colocamos las larvas disecadas sobre un portaobjetos con una gota de medio de montaje. Con el uso de una pinza y una aguja de disección, separamos el cuerpo graso del resto de los órganos larvales, los cuales fueron descartados. Los fragmentos de cuerpo graso retirados fueron luego distribuidos en el centro del portaobjetos, sobre el cual colocamos un cubreobjetos, los bordes del cual sellamos con esmalte de uñas transparente para evitar la deshidratación del preparado. Para montar los cerebros y los tubos digestivos, en primer lugar, los transferimos, sumergidos en el medio de montaje, a un portaobjetos. Dispusimos el medio de montaje en una línea a lo largo del eje longitudinal del portaobjetos y, tomándolos desde los ganchos mandibulares con una pinza, colocamos los órganos en la interfase entre el medio de montaje y el aire, quedando éstos adheridos al portaobjetos. Luego, cortamos con una aguja la unión entre el órgano y los ganchos mandibulares, y cubrimos con un cubreobjetos. En caso de quedar burbujas de aire, agregamos más medio de montaje con una pipeta por el costado del cubreobjetos. Finalmente, sellamos los bordes con esmalte de uñas transparente. En todos los casos, para garantizar la separación apropiada entre los dos vidrios y evitar que se aplasten los tejidos, colocamos puntos de vaselina sólida en los vértices del cubreobjetos.

## **3.4. Adquisición y procesamiento de imágenes**

Las imágenes se obtuvieron utilizando una lupa de fluorescencia Olympus MVX10 o un microscopio confocal Zeiss LSM 880 invertido. Dependiendo de la muestra, se usaron los filtros correspondientes a los fluoróforos empleados y las condiciones de adquisición necesarias para evitar la saturación de la

imagen. En el confocal se procuró tomar imágenes del plano medio del tejido observado. Las imágenes confocales fueron adquiridas con el *software* ZEN de Zeiss y procesadas en ImageJ. En cada caso se cuantificó el área de tejido y la cantidad de *foci* de 3XmCherry-ATG8. Estos últimos se contabilizaron de forma automática con las funciones *Threshold* y *Analyze Particles* del programa ImageJ, considerando aquellos *foci* de un tamaño de entre 0,1 y 10 $\mu\text{m}^2$ . Para evaluar la colocalización entre 3XmCherry-ATG8 y Lysotracker, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson utilizando el *plug-in* “JACoP” de ImageJ (Bolte & Cordelières, 2006). Las cuantificaciones de la cantidad de células en una imagen se llevaron a cabo utilizando la función *Find Maxima*.

### 3.5. RT-PCR cuantitativa

Para la obtención de las muestras de RNA, se disecaron cerebros de larvas de tercer estadío. Por cada grupo experimental, se colectaron aproximadamente 15 cerebros por muestra, y se realizó el experimento por triplicado. Los tejidos fueron homogeneizados en 500 $\mu\text{l}$  de trizol (Quick-Zol) en frío, utilizando tubos Eppendorf tratados previamente con dietilpirocarbonato (DPC), inhibidor de RNAsas. Los homogenatos se almacenaron a -80°C para asegurar la preservación del RNA. La extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar establecido por el fabricante del Quick-Zol. La calidad y concentración del RNA extraído se calculó por el cociente de absorbancia 260nm/280nm utilizando un equipo NanoDrop.

Para la retrotranscripción, se utilizó 1 $\mu\text{g}$  de RNA total, al cual se agregó 1 $\mu\text{l}$  de *random primers* (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en un volumen total de 10,5 $\mu\text{l}$ . La mezcla se incubó a 70°C durante 5 minutos, luego de lo cual se la mantuvo en hielo. A continuación, se agregaron 14,5 $\mu\text{l}$  de *mix* de retrotranscripción (ver composición en 3.7.3. Reactivos y soluciones), en un volumen final de 25 $\mu\text{l}$  por tubo. La incubación para la síntesis del cDNA se realizó a 37°C durante 1 hora. Para la PCR cuantitativa (qPCR), se emplearon *primers* a una concentración de 400nM, específicos para los genes Rpl29 (gen de referencia) y Atg8a, los cuales hemos utilizado previamente en el laboratorio (Valko et al., 2022). El cDNA obtenido fue diluido 1:2 y, finalmente, el volumen de reacción por pocillo fue de 10 $\mu\text{l}$ , compuesto por 5,5 $\mu\text{l}$  de “*mix* de PCR” y 4,5 $\mu\text{l}$  de cDNA diluido. La corrida de la qPCR comenzó con una desnaturización inicial a 95°C durante 15 minutos. La amplificación se llevó a cabo con 40 ciclos, con desnaturización a 95°C por 5 segundos, *annealing* a 60°C por 1 minuto, y extensión a 72°C por 30 segundos. La curva de disociación se realizó con un gradiente de temperatura de 65°C a 97°C. Finalmente, se realizó un ciclo de enfriamiento a 40°C por 30 segundos. La cuantificación de la expresión génica se realizó por el método 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

### 3.6. Análisis estadístico

La confección de gráficos y las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism 8.0. Cuando trabajamos con variables de distribución normal y varianza homogénea, realizamos pruebas *t*

de Student desapareadas a dos colas para comparaciones entre dos tratamientos, y pruebas de ANOVA de un factor para más de dos tratamientos. En casos donde la variable era normal pero no se cumplió el supuesto de homocedasticidad, utilizamos la prueba *t* de Welch o la prueba de ANOVA de Brown-Forsythe, en función de la cantidad de tratamientos. Por otro lado, los datos de qPCR, de distribución no normal, se analizaron por el test U no paramétrico de Mann-Whitney. Para los experimentos con más de dos tratamientos, se realizaron comparaciones *a posteriori* mediante test de Tukey en el caso de las pruebas de ANOVA, y por test de Tamhane para las pruebas de Brown-Forsythe. En todos los casos se consideró un nivel de significancia del 5% ( $p<0,05$ ).

### **3.7. Equipamiento, materiales y reactivos**

#### **3.7.1. Equipos**

- Lupa estereoscópicas Olympus SZ40 y Olympus SZ51
- Microscopio confocal Zeiss LSM 880 (objetivos 20X/NA 0,8, 63X/NA 1,4).
- Lupa de fluorescencia Olympus MVX10 con cámara Olympus DP72
- Incubadora Forma Series II Thermo Electron Corporation
- Ultrafreezer - Thermo
- Agitador MAXI ROCKER
- Agitador orbital Thermomixer – Eppendorf, Marshall Scientific
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5414R
- Cicladora Lightcycler 480 - Roche
- Placas *multiwell* 96 - Roche
- NanoDrop - Thermo Fisher Scientific

#### **3.7.2. Materiales**

- Viales de plástico de 2,5cm de diámetro y 10 cm de alto – Flystuff
- Botellas plásticas de 250cm<sup>3</sup> de capacidad – Flystuff
- Placa porosa para trabajo con CO<sub>2</sub> – Flystuff
- Vasos de ovipuesta - Flystuff
- Placas de Petri de 5cm de diámetro
- Pinceles
- Pinzas para disección #5 - Dumont
- Agujas de disección
- Pipetas automáticas - Eppendorf Research (P1000, P100, P20, P10), Gilson (P1000, P200, P20, P2)
- Tubos Eppendorf de 2ml y 1,5ml
- Pipetas Pasteur - Deltalab
- Portaobjetos - Pathoglass

- Cubreobjetos - Deckgläser
- Esmalte de uñas transparente
- Vaseline sólida
- Placa de disección de silicona

### 3.7.3. Reactivos y soluciones

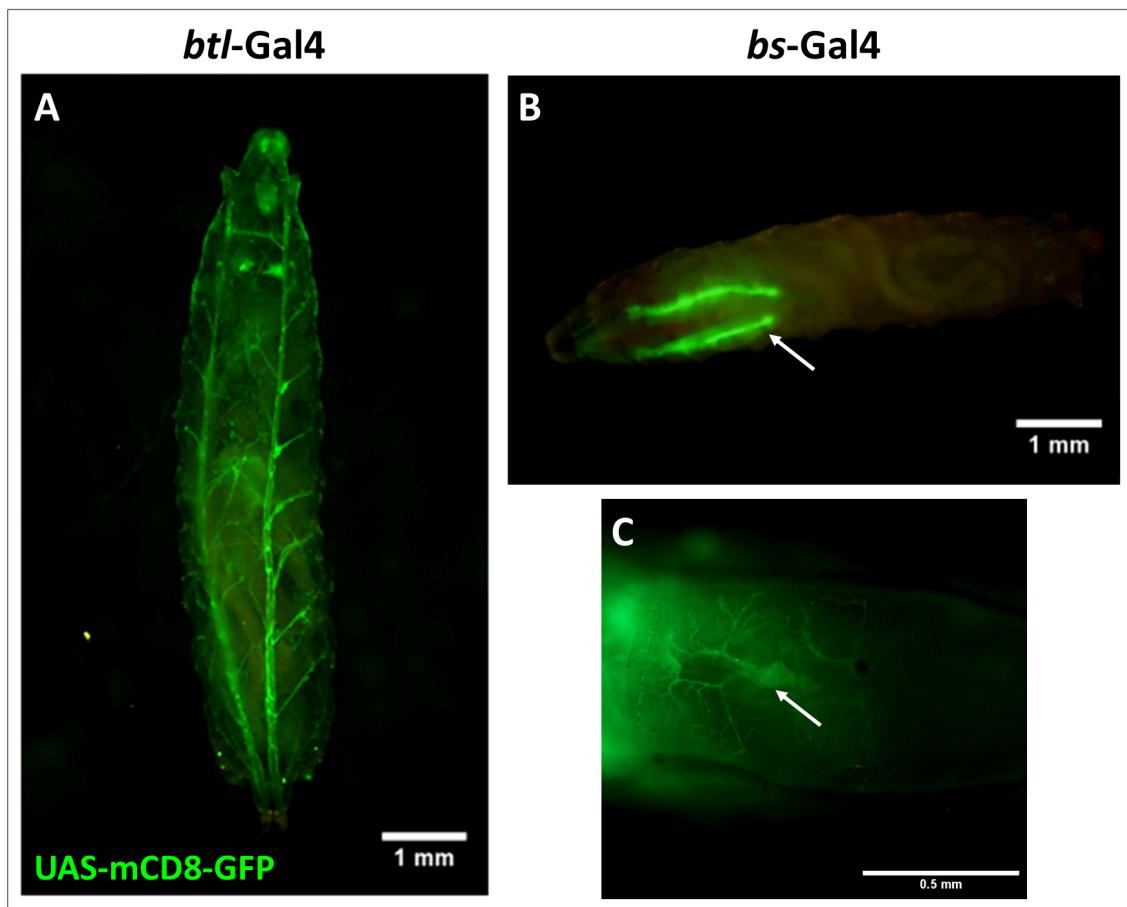
- Dióxido de carbono
- Medio de crecimiento:
  - Levadura instantánea - Levex (20g/L - 2% m/v)
  - Harina precocida de maíz - Prestopronta (66,5g/L)
  - Agar-agar - Van Rossum (10g/L)
  - Nipagin - Van Rossum (6,4ml/L de una solución 46,85g/250ml [Sv:EtOH 96%])
  - Sacarosa - Anedra (40g/L)
  - Ácido propiónico - Cicarelli (4,5ml/L)
- Tritón X-100
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 100X - Sigma-Aldrich D9542
- Lysotracker Green DND26 - Invitrogen
- TO-PRO-3 - Invitrogen
- MOWIOL - 4-88 Reagent Calbiochem 9CAS 9002-89-5
- qRT-PCR:
  - Quick-Zol - Kaliun Technologies RA01011933
  - M-MLV RT 5X Buffer - Promega
  - Desoxinucleótidos (dNTPs) 10mM - Promega
  - Inhibidor de RNAsas - Roche
  - Transcriptasa reversa M-MLV (RT) - Promega
- *Primers* - Macrogen
  - Rpl29: Fw: 5'-GAACAAGAAGGCCATCGTA-3', Rv: 5'-AGTAAACAGGCTTGCTTGC-3'
  - Atg8a: Fw 5'- GCAAATATCCAGACCGTGTGCC-3', Rv 5'- AGCCCATGGTAGCCGATGTT-3'
- PBS 1x: 137mM NaCl + 2,7mM KCl + 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Solución de fijación: paraformaldehído (PFA) 4%
- Solución de lavado (PT 0,1%): PBS 1x + 0,1% Tritón X-100
- Solución de montaje: 0,1g/ml MOWIOL + 0,25g/ml glicerol +, 0,5ml/ml TRIS 0,2M
- Mix de retrotranscripción: 5μl RT 5X Buffer + 1,25μl dNTPs 10mM + 0,625μl inhibidor de RNAsa + 1μl M-MLV RT + agua miliQ
- Mix de PCR: 5μl SYBR Green Master (Roche) + 0,25μl primer Fw + 0,25μl primer Rv

## 4. Resultados

---

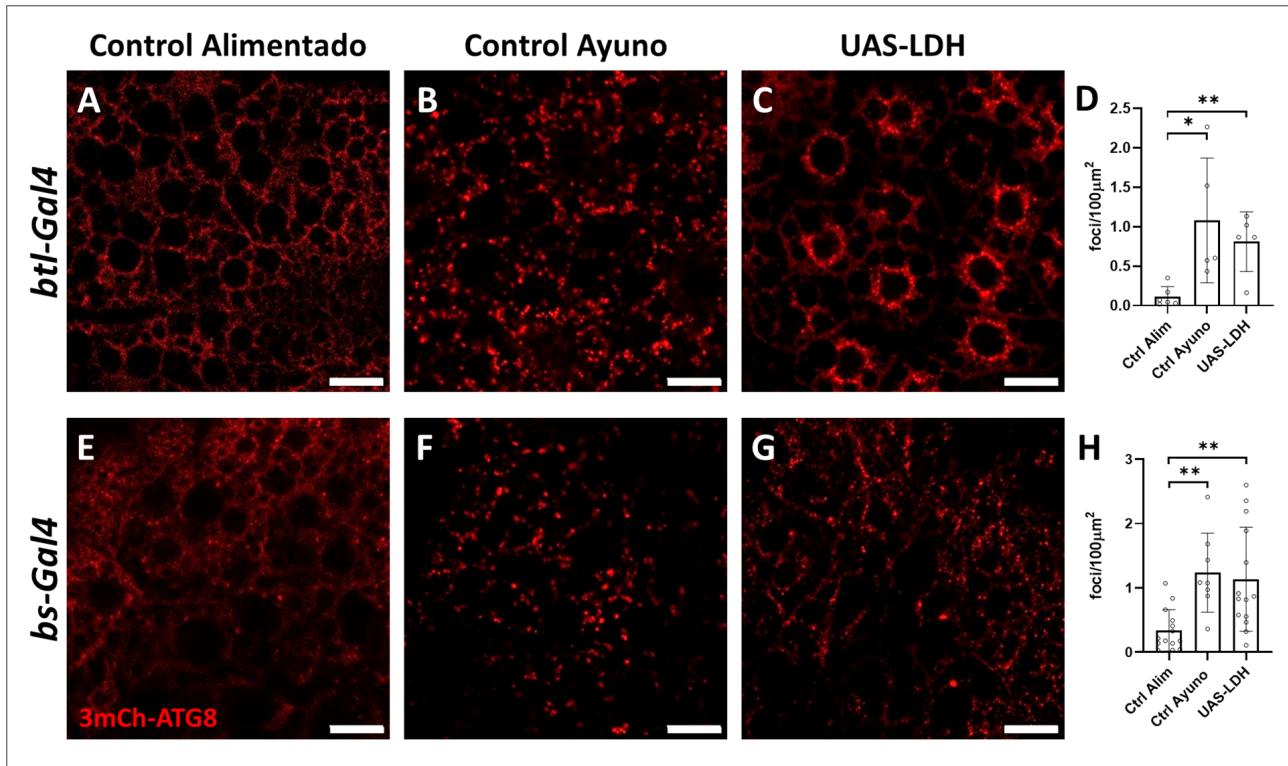
### 4.1. La sobreexpresión de LDH en el sistema traqueal gatilla la autofagia en el cuerpo graso

A modo de continuación de la investigación iniciada por el Dr. Sebastián Pérez Pandolfo en su Tesis doctoral (ver 1.4. Resultados previos...), buscamos dilucidar en qué tejido o grupo de células la sobreexpresión de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) provoca la inducción de la autofagia en el cuerpo graso. Para eso, en primer lugar, realizamos cruzamientos de líneas que nos permitieran sobreexpresar LDH en el sistema traqueal de las larvas. Las tráqueas son un órgano capaz de responder a hipoxia alterando el crecimiento de sus proyecciones (Centanin et al., 2008). Al ser responsables de proveer de oxígeno a los demás tejidos, estando en estrecho contacto con estos, razonamos que las tráqueas podrían inducir la autofagia en otros tejidos en respuesta a alteraciones metabólicas que recapitulan condiciones hipóxicas, como lo es la acumulación de lactato (Kocianova et al., 2022b; Valko et al., 2022). Con este fin, expresamos, en larvas crecidas en medio enriquecido, el gen de LDH (UAS-LDH, ver 3.1.5. Líneas utilizadas) bajo el control del inductor *btl*-Gal4, utilizando como controles a individuos donde expresamos mCD8-GFP en lugar de LDH (UAS-mCD8-GFP). En todo este trabajo de Tesis, usamos como control negativo larvas crecidas en medio enriquecido, en las cuales la autofagia se encuentra activa en niveles basales. Como control positivo de inducción de la autofagia utilizamos larvas sometidas a ayuno (ver 3.1.4. Tratamiento de ayuno). Cada genotipo, además, incluyó la expresión del reportero de autofagia 3XmCherry-ATG8 (de aquí en adelante, 3mCh-ATG8), bajo el control del promotor del gen Atg8 endógeno, cuya nucleación fue evaluada en cada grupo experimental. El inductor *btl*-Gal4 promueve la expresión génica de forma fuerte y específica en la totalidad del sistema traqueal, como pudimos verificar expresando mCD8-GFP bajo el control de este inductor (Figura 12A). Observamos que el grado de inducción de la autofagia, evaluado en base a la cantidad de puntos (*foci*) de 3mCh-ATG8 por  $100\mu\text{m}^2$  de cuerpo graso, se ve significativamente aumentado en este órgano cuando se sobreexpresa LDH en el sistema traqueal con el inductor *btl*-Gal4 (Figura 13A-D). Estos resultados indican que la acumulación de ácido láctico en las células traqueales es capaz de inducir, a distancia, una respuesta autófágica en el cuerpo graso.



**Figura 12.** Patrones de expresión de los inductores *btl-Gal4* y *bs-Gal4*. A) El inductor *btl-Gal4* promueve la expresión génica de forma específica en el sistema traqueal de las larvas de tercer estadío. B-C) Larvas que expresan GFP bajo el control del inductor *bs-Gal4*. B) *bs-Gal4* se expresa de forma fuerte en las glándulas salivales, indicadas con la flecha. C) De manera más débil, *bs-Gal4* también se expresa en las células terminales del sistema traqueal, marcadas con la flecha. Barras de escala: 1mm (A-B) y 0,5mm (C).

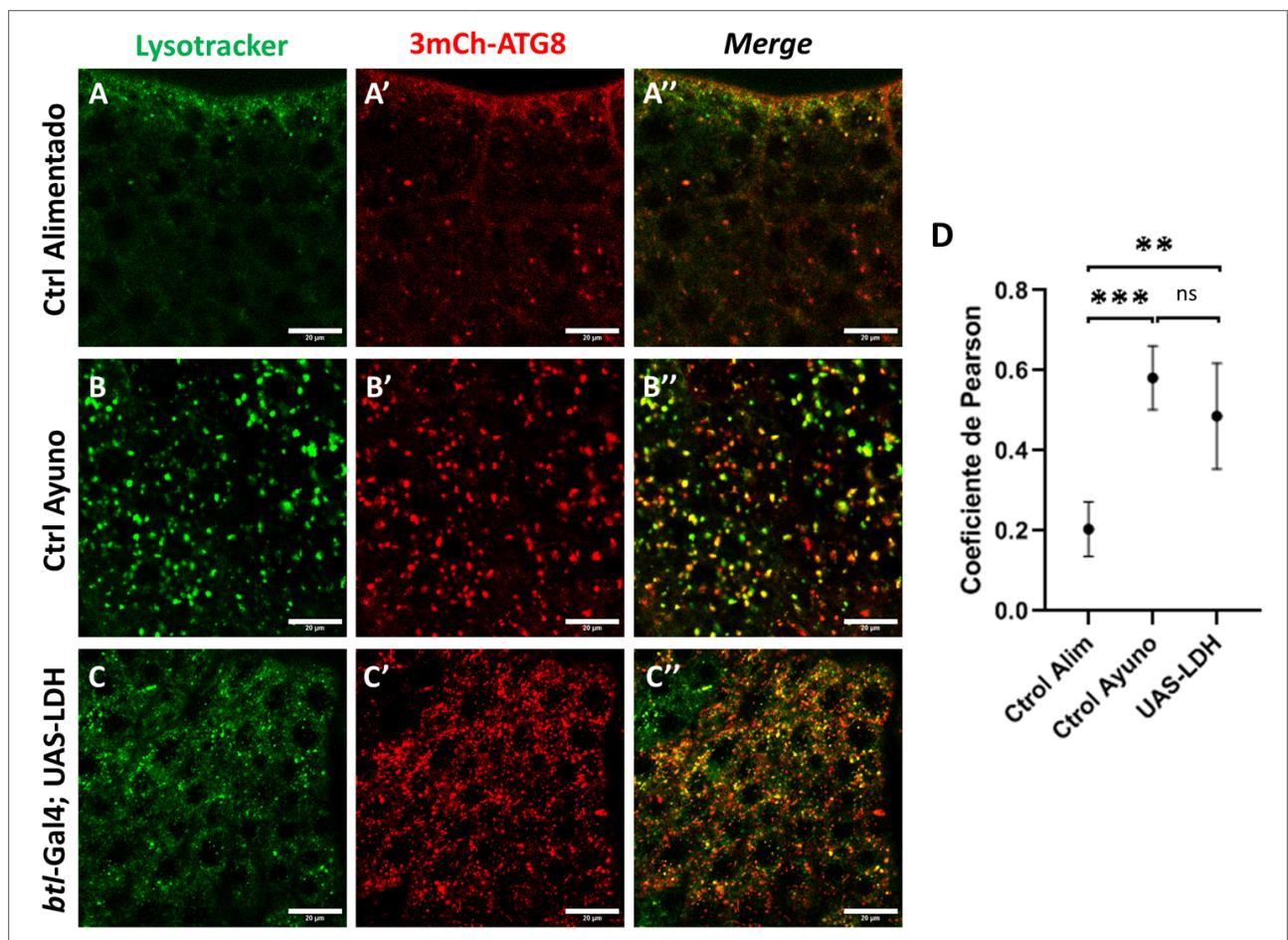
A continuación, con el objetivo de definir un tipo o grupo de células más reducido en el cuál la acumulación de ácido láctico induce la autofagia en el cuerpo graso, expresamos nuevamente LDH esta vez bajo el control del inductor *bs-Gal4*. Este inductor promueve la expresión génica en las células terminales del sistema traqueal y en las glándulas salivales, lo cual observamos expresando mCD8-GFP bajo su control (Figura 12B-C). En este caso, también observamos un aumento significativo en la cantidad de *foci* de 3mCh-ATG8 en el cuerpo graso con respecto a los observados en larvas alimentadas (Figura 13E-H). De acuerdo con nuestra observación previa de que la sobreexpresión de LDH en las glándulas salivales no induce la autofagia en el cuerpo graso (ver 1.4. Resultados previos...), en conjunto con el resultado obtenido con el inductor *btl-Gal4* (ver más arriba), este nuevo resultado indica que las células terminales traqueales, tras acumular ácido láctico, liberan una señal que gatilla la autofagia a distancia en el cuerpo graso.



**Figura 13. La sobreexpresión de LDH en las tráqueas induce la autofagia en el cuerpo graso.** Se observa que 3mCh-ATG8 se nuclea formando *foci* en el cuerpo graso de larvas en las que se sobreexpresa LDH con los inductores *btl-Gal4* (C) o *bs-Gal4* (G), en contraste con el patrón difuso que se observa en larvas control (UAS-mCD8-GFP) alimentadas para cada inductor, respectivamente (A, E). (B, F) Como controles positivos de activación de la autofagia se analizaron larvas del genotipo control sometidas a ayuno. (D, H) Cuantificaciones de la cantidad de *foci* por  $100\mu\text{m}^2$  de cuerpo graso, para ambos inductores, donde las barras representan el desvío estándar. (D) Prueba de ANOVA de Brown-Forsythe y contrastes de Tamhane, (H) prueba de ANOVA y contrastes de Tukey. \*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ . N=5-14. Barras de escala:  $20\mu\text{m}$ .

Notablemente, cuando utilizamos el inductor *btl-Gal4*, observamos que los *foci* de 3mCh-ATG8 en el cuerpo graso se distribuyeron en un patrón perinuclear, que difiere del patrón de nucleación tanto en el control positivo de autofagia por ayuno, como en las larvas en las que sobreexpresamos LDH con el inductor *bs-Gal4* (Figura 13B-C, F-G). Este fenómeno se observó en todas las repeticiones de este experimento. Como criterio adicional de inducción de la autofagia y con el fin de evaluar posibles alteraciones en el flujo autofágico que pudieran estar generando este patrón perinuclear de nucleación, realizamos tinciones con Lysotracker. La colocalización de este colorante con la señal de 3mCh-ATG8 nos indica la presencia de autolisosomas, en tanto que la presencia de *foci* positivos para 3mCh-ATG8 pero negativos para Lysotracker denota la presencia de vesículas autofágicas no ácidas, en estadíos previos de maduración (Lőrincz et al., 2017). Disecamos larvas de tercer estadío expresando 3mCh-ATG8 del genotipo control (*btl>mCD8-GFP*), tanto alimentadas como en ayuno, y del genotipo experimental (*btl>LDH*). Observamos en todos los casos la presencia de autolisosomas, lo cual nos indica que el flujo autofágico no se ve bloqueado por la sobreexpresión de LDH, y que la autofagia inducida es degradativa (Figura 14). Para determinar el grado de colocalización entre Lysotracker y 3mCh-ATG8, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Figura 14D). Como esperábamos,

encontramos que el coeficiente de Pearson, el cual nos da una idea de la proporción de autolisosomas, es similar entre las larvas control ayunadas y las larvas *btl>LDH*, y que estos valores son significativamente mayores al de larvas control alimentadas (Figura 14D). Llamativamente, en este caso no observamos una clara distribución perinuclear de los *foci* en larvas *btl>LDH*, sino que estos se encontraron en toda la superficie del cuerpo graso (Figura 14C). Las muestras de los primeros experimentos (Figura 13) habían sido fijadas, mientras que las del presente análisis (Figura 14) fueron observadas sin una fijación previa. Suponiendo que la localización perinuclear observada inicialmente no se trate de un artificio técnico, atribuimos la diferencia entre los resultados obtenidos con *btl-Gal4* y con *bs-Gal4* únicamente al uso de distintos inductores que podrían promover la expresión génica en las células traqueales con diferente fuerza (Figura 12A, C). En definitiva, esta diferencia en la distribución intracelular de *foci* merece ser estudiada en mayor profundidad en el futuro.

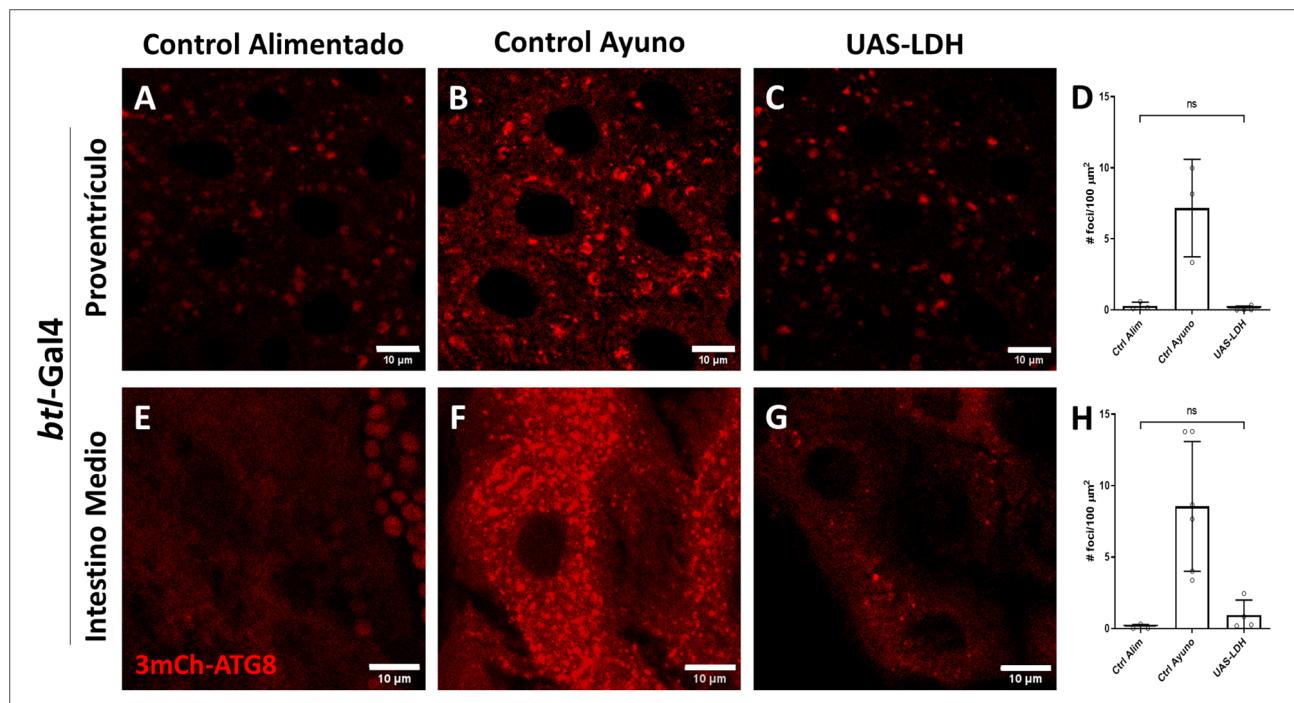


**Figura 14. La autofagia inducida por la sobreexpresión de LDH es degradativa.** 3mCh-ATG8 se nuclea en *foci* tras la sobreexpresión de LDH con el inductor *btl-Gal4*, por lo que se induce la autofagia en el cuerpo graso (C). Los *foci* rojos corresponden a autofagosomas, mientras que los *foci* amarillos a autolisosomas, la presencia de los cuales indica que la autofagia observada es degradativa. Utilizamos como control de autofagia basal a larvas de genotipo control (UAS-mCD8-GFP) alimentadas (A) y como control positivo de autofagia degradativa a larvas control sometidas a ayuno (B). El grado de colocalización entre Lysotracker y 3mCh-ATG8 se cuantificó mediante el coeficiente de Pearson (D). Las barras representan el desvío estándar (D). Prueba de ANOVA y contrastes de Tukey. ns: p>0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001. N=5-6. Barras de escala: 20μm.

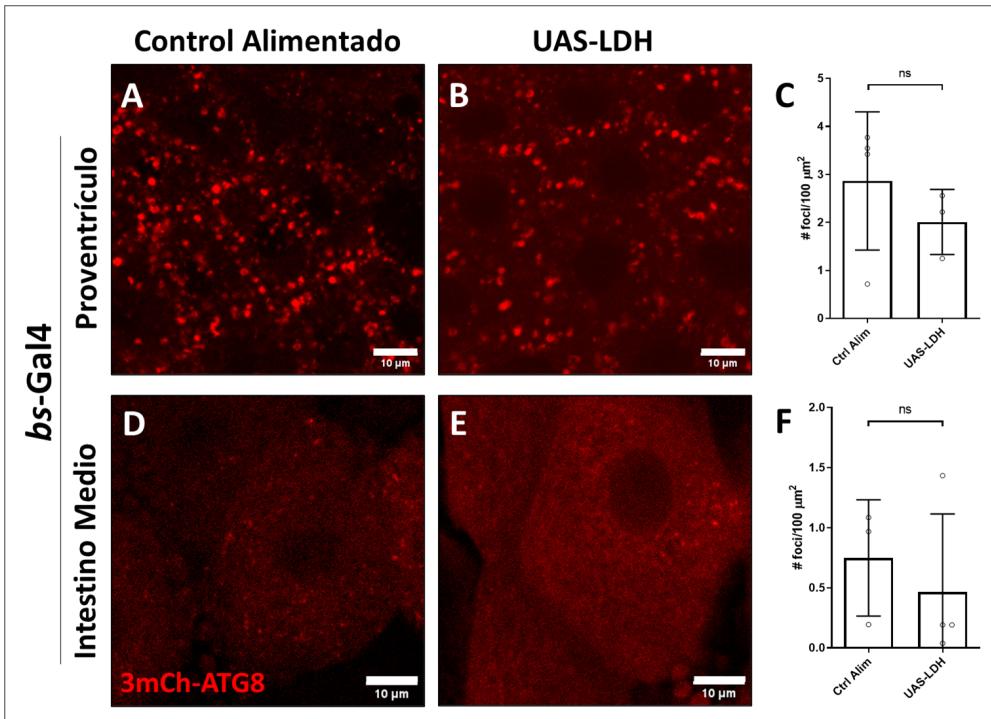
#### 4.2. La sobreexpresión de LDH en las tráqueas no induce la autofagia en el sistema digestivo

Habiendo determinado que la sobreexpresión de LDH en las células traqueales induce la autofagia en el cuerpo graso, nos preguntamos si en otros órganos larvales podría inducirse también. Empezamos, entonces, por evaluar la nucleación de 3mCh-ATG8 en el sistema digestivo. Sobreexpresamos LDH en las tráqueas con los inductores *btl-Gal4* o *bs-Gal4* de la manera ya descripta, y utilizamos como control larvas en las que expresamos UAS-mCD8-GFP. En estos experimentos analizamos dos regiones distintas del tracto digestivo, el proventrículo y el intestino medio (Figura 5), con el propósito de obtener una mejor representación de este órgano. En ninguno de los dos casos observamos diferencias en la nucleación de 3mCh-ATG8 entre la condición control (larvas alimentadas) y tras sobreexpresar LDH en las tráqueas, con ninguno de los dos inductores Gal4 utilizados (Figura 15, Figura 16). Concluimos, así, que la sobreexpresión de LDH en el sistema traqueal no induce la autofagia en el sistema digestivo.

Interesantemente, observamos que en el proventrículo se nuclea el reportero 3mCh-ATG8 en condiciones control (larvas bien alimentadas) (Figura 15A, Figura 16A), lo que sugiere que en esta región del sistema digestivo la autofagia basal podría cumplir un rol fisiológico.



**Figura 15. La sobreexpresión de LDH con el inductor *btl-Gal4* no induce la autofagia en el tracto digestivo.** El grado de nucleación de 3mCh-ATG8 en el proventrículo (A, C) o en el intestino medio (E, G) no difiere entre las larvas control (UAS-mCD8-GFP) alimentadas y larvas *UAS-LDH*. Se observa un claro aumento de la autofagia en larvas sometidas a ayuno en ambas zonas (B, F). Cuantificación de la cantidad de *foci* de 3mCh-ATG8 por  $100\mu\text{m}^2$  en cada región; las barras representan el desvío estándar (D, H). Prueba de ANOVA de Brown-Forsythe y contrastes de Tamhane. ns:  $p>0,05$ . N=3-6. Barras de escala:  $10\mu\text{m}$ .

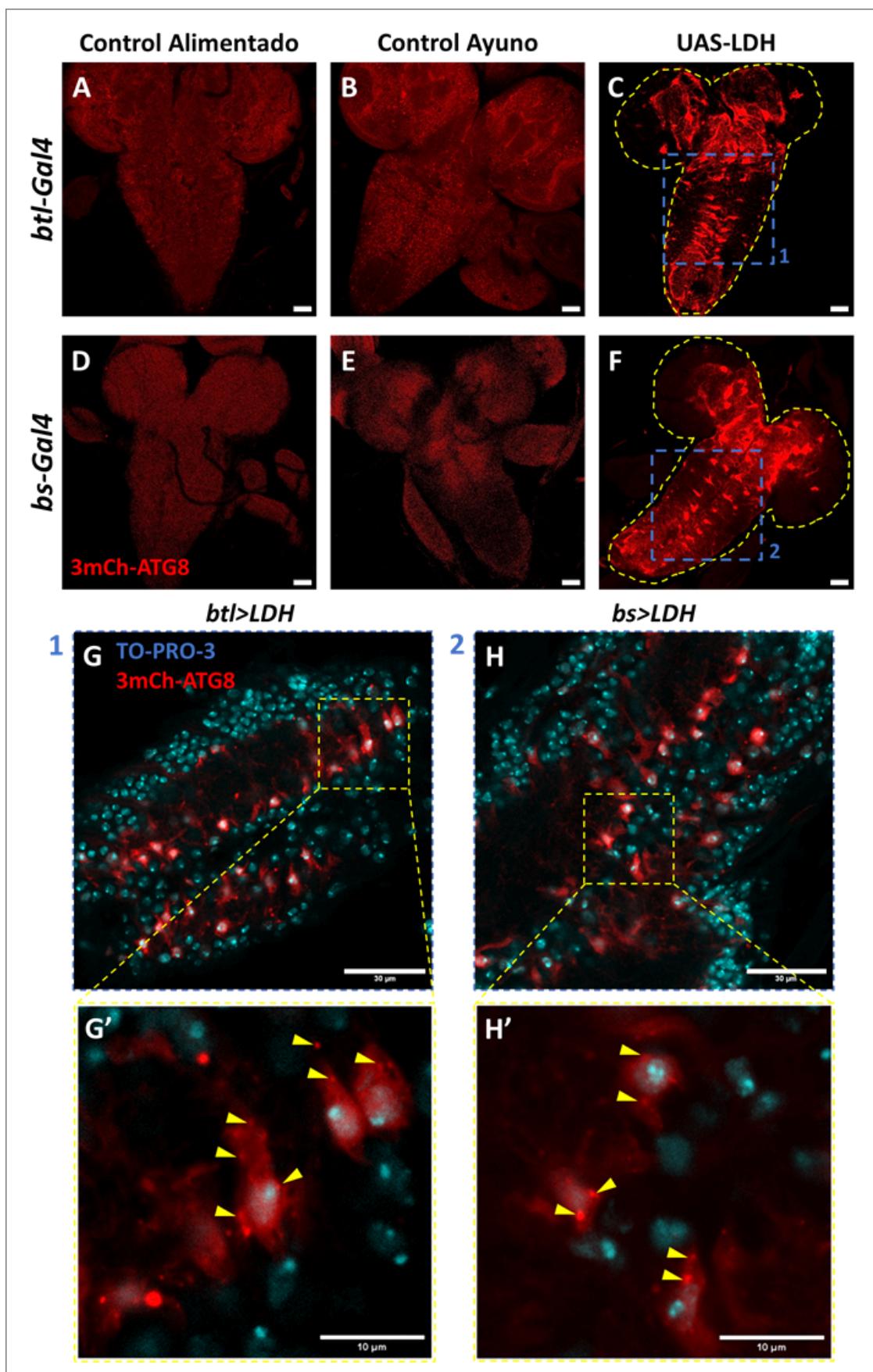


**Figura 16. La sobreexpresión de LDH con el inductor *bs-Gal4* no induce la autofagia en el sistema digestivo.** La cantidad de *foci* de 3mCh-ATG8 en el proventrículo (A, B) o en el intestino medio (D, E) no difiere entre las larvas control (UAS-mCD8-GFP) alimentadas y larvas *UAS-LDH*. Cuantificación de la cantidad de *foci* por  $100\mu\text{m}^2$  en cada una de las regiones; las barras representan el desvío estándar (C, F). Prueba *t* de Welch no pareada. ns:  $p>0,05$ . N=3-4. Barras de escala:  $10\mu\text{m}$ .

#### 4.3. La sobreexpresión de LDH en las tráqueas provoca la acumulación de Atg8 en el cerebro

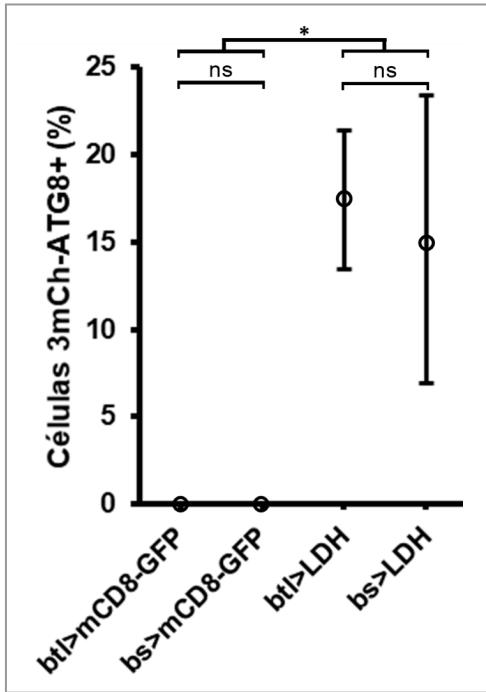
A continuación, evaluamos el comportamiento del reportero 3mCh-ATG8 en el cerebro. En este experimento, utilizamos los mismos genotipos y controles ya mencionados en las secciones anteriores. El cerebro larval es un órgano en el que la autofagia se encuentra fuertemente activa en condiciones basales, induciéndose ligeramente en condiciones de ayuno (Figura 17A-B, D-E). Tanto en larvas alimentadas como en larvas sujetas a ayuno, se observa la nucleación de 3mCh-ATG8 de manera uniforme por todo el cerebro (Figura 17A-B, D-E). Llamativamente, observamos que en larvas que sobreexpresan LDH, tanto con *btl-Gal4* como con *bs-Gal4*, se da una fuerte acumulación de 3mCh-ATG8 en un grupo de células del cordón ventral, en los planos centrales del órgano (Figura 17C, F-H'). Estas células corresponden al 17% y al 15% de las células totales del plano del cerebro observado, con *btl-Gal4* y *bs-Gal4* respectivamente (Figura 18). En estas células observamos una fuerte fluorescencia distribuida en toda la superficie celular, con la presencia de pocos *foci* que generan una señal aún más fuerte (Figura 17G-H').

Debido al notorio aumento observado en la intensidad de fluorescencia, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de LDH en las células traqueales podría inducir un aumento de la expresión de Atg8 en un grupo de células del cerebro larval, y no sólo la redistribución de Atg8 dentro de las células. Atg8 cumple funciones no canónicas en procesos no vinculados a la autofagia, por lo que su acumulación podría estar asociada a alguno de estos roles alternativos (ver 5. Discusión).



**Figura 17. La sobreexpresión de LDH provoca la acumulación de 3mCh-ATG8 en un grupo de células del cerebro.**  
Imágenes confocales de cerebros de larvas bien alimentadas (A, D), sometidas a ayuno (B, E) o tras la sobreexpresión de LDH en tráqueas con los inductores *btl-Gal4* (C) o *bs-Gal4* (F). Se observa un gran aumento de

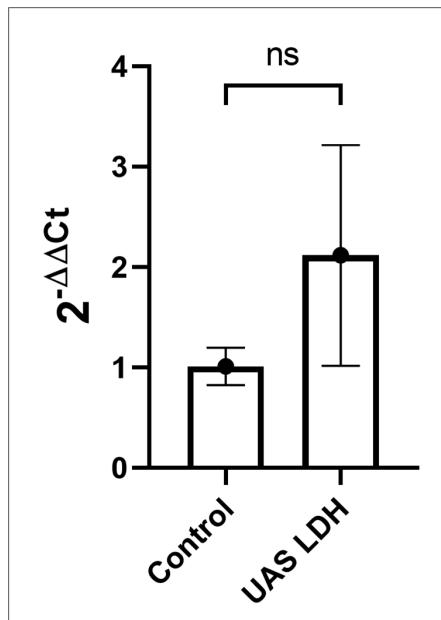
la fluorescencia correspondiente a 3mCh-ATG8 en células del cordón ventral del cerebro tras la sobreexpresión de LDH en las tráqueas (C, F, G, H). Las puntas de flecha en las magnificaciones (G', H') señalan *foci* de 3mCh-ATG8 en estas células. Nótese que por fuera de los *foci* hay altos niveles de fluorescencia homogéneamente distribuida dentro de cada célula. Barras de escala: 30 $\mu$ m (A-H), 10 $\mu$ m (G', H').



**Figura 18. La sobreexpresión de LDH en las tráqueas induce la acumulación de Atg8 en una parte de las células del cerebro.** En larvas de los genotipos *btl*>LDH y *bs*>LDH, observamos un fuerte aumento de la fluorescencia de 3mCh-ATG8 en una fracción de las células del cerebro. Se cuantificó la cantidad de células con una fuerte señal de 3mCh-ATG8 homogéneamente distribuida en el citoplasma, respecto del total de células en el mismo plano confocal, cuyos núcleos fueron marcados con TO-PRO-3. En larvas de los genotipos control sometidas a ayuno (control de inducción de autofagia) 3mCh-ATG8 se observó nucleado en *foci* de baja intensidad de fluorescencia, los cuales no fueron considerados en la cuantificación. Prueba de ANOVA. Las barras representan el desvío estándar. ns: p>0,05; \*: p<0,05. N=3-4.

#### 4.4. El aumento de Atg8 en el cerebro tras la sobreexpresión de LDH no se debería a la inducción transcripcional del gen

Habiendo observado un importante aumento de la fluorescencia correspondiente a Atg8 en una porción de las células del cerebro, nos preguntamos si este cambio está regulado a nivel transcripcional. Para esto, analizamos por qRT-PCR los niveles de RNA mensajero (mRNA) de Atg8 en los cerebros. Disecamos cerebros de los genotipos *btl*>mCD8-GFP de larvas bien alimentadas (utilizados como control negativo) y de larvas *btl*>LDH, de los cuales extrajimos RNA para su cuantificación por qRT-PCR. Encontramos que la sobreexpresión de LDH en las tráqueas no provocó un aumento estadísticamente significativo de la expresión del mRNA de Atg8 (Figura 19). De esta forma, concluimos que el aumento de la señal de 3mCh-ATG8 observado tras la sobreexpresión de LDH no se debería a la inducción transcripcional del gen.



**Figura 19. La sobreexpresión de LDH en las tráqueas no modifica la expresión de Atg8 a nivel transcripcional.** Se cuantificaron los niveles de mRNA de Atg8 por qRT-PCR a partir de homogenatos de cerebros. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de expresión entre larvas control (*btl>mCD8-GFP*) alimentadas y larvas que sobreexpresan LDH en el sistema traqueal (*btl>LDH*). Se utilizó *Rpl29* como gen de referencia. Los datos obtenidos se analizaron por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001) y se compararon estadísticamente con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney de una cola. Las barras representan el desvío estándar. ns: p>0,05. N=3 réplicas biológicas con duplicado técnico.

## 5. Discusión

---

La autofagia contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular, mediante la degradación inespecífica de material citoplasmático (Chang & Neufeld, 2010; Deretic et al., 2013; Kimmelman & White, 2017; Noda & Inagaki, 2015). Por su rol catabólico, es regulada por una multitud de factores tanto externos como intracelulares. La autofagia constituye en sí misma un proceso de respuesta a estrés, generada por las células para hacer frente a insultos tanto a nivel celular como a nivel sistémico (Chen et al., 2015; Hale et al., 2013; Lei et al., 2022; Pan et al., 2019; Valko et al., 2022). En esta Tesis hemos utilizado a la larva de *Drosophila melanogaster* como modelo, centrándonos en el estudio de la inducción de la autofagia por lactato.

### 5.1. Inducción de la autofagia por lactato

La hipoxia provoca en las células una transición metabólica, denominada efecto Warburg, en la cual estas empiezan a producir ácido láctico en ausencia del O<sub>2</sub> necesario como acceptor final de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial (DeBerardinis et al., 2008; Kocanova et al., 2022a; Voet et al., 2016; Warburg, 1956). Estudios previos de nuestro laboratorio permitieron determinar que en condiciones de hipoxia en *Drosophila*, el lactato intracelular se acumula rápidamente (Gándara et al., 2019). Por otro lado, nosotros y otros grupos hemos observado que la autofagia se induce por hipoxia en distintos sistemas modelo, incluyendo *Drosophila*, pero los mecanismos moleculares por los cuales se gatilla el proceso no se comprenden aún completamente (Bellot et al., 2009; Cen et al., 2023; Feng et al., 2021; Valko et al., 2022). Se han descripto mecanismos de inducción de la autofagia por hipoxia tanto dependientes como independientes de HIF/sima (Doering et al., 2022; Lőw et al., 2013; Pérez-Perri et al., 2016), evidenciando la complejidad del fenómeno. Asimismo, es posible que la respuesta autofágica se regule de manera no transcripcional, mediada directamente por la alteración de los niveles de determinados metabolitos de la célula, o bien de manera dependiente de enzimas asociadas a la síntesis de dichos metabolitos, producto de la reducción en la disponibilidad de O<sub>2</sub> (Fedotova et al., 2022; Feng et al., 2021; Kocanova et al., 2022a; Roberts et al., 2014).

En esta Tesis trabajamos en base al modelo de que la sobreexpresión de LDH provoca, en las larvas de *Drosophila*, la acumulación intracelular de lactato, recapitulando la principal alteración metabólica que se produce en condiciones de hipoxia (Gándara et al., 2019; Gándara & Wappner, 2018). Partiendo de la observación previa de nuestro laboratorio de que la sobreexpresión de LDH induce la autofagia en diversos tejidos larvales (Figura 6), razonamos que la respuesta autofágica observada está mediada por la acumulación de lactato, tanto en condiciones de hipoxia como tras la sobreexpresión de LDH. Específicamente, encontramos que son las células traqueales las que disparan la autofagia en el cuerpo graso en respuesta a la acumulación de lactato (Figura 13). La activación de la autofagia por lactato ha

atraído recientemente gran interés en el campo de la biología celular. Se reportó que el lactato induce una respuesta autofágica en células de la retina de mamíferos, protegiendo a estas células del daño provocado por especies reactivas de oxígeno en un modelo de degeneración macular (Zou et al., 2023). Por otro lado, se reportó un mecanismo de inducción de la actividad lisosomal y de la autofagia en células tumorales en el cual el lactato, producido en grandes cantidades por estas células, es oxidado a piruvato por la Lactato Deshidrogenasa B (LDHB), de manera acoplada a la reducción de NADH a NAD<sup>+</sup> y H<sup>+</sup>. Así, los protones generados median la acidificación lisosomal y promueven la actividad degradativa autofágica (Brisson et al., 2016). Recientemente, se ha descripto un mecanismo molecular por el cual el lactato media la inducción de la autofagia por ayuno, vinculado a la fosforilación y activación de LDHA por parte de ULK1/Atg1. Una vez activada LDHA, el lactato producido promueve la lactoilación de la PI3K Vps34, estimulando así la autofagia (Jia et al., 2023). De todos modos, cabe destacar que los procesos descriptos están implicados en la inducción de la autofagia en las mismas células en las que se acumula el lactato, haciendo del fenómeno observado en esta Tesis un proceso fundamentalmente diferente, en el cual la autofagia se activa a distancia en un órgano diferente del que acumula el lactato.

## 5.2. Localización de los *foci* del reportero 3mCh-ATG8

En esta Tesis, observamos que el reportero de autofagia 3mCh-ATG8 se nuclea en el cuerpo graso tras sobreexpresar LDH en las tráqueas, y que dicha nucleación ocurre en un grado comparable al de la nucleación inducida por ayuno (Figura 13). Notablemente, en larvas *btl>LDH*, observamos que 3mCh-ATG8 exhibe un patrón de nucleación perinuclear, mientras que en las larvas control (*btl>mCD8-GFP*) sometidas a ayuno, los *foci* de 3mCh-ATG8 se distribuyen de manera homogénea (Figura 13). Como se mencionó, Atg8 se incorpora a la membrana del autofagosoma en formación, y permanece en dicha membrana tras la fusión del autofagosoma con el lisosoma, proceso que da origen al autolisosoma (Grasso et al., 2018; Hale et al., 2013; Nieto-Torres et al., 2021). Por esto, 3mCh-ATG8 es utilizado como reportero tanto de autofagosomas como de autolisosomas (Boda et al., 2024; Xu et al., 2017). Se ha descripto que la biogénesis de los autofagosomas se da azarosamente en toda la célula, y que, posteriormente, estos se mueven sobre microtúbulos de manera retrógrada mediada por dineínas hacia la región perinuclear, donde se da la fusión de los autofagosomas con los lisosomas (Boda et al., 2024; Jahreiss et al., 2008; Lőrincz & Juhász, 2020). A su vez, se sabe que existen subpoblaciones de lisosomas, que se agrupan de acuerdo a su acidez y actividad degradativa, la cual correlaciona con su localización subcelular (Jahreiss et al., 2008; Johnson et al., 2016; Pu et al., 2016). Así, los lisosomas localizados en la región perinuclear, cercanos al centro organizador de microtúbulos (MTOC), poseen un pH más bajo y mayor actividad de hidrolasas ácidas (Ebner et al., 2023; Pu et al., 2016). Por otro lado, la localización perinuclear de los lisosomas correlaciona con una disminución en la actividad de mTORC1 y un aumento de la formación de autofagosomas, mientras que su distribución

periférica promueve la actividad de mTORC1, inhibiendo la autofagia y promoviendo el anabolismo (Korolchuk et al., 2011; Pu et al., 2016). Recientemente se reportó en *Drosophila* que, en células del cuerpo graso en las que se inhibió experimentalmente la fusión del autofagosoma con el lisosoma, los autofagosomas se acumulan en el MTOC, ubicado en la región perinuclear (Boda et al., 2019; Lőrincz et al., 2019; Takáts et al., 2014). Se describió, además, que el transporte retrógrado de autofagosomas en estas células requiere de la actividad de las GTPasas pequeñas Rab7 y Rab39, como así también de sus interactores Epg5 y Ema, respectivamente (Boda et al., 2024). Integrando esta información, la distribución perinuclear de *foci* de 3mCh-ATG8 observada tras la sobreexpresión de LDH en las tráqueas podría deberse a dos fenómenos, no excluyentes entre sí: 1) a que en el cuerpo graso se induce la biogénesis de autofagosomas, pero se ve afectado el proceso de fusión con los lisosomas, acumulándose autofagosomas en la zona perinuclear de las células; o 2) a que además de la autofagia, en las células del cuerpo graso se producen alteraciones en el transporte vesicular por microtúbulos, generando la acumulación de vesículas en la región perinuclear. La señal liberada por las tráqueas podría actuar en el cuerpo graso, afectando elementos de la maquinaria molecular de anclaje y transporte de los autofagosomas, como así también afectar el proceso de fusión entre autofagosomas y lisosomas, generando el patrón observado de autofagosomas perinucleares.

Al evaluar la formación de autolisosomas con Lysotracker, vemos que el proceso de fusión de los autofagosomas con los lisosomas no estaría afectado, siendo el coeficiente de Pearson similar entre las larvas control sujetas a ayuno y las larvas *btl>LDH* (Figura 14D). Llamativamente, observamos que en este experimento los *foci* de 3mCh-ATG8 se distribuyen homogéneamente en toda la célula (Figura 14C), y no en un patrón perinuclear como observamos previamente (Figura 13C). Considerando que las larvas utilizadas en ambos experimentos tienen el mismo genotipo (*btl>LDH*), no descartamos que esta última observación se trate de un artificio técnico. Al no poder evaluar la formación de autolisosomas a la vez que se genera una acumulación perinuclear de los *foci* de 3mCh-ATG8, no podemos concluir acerca de la importancia de la fusión autofagosoma-lisosoma para el cambio de localización observado (Figura 13C). Este fenómeno merece ser estudiado en mayor detalle en experimentos futuros.

### 5.3. Comunicación entre tejidos

Observamos que la sobreexpresión de LDH en el sistema traqueal induce la autofagia en el cuerpo graso (Figura 13), mientras que en el cerebro promueve un fuerte aumento de la fluorescencia asociada a la expresión de Atg8 (Figura 17), sugiriendo un aumento en los niveles de esta proteína. Estos resultados ponen en evidencia la existencia de un proceso de comunicación entre tejidos en la larva de *Drosophila* en respuesta a la acumulación de lactato en las células traqueales. Las tráqueas liberarían una señal a la hemolinfa que difundiría por el torrente sanguíneo, culminando con la activación de la autofagia en el cuerpo graso y la acumulación de Atg8 en el cerebro (Figura 20). La

comunicación y acción combinada de distintos tejidos son fenómenos fisiológicos de enorme importancia, en tanto que permiten la integración sistémica y el control de la homeostasis a nivel organísmico (Droujinine & Perrimon, 2016; Morin-Poulard et al., 2021; Rajan & Perrimon, 2011). De esta manera, la presencia de un agente estresor, como la hipoxia, a través de los cambios metabólicos asociados, iniciaría una respuesta sistémica, promoviendo así la adaptación del organismo a dicha condición. En *Drosophila*, la hipoxia genera un aumento del lactato intracelular en distintos tejidos larvales, que incluyen al cerebro, el intestino y discos imaginarios de ala (Gándara et al., 2019). Si bien en las tráqueas esta acumulación de lactato tras la exposición a hipoxia no ha sido aún verificada, consideramos probable que la acumulación del metabolito se verifique también. Dado que las tráqueas conducen el oxígeno accediendo a cada uno de los tejidos del cuerpo, las mismas tienen la capacidad de sensar los requerimientos de oxígeno en cada uno de ellos. En nuestro laboratorio hemos encontrado que las tráqueas responden a hipoxia, incrementando su ramificación hacia los demás tejidos larvales (Centanin et al., 2008, 2010). Específicamente, la ramificación de las ramas terminales de las tráqueas es promovida por la inducción de la expresión del receptor *breathless* (FGFR en mamíferos) en las tráqueas y de su ligando *branchless* (FGF) en tejidos extra-traqueales, de manera dependiente de sima/HIF1 $\alpha$  (Centanin et al., 2008). Dado su carácter de “sensores de O<sub>2</sub>” por excelencia, parece razonable especular que las tráqueas podrían tener la capacidad de orquestar respuestas adaptativas a hipoxia a nivel sistémico. Por lo discutido más arriba, será interesante, en proyectos futuros, evaluar si la concentración de lactato aumenta específicamente en las tráqueas tras exponer a las larvas a condiciones de hipoxia, y, en una segunda etapa, investigar si el aumento del lactato intracelular media la expresión de factores difusibles que son liberados a la hemolinfa para activar la autofagia a distancia. Por otro lado, hemos observado que la sobreexpresión de LDH en las tráqueas no induce la autofagia en el sistema digestivo (Figura 15, Figura 16). Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la sobreexpresión de LDH con el inductor *ppl-Gal4* es capaz de inducir la autofagia no sólo en el cuerpo graso, sino también en el intestino (Figura 6). Esto sugiere que otro tejido, aún no identificado (distinto de las tráqueas), y donde el inductor *ppl-Gal4* también se encuentra activo, actuaría de manera aditiva, o tal vez sinérgica con las tráqueas, para inducir la autofagia en el intestino. No descartamos la posibilidad de que distintos tipos celulares actúen de manera conjunta, liberando señales inductoras diversas en respuesta a la acumulación de lactato. Será de gran interés, en futuros proyectos, identificar la señal liberada por las tráqueas, y determinar tanto los mecanismos por los cuales el ácido láctico induce la liberación de dicha señal traqueal, como aquellos que median la inducción de la autofagia en las células blanco en el cuerpo graso.

#### 5.4. Autofagia basal y funciones no canónicas de Atg8

En esta Tesis hemos observado que el cerebro y el proventrículo presentan niveles elevados de autofagia basal (Figura 15A, Figura 16A, Figura 17A, D). En este sentido, se han reportado resultados

similares en la glándula anular larval, donde también se registra una elevada autofagia basal en larvas bien alimentadas, la cual se incrementa aún más al someter las larvas a ayuno (Pan et al., 2019). El significado fisiológico de la alta autofagia basal en determinados tejidos y no en otros no está del todo claro. Una explicación posible es que el grado de activación de la autofagia en un determinado tejido se asocie a una alta demanda energética, aunque esto debe ser corroborado aún.

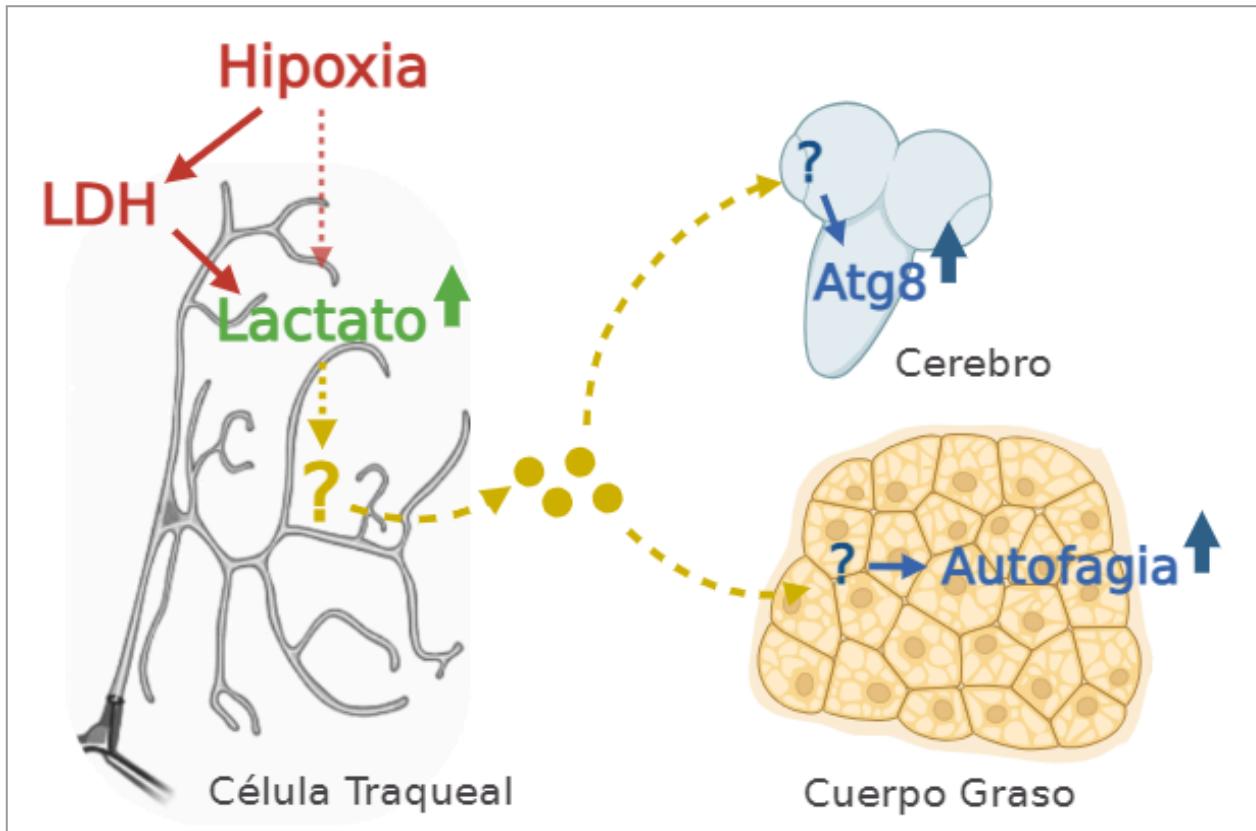
Tras sobreexpresar LDH en el sistema traqueal, observamos un fuerte aumento de la fluorescencia asociada al reportero 3mCh-ATG8 en grupos definidos de células del cerebro larval (Figura 17). Esto sugiere que la acumulación de lactato en las tráqueas promueve la acumulación de Atg8 en el cerebro. Llamativamente, no hemos encontrado diferencias significativas en la expresión del mRNA de Atg8 respecto de condiciones control, lo que sugiere que el aumento observado en los niveles de Atg8 no se debería a un aumento de la transcripción del gen (Figura 19). El aumento de la fluorescencia seguramente se deba a una regulación postranscripcional de la expresión de Atg8, como podría ser una disminución de la degradación de la proteína. La acumulación de Atg8 observada podría estar asociada, al menos en parte, a funciones no canónicas de la proteína, vinculadas a procesos no relacionados con la autofagia. Se han descripto roles de las distintas isoformas de Atg8/LC3 en procesos como la supresión tumoral, la fagocitosis, y la regulación de la motilidad celular, entre otros (Nieto-Torres et al., 2021; Schaaf et al., 2016). En la fagocitosis asociada a LC3, esta proteína se lipida y se asocia a la membrana del fagosoma en formación. La maquinaria molecular involucrada comparte componentes con la autofagia, a la vez que requiere de proteínas específicas, como Rubicon y NADPH oxidasa 2 (Heckmann & Green, 2019; Schaaf et al., 2016). Este proceso se ha estudiado principalmente en el campo de la inmunología, siendo necesario para el control de la inflamación y la defensa contra patógenos extracelulares (Heckmann & Green, 2019). Por otro lado, se ha reportado que GABARAP, un ortólogo de Atg8 específico de mamíferos, participa en el control de la movilidad celular, a través de la regulación de la ubiquitinación y degradación de la proteína TIAM1, una GEF de la GTPasa pequeña RAC1, la cual es fundamental para la remodelación de microfilamentos de actina (Genau et al., 2015). En este caso se observó que GABARAP se localiza en vesículas, distintas de los autofagosomas, restringiendo de esta manera la señalización de RAC1 a zonas específicas de la célula (Genau et al., 2015).

Por lo observado en esta Tesis, una posibilidad es que, en determinados grupos de células del cerebro larval, la señal liberada por las tráqueas inhiba la autofagia llevando a la acumulación de Atg8. Estudios futuros permitirán determinar si éste es realmente el caso. Se ha reportado que la inhibición de la actividad lisosomal en neuronas humanas en cultivo promueve la acumulación de vesículas autofágicas marcadas con LC3/Atg8 en estadíos intermedios de maduración (Boland et al., 2008). En ese mismo estudio, se observó un aumento de la cantidad de vesículas autofágicas tras un tratamiento con vinblastina, un agente despolimerizante de microtúbulos que afectaría negativamente la fusión entre autofagosomas y lisosomas (Boland et al., 2008). Como se discutió más arriba, en las células del cuerpo graso de *Drosophila*, la localización perinuclear de los *foci* de 3mCh-ATG8 podría asociarse a defectos

en el proceso de fusión autofagosoma-lisosoma, o a defectos en la maquinaria de transporte por microtúbulos. Si la acumulación de Atg8 en el cerebro se vinculara a una disminución de su degradación por autofagia, la señal liberada por las tráqueas tras la sobreexpresión de LDH podría ejercer efectos mecanísticamente similares en el cuerpo graso y en el cerebro, si bien los fenotipos resultantes en estos dos tejidos son distintos.

En las células del cerebro larval donde aumenta la fluorescencia correspondiente a 3mCh-ATG8, observamos además la presencia de algunos pocos *foci* de gran tamaño (Figura 17G', H'). Con respecto a esto, se ha reportado en un modelo de cultivo de células HeLa que la inhibición de la autofagia promueve la formación de *foci* de LC3/Atg8 prominentes, que no corresponden a autofagosomas, sino a agregados de la proteína p62/Ref(2)P, que forma complejos con LC3/Atg8 (Runwal et al., 2019; Szeto et al., 2006). Ref(2)P/p62 es un receptor de autofagia, el cual reconoce componentes citoplasmáticos y los recluta al autofagosoma en formación para su degradación de forma específica a través de la autofagia (Moscat & Diaz-Meco, 2009; Stoltz et al., 2014). Se sabe que la inhibición de la autofagia lleva a la formación de agregados de Ref(2)P en tejidos de *Drosophila*, incluido el cerebro (DeVorkin & Gorski, 2014; Nezis et al., 2008; Yoshii & Mizushima, 2017). La formación de agregados de Ref(2)P y Atg8, si bien sería complementaria con lo discutido más arriba, no alcanza para explicar el importante aumento de la fluorescencia homogéneamente distribuida correspondiente a 3mCh-ATG8, observado en grupos de células del cerebro de *Drosophila*.

Alternativamente, no podemos descartar la posibilidad de que exista regulación transcripcional de Atg8, pero que no la hayamos podido detectar en nuestros ensayos de qRT-PCR. Esto podría deberse a que el aumento de fluorescencia ocurre en un grupo minoritario de las células del cerebro (alrededor del 15%), y que al preparar homogenatos de cerebros enteros, el posible aumento del mRNA de Atg8 podría haberse diluido (Figura 18). Considerando todo lo discutido más arriba, será interesante explorar posibles vínculos entre la respuesta traqueal al lactato y la acumulación de Atg8 en el cerebro de *Drosophila*.



**Figura 20. Modelo de inducción de la autofagia a distancia.** En hipoxia, se produciría la acumulación de lactato en los tejidos. En las tráqueas, esto provocaría la liberación de una señal desconocida, que difundiría por la hemolinfa e induciría la autofagia en el cuerpo graso y la acumulación de Atg8 en un grupo de células del cerebro.

## **6. Conclusiones**

---

Los resultados obtenidos en esta Tesis permiten inferir que la acumulación de lactato en las células traqueales provoca la inducción de la autofagia a distancia en el cuerpo graso, presuntamente mediante la liberación de una señal desconocida que difunde por la hemolinfa. Por otro lado, tras evaluar otros órganos larvales, encontramos que la sobreexpresión de LDH en el sistema traqueal provoca una fuerte acumulación de Atg8 en un grupo de células del cerebro, y que esta acumulación no se debería a un aumento de la transcripción del gen.

## 7. Referencias Bibliográficas

---

- Agathocleous, M., & Harris, W. A. (2013). Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Trends in Cell Biology*, 23(10), 484-492. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.05.004>
- Agathocleous, M., Love, N. K., Randlett, O., Harris, J. J., Liu, J., Murray, A. J., & Harris, W. A. (2012). Metabolic differentiation in retinal cells. *Nature cell biology*, 14(8), 859-864. <https://doi.org/10.1038/ncb2531>
- Anding, A. L., & Baehrecke, E. H. (2015). Vps15 is required for stress induced and developmentally triggered autophagy and salivary gland protein secretion in Drosophila. *Cell Death & Differentiation*, 22(3), 457-464. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.174>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, 55(Volume 55, 2010), 207-225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouysségur, J., & Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2570-2581. <https://doi.org/10.1128/MCB.00166-09>
- Boda, A., Balázs, V., Nagy, A., Hargitai, D., Lippai, M., Simon-Vecsei, Z., Molnár, M., Fürstenhoffer, F., Juhász, G., & Lőrincz, P. (2024). The Rab7-Epg5 and Rab39-ema modules cooperately position autophagosomes for efficient lysosomal fusions. <https://doi.org/10.1101/2024.08.16.608254>
- Boda, A., Lőrincz, P., Takáts, S., Csizmadia, T., Tóth, S., Kovács, A. L., & Juhász, G. (2019). Drosophila Arl8 is a general positive regulator of lysosomal fusion events. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(4), 533-544. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.12.011>
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F. M., Wegiel, J., Yu, W. H., & Nixon, R. A. (2008). Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to Autophagic Pathology in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 28(27), 6926-6937. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0800-08.2008>
- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3), 213-232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- 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>
- Brisson, L., Bański, P., Sboarina, M., Dethier, C., Danhier, P., Fontenille, M.-J., Van Hée, V. F., Vazeille, T., Tardy, M., Falces, J., Bouzin, C., Porporato, P. E., Frédéric, R., Michiels, C., Copetti, T., & Sonveaux, P. (2016). Lactate Dehydrogenase B Controls Lysosome Activity and Autophagy in Cancer. *Cancer Cell*, 30(3), 418-431. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.08.005>
- Bruick, R. K. (2003). Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes & Development*, 17(21), 2614-2623.

<https://doi.org/10.1101/gad.1145503>

- Bruick, R. K., & McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1337-1340. <https://doi.org/10.1126/science.1066373>
- Cen, H., Fan, P., Ding, Y., Luo, B., Luo, H., Chen, M., & Zhang, Y. (2023). iPSCs ameliorate hypoxia-induced autophagy and atrophy in C2C12 myotubes via the AMPK/ULK1 pathway. *Biological Research*, 56, 29. <https://doi.org/10.1186/s40659-023-00435-4>
- Centanin, L., Dekanty, A., Romero, N., Irisarri, M., Gorr, T. A., & Wappner, P. (2008). Cell Autonomy of HIF Effects in Drosophila: Tracheal Cells Sense Hypoxia and Induce Terminal Branch Sprouting. *Developmental Cell*, 14(4), 547-558. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.020>
- Centanin, L., Gorr, T. A., & Wappner, P. (2010). Tracheal remodelling in response to hypoxia. *Journal of Insect Physiology*, 56(5), 447-454. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.05.008>
- 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>
- Chen, L., Liao, B., Qi, H., Xie, L.-J., Huang, L., Tan, W.-J., Zhai, N., Yuan, L.-B., Zhou, Y., Yu, L.-J., Chen, Q.-F., Shu, W., & Xiao, S. (2015). Autophagy contributes to regulation of the hypoxia response during submergence in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy*, 11(12), 2233-2246. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1112483>
- Chiang, H. L., & Dice, J. F. (1988). Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(14), 6797-6805.
- Chyb, S., & Gompel, N. (2013). *Atlas of Drosophila Morphology: Wild-type and Classical Mutants* (1.<sup>a</sup> ed.). Elsevier.
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*, 7(1), 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>
- Deretic, V., Saitoh, T., & Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 13(10), 722-737. <https://doi.org/10.1038/nri3532>
- DeVorkin, L., & Gorski, S. M. (2014). Monitoring Autophagic Flux Using Ref(2)P, the Drosophila p62 Ortholog. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(9), pdb.prot080333. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot080333>
- Doering, K. R. S., Cheng, X., Milburn, L., Ratnappan, R., Ghazi, A., Miller, D. L., & Taubert, S. (2022). Nuclear hormone receptor NHR-49 acts in parallel with HIF-1 to promote hypoxia adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *eLife*, 11, e67911. <https://doi.org/10.7554/eLife.67911>
- Droujinine, I. A., & Perrimon, N. (2016). Interorgan Communication Pathways in Physiology: Focus on Drosophila. *Annual review of genetics*, 50, 539-570. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-121415-122024>
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in drosophila: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*, 34(1-2), 1-15. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>
- Ebner, M., Puchkov, D., López-Ortega, O., Muthukottiappan, P., Su, Y., Schmied, C., Zillmann, S.,

- Nikonenko, I., Koddebusch, J., Dornan, G. L., Lucht, M. T., Koka, V., Jang, W., Koch, P. A., Wallroth, A., Lehmann, M., Brügger, B., Pende, M., Winter, D., & Haucke, V. (2023). Nutrient-regulated control of lysosome function by signaling lipid conversion. *Cell*, 186(24), 5328-5346.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.09.027>
- Fan, J., Hitosugi, T., Chung, T.-W., Xie, J., Ge, Q., Gu, T.-L., Polakiewicz, R. D., Chen, G. Z., Boggon, T. J., Lonial, S., Khuri, F. R., Kang, S., & Chen, J. (2011). Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells. *Molecular and Cellular Biology*, 31(24), 4938-4950. <https://doi.org/10.1128/MCB.06120-11>
- Fedotova, E. I., Dolgacheva, L. P., Abramov, A. Y., & Berezhnov, A. V. (2022). Lactate and Pyruvate Activate Autophagy and Mitophagy that Protect Cells in Toxic Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 59(1), 177-190. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02583-8>
- Feng, X., Zhang, H., Meng, L., Song, H., Zhou, Q., Qu, C., Zhao, P., Li, Q., Zou, C., Liu, X., & Zhang, Z. (2021). Hypoxia-induced acetylation of PAK1 enhances autophagy and promotes brain tumorigenesis via phosphorylating ATG5. *Autophagy*, 17(3), 723-742. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1731266>
- Fernández-Moreno, M. A., Farr, C. L., Kaguni, L. S., & Garesse, R. (2007). *Drosophila melanogaster* as a model system to study mitochondrial biology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ.)*, 372, 33-49. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_3)
- Firth, J. D., Ebert, B. L., & Ratcliffe, P. J. (1995). Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(36), 21021-21027. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21021>
- Gándara, L., Durrieu, L., Behrensen, C., & Wappner, P. (2019). A genetic toolkit for the analysis of metabolic changes in *Drosophila* provides new insights into metabolic responses to stress and malignant transformation. *Scientific Reports*, 9(1), 19945. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56446-3>
- Gándara, L., & Wappner, P. (2018). Metabo-Devo: A metabolic perspective of development. *Mechanisms of Development*, 154, 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.02.004>
- Gatica, D., Lahiri, V., & Klionsky, D. J. (2018). Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature Cell Biology*, 20(3), 233-242. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0037-z>
- Genau, H. M., Huber, J., Baschieri, F., Akutsu, M., Dötsch, V., Farhan, H., Rogov, V., & Behrends, C. (2015). CUL3-KBTBD6/KBTBD7 ubiquitin ligase cooperates with GABARAP proteins to spatially restrict TIAM1-RAC1 signaling. *Molecular Cell*, 57(6), 995-1010. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.040>
- Geng, J., & Klionsky, D. J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO Reports*, 9(9), 859-864. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.163>
- Gervais, L., & Casanova, J. (2011). The *Drosophila* homologue of SRF acts as a boosting mechanism to sustain FGF-induced terminal branching in the tracheal system. *Development*, 138(7), 1269-1274. <https://doi.org/10.1242/dev.059188>
- Gorr, T. A., Gassmann, M., & Wappner, P. (2006). Sensing and responding to hypoxia via HIF in model invertebrates. *Journal of Insect Physiology*, 52(4), 349-364.

<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.002>

- Grasso, D., Renna, F. J., & Vaccaro, M. I. (2018). Initial Steps in Mammalian Autophagosome Biogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 146. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00146>
- Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P., & Brunet, A. (2007). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30107-30119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705325200>
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, 30(2), 214-226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
- Hale, A. N., Ledbetter, D. J., Gawriluk, T. R., & Rucker, E. B. (2013). Autophagy: Regulation and role in development. *Autophagy*, 9(7), 951-972. <https://doi.org/10.4161/auto.24273>
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual review of genetics*, 43, 67-93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- Heckmann, B. L., & Green, D. R. (2019). LC3-associated phagocytosis at a glance. *Journal of Cell Science*, 132(5), jcs222984. <https://doi.org/10.1242/jcs.222984>
- Hegedűs, K., Takáts, S., Boda, A., Jipa, A., Nagy, P., Varga, K., Kovács, A. L., & Juhász, G. (2016). The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 27(20), 3132-3142. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-03-0205>
- Hong, S.-S., Gibney, G. T., Esquelin, M., Yu, J., & Xia, Y. (2004). Effect of protein kinases on lactate dehydrogenase activity in cortical neurons during hypoxia. *Brain Research*, 1009(1-2), 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.004>
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., & Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 7987-7992. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.7987>
- Ikeya, T., & Hayashi, S. (1999). Interplay of Notch and FGF signaling restricts cell fate and MAPK activation in the *Drosophila* trachea. *Development*, 126(20), 4455-4463. <https://doi.org/10.1242/dev.126.20.4455>
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5), 577-590. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00929-2)
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., & Kaelin, W. G. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5516), 464-468. <https://doi.org/10.1126/science.1059817>
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of

HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5516), 468-472. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>

Jacomin, A.-C., Petridi, S., Di Monaco, M., Bhujabal, Z., Jain, A., Mulakkal, N. C., Palara, A., Powell, E. L., Chung, B., Zampronio, C., Jones, A., Cameron, A., Johansen, T., & Nezis, I. P. (2020). Regulation of Expression of Autophagy Genes by Atg8a-Interacting Partners Sequoia, YL-1, and Sir2 in Drosophila. *Cell Reports*, 31(8), 107695. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107695>

Jahreiss, L., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2008). The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(4), 574-587. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x>

Jia, M., Yue, X., Sun, W., Zhou, Q., Chang, C., Gong, W., Feng, J., Li, X., Zhan, R., Mo, K., Zhang, L., Qian, Y., Sun, Y., Wang, A., Zou, Y., Chen, W., Li, Y., Huang, L., Yang, Y., ... Cheng, X. (2023). ULK1-mediated metabolic reprogramming regulates Vps34 lipid kinase activity by its lactylation. *Science Advances*, 9(22), eadg4993. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg4993>

Jiang, B. H., Semenza, G. L., Bauer, C., & Marti, H. H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *The American Journal of Physiology*, 271(4 Pt 1), C1172-1180. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.4.C1172>

Johnson, D. E., Ostrowski, P., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2016). The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *The Journal of Cell Biology*, 212(6), 677-692. <https://doi.org/10.1083/jcb.201507112>

Juhász, G., Hill, J. H., Yan, Y., Sass, M., Baehrecke, E. H., Backer, J. M., & Neufeld, T. P. (2008). The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in Drosophila. *Journal of Cell Biology*, 181(4), 655-666. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712051>

Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Molecular Cell*, 30(4), 393-402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*, 13(2), 132-141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>

Kimmelman, A. C., & White, E. (2017). Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metabolism*, 25(5), 1037-1043. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.004>

Kocianova, E., Piatrikova, V., & Golias, T. (2022a). Revisiting the Warburg Effect with Focus on Lactate. *Cancers*, 14(24), 6028. <https://doi.org/10.3390/cancers14246028>

Kocianova, E., Piatrikova, V., & Golias, T. (2022b). Revisiting the Warburg Effect with Focus on Lactate. *Cancers*, 14(24), 6028. <https://doi.org/10.3390/cancers14246028>

Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Menzies, F. M., O'Kane, C. J., Deretic, V., & Rubinsztein, D. C. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nature Cell Biology*, 13(4), 453-460. <https://doi.org/10.1038/ncb2204>

Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2002). Formation of the ~350-kDa

Apg12-Apg5·Apg16 Multimeric Complex, Mediated by Apg16 Oligomerization, Is Essential for Autophagy in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18619-18625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111889200>

Lavista-Llanos, S., Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D. M., Gleadle, J. M., Bocca, S. N., Muzzopappa, M., Ratcliffe, P. J., & Wappner, P. (2002). Control of the Hypoxic Response in *Drosophila melanogaster* by the Basic Helix-Loop-Helix PAS Protein Similar. *Molecular and Cellular Biology*, 22(19), 6842-6853. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.19.6842-6853.2002>

Lei, Y., Huang, Y., Wen, X., Yin, Z., Zhang, Z., & Klionsky, D. J. (2022). How Cells Deal with the Fluctuating Environment: Autophagy Regulation under Stress in Yeast and Mammalian Systems. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(2), 304. <https://doi.org/10.3390/antiox11020304>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lőrincz, P., & Juhász, G. (2020). Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Molecular Biology*, 432(8), 2462-2482. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.10.028>

Lőrincz, P., Kenéz, L. A., Tóth, S., Kiss, V., Varga, Á., Csizmadia, T., Simon-Vecsei, Z., & Juhász, G. (2019). Vps8 overexpression inhibits HOPS-dependent trafficking routes by outcompeting Vps41/Lt. *eLife*, 8, e45631. <https://doi.org/10.7554/eLife.45631>

Lőrincz, P., Mauvezin, C., & Juhász, G. (2017). Exploring Autophagy in *Drosophila*. *Cells*, 6(3), 22. <https://doi.org/10.3390/cells6030022>

Lőw, P., Varga, Á., Pircs, K., Nagy, P., Szatmári, Z., Sass, M., & Juhász, G. (2013). Impaired proteasomal degradation enhances autophagy via hypoxia signaling in *Drosophila*. *BMC Cell Biology*, 14, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-29>

Luo, Z., Tian, M., Yang, G., Tan, Q., Chen, Y., Li, G., Zhang, Q., Li, Y., Wan, P., & Wu, J. (2022). Hypoxia signaling in human health and diseases: Implications and prospects for therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1-30. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01080-1>

Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *The EMBO Journal*, 20(18), 5197-5206. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.18.5197>

Menzies, F. M., Fleming, A., & Rubinsztein, D. C. (2015). Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 345-357. <https://doi.org/10.1038/nrn3961>

Miao, P., Sheng, S., Sun, X., Liu, J., & Huang, G. (2013). Lactate dehydrogenase A in cancer: A promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life*, 65(11), 904-910. <https://doi.org/10.1002/iub.1216>

Mihaylova, M. M., & Shaw, R. J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology*, 13(9), 1016-1023. <https://doi.org/10.1038/ncb2329>

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., &

- Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395(6700), 395-398. <https://doi.org/10.1038/26506>
- Morin-Poulard, I., Tian, Y., Vanzo, N., & Crozatier, M. (2021). Drosophila as a Model to Study Cellular Communication Between the Hematopoietic Niche and Blood Progenitors Under Homeostatic Conditions and in Response to an Immune Stress. *Frontiers in Immunology*, 12, 719349. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.719349>
- Moscat, J., & Diaz-Meco, M. T. (2009). P62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell*, 137(6), 1001-1004. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.023>
- 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>
- Nascimbeni, A. C., Giordano, F., Dupont, N., Grasso, D., Vaccaro, M. I., Codogno, P., & Morel, E. (2017). ER -plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI 3P synthesis. *The EMBO Journal*, 36(14), 2018-2033. <https://doi.org/10.15252/embj.201797006>
- Nezis, I. P., Simonsen, A., Sagona, A. P., Finley, K., Gaumer, S., Contamine, D., Rusten, T. E., Stenmark, H., & Brech, A. (2008). Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *The Journal of Cell Biology*, 180(6), 1065-1071. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711108>
- Nieto-Torres, J. L., Leidal, A. M., Debnath, J., & Hansen, M. (2021). Beyond Autophagy: The Expanding Roles of ATG8 Proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(8), 673-686. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.004>
- Noda, N. N., & Inagaki, F. (2015). Mechanisms of Autophagy. *Annual Review of Biophysics*, 44(1), 101-122. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-034248>
- Pan, X., Neufeld, T. P., & O'Connor, M. B. (2019). A Tissue- and Temporal-Specific Autophagic Switch Controls *Drosophila* Pre-metamorphic Nutritional Checkpoints. *Current Biology*, 29(17), 2840-2851.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.027>
- Perez Pandolfo, S. (2023). *Caracterización de la autofagia inducida por hipoxia en Drosophila melanogaster*.
- Perez-Perri, J. I., Dengler, V. L., Audetat, K. A., Pandey, A., Bonner, E. A., Urh, M., Mendez, J., Daniels, D. L., Wappner, P., Galbraith, M. D., & Espinosa, J. M. (2016). The TIP60 Complex Is a Conserved Coactivator of HIF1A. *Cell Reports*, 16(1), 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.082>
- Pu, J., Guardia, C. M., Keren-Kaplan, T., & Bonifacino, J. S. (2016). Mechanisms and functions of lysosome positioning. *Journal of Cell Science*, 129(23), 4329-4339. <https://doi.org/10.1242/jcs.196287>
- Puente, C., Hendrickson, R. C., & Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(11), 6026-6035. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689646>
- Rabanal-Ruiz, Y., Otten, E. G., & Korolchuk, V. I. (2017). mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays in Biochemistry*, 61(6), 565-584. <https://doi.org/10.1042/EBC20170027>

- Rajan, A., & Perrimon, N. (2011). Drosophila as a Model for Interorgan Communication: Lessons from Studies on Energy Homeostasis. *Developmental cell*, 21(1), 29-31. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.034>
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 11(6), 1114-1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>
- Roberts, D. J., Tan-Sah, V. P., Ding, E. Y., Smith, J. M., & Miyamoto, S. (2014). Hexokinase-II positively regulates glucose starvation induced autophagy through TORC1 inhibition. *Molecular cell*, 53(4), 521-533. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.019>
- Romero, N. M., Dekanty, A., & Wappner, P. (2007). Cellular and Developmental Adaptations to Hypoxia: A *Drosophila* Perspective. En *Methods in Enzymology* (Vol. 435, pp. 123-144). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)35007-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)35007-6)
- Runwal, G., Stamatakou, E., Siddiqi, F. H., Puri, C., Zhu, Y., & Rubinsztein, D. C. (2019). LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Scientific Reports*, 9(1), 10147. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46657-z>
- Schaaf, M. B. E., Keulers, T. G., Vooijs, M. A., & Rouschop, K. M. A. (2016). LC3/GABARAP family proteins: Autophagy-(un)related functions. *The FASEB Journal*, 30(12), 3961-3978. <https://doi.org/10.1096/fj.201600698R>
- Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5), 343-354. <https://doi.org/10.1038/nrm1366>
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M., & Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal*, 31(5), 1095-1108. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.32>
- Stoltz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology*, 16(6), 495-501. <https://doi.org/10.1038/ncb2979>
- Szeto, J., Kaniuk, N. A., Canadien, V., Nisman, R., Mizushima, N., Yoshimori, T., Bazett-Jones, D. P., & Brumell, J. H. (2006). ALIS are Stress-Induced Protein Storage Compartments for Substrates of the Proteasome and Autophagy. *Autophagy*, 2(3), 189-199. <https://doi.org/10.4161/auto.2731>
- Takáts, S., Pircs, K., Nagy, P., Varga, Á., Kárpáti, M., Hegedűs, K., Kramer, H., Kovács, A. L., Sass, M., & Juhász, G. (2014). Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila*. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8), 1338-1354. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-08-0449>
- Tamargo-Gómez, I., & Mariño, G. (2018). AMPK: Regulation of Metabolic Dynamics in the Context of Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3812. <https://doi.org/10.3390/ijms19123812>
- 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>
- Tsuboyama, K., Koyama-Honda, I., Sakamaki, Y., Koike, M., Morishita, H., & Mizushima, N. (2016). The

ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science*, 354(6315), 1036-1041. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6136>

Valko, A., Perez-Pandolfo, S., Sorianello, E., Brech, A., Wappner, P., & Melani, M. (2022). Adaptation to hypoxia in *Drosophila melanogaster* requires autophagy. *Autophagy*, 18(4), 909-920. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1991191>

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of biochemistry: Life at the molecular level* (Fifth edition). Wiley.

Walczak, M., & Martens, S. (2013). Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy*, 9(3), 424-425. <https://doi.org/10.4161/auto.22931>

Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5510-5514. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>

Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1995). Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1 (\*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1230-1237. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.3.1230>

Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309-314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>

Wesselborg, S., & Stork, B. (2015). Autophagy signal transduction by ATG proteins: From hierarchies to networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(24), 4721-4757. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2034-8>

Xu, T., Kumar, S., & Denton, D. (2017). Characterization of Autophagic Responses in *Drosophila melanogaster*. En *Methods in Enzymology* (Vol. 588, pp. 445-465). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.09.089>

Yin, Z., Pascual, C., & Klionsky, D. J. (2016). Autophagy: Machinery and regulation. *Microbial Cell*, 3(12), 588-596. <https://doi.org/10.15698/mic2016.12.546>

Yoshii, S. R., & Mizushima, N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1865. <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>

Yuan, H.-X., Russell, R. C., & Guan, K.-L. (2013). Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy*, 9(12), 1983-1995. <https://doi.org/10.4161/auto.26058>

Zou, G.-P., Wang, T., Xiao, J.-X., Wang, X.-Y., Jiang, L.-P., Tou, F.-F., Chen, Z.-P., Qu, X.-H., & Han, X.-J. (2023). Lactate protects against oxidative stress-induced retinal degeneration by activating autophagy. *Free Radical Biology and Medicine*, 194, 209-219. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.12.004>