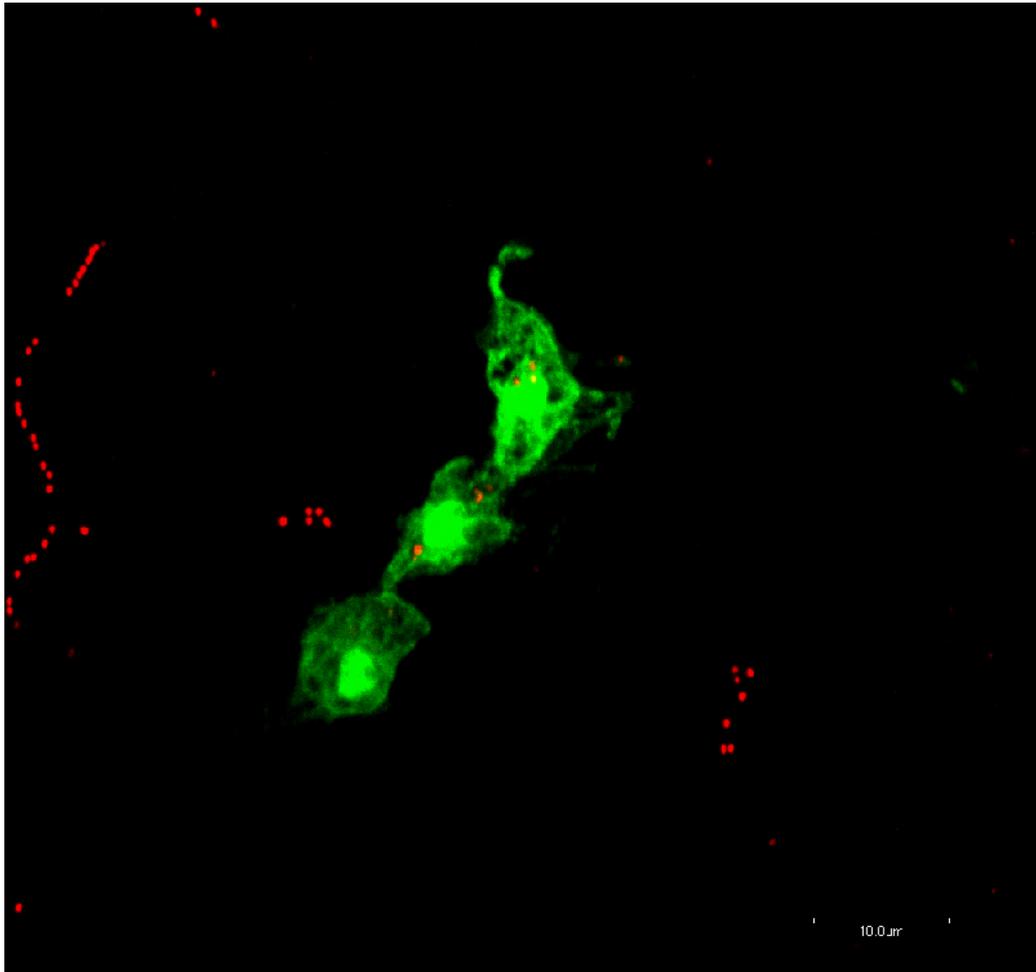


Fagocitosis circadiana de material neuronal

El rol de los hemocitos en la plasticidad neuronal de *Drosophila melanogaster*



Tesina de grado | Licenciatura en Bioquímica | Facultad de Ciencias | Universidad de la República

Bach. Flavio Pazos | Tutor: Dr. Rafael Cantera | Cotutora: Msc. María José Ferreiro

Departamento de Biología del Neurodesarrollo | Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

INDICE

Resumen | 3

Introducción | 4

Plasticidad neuronal | 4

Ritmos circadianos | 6

Plasticidad circadiana | 7

Fagocitosis de material neuronal | 9

Origen y funciones de los hemocitos | 9

Objetivos | 12

Hipótesis | 12

Estrategia experimental | 13

Resultados | 18

Discusión | 23

Anexos | 27

Anexo I – Tablas de datos y análisis estadístico | 27

Anexo II – Materiales y equipos utilizados | 32

Referencias | 34

RESUMEN

Se ha demostrado que la morfología de algunas motoneuronas en *Drosophila melanogaster* cambia entre el día y la noche, lo que se conoce como plasticidad neuronal circadiana. Este tipo de plasticidad neuronal incluye una variación del tamaño, la distribución y el número de los botones sinápticos a lo largo del día, es decir, una remodelación neuronal diaria. Los mecanismos biológicos mediante los cuales ocurren estas variaciones son aun desconocidos. En este trabajo nos planteamos el objetivo general de determinar como ocurre el proceso diario de remodelación de los botones sinápticos de la motoneurona de vuelo MN5 de adultos de *Drosophila*. Nuestra hipótesis es que este proceso de remodelación incluye fagocitosis a cargo de hemocitos. Los hemocitos son el componente celular del sistema inmune de *Drosophila*, fagocitan patógenos, y material apoptótico y participan en la remodelación del sistema nervioso en desarrollo durante la metamorfosis.

Nuestra estrategia experimental general fue realizar disecciones de músculos de vuelo que contactan con la MN5 de moscas adultas salvajes y transgénicas en momentos específicos del día, en condiciones de luz/oscuridad, y realizar ensayos de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para sinápsis, analizando los resultados por microscopía láser confocal. Buscamos evidencia de la presencia de material neuronal en el interior de hemocitos localizados sobre los músculos de vuelo. Para hacer visibles los hemocitos utilizamos una cepa de moscas transgénicas que expresan Proteína Fluorescente Verde bajo el control de un promotor específico de hemocitos. Para detectar material neuronal utilizamos anticuerpos monoclonales específicos para microtúbulos de neurona o para una proteína de sinápsis, marcados con fluorescencia roja. Para determinar si la fluorescencia emitida por el marcador neuronal estaba dentro de los hemocitos, realizamos reconstrucciones tridimensionales de los mismos en un microscopio láser confocal. Con este método cuantificamos la cantidad de hemocitos presentes sobre los músculos de vuelo en diferentes momentos del ciclo de luz/oscuridad, la proporción de hemocitos asociados a la ramificación axonal de la MN5 y la proporción de hemocitos con material neuronal en su interior.

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que los hemocitos fagocitan diariamente material neuronal en la MN5 de adultos sanos de *Drosophila*, como parte de un proceso de remodelación de los botones sinápticos. Demostramos también que existe una variación estadísticamente significativa del número de hemocitos sobre los músculos de vuelo en dos momentos distintos del ciclo luz/oscuridad, siendo éste mayor durante la noche. Finalmente, también comprobamos una variación en la proporción de hemocitos con material neuronal en su interior, en este caso mayor durante el día.

INTRODUCCIÓN

Plasticidad neuronal

El sistema nervioso está conformado por gran número de neuronas que varían en forma, tamaño, posición y patrones de conexión. Esta riqueza morfológica del sistema nervioso es reflejo de su complejidad funcional (Ramón y Cajal, 1911). El desarrollo del sistema nervioso está determinado en parte por la información genética que porta cada organismo en su genoma. El tamaño y la forma que adopta una neurona en un momento dado del desarrollo o la vida de un organismo depende de los genes que ha expresado hasta ese momento, en qué grado y con qué patrón temporal lo ha hecho. El patrón de expresión génica de cada célula en desarrollo interacciona a su turno con el de todas las demás células del organismo, tanto espacial como temporalmente. Cada neurona se desarrolla en un “ambiente interno” conformado por el resto de las células y sus productos extracelulares. A esta intrincada trama de interacciones recíprocas deben agregarse los factores ambientales propiamente dichos, factores físicos y químicos externos al organismo.

La morfología y fisiología que adopta el sistema nervioso en cada momento, depende del resultado final de esta interacción entre el genoma y las condiciones ambientales en las que se expresa el mismo. La capacidad del sistema nervioso para adaptarse a los cambios tanto del ambiente interno como del ambiente externo se denomina “plasticidad neuronal”, e involucra complejas interacciones entre moléculas, células y circuitos neuronales, llegando al nivel de interacciones del organismo como un todo.

Una condición ambiental que ha permanecido inalterada a lo largo de toda la evolución de la vida es la rotación terrestre. Desde su aparición, los organismos han sido testigos desde variaciones de la temperatura media o de la composición de la atmósfera hasta drásticos cambios geológicos. Sin embargo, desde que existe vida, la tierra siempre ha rotado sobre su eje con un período de aproximadamente 24 horas, y los organismos han debido adaptarse a una alternancia constante de horas de luz y horas de oscuridad, lo que se conoce como “ritmo circadiano”. La existencia de ciclos circadianos en la plasticidad morfológica de las neuronas está bien documentada en numerosos

organismos, entre ellos *Drosophila melanogaster* (revisión en Mehnert y Cantera, 2011).

Drosophila es ampliamente reconocida como organismo modelo para el estudio del desarrollo y la plasticidad del sistema nervioso, debido a que presenta diversas ventajas que incluyen un corto ciclo de vida, la relativa facilidad para la construcción de distintas cepas transgénicas y su mantenimiento en el laboratorio y el vasto conocimiento de su biología del desarrollo (Lessing y Bonini, 2009). Utilizando *Drosophila* como modelo, se ha demostrado por ejemplo la incidencia de condiciones ambientales sobre el tamaño de algunas partes del cerebro, la cantidad o el tamaño de los axones e incluso la cantidad de neuronas (Barth et al., 1997; Barth y Heisenberg, 1997; Technau, 1984). En los últimos años se ha extendido además el uso del sistema GAL4/UAS (Brand y Perrimon, 1993), que permite introducir en un organismo genes exógenos y dirigir su expresión ectópica en tipos celulares específicos. En particular, es posible expresar Proteína Fluorescente Verde (GFP, por su sigla en inglés) exclusivamente en un tipo celular (ej. glia o neurona) o gen específico, acoplando la secuencia de la GFP (unida a UAS: sitio de unión upstream de GAL4) a un promotor específico para dicho tipo celular o gen (unido a la secuencia GAL4 de levadura) (Brand y Phelps, 1998).

El método se esquematiza en la Figura 1.

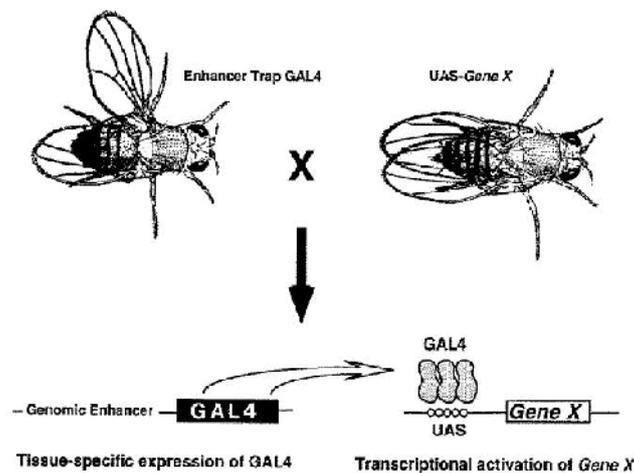


Figura 1 – Sistema GAL4/UAS para la expresión ectópica de genes en *Drosophila melanogaster*. En la cepa Hml-GAL4, UAS-GFP empleada en esta tesis, GAL4 está unido al promotor de hemoclectina, específico de hemocitos, y UAS está unido a la secuencia codificante de GFP. De eso modo, los hemocitos expresan también GFP, facilitando así su detección. Imagen obtenida de Brand y Perrimon, 1993.

Ritmos circadianos

Los ritmos circadianos se definen como ritmos biológicos que presentan un ciclo de oscilación de aproximadamente 24 horas y que se mantienen en condiciones de oscuridad constante (Pyza y Meinertzhagen, 1993). Son controlados por mecanismos endógenos y suelen estar sincronizados con las variaciones ambientales. Los relojes biológicos circadianos implican una ventaja adaptativa para el organismo, al permitirle anticiparse a cambios ambientales diarios y ajustar su conducta y fisiología a cada momento del día (Albertch, 2002). La selección natural ha favorecido entonces la evolución de relojes biológicos circadianos como adaptación a los cambios de luz y temperatura provocados por la rotación de la Tierra (Albertch, 2002; Panda, 2002).

Se han documentado cambios morfológicos, fisiológicos y comportamentales de los organismos que siguen un ritmo circadiano. Ejemplos de estos cambios son el ritmo de actividad locomotora/vigilia y de reposo/sueño exhibido por muchos animales (Bell-Pedersen et al., 2005; Allada y Chung, 2010). Se dice que esos ritmos están controlados por un reloj biológico endógeno cuando esos cambios continúan ocurriendo de forma circadiana en condiciones experimentales de oscuridad continua, es decir en ausencia de un ciclo de luz/oscuridad. Aun cuando no sean imprescindibles para generar los ritmos circadianos, los ciclos de luz/oscuridad suelen modular la amplitud de los mismos. Además, los ritmos circadianos endógenos pueden ajustarse a los cambios del ciclo luz oscuridad, como los que pueden implicar las migraciones o el cambio de estaciones.

Existe evidencia molecular y filogenética que sugiere que los mecanismos intracelulares responsables por el mantenimiento del ritmo circadiano se establecieron antes de la divergencia entre procariotas y eucariotas (Panda, 2002). Mamíferos, insectos y hongos, construyen sus osciladores circadianos a partir de proteínas relacionadas y análisis genómicos comparativos han revelado la conservación de sus mecanismos subyacentes (Young, 1998; Panda, 2002)

La primera evidencia de que un solo gen podía tener influencia sobre el ritmo circadiano fue obtenida al identificar ciertas mutaciones en *Drosophila* que provocaban una alteración del período del reloj circadiano (Konopka y Banzer, 1971). Desde entonces, *Drosophila* se ha confirmado como un excelente organismo modelo también para el

estudio de los mecanismos de funcionamiento del reloj biológico y su influencia sobre distintos aspectos de la fisiología y la conducta de los seres vivos.

Plasticidad circadiana

Cambios circadianos en la morfología celular han sido documentados en un amplio rango de tipos celulares pertenecientes a diversos organismos, vertebrados, invertebrados e incluso unicelulares (Basinger et al., 1976; Barlow, 2001; Lonergan, 1983).

Se ha propuesto el término "plasticidad circadiana" (Mehnert y Cantera, 2011) para referirse a los cambios en la morfología neuronal que siguen un ritmo circadiano. Pyza y Meinertzhagen (1993, 1995) fueron quienes documentaron por primera vez la existencia de este tipo de cambios, estudiando neuronas del centro visual de *Musca domestica*, *Calliphora vicina* y *Drosophila melanogaster*. Luego, en *Drosophila*, se descubrieron cambios circadianos en la morfología de las neuronas del reloj del CNS (Fernández et al., 2008) y de la unión neuromuscular (NMJ por su sigla en inglés) de la motoneurona 5 (MN5) de vuelo (Mehnert et al., 2007).

La unión neuromuscular es una estructura formada por las terminales de las motoneuronas sobre los músculos somáticos. En *Drosophila*, las uniones neuromusculares se forman en el embrión, crecen en la larva y son eliminadas o reorganizadas durante la metamorfosis para controlar los músculos del individuo adulto (Truman, 1990). Se sabe que los patrones de expresión génica, la morfología y la fisiología de las uniones neuromusculares continúan cambiando desde los primeros días de vida adulta hasta sus fases más tardías (Rivlin et al., 2004).

Como ilustra la figura 2, la plasticidad circadiana en la MN5 de *Drosophila* incluye una variación en el tamaño de sus botones sinápticos a lo largo del día (Mehnert et al., 2007; Ruiz et al., 2010). Los axones de esta neurona presentan cientos de ramificaciones con miles de botones sinápticos distribuidos a lo largo de los dos músculos longitudinales de vuelo más dorsales (Mehnert y Cantera, 2011). El tamaño medio de estos botones es más grande durante el día que durante la noche. Este ritmo se mantiene en condiciones de oscuridad constante, pero no ocurre en moscas mutantes nulos para los genes del

reloj *period* y *timeless*, demostrando que el ritmo está controlado por un reloj endógeno (Mehnert et al., 2007). El número de botones de la MN5 también presenta variación circadiana (Ruiz et al. comunicación personal).

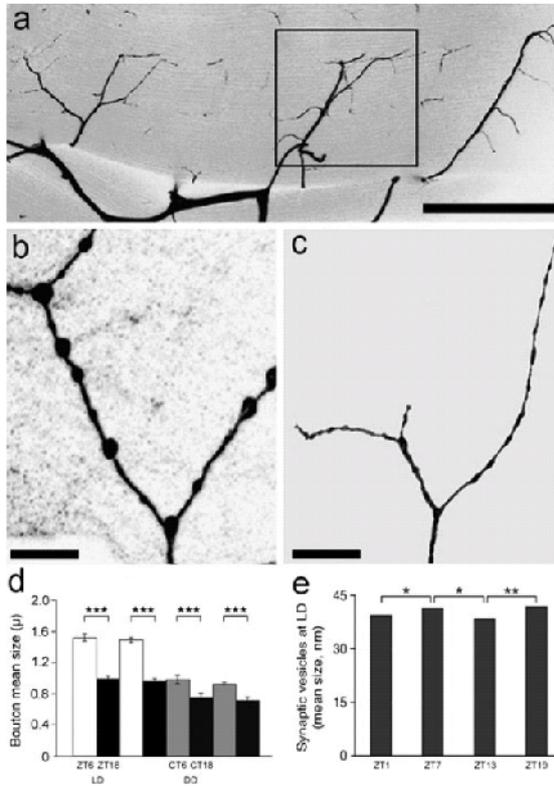


Figura 2 - Reorganización diaria de las terminales motoras y las vesículas sinápticas en *Drosophila*. A) Vista panorámica de la MN5 inervando los músculos dorsales de vuelo. La imagen muestra una vista lateral de los músculos de vuelo longitudinales más dorsales (el recuadro se usó para cuantificar ramificaciones) Barra; 10 µm .

B, C) Ejemplos representativos de terminales axonales marcadas con anticuerpos anti-horeseradish peroxisasa (HRP) durante el día (B) y la noche (C). Barra; 10 µm. D) Tamaño promedio de los botones sinápticos en dos ciclos consecutivos de luz/oscuridad (barras blancas y negras, $F_{1,56}=205.7$, $P<0.0001$) y en dos ciclos consecutivos de oscuridad continua (barras grises y negras; $P<0.00015$, Duncan test).

E) Tamaño de las vesículas en las sinápsis neuromusculares de vuelo en condiciones de luz/oscuridad. Las vesículas de la zona activa muestran un cambio rítmico en su tamaño (Kruskal–Wallis Test, $H(3, n 5 346) 5 11.968$, $*P<0.05$, $**P<0.01$). Figura tomada de Mehnert y Cantera, 2011.

Se desconocen los mecanismos celulares por medio de los cuales ocurre la disminución del tamaño y la cantidad de botones sinápticos en la terminal sináptica de la MN5. Sin embargo, se han descrito dos mecanismos celulares de remoción de porciones axonales: retracción y degeneración (Luo y O’Leary, 2005). En la retracción, el proceso axonal es gradualmente empujado hacia atrás, y el material axonal correspondiente es transportado retrógradamente hacia secciones del axón más próximas al soma. Por otro lado, la degeneración implica el desprendimiento y la fragmentación de segmentos axonales en pequeños trozos que luego son removidos por células fagocíticas. Ambos procesos están muy regulados y pueden ser seguidos de nuevo crecimiento del axón (Awasaki e Ito, 2004; Watts et al., 2004; Saxena y Caroni, 2007). Este tipo de procesos son comunes durante el desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila*, durante el cual se producen dramáticas remodelaciones de la morfología neuronal. Esas

modificaciones incluyen la muerte celular programada de neuronas y la pérdida o modificación morfológica de ramificaciones axonales.

Fagocitosis de material neuronal

Se ha demostrado que durante el desarrollo del sistema nervioso tanto de ratón como de *Drosophila*, las neuronas apoptóticas y los desprendimientos de material neuronal son fagocitados por distintos tipos celulares; células gliales, hemocitos, e incluso células musculares, tanto a nivel del sistema nervioso central como del sistema nervioso periférico (Sonnenfeld y Jacobs, 1995; Cantera y Technau, 1996; Awasaki e Ito, 2004; Watts et al., 2004; Fuentes-Medel, 2009, Paolicelli et al., 2011).

A nivel del sistema nervioso periférico, se ha descubierto que durante el desarrollo larval de *Drosophila*, muchos botones sinápticos de motoneuronas que fallan en establecer contactos post-sinápticos estables con el músculo, se desprenden del axón y son fagocitados por la glía y las células musculares (Fuentes-Medel et al., 2009). La supresión de la vía fagocítica en estas células resulta en una acumulación de desprendimientos de material neuronal y en un crecimiento sináptico comprometido (Fuentes-Medel et al., 2009). Estas observaciones apoyan la idea de que en la NMJ en desarrollo, las ramificaciones axonales generan constitutivamente un número excesivo de botones inmaduros, para luego desprender aquellos que no son estabilizados. Esto a su vez requiere de la fagocitosis del material neuronal que se va desprendiendo.

Si la variación circadiana en el tamaño de los botones sinápticos a nivel de la motoneurona adulta de *Drosophila* incluyera fagocitosis, una opción es que la misma estuviera a cargo de células gliales y musculares, tal como ocurre en la larva. Otra posibilidad es que la fagocitosis de la terminal motora estuviera a cargo de los hemocitos, los fagocitos profesionales de *Drosophila*.

Origen y funciones de los hemocitos

La cavidad corporal de *Drosophila*, como la de todos los artrópodos, está llena de hemolinfa (“sangre”) circulante que contiene células “sanguíneas” denominadas

hemocitos. Los hemocitos derivan de células madre de origen mesodérmico y pueden ser sésiles o móviles. Representan el componente celular del sistema inmune de *Drosophila* y una de sus principales funciones es la de fagocitar bacterias y células dañadas, o tejidos larvales que deben ser eliminados durante la metamorfosis (Lavine y Strand, 2002).

Durante su etapa larval *Drosophila melanogaster* tiene varios miles de hemocitos, que se pueden subdividir en tres tipos celulares según su morfología, función y en base a marcadores moleculares: plasmátocitos, lamelocitos y células cristalinas (Lemaitre y Hoffmann, 2007; Márkus et al., 2009; Honti et al., 2010). Los plasmátocitos representan entre el 90 y el 95% de de todos los hemocitos maduros en la larva y son fagocitos profesionales análogos a la línea celular de macrófagos y monocitos de mamíferos (Wood y Jacinto, 2007). Los lamelocitos son células relativamente grandes, chatas y adherentes, que se encuentran exclusivamente en larvas enfermas (Márkus et al., 2009), y cuya principal función es la encapsulación y neutralización de objetos demasiado grandes para ser fagocitados. Las células cristalinas tampoco llevan a cabo fagocitosis, representan un 5% de los hemocitos larvales y participan del proceso de melanización al servir como células de síntesis, almacenamiento y liberación de oxidoreductasas que median la melanización (Lemaitre y Hoffmann, 2007).

En *Drosophila*, los plasmátocitos provienen de dos fases hemocitopoiéticas espacial y temporalmente distintas del desarrollo del animal. La primera fase da lugar a los plasmátocitos circulantes maduros que se observan en la larva y tiene lugar en el mesodermo de la cabeza del embrión. La segunda fase se produce en la glándula linfática de la larva, donde proliferan y se diferencian plasmátocitos que, de no mediar compromiso inmune, entrarán en circulación recién durante la metamorfosis. Al inicio de la metamorfosis, la glándula linfática libera gran cantidad de plasmátocitos activamente fagocíticos, llamados macrófagos pupales, que juegan un rol crítico en el remodelamiento tisular al fagocitar células larvales apoptóticas (Lanot, 2000; Tepass, 1994). El organismo adulto no posee glándulas linfáticas y no se observa proliferación de hemocitos, por lo que el organismo adulto presenta una población uniforme de plasmátocitos que conserva desde la etapa larval (Holz, 2003; Meiser, 2004).

Además de su rol en el sistema inmune fagocitando microorganismos invasores y

secretando péptidos antimicrobianos, los hemocitos tienen otras funciones a lo largo del desarrollo de *Drosophila*. Los plasmatocitos patrullan el embrión fagocitando células apoptóticas y al hacerlo, ayudan a dar forma a varios tejidos durante los cambios morfológicos ocurridos durante la embriogénesis. Son además la principal fuente de muchos componentes de la matriz extracelular, que sintetizan y secretan durante la embriogénesis. Ambas funciones son vitales para el desarrollo embrional, y una falla de los plasmatocitos en llevar a cabo estos procesos tiene serias consecuencias. A excepción de algunas células apoptóticas del sistema nervioso central en desarrollo, que son fagocitadas por la glía, y de los desprendimientos de botones sinápticos inmaduros de las NMJ en crecimiento, que son fagocitadas por la glía y el músculo, hasta donde se sabe todas las células apoptóticas en el embrión, la larva y el adulto son fagocitadas por los plasmatocitos (Wood y Jacinto, 2007).

Se sabe entonces que existe un proceso de remodelación diaria de las ramificaciones axonales a nivel de la MN5 de *Drosophila*, pero se desconocen los mecanismos celulares que explican esa remodelación. En *Drosophila*, los hemocitos son las células especializadas en la fagocitosis, por lo que si la plasticidad circadiana de la NMJ incluye fagocitosis, los hemocitos son un buen candidato para llevarla a cabo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si los hemocitos intervienen en la plasticidad circadiana de la motoneurona de vuelo MN5 de adultos de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos específicos

1. Determinar si los hemocitos fagocitan material neuronal en las terminales sinápticas de la MN5 de *Drosophila*.
2. Determinar si existe una variación a lo largo del día en el número de hemocitos asociados a la MN5 de *Drosophila*.
3. Determinar si existe una variación a lo largo del día en el número de hemocitos asociados a la MN5 de *Drosophila*, con material neuronal en su interior.

HIPÓTESIS

El proceso de remodelación circadiano que se observa en las terminales motoras de la MN5 de *Drosophila* durante la vida adulta, incluye fagocitosis rítmica de material neuronal por parte de los hemocitos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Nuestra estrategia experimental general fue realizar disecciones de músculos de vuelo que contactan con la MN5 de moscas adultas salvajes y transgénicas en momentos específicos del día, en condiciones de luz/oscuridad, y realizar ensayos de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para sinápsis, analizando los resultados por microscopía láser confocal. A continuación se detallan los materiales y procedimientos empleados.

Cepa de *Drosophila melanogaster*

Utilizamos moscas adultas de la cepa Hml-GAL4, UAS-GFP (Goto et al., 2003), mantenidas en una incubadora a 25°C y en condiciones controladas de humedad, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas y criadas en medio a base de harina de maíz, glucosa y levadura preparado con una receta estándar. Mediante el sistema GAL4/UAS, los hemocitos de esta cepa expresan GFP bajo el control del promotor de del gen que codifica la hemolectina, una proteína que se expresa exclusivamente en hemocitos.

Para evitar la influencia del factor de género y de factores hormonales que pudieran introducir variabilidad, en todos los experimentos se utilizaron hembras vírgenes, reconocidas por presentar las alas plegadas, el cuerpo sin pigmentar y el meconio verde que aparece en el extremo dorsal posterior del abdomen. Las hembras alcanzan su madurez sexual aproximadamente 6 horas después de emerger de la pupa. De este modo, sexando y separando los individuos a medida que emergían pudimos obtener una cantidad suficiente de hembras vírgenes para analizar estadísticamente los datos obtenidos, a las que dejamos madurar hasta alcanzar 5 días de edad antes de ser utilizadas en nuestros experimentos.

Disección de los músculos de vuelo de la MN5

El objetivo de la disección es obtener un trozo dorsal del tórax que contenga los músculos de vuelo longitudinales 5 y 6 que sinapsan con la MN5, para su observación directa o para la realización posterior de los ensayos de inmunohistoquímica en diversos

momentos del ciclo de luz/oscuridad (LD). Estos diferentes momentos dentro de un ciclo LD reciben el nombre de Zeitbergers (ZTs). Se optó por analizar dos ZT específicos, en base a resultados de experimentos previos (Ruiz y cols., comunicación personal): ZT 19 (5 horas antes de que se apague la luz) y ZT 7 (7 horas luego del comienzo del período de 12 horas de luz). (Ver fig. 3).

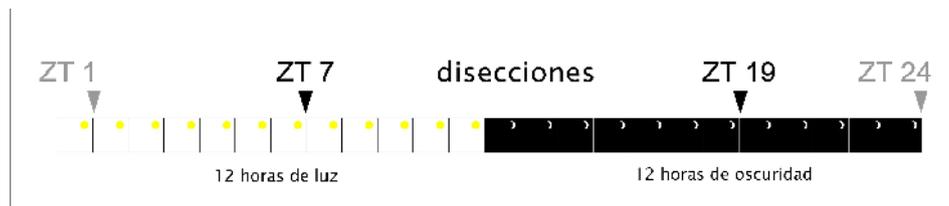


Figura 3 – Esquema temporal de las disecciones

En primer lugar las moscas colectadas en cada ZT seleccionado ($n > 5$) fueron anestesiadas con óxido nítrico generado por un surtidor Inject+Matic Sleeper y colocadas sobre un porta objeto en una gota de PBS 1x. En cada experimento, las moscas fueron decapitadas en un lapso menor a 5 minutos a partir del comienzo de cada ZT y fijadas en paraformaldeído 4% sobre hielo, durante 1 hora y cuarenta minutos. Durante ese lapso se completaron las disecciones del tórax para la obtención exclusiva de los músculos de vuelo de interés. Para ello, con una pinceta y una aguja, se cortó el abdomen, las alas y las patas de cada mosca. El tórax se cortó sagitalmente en dirección dorso-ventral conservando una de sus dos mitades, a la que se le retiró la mitad ventral y la mayor cantidad posible de cutícula. Se obtuvo así una pequeña porción de la parte dorsal del tórax que contiene los músculos de vuelo 5 y 6. Pasado el tiempo de fijación, realizamos 3 lavados en de 15 minutos en PBS 0.3%.

Las muestras fueron luego o bien directamente montadas en glicerol 80% para su análisis en un microscopio invertido de fluorescencia, o bien sometidas a tinción inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales para su posterior observación en un microscopio confocal, tal como se detalla más adelante.

Cuantificación de la cantidad de hemocitos sobre los músculos de vuelo

Para determinar una eventual variación circadiana en la cantidad de hemocitos presentes sobre el músculo de vuelo de la MN5 en los distintos ZT seleccionados, se analizaron

los preparados de las disecciones de músculos de vuelo correspondientes, haciendo uso de un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX81) equipado con una cámara digital (*Olympus DP71*), contabilizando la cantidad de hemocitos presentes en cada muestra según el siguiente procedimiento. Cada preparado fue fotografiado en 5 planos focales separados 20 micras entre sí con un lente de 20x, y las 5 fotografías fueron superpuestas digitalmente. Luego, haciendo uso del software de procesamiento de imágenes "Adobe Photoshop", en cada superposición de 5 fotografías se trazó una línea paralela a las fibras de los músculos de vuelo que pasase por una porción del escutelo del tórax. Se contaron los hemocitos observables dentro del área delimitada por la línea trazada y el borde dorsal de la disección. La cantidad de hemocitos de cada muestra fue dividida por el área total de la muestra, medida en píxeles, con el fin de normalizar la cantidad de hemocitos respecto a la variación del tamaño de cada muestra (ver fig. 4). Se realizaron 3 experimentos independientes siguiendo el mismo procedimiento, y luego de los análisis estadísticos correspondientes (ver más adelante) los datos fueron agrupados.

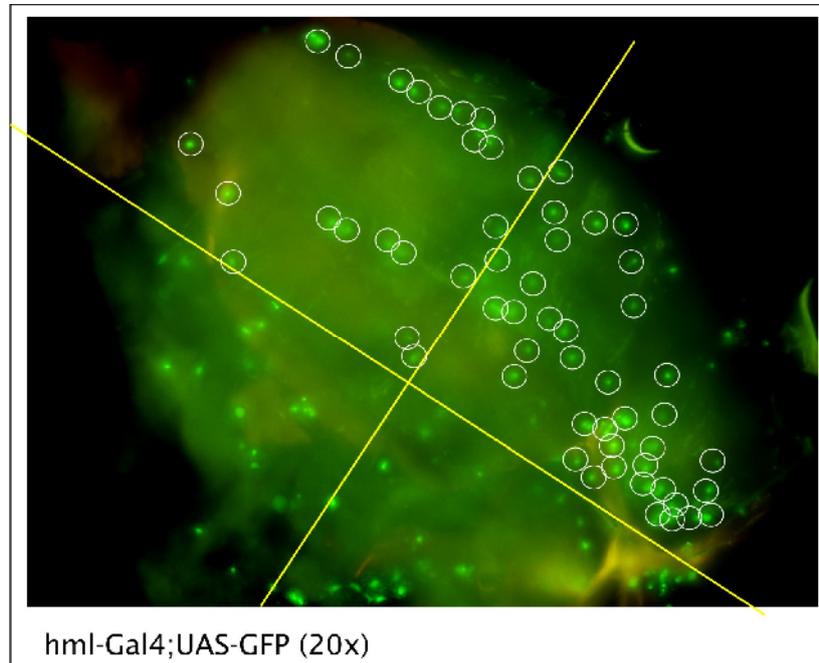


Figura 4 – Metodología para la cuantificación de hemocitos sobre los músculos de vuelo longitudinales que hacen sinápsis con la MN5. Ver detalles en el texto.

Determinación de la presencia de material neuronal en el interior de los hemocitos

Para documentar si encontrábamos material neuronal dentro de los hemocitos, llevamos a cabo ensayos de inmunohistoquímica de los músculos de vuelo 5 y 6 de moscas de la cepa Hml-GAL4, con dos anticuerpos primarios monoclonales específicos para proteínas expresadas exclusivamente en neuronas. Los anticuerpos utilizados fueron 22c10 y nc82. El antígeno de 22c10 es la proteína Futsch, que está asociada al citoesqueleto axonal en todos los compartimientos celulares de algunas neuronas del sistema nervioso central y de todas las neuronas del sistema nervioso periférico (Fujita, 1982). El antígeno de nc82 es la proteína específica de sinápsis Bruchpilot, un componente de las zonas activas presinápticas, el sitio en el que se liberan los neurotransmisores (Wagh et al., 2006). Ninguna de las dos proteínas es expresada en hemocitos.

Luego de la disección y fijación de las muestras de tórax, tal como fue descrito anteriormente, éstas se lavaron con PBS 1x y PBST 0.1%, y se incubaron en los anticuerpos primarios de ratón anti-Futsch (dilución 1:50 en PBTA 0.1%) o anti-Bruchpilot (dilución 1:100), durante toda la noche, a 4°C. Posteriormente se realizaron varios lavados en PBST 0.1% y se incubó en una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario Cy3 cabra anti-ratón (Jackson Immuno Research), en oscuridad y hielo y sobre un Shaker. La incubación se cortó con lavados en PBST 0.1% y PBS 1x, sobre hielo. Las muestras se dejaron en glicerol 80% hasta el momento de su montaje en portaobjetos, también en glicerol.

Con los preparados marcados con anticuerpos contra material neuronal, realizamos reconstrucciones tridimensionales de los hemocitos con un microscopio láser confocal (Olympus Fluoview FV300). Cada reconstrucción fue hecha a partir de una serie de fotografías tomadas a lo largo del eje z distantes 0,3 micras entre sí. De este modo, si en un punto se observa marcador neuronal rodeado de GFP en los tres planos del espacio, se puede afirmar que el material marcado está completamente dentro del hemocito.

Variación de la proporción de hemocitos con marcador neuronal en su interior

Siguiendo el procedimiento detallado en el apartado anterior, contamos la cantidad total de hemocitos y la proporción de los mismos que se encontraba en contacto con el axón de la MN5 en cada muestra. Luego, en cada preparado reconstruimos tridimensionalmente diez de los hemocitos que se encontraban tocando un axón y determinamos cuántos de ellos contenía marcador neuronal en su interior.

Análisis estadístico

Para procesar estadísticamente los datos obtenidos se utilizó el programa de análisis estadístico "Statistica 9". Con los tests de Shapiro-Wilk y Levene (ANOVA), se determinó respectivamente la normalidad y homogeneidad de varianza de cada grupo de datos, con un p valor de 0,05. Cuando los datos eran homogéneos y normales, se realizó el análisis paramétrico de ANOVA y posteriormente el test Pos Hoc de Tukey para comparar pares de muestras entre sí, estableciendo el nivel de significancia de $p = 0,05$. Cuando los datos no eran homogéneos y normales, se realizaron tests no paramétricos considerando las variables independientes y estableciendo el nivel de significancia de $p = 0,05$. Los test no paramétricos empleados fueron Mann-Whitney para comparar dos muestras entre sí y Kruskal-Wallis para comparar más de dos muestras entre sí.

RESULTADOS

A continuación se resumen los principales resultados obtenidos en esta tesis. Primeramente, cabe resaltar como resultado que el empleo de la cepa hml-GAL4;UAS-GFP en nuestros experimentos confirma por primera vez la expresión de GFP en los hemocitos de individuos adultos de *Drosophila melanogaster* (ver figura 5).

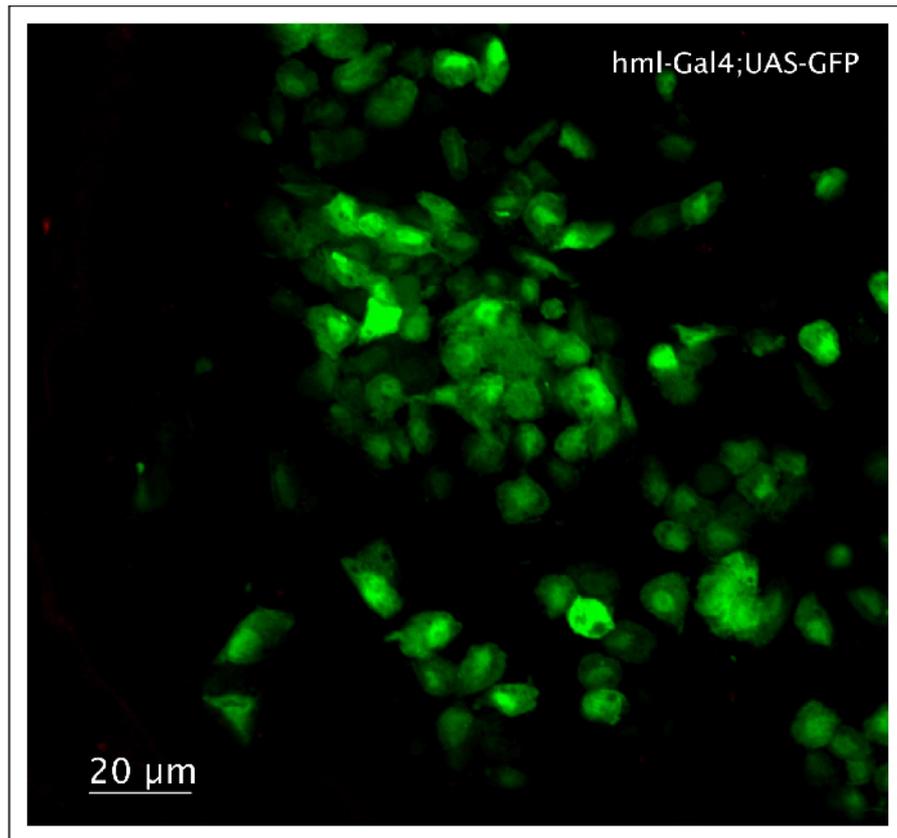


Figura 5 – Expresión de GFP en hemocitos de hembras adultas de *Drosophila melanogaster*.

Estos hemocitos fueron fácilmente distinguibles y cuantificados sobre los músculos de vuelo que sinapsan con la MN5 gracias a la expresión específica de GFP (ver figura 6).

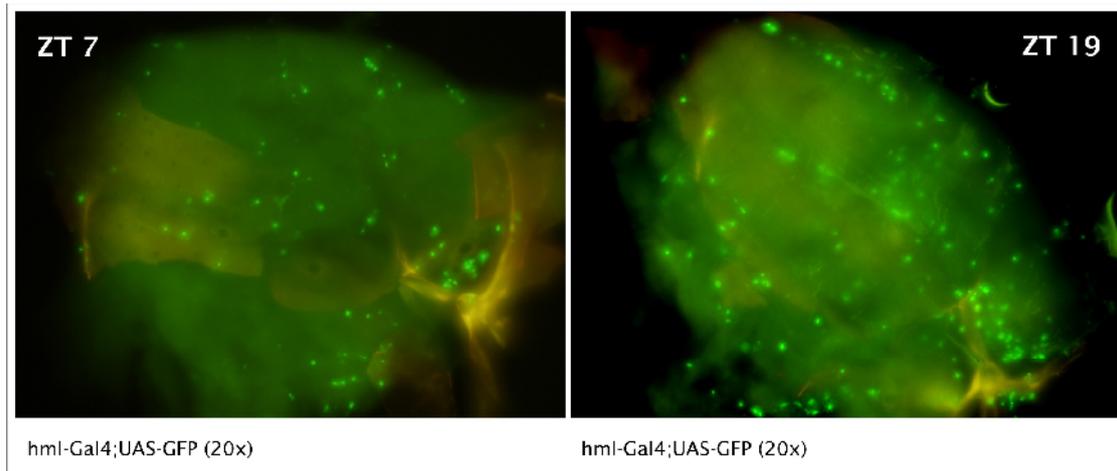


Figura 6 – Confirmación de la presencia de hemocitos sobre los músculos de vuelo de la MN5. Se observan dos disecciones típicas de los músculos de vuelo, dorsal hacia arriba y frontal hacia la izquierda. Los restos de cutícula torácica aparecen en color dorado. En verde, hemocitos marcados con GFP.

Una vez confirmada la presencia de hemocitos en los músculos de vuelo bajo estudio, estos fueron cuantificados a ZT 19 y ZT7, a fin de identificar si existían diferencias en la cantidad de hemocitos presentes en la NMJ de la MN5 a lo largo de distintos momentos del ciclo de luz/oscuridad (LD).

El gráfico de la figura 7 muestra los datos reunidos de tres experimentos independientes. Durante la noche (ZT 19), la cantidad de hemocitos es aproximadamente un tercio mayor que durante el día (ZT 7).

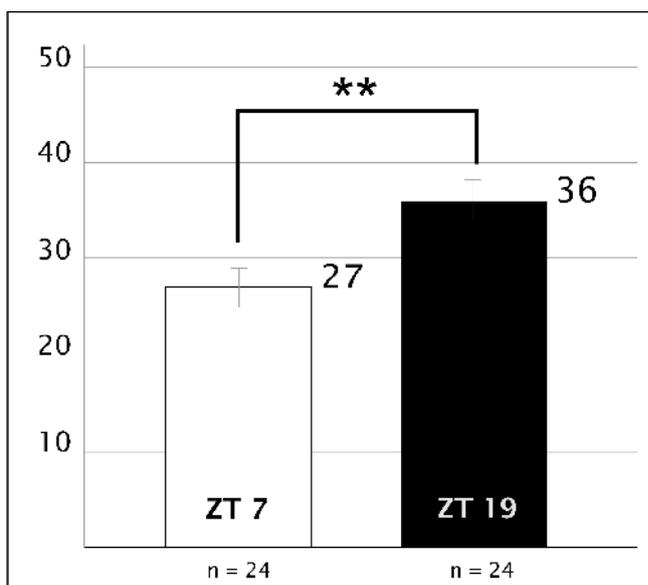


Figura 7 - Cuantificación de hemocitos sobre los músculos de vuelo de la MN5 en dos momentos del ciclo LD. El gráfico representa el promedio de hemocitos hallado sobre los músculos de vuelo a ZT 19 y ZT 7 de tres experimentos independientes. El eje de las “y” representa el promedio de hemocitos y el eje de las “x” el ZT analizado (Test estadístico ANOVA, $p=0,004$).

Además de contabilizar la cantidad total de hemocitos por ZT en el área de los músculos de vuelo definida previamente (ver estrategia experimental), se contabilizó la proporción de hemocitos en contacto directo con el axón de la MN5, identificado con el marcador de sinápsis Bruchpilot (figura 8) y el marcador de citoesqueleto axonal Futsch (figura 9).

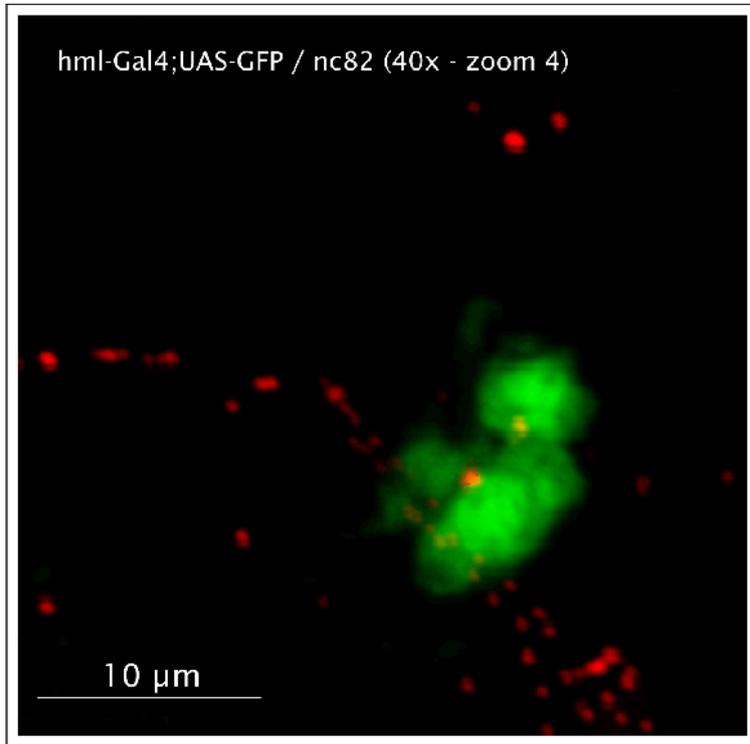


Figura 8 – Ejemplo de hemocito en contacto con un axón marcado con anti-Bruschpilot. La imagen muestra una proyección de 34 planos focales distantes 0.2 micras entre sí. En verde, hemocito expresando GFP. En rojo, señal de marcaje axonal de la MN5 con anticuerpo monoclonal específico de sinápsis nc82.

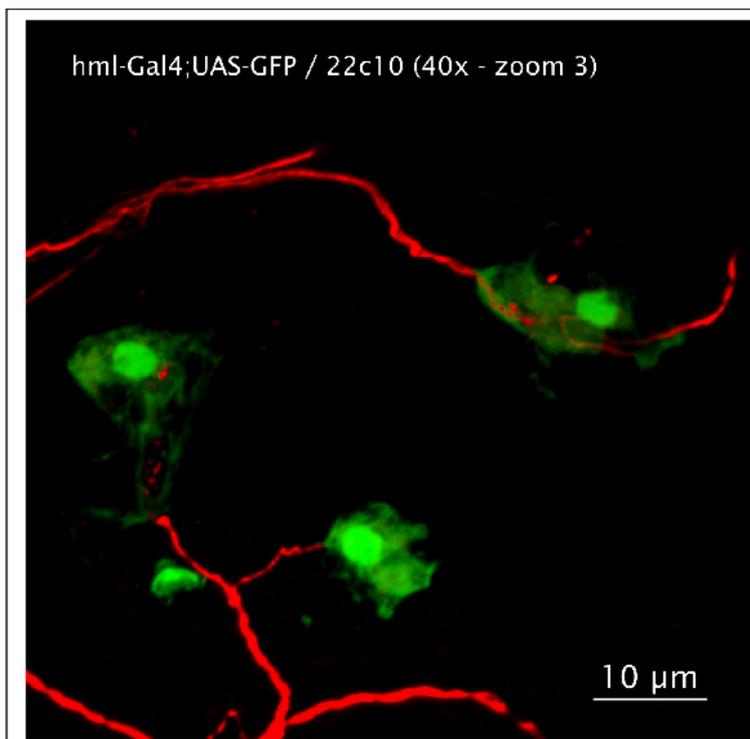


Figura 9 – Ejemplo de hemocitos en contacto con axones marcados con anti-Futsch. La imagen es una proyección de 56 planos focales distantes 0.2 micras entre sí. En verde, hemocito expresando GFP. En rojo, señal de marcaje axonal de la MN5 con anticuerpo monoclonal específico de citoesqueleto 22c10.

El gráfico de la figura 10 muestra los resultados de la proporción de hemocitos en contacto con el axón de la MN5 en cada ZT analizado. Contrario a lo que muestra la cuantificación de hemocitos totales por área de músculo, la proporción de hemocitos en contacto con el axón es aproximadamente un tercio mayor durante el día (ZT 7) que durante la noche (ZT 19).

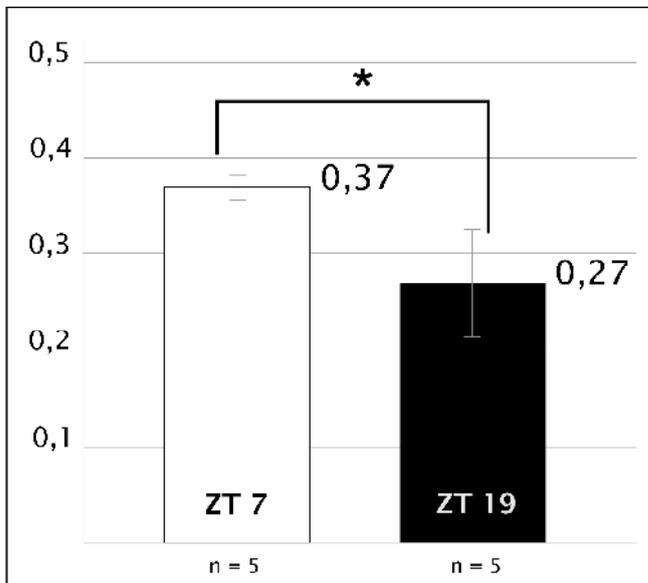


Figura 10 - Proporción de hemocitos tocando el axón de la MN5 en dos momentos del ciclo LD. El gráfico representa el promedio de hemocitos en contacto con el axón de la MN5 a ZT 19 y ZT 7 de tres experimentos independientes. El eje de las “y” representa el promedio de hemocitos en contacto con el axón y el eje de las “x” el ZT analizado, (Test Mann-Whitney $p=0,008$).

Finalmente, una vez demostrada la interacción física directa entre el axón de la MN5 y los hemocitos, y que esta interacción se ve modificada dependiendo del momento del día, quisimos determinar si estas células efectivamente eran capaces de fagocitar material neuronal normalmente, como parte de un proceso de remodelación circadiana de las terminales motoras. Para ello se analizó la presencia o no de material neuronal en el interior de los hemocitos presentes en la NMJ de la MN5.

La figura 11 muestra un ejemplo representativo de las reconstrucciones tridimensionales que permitieron detectar la existencia de material sináptico en el interior de los hemocitos.

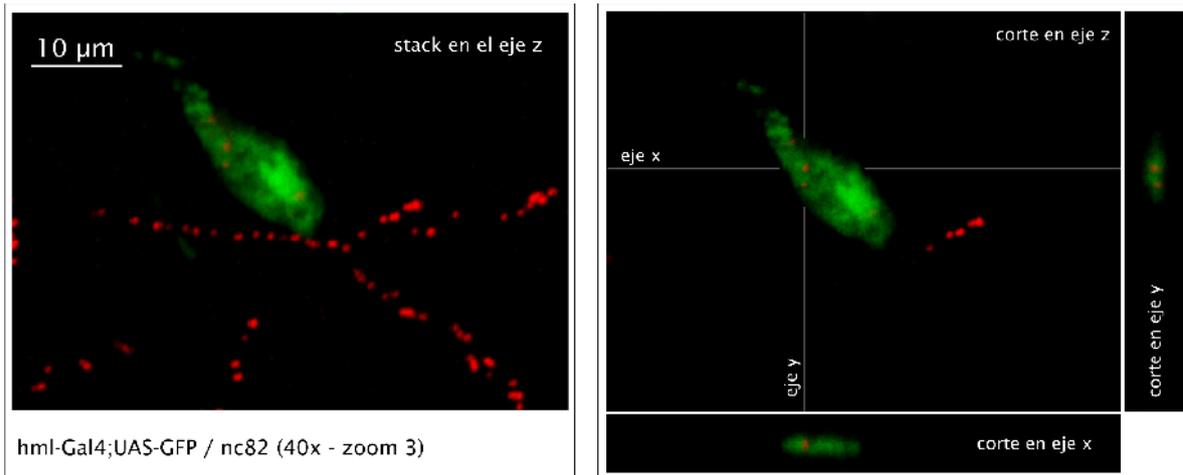


Figura 11 – Hemocito con material neuronal en su interior. A la izquierda, proyección a lo largo del eje z de 32 planos focales separados entre sí por 0,2 μ m. A la derecha, un plano focal de la misma serie y su correspondiente vista ortogonal en ejes x e y. En verde, hemocito expresando GFP. En rojo, señal de marcaje axonal de la MN5 con anticuerpo monoclonal específico de sinápsis nc82.

El gráfico de la figura 12 muestra los resultados de la proporción de hemocitos en contacto con el axón de la MN5 con material neuronal en su interior, en cada ZT analizado. La proporción de hemocitos tocando axones con material neuronal en su interior es aproximadamente un tercio mayor durante el día (ZT7) que durante la noche (ZT19).

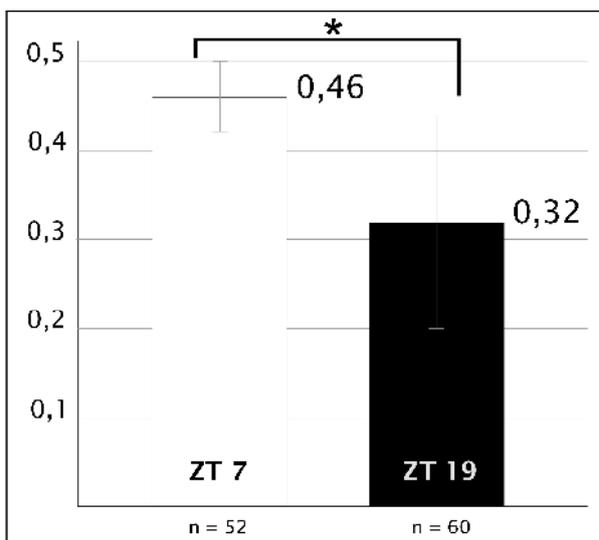


Figura 12 - Proporción de hemocitos tocando el axón de la MN5 con material neuronal en su interior, en dos momentos del ciclo LD. Se reconstruyeron tridimensionalmente, 52 y 60 hemocitos que se encontraban tocando un axón en 34 y 46 proyecciones en el eje z, para determinar si poseían material neuronal en su interior, a ZT7 y ZT 19 respectivamente. El eje de las “y” representa el promedio de hemocitos en contacto con el axón con material neuronal en su interior y el eje de las “x” el ZT analizado. (Test Mann-Whitney p=0,008)

DISCUSIÓN

En primer lugar, los resultados aquí presentados demuestran que los axones de la MN5 que inervan los músculos de vuelo en *Drosophila melanogaster* son fagocitados diariamente por los hemocitos. Es importante resaltar que este es el primer reporte de este fenómeno en adultos ya que fue descrito anteriormente únicamente en larva (Wood y Jacinto, 2007), y que éste fenómeno se observa en individuos adultos y sanos, esto es, individuos con su sistema nervioso completamente desarrollado y sin estar en condiciones de estrés inmune o atravesando algún proceso de neurodegeneración. Por tanto este sería un proceso normal de remodelación o reciclaje diario de material neuronal y no parte de un proceso patológico.

La participación de los hemocitos en el remodelamiento de tejidos durante el desarrollo de *Drosophila* ya ha sido demostrada (Franc et al., 1999; Jacinto y Wood, 2007). Sin embargo, no encontramos referencias en la bibliografía que describan un rol para estas células del sistema inmune en el mantenimiento del sistema nervioso en individuos adultos y sanos, por lo que este trabajo representaría también el primer reporte de este fenómeno, en la vida adulta y no como parte del desarrollo inicial del tejido nervioso.

Los mecanismos de reconocimiento del material neuronal a ser fagocitado en este proceso de remodelación neuronal diario, podrían ser similares a los ya conocidos para los diferentes procesos biológicos ya descritos para los hemocitos, en los procesos patológicos de infección y durante la remodelación de tejidos durante la metamorfosis.

Se conoce que, durante los procesos de infección, los hemocitos son capaces de reconocer patógenos y otras entidades que deben ser fagocitadas gracias a sus receptores de reconocimiento de patrones (PPRs). Los PPRs se unen a patrones moleculares conservados en los patógenos (PAMPs). Existen PPRs humorales, que se unen a los PAMPs y luego son reconocidos por proteínas de membrana expresadas en los hemocitos (Fearon, 1997). Existen también PPRs expresados en la membrana de los hemocitos que se unen directamente a los PAMPs (Aderem y Underhill, 1999).

Los hemocitos son además capaces de reconocer y fagocitar tejidos propios que deben desaparecer durante la metamorfosis (Wood y Jacinto, 2007). Se cree que ésta capacidad se debe al reconocimiento de cambios a nivel de la membrana basal, que cuando dañada, es reconocida por los hemocitos (Lavine y Strand, 2002). En *Drosophila*, el receptor de superficie Croquemort se expresa específicamente en plasmotocitos. Los mutantes nulos para Croquemort, aun siendo capaces de fagocitar bacterias, son incapaces de fagocitar células apoptóticas, lo que sugiere un papel para este receptor en el reconocimiento de tejido propio destinado a ser fagocitado (Franc et al., 1999). Sería interesante estudiar si esta deficiencia para fagocitar tejidos propios, en el mutante croquemort, tiene consecuencias sobre la fagocitosis de material neuronal tal como se puede estudiar en nuestro modelo y si eso, a su vez, tiene consecuencias sobre la plasticidad circadiana de la neurona MN5.

Nuestros experimentos muestran que existe un aumento del número de hemocitos sobre los músculos de vuelo que sinapsan con la MN5 durante la noche respecto al día. Por otro lado, la proporción de hemocitos asociados a axón es mayor durante el día que durante la noche y también es mayor durante el día la proporción de hemocitos con material neuronal en su interior (ver figura 13).

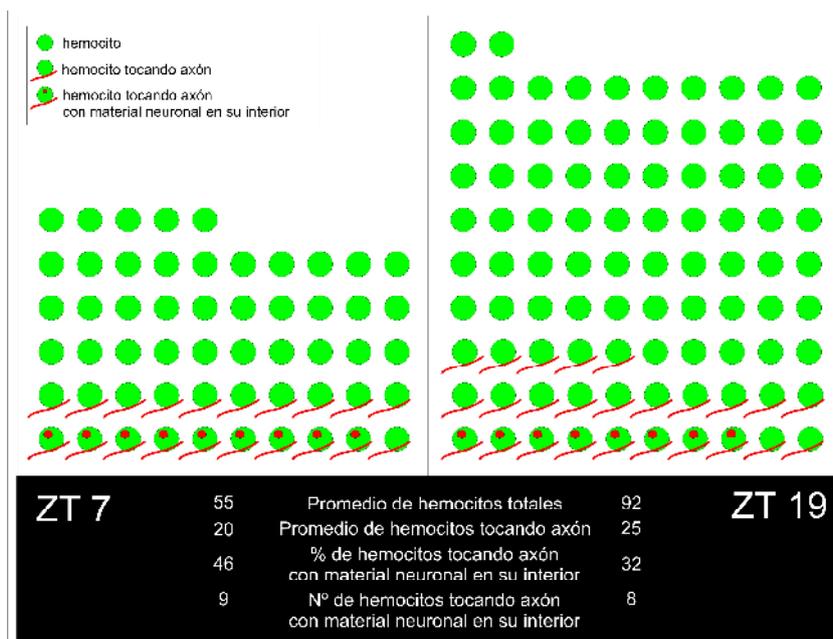


Figura 13 – Esquema representando las variaciones encontradas entre ZT 7 y ZT19. Los círculos representan los hemocitos. En la parte inferior se representan las proporciones halladas de hemocitos tocando un axón y la proporción de éstos que contiene material neuronal. En números absolutos, éste último parámetro parece ser constante.

La aparente mayor intensidad en la fagocitosis de material neuronal se da en el momento del día en que hay menos hemocitos. Transformando esas proporciones en cantidades absolutas, resulta que, al menos en los dos momentos del día investigados, la cantidad de hemocitos con material neuronal en su interior es aproximadamente constante. Dicho de otro modo, por la noche hay más hemocitos pero estos fagocitan menos material neuronal y durante el día hay menos hemocitos, pero parecen fagocitar más material neuronal. Esto ocurre a pesar de que los hemocitos varían en número, algo que se explicaría por una regulación rítmica de la fagocitosis. Sería interesante repetir los experimentos en otros momentos del ciclo luz-oscuridad, para obtener una mayor resolución temporal de estos ciclos.

El trabajo de revisión de Menhert y Cantera (2011) reúne resultados que indican que la reducción del tamaño de los botones sinápticos de la MN5 que se observa durante la noche no es una consecuencia de la baja actividad motora. Más aun, el crecimiento de los botones durante la mañana no es ni una consecuencia ni una condición para el incremento en la actividad motora al final de la noche. Los mismos resultados se obtienen cuando la actividad locomotora es eliminada por completo mediante decapitación, un procedimiento que además de eliminar la actividad motora, elimina el marcapasos central, ubicado en el cerebro (Mehnert y Cantera, 2008). En suma, estos estudios indican que, al menos para la MN5, el ritmo circadiano en el tamaño de los botones sinápticos es en mayor parte independiente de la actividad locomotora, y que, en condiciones normales, estaría dirigido por relojes circadianos periféricos.

Los hemocitos podrían representar al menos uno de estos relojes circadianos periféricos. En mamíferos se han descrito relojes circadianos autónomos que operan en los nódulos linfáticos, el hígado y en los macrófagos peritoneales de ratón (Keller et al., 2009). El mismo trabajo mostró que más del 8% del transcriptoma de macrófagos de ratón oscila circadianamente y que esa oscilación incluye la expresión de factores reguladores del reconocimiento de patógenos. En *Drosophila* también se ha demostrado la existencia de relojes periféricos (Allada y Chung, 2010). Se ha demostrado un ritmo circadiano en la fagocitosis de bacterias y la expresión de citoquinas en macrófagos peritoneales de ratón (Hayashi et al., 2007). Recientemente se ha descrito que la proteína del reloj Timeless regula la resistencia a infecciones bacterianas en *Drosophila* (Stone et al., 2012). En efecto, la fagocitosis de bacterias por parte de los hemocitos está regulada

circadianamente y tiene un pico durante la noche.

Todos estos trabajos encuentran una ritmicidad circadiana de la actividad fagocítica contra bacterias. Nuestros resultados demuestran que en *Drosophila*, los hemocitos fagocitan también material neuronal en condiciones fisiológicas normales y sugieren que lo hacen con un ritmo circadiano. Para demostrarlo inequívocamente, haría falta repetir nuestros experimentos usando moscas mutantes nulas para *timeless* u otros genes del reloj. Esos experimentos, que estaban previstos para esta pasantía, no pudieron ser llevados a cabo hasta ahora por falta de anticuerpos adecuados para detectar hemocitos en moscas mutantes.

Sin embargo, consideramos que hemos alcanzado los objetivos planteados para esta pasantía, en tanto hemos obtenido datos que apoyan la hipótesis de que la fagocitosis a cargo de hemocitos juega un rol importante en el proceso de remodelación diario de las motoneuronas en adulto de *Drosophila melanogaster*.

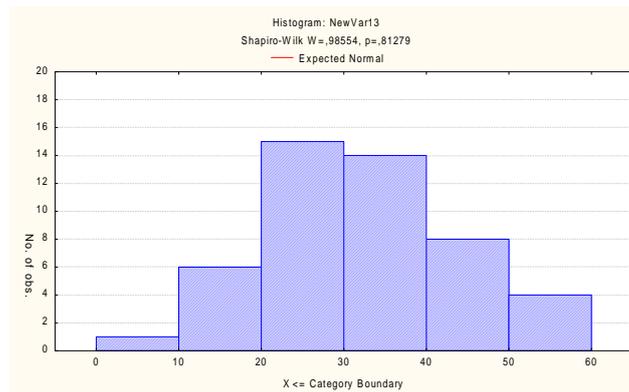
Anexo I – Tablas y análisis estadístico

Cuantificación de hemocitos sobre los músculos de vuelo de la MN5 en dos momentos del ciclo LD

Tabla de datos

EXP1							
Porta	Dissección	ZT	Nº Hem	Area	Hem/Area	Prom ZT	std error
16	IV	7a	69	1717062	40.2		
17	I	7a	56	1372072	40.8		
16	III	7a	66	2390851	27.6		
16	IV	7a	15	2409360	6.2		
16	II	7a	35	2471380	14.2		
17	IV	7a	66	1582115	41.7	28.5	5.1
19a	II	19a	71	2215016	32.1		
18	IV	19a	115	2392858	48.1		
19a	IV	19a	132	2509842	52.6		
18	V	19a	119	2316343	51.4		
19a	I	19a	113	2118154	53.3	47.5	5.6
EXP2 Día 1							
Porta	Corte	ZT	Nº Hem	Area	Hem/Area	Prom ZT	std error
20	VI	7b	58	2223484	26.1		
19b	I	7b	52	2438428	21.3		
19b	IV	7b	60	2347471	25.6		
19b	II	7b	61	2205455	27.7		
19b	V	7b	77	2767009	27.8		
19b	II	7b	67	2707687	24.7		
20	II	7b	68	1959581	34.7	26.8	2.1
21	II	19b	97	2487398	39.0		
22	I	19b	67	2057969	32.6		
21	III	19b	53	1532831	34.6		
21	VI	19b	79	1657476	47.7		
22	VI	19b	79	2214083	35.7		
21	I	19b	81	2998461	27.0	36.1	2.3
EXP2 Día 2							
Porta	Corte	ZT	Nº Hem	Area	Hem/Area	Prom ZT	std error
24	IV	7c	55	2651202	20.7		
23	II	7c	50	2061332	24.3		
24	II	7c	72	2927947	24.6		
24	VII	7c	80	2521808	31.7		
24	I	7c	102	3391546	30.1	26.3	2.7
26	II	19c	50	1663913	30.0		
26	VI	19c	71	3888375	18.3		
26	I	19c	50	3163681	15.8	21.4	2.7
EXP 3							
Porta	Corte	ZT	Nº Hem	Area	Hem/Area	Prom ZT	std error
F027	VIII	7d	42	2630988	28.7		
F027	II	7d	51	3934459	23.3		
F027	I	7d	40	3981002	18.1		
F027	III	7d	57	5069037	20.2		
F027	IV	7d	37	2329694	28.6		
F027	VI	7d	62	2795088	39.9	26.5	2.6
F030	I	19d	73	3811662	34.5		
F029	I	19d	78	3344752	42.0		
F029	III	19d	62	3101206	36.0		
F029	II	19d	61	2160266	50.8		
F030	IV	19d	58	2340113	44.6		
F029	IV	19d	77	3515185	39.4		
F030	V	19d	52	2236507	41.9		
F029	VI	19d	84	3956057	38.2	40.9	2.3

Según el test de normalidad Shapiro-Wilk, los datos son normales

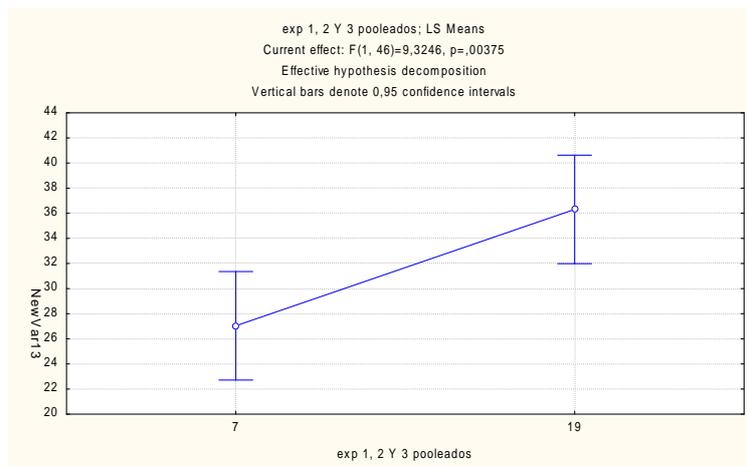


Según el test de homogeneidad de Levene, los datos son homogéneos

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Spreadsheet1 in experimentos 1, 2 y 3 21209)				
Effect: "exp 1, 2 Y 3 pooleados"				
Degrees of freedom for all F's: 1, 46				
	MS Effect	MS Error	F	p
NewVar13	121,3829	43,64914	2,780878	0,102191

Como los datos son normales y homogéneos, aplicamos el test paramétrico ANOVA.

Los dos conjuntos de datos son significativamente distintos.

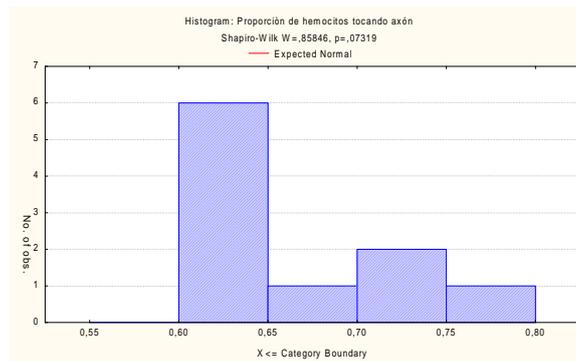


Proporción de hemocitos tocando el axón de la MN5 en dos momentos del ciclo LD

Tabla de datos

preparado	mosca	hemocitos tocando axón	hemocitos sin tocar	total hemocitos	prop de hemocitos tocando axón	ZT
F038	III	30	48	78	0.38	7
F039	I	23	39	62	0.37	7
F039	III	20	32	52	0.38	7
F040	I	11	19	30	0.37	7
F040	III	18	33	51	0.35	7
F042	I	18	71	89	0.20	19
F042	II	39	72	111	0.35	19
F042	III	26	76	102	0.25	19
F043	II	17	51	68	0.25	19
F043	III	27	62	89	0.30	19
promedio		20.4	34.2	54.6	0.37	7
promedio		25.4	66.4	91.8	0.27	19

Según el test de normalidad Shapiro-Wilk, los datos son normales



Según el test de homogeneidad de Levene, los datos no son homogéneos

Levene's Test for Homogeneity of Variances (conteo exp 5 parte b 2012)				
Effect: ZT				
Degrees of freedom for all F's: 1, 8				
	MS Effect	MS Error	F	p
Proporción de hemocitos tocando axón	0.002867	0.000431	6.658183	0.032599

Como los datos son normales pero no homogéneos, aplicamos el test no paramétrico Mann-Whitney. Los dos conjuntos de datos son significativamente distintos.

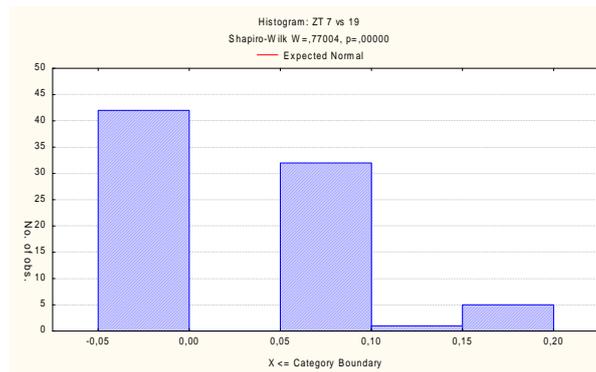
Mann-Whitney U Test (conteo exp 5 parte b 2012)										
By variable ZT										
Marked tests are significant at p < .05000										
variable	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2-sided exact p
Proporción de hemocitos tocando axón	15.00000	40.00000	0.00	-2.61116	0.009024	-2.61911	0.008816	5	5	0.007937

Proporción de hemocitos tocando el axón de la MN5 con material neuronal en su interior, en dos momentos del ciclo LD

Tabla de datos

Foto	Prep.	Dissección	Hom con fagosoma	Hom sin fagosoma	Hemocitos reconstruidos	Prop de hom con fagosoma
ZT 7						
8	UEB	III	0	1	1	
9	F030	III	1	1	2	
10	UEB	III	2	2	4	
11	F030	III	1	0	1	
12	F038	III	0	1	1	
31	F030	III	0	1	1	
Porta F038 III 4 8 10 0.40						
4	HCB	I	0	2	2	
5	F039	I	1	2	3	
6	F039	I	1	0	1	
7	UEB	I	2	0	2	
29	F039	I	1	1	2	
Porta F039 I 5 5 10 0.50						
2	F039	III	0	2	2	
3	F039	III	1	1	2	
21	HCB	III	1	0	1	
22	F039	III	1	1	2	
30	HCB	III	2	1	3	
Porta F039 III 5 5 10 0.50						
13	F040	I	2	1	3	
14	HCB	I	0	1	1	
15	F040	I	1	0	1	
16	HCB	I	0	2	2	
17	F040	I	0	1	1	
18	F040	I	1	0	1	
19	F040	I	0	1	1	
20	F040	I	1	0	1	
Porta F040 I 5 8 11 0.45						
23	F040	II	1	1	2	
24	F040	II	0	1	1	
25	F040	II	1	0	1	
26	F040	II	0	1	1	
27	HCB	II	1	0	1	
28	F040	II	0	1	1	
32	HCB	II	1	0	1	
33	F040	II	1	2	1	
34	F040	II	0	1	1	
35	F040	II	0	1	1	
Porta F040 II 5 8 11 0.45						
Promedio ZT 7 0.46						
ZT 19						
36	F042	I	0	1	1	
37	HCB	I	1	1	2	
38	F042	I	0	2	2	
39	HCB	I	0	1	1	
40	F042	I	1	1	2	
41	F042	I	1	1	2	
42	F042	I	0	0	0	
43	F042	I	1	0	1	
Porta F042 I 4 7 11 0.36						
43a	F042	II	0	1	1	
44	F042	II	0	1	1	
45	F042	II	0	0	0	
46	F042	II	0	1	1	
47	HCB	II	0	1	1	
48	F042	II	0	0	0	
49	HCB	II	2	2	4	
50	F042	II	0	0	0	
51	F042	II	1	0	1	
52	F042	II	0	1	1	
53	F042	II	1	1	2	
54	HCB	II	0	0	0	
55	F042	II	1	0	1	
56	HCB	II	0	0	0	
Porta F042 II 5 8 13 0.38						
57	F042	III	0	3	3	
58	HCB	III	0	1	1	
59	F042	III	0	2	2	
60	HCB	III	0	1	1	
61	F042	III	0	2	2	
62	F042	III	1	0	1	
Porta F042 III 1 9 10 0.10						
63	F043	II	0	2	2	
64	HCB	II	1	0	1	
65	F043	II	1	0	1	
66	F043	II	1	0	1	
67	F043	II	1	1	2	
68	F043	II	0	2	2	
69	HCB	II	0	1	1	
70	F043	II	1	1	2	
Porta F043 II 5 7 12 0.42						
71	HCB	III	1	0	1	
72	F043	III	0	1	1	
73	HCB	III	1	1	2	
74	F043	III	1	0	1	
75	HCB	III	0	2	2	
76	F043	III	0	0	0	
77	F043	III	0	1	1	
78	HCB	III	0	1	1	
79	HCB	III	0	1	1	
80	F043	III	2	2	4	
Porta F043 III 5 9 14 0.36						
Promedio ZT 7 0.32						

Según el test de normalidad Shapiro-Wilk, los datos no son normales



Según el test de homogeneidad de Levene, los datos no son homogéneos

Levene's Test for Homogeneity of Variances (conteo exp 5 2012)				
Effect: "Var1"				
Degrees of freedom for all F's: 1, 78				
	MS	MS	F	p
	Effect	Error		
ZT 7 vs 19	0,003305	0,000628	5,266575	0,024428

Como los datos no normales ni homogéneos, aplicamos el test no paramétrico Mann-Whitney. Los dos conjuntos de datos son significativamente distintos.

Mann-Whitney U Test (conteo exp 5 2012)										
By variable Var1										
Marked tests are significant at p < .05000										
variable	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
ZT 7 vs 19	1651,000	1589,000	508,0000	2,666738	0,007660	2,892104	0,003827	34	46	0,007271

Anexo II – Materiales y equipos utilizados

Materiales de mesada

Tubos de plástico de 64 por 25 mm, con comida para moscas y tapones de algodón

Portaobjetos de vidrio de 26x76mm

Cubreobjetos de vidrio 22x22 mm

Pincetas de acero inoxidable número 4 y 5

Agujas hipodérmicas de 0,5mm x 16 mm.

Tubos ependorf de 1.5 ml

Placas de Petri de 50 mm de diámetro

Placas de plástico con 12 pocillos de aproximadamente 5 mL de capacidad cada uno

Matraces de 50 mL

Pipetas automáticas de 20mL, 200mL y 1000mL, con tips

Papel de aluminio

Equipamiento

Microscopio estereoscópico de disección y fibra óptica *Fiber Optic-Heim* LQ 1100

Shaker *TS-2000A VDRL Shaker*

Vortex *Vortex-Genie 2*

Heladera

Microscopio invertido de fluorescencia *Olympus IX81* con cámara digital *Olympus DP71*

Microscopio confocal de fluorescencia *Olympus Fluoview FV300*

Computador con los programas *Adobe Photoshop CS3*, *Imaje J* y *Statistica 9* instalados

Aparato surtidor de NO para anestesia *Inject+Matic Sleeper*

Incubadora *Termaks*, configurada a 25°C, período de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad

Soluciones

Buffer Fosfato salino (PBS), pH 7,2 - 7,4 0,1 M

Para preparar la solución madre de PBS 10 x, se disolvieron las siguientes sales en una botella con un volumen pequeño de agua destilada y luego se enrasó a 1000 mL con

agua destilada

- 18,6 mM NaH₂PO₄ (2,56 g NaH₂PO₄.H₂O)
- 84,1 mM Na₂HPO₄ (11,9 g Na₂HPO₄)
- 1750 mM NaCl (102,2 g NaCl)

PBST 0,1% (PBS con detergente)

Se hizo una solución 0,1% de Tritón X-100 en PBS 1X

PBSTA 0,1% (PBST con albúmina)

Se hizo una solución 0,1% de albúmina de suero bovino en PBST 0,1%.

Paraformaldehido 4% (PFA)

- Se disolvieron 2 g de paraformaldehido en 50 mL de PBS 1x
- Se calentó y mezcló en plancha caliente, manteniendo la temperatura debajo de 60°C para evitar la disociación del compuesto
- Se agregaron unas gotas de NaOH 1N si después de unos minutos no se había aclarado la solución
- Una vez que la solución se aclarase, se ajustó pH a 7,2 - 7,4 con HCl

Glicerol 50% u 80%

Se hizo una solución de 50% u 80% de glicerol en PBS 1x

Comida para moscas

Para preparar un litro se utilizaron:

- 1 L de agua
- 80 g de Agar
- 50 g de levadura
- 90 g de harina de maíz
- 100 g de glucosa
- 3mL de ácido propiónico
- 7 mL de Nipagina (preparada en solución, 10 g de nipagina en 70mL de alcohol 95% y 30 mL de agua destilada)

- Se colocaron 750 mL de agua fría en una olla y se agregaron el agua y la levadura. Se

cocinó a fuego fuerte, revolviendo hasta alcanzar el primer hervor.

- Por otro lado, se agregó el harina de maíz a 250 mL de agua y la mezcla se agregó a la preparación anterior una vez ésta había hervido, y se continuó revolviendo hasta que se alcanzaba el hervor nuevamente.

- Se bajó el fuego y se agregó la glucosa, siempre revolviendo

- Se apagó el fuego y se esperó a que la temperatura de la preparación fuese de 60°C. Se agregó el ácido propiónico con la nipagina (mezcla de agentes antibióticos y antifúngicos).

- Se dosificó en tubos apropiados para la cría de moscas.

REFERENCIAS

Aderem, A., Underhill, D.M., (1999) *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623.

Albrecht, U. (2002) *Invited Review: Regulation of mammalian circadian clock genes*. *J. Appl. Physiol.* 92: 1348-1355.

Allada R y Chung BY (2010) *Circadian organization of behavior and physiology in Drosophila*. *Annu Rev Physiol* 72:605-624.

Awasaki T. y Ito K. (2004). *Engulfing Action of Glial Cells Is Required for Programmed Axon Pruning during Drosophila Metamorphosis*. *Curr Biol.* 14: 668–677.

Basinger S., Hoffman R., Matthes M. (1976) *Photoreceptor shedding is initiated by light in the frog retina*. *Science* 194:1074–1076.

Barlow R. (2001) *Circadian and efferent modulation of visual sensitivity*. *Prog Brain Res* 131:487–503.

Barth M., Meinertzhagen I.A., Hirsch H.V.B., Heisenberg M. (1997) *Experience-dependent developmental plasticity in the optic lobe of Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 17:1493–1504.

Barth M., Heisenberg M. (1997) *Vision affects mushroom bodies and central complex in Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* 4:219–229.

Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. 2005. *Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms*. *Nat Rev Genet.* 6:544-56.

- Brand, A. H., y Dormand, E. L. (1995) *The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the Drosophila nervous system*. Current Opinion in Neurobiology, 5:572-578.
- Brand, A.H., y Perrimon, N. (1993). *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development 118(2): 401—415
- Brand, A.H., y Phelps, C.B. (1998) *Ectopic Gene Expression in Drosophila Using GAL4 System*. Methods: A Companion to Methods in Enzymology 14, 367-379.
- Cantera R., Technau G.M.: *Glial cells phagocytose neuronal debris during the metamorphosis of the central nervous system in Drosophila melanogaster*. (1996) Dev Genes Evol. 206:277-280.
- Fearon, D.T. (1997) Seeking wisdom in innate immunity. Nature 388,323–324.
- Fernández MP, Berni J, Ceriani MF. 2008. *Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior*. PLoS Biol 6:e69.
- Franc N. C., Dimarcq J.L., Lagueux M., Hoffmann J., y Ezekowitz A. B. (1996) *Croquemort, A Novel Drosophila Hemocyte/Macrophage Receptor that Recognizes Apoptotic Cells*. Immunity, Vol. 4, 431–443.
- Fuentes-Medel Y., Logan M.A., Ashley J., Ataman B., Budnik V. (2009) *Glia and Muscle Sculpt Neuromuscular Arbors by Engulfing Destabilized Synaptic Boutons and Shed Presynaptic Debris*. PLoS Biol 7(8): e1000184.
- Fujita S.C., Zipursky S.L., Benzer S., Ferrus A., Shotwell S.L. (1982). *Monoclonal antibodies against the Drosophila nervous system*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7929ñ7933.
- Glossop NR, Hardin PE (2002) *Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals*. J Cell Sci 115:3369-3377.
- Goto A., Kadowaki T., Kitagawa Y. (2003) *Drosophila hemolymph gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects*. Developmental Biology 264:582-591.
- Hayashi M., Shimba S., y Tezuka M. (2007). *Characterization of the Molecular Clock in Mouse Peritoneal Macrophages* Biol. Pharm. Bull. 30(4) 621-626.
- Holz A., Bossinger B., Strasser T., Janning W., Klapper R. (2003) *The two origins of hemocytes in Drosophila*. Development 130:4955-62

- Honti V., Csordás G., Márkus R., Kurucz E., Jankovics F., Andó I. (2010) *Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in Drosophila melanogaster*. Mol. Immun., 47: 11-12, 1997-2004
- Keller M., Mazuch J., Abraham U., Eom G.D., Herzog E.D., et al. (2009) *A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 21407–21412.
- Konopka R.J. y Benzer S. (1971) *Clock mutants of Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 2112-2116.
- Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M. (2000) *Post-embryonic hematopoiesis in Drosophila*. Dev. Biol. 230:243–57
- Lavine M.D., Strand M.R. (2002) *Insect hemocytes and their role in immunity*. Insect Biochem. Mol. Biol. 32:1295-1309
- Lemaitre B. y Hoffmann J. (2007) *Host Defense of Drosophila melanogaster*. Annu. Rev. Immunol. 25:697-743
- Lessing, D. y Bonini, N.M. (2009) *Maintaining the brain: insight into human neurodegeneration from Drosophila melanogaster mutants*. Nature Reviews in Genetics 10:359-370.
- Lonergan T.A. (1983) *Regulation of cell shape in Euglena gracilis*. Plant Physiol 71:719–730.
- Luo L., O’Leary D. (2005) *Axon retraction and degeneration in development and disease*. Annu. Rev. Neurosci. 28, 127-156.
- Márkus R., Laurinyeczka B., Kurucz E., Hontia V., Bajusza I., Siposa B., Somogyia K., Kronhamnb J., Hultmarkb D., and Ando I. (2009) *Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 106: 4805-4809.
- Mehnert K. I. y Cantera R. (2011) *Circadian rhythms in the morphology of neurons in Drosophila*. Cell Tissue Res 344:381-389.
- Mehnert K.I., Beramendi A., Elghazali F., Negro P., Kyriacou C.P., Cantera R. (2007) *Circadian changes in Drosophila motor terminals*. Dev Neurobiol 67:415–421.
- Meister M. (2004) *Blood cells of Drosophila: cell lineages and role in host defense*. Curr. Opin. Immunol. 16:10–15

- Panda S., Hogenesch J., Kay S. (2002) *Circadian rhythms from flies to human*. Nature. 16:417(6886):329-35
- Paolicelli R., Bolasco G., Pagani F., Maggi L., Scianni M., Panzanelli P., Giustetto M., Alves Ferreira T., Guiducci E., Dumas L., Ragozzino D., Gross C. (2011) *Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development*. Science 333, 1456.
- Phelps C.B., Brand A.H. (1998) Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. Methods. 14(4):367-79.
- Pyza E., Meinertzhagen I.A. (1993) *Daily and circadian rhythms of synaptic frequency in the first visual neuropile of the housefly s (Musca domestica L.) optic lobe*. Proc R Soc Lond B Biol Sci 254:97–105.
- Pyza E., Meinertzhagen I.A. (1995) *Monopolar cell axons in the first optic neuropil of the housefly, Musca domestica L., undergo daily fluctuations in diameter that have a circadian basis*. J Neurosci 15:407–418
- Ramón y Cajal, S. (1911) *Histology of the nervous system of man and vertebrates*. Traducción de 1995. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Rivlin P.K., Clair R.M., Vilinsky I., Deitcher D.L. (2004) *Morphology and molecular organization of the adult neuromuscular junction of Drosophila*. J Comp Neurol 468:596–613.
- Ruiz S., Ferreira M.J., Casanova G., Olivera A., Cantera R. (2010) *Synaptic vesicles in motor synapses changes size and distribution during the day*. Synapse 64:14–19.
- Saxena S., Caroni P., (2007) *Mechanisms of axon degeneration: From development to disease* Prog. Neurobiol. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.07.007
- Schmucker D. (2007) *Molecular diversity of Dscam: recognition of molecular identity in neuronal wiring*. Nat. Rev. Neurosci. 8:915-20.
- Sonnenfeld M.J., Jacobs J.R. (1995) *Macrophages and glia participate in the removal of apoptotic neurons from the Drosophila embryonic nervous system*. J Comp Neurol. 359:644-652.
- Stone E.F., Fulton B.O., Ayres J.S., Pham L.N., Ziauddin J., et al. (2012) *The Circadian Clock Protein Timeless Regulates Phagocytosis of Bacteria in Drosophila*. PLoS Pathog 8(1): e1002445

Technau G.M. (1984) *Fiber number in the mushroom bodies of adult Drosophila melanogaster depends on age, sex and experience.* J Neurogenet 1:113–126.

Tepass U., Fessler L.I., Aziz A., Hartenstein V. (1994) *Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in Drosophila.* Development 120:1829-37.

Truman J.W. (1990) *Metamorphosis of the central nervous system of Drosophila.* J Neurobiol 21:1072–1084.

Wagh D.A., Rasse T.M., Asan E., Hofbauer A., Schwenkert I., Duerrbeck H., Buchner S., Dabauvalle M. C., Schmidt M., Qin G., Wichmann C., Kittel R., Sigrist S.J., Buchner E. (2006). *Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in Drosophila.* Neuron 49: 833-844.

Watson F.L., Puttmann-Holgado R., Thomas F., Lamar D.L., Hughes M., Kondo M., Rebel V.I., Schmucker D. (2005) *Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects.* Science 309:1874-8.

Watts RJ, Schuldiner O, Perrino J, Larsen C, Luo L.(2004) *Glia engulf degenerating axons during developmental axon pruning.* Curr Biol. 14(8):678-84.

Wood W., y Jacinto A. (2007) *Drosophila melanogaster embryonic haemocytes: masters of multitasking.* Nat Rev Mol Cell Biol. 8: 542-551.

Young M. W. (1998) *The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in Drosophila.* Annu. Rev. Biochem. 67:135-52.