

TESINA DE GRADO 2013

**POSIBLES EFECTOS NEURODEGENERATIVOS DE LA FALTA DE FUNCIÓN DEL
GEN *WHITE* EN *DROSOPHILA MELANOGASTER***



Bach. Mariana Marchesano

Licenciatura en Ciencias Biológicas- Orientación: Biofísica

Facultad de Ciencias – UDELAR

Orientadora: MSc. María José Ferreiro/ Co-orientador: Dr. Rafael Cantera

Departamento de Biología del Neurodesarrollo, IIBCE, MEC

INDICE

INDICE	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
LOS PROCESOS NEURODEGENERATIVOS Y EL USO DE <i>DROSOPHILA</i> COMO MODELO BIOLÓGICO PARA SU ESTUDIO	5
UN NUEVO PARADIGMA: REVERSIBILIDAD DE UN PROCESO NEURODEGENERATIVO	8
EL GEN <i>WHITE</i>	10
GENES DE PIGMENTACIÓN Y SUS EFECTOS PLEIOTRÓPICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO	11
OBJETIVOS	13
HIPÓTESIS	13
DISEÑO EXPERIMENTAL	14
<i>CEPAS UTILIZADAS</i>	14
<i>MEDICIÓN DEL LARGO DE VIDA</i>	14
<i>ENSAYO DE LOCOMOCIÓN</i>	15
<i>HISTOLOGÍA DEL CEREBRO</i>	16
RESULTADOS	18
<i>MEDICIÓN DEL LARGO DE VIDA</i>	18
<i>ENSAYO DE LOCOMOCIÓN</i>	20
<i>HISTOLOGÍA DEL CEREBRO</i>	22
DISCUSIÓN	25
ANEXOS	35
I– TABLAS DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
II– MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS	44
REFERENCIAS	47

RESUMEN

El presente trabajo plantea la hipótesis de que en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* la falta de función del gen *white* está asociada a la aparición de procesos neurodegenerativos. Esta hipótesis surgió a partir del antecedente de un sorprendente hallazgo: embriones de *Drosophila melanogaster* homocigotos mutantes nulos para los genes *salI* que codifican factores de transcripción importantes para el desarrollo y mantenimiento del tejido nervioso, presentan un grave fenotipo neurodegenerativo en el estadio 16 embrionario, que desaparece en el estadio 17 embrionario, sugiriendo por primera vez la reversibilidad de un proceso de neurodegeneración. Esta reversión de neurodegeneración está asociada a un perfil de transcripción característico en diversos genes de la mosca. El gen *white* forma parte de la extensa lista de genes cuya desregulación se vincula a este proceso: está sub-expresado en embriones mutantes homocigotos *salI*^{-/-} de estadio 17 (donde se observa recuperación morfológica del tejido nervioso) respecto a embriones mutantes homocigotos de estadio 16 (donde se observa neurodegeneración) y respecto a embriones silvestre (“wild type”) del mismo estadio de desarrollo.

Para estudiar los posibles efectos neurodegenerativos de la mutación nula en el gen *white* en moscas machos y hembras adultas, el abordaje experimental se basó fundamentalmente en la detección y cuantificación en los mutantes nulos *white* de tres parámetros ampliamente asociados a neurodegeneración: acortamiento del largo de vida, deficiencias en la locomoción e histología anormal del cerebro (presencia de vacuolas).

De los resultados obtenidos de la comparación entre moscas mutantes *white* y normales (salvajes) dos en particular merecen especial consideración: las diferencias significativas en el largo de vida y la tendencia observada en los ensayos de locomoción: las hembras *white* viven menos que las wild-type; los machos *white* tienen locomoción deficiente respecto a los wild-type. La ausencia de efecto de la falta de función del gen *white* en la duración de la vida en machos y en la locomoción en las hembras podría ser explicada en parte por la localización del gen *white* en el cromosoma sexual X y consecuente compensación de dosis génica en los machos así como por las diferencias en los perfiles de expresión del gen entre machos y hembras.

Estos resultados estarían sugiriendo preliminarmente, tal cual se plantea en nuestra hipótesis, que la falta de función del gen *white* produce neurodegeneración, aunque de manera sexo-específica. Esto puede vincularse con el rol de White en el procesamiento de las aminoras biógenas en el cerebro y la sensibilidad diferenciada a los receptores aminérgicos. El rol de White en el transporte de metabolitos neuroactivos de la vía de la kinurenina emerge como conjetura posible y línea a desarrollar en próximas investigaciones.

De cualquier forma se corroboran diferencias importantes indicativas de neurodegeneración en el genotipo mutante *white* en relación al salvaje. Esto puede tener enormes implicancias condicionando el uso de las cepas mutantes *white* en la experimentación con *Drosophila*.

INTRODUCCIÓN

Los procesos neurodegenerativos y el uso de *Drosophila* como modelo biológico para su estudio

Los procesos neurodegenerativos comprenden alteraciones que afectan progresivamente la función y el mantenimiento de poblaciones celulares específicas del sistema nervioso y se caracterizan por generar defectos comportamentales, cognitivos y físicos que disminuyen la esperanza de vida del individuo que los padece, siendo comunes en diversidad de organismos (Lessig & Bonini, 2009; Lu & Vogel, 2009). El desarrollo de estas enfermedades es el resultado de complejas interacciones a nivel molecular, celular, histológico y del organismo en general y se asocia a una gran variedad de factores ambientales y genéticos (revisión en Hirth, 2010). No obstante, en general, las causas de los procesos neurodegenerativos no son claras. En humanos, el factor de riesgo principal continúa siendo la edad, suponiendo un serio problema socioeconómico en las sociedades desarrolladas, donde el largo de vida se ha ido incrementando paulatinamente. Sin embargo muy poco se sabe acerca de los mecanismos patogénicos relacionados y como estos impactan en la neurodegeneración.

Las enfermedades neurodegenerativas humanas se categorizan por ciertas manifestaciones clínicas como desórdenes del movimiento (Parkinson, Huntington, enfermedad de las motoneuronas) y demencias (Alzheimer, demencia fronto-temporal), por el tipo de neuronas afectadas (dopaminérgicas, GABAérgicas, motoneuronas), y según su origen sea hereditario (casos familiares) o no (casos esporádicos) (Hirth, 2010). Sin embargo, carecen de tratamientos efectivos y los que se ofrecen son en su mayoría sintomáticos o paliativos. Por este motivo actualmente existe un gran número de proyectos científicos orientados a comprender estas patologías y descubrir mecanismos que puedan enlentecerlas, o incluso revertirlas. Muchas investigaciones se centran en el estudio de los casos esporádicos, que son los más frecuentes. En ellas se apunta a dilucidar la naturaleza del contenido de inclusiones proteicas que se acumulan en el medio extracelular o en compartimentos intracelulares de las neuronas afectadas (Glenner & Wong, , 1984; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Tanzi *et al.*, 1988; Neumann *et al.*, 2006; Winderickx *et al.*, 2008). Estos agregados proteicos son característicos de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas. Las proteínas están usualmente modificadas (fragmentadas, fosforiladas, ubiquitinizadas) y su identificación permite indagar en los mecanismos subyacentes a las principales vías que causan la patogénesis. Las formas familiares representan una minoría de todos los casos (un 5%). Muestran características clínicas similares a los casos esporádicos lo que ha permitido profundizar en el estudio del origen, causa y mecanismos subyacentes de estas enfermedades en general (Satake *et al.*, 2009; Simón-Sánchez *et al.*, 2009).

El estudio de los factores genéticos determinantes de las enfermedades neurodegenerativas humanas ha sido decisivo en el desarrollo de nuestro entendimiento de la etiología y progresión de tales

enfermedades. Sin embargo las limitaciones de los estudios genéticos en humanos dificultan un análisis detallado de genes y vías involucradas debido a sus complejos patrones de herencia, la falta de suficientes datos genealógicos familiares y la heterogeneidad genética de la población. Por estos motivos se ha recurrido a la utilización de modelos animales que permiten estudiar experimentalmente aspectos funcionales específicos de los genes o proteínas identificados.

Los modelos animales para el estudio de enfermedades neurodegenerativas abarcan desde levaduras y nemátodos a mamíferos y cultivos celulares humanos y han proporcionado nuevos conocimientos sobre los procesos patológicos asociados a estas enfermedades (Winderickx *et al.*, 2008; Teschendorf & Link, 2009). Sin embargo la mayoría de estos modelos no cumple con los criterios esenciales requeridos para el estudio de la neurodegeneración humana como son el presentar disfunciones cognitivas, comportamentales y físicas causadas por la neurodegeneración de un tipo celular específico, fisiopatología celular (incluyendo la formación de agregados), patrones claros de herencia, información genealógica que abarque varias generaciones y homogeneidad genética de la población. Un organismo que cumple con todos estos criterios es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster es un artrópodo perteneciente a la familia Drosophilidae (insectos dípteros cosmopolitas), y ha sido una herramienta clave en gran parte del trabajo para identificar genes involucrados en la integridad neuronal y en descubrir sus funciones a nivel molecular (revisión en Hirth, 2010). Presenta diversas ventajas que la convierten en un modelo biológico ideal para el estudio de enfermedades humanas, entre ellas, un largo de vida relativamente corto (de 40 a 120 días dependiendo de la dieta y el stress) lo que permite acceder a información caso-específica desde la concepción a la muerte del individuo y por tanto estudiar la formación y progresión de una enfermedad en relación a la edad. También proporciona conocimiento acerca del foco de una enfermedad, su momento y lugar de origen, lo que permite la visualización y manipulación de la formación y progresión de la enfermedad. Puede dar lugar a un gran número de descendientes genéticamente idénticos permitiendo deducir rasgos cuantitativos y obtener conocimientos estadísticamente significativos sobre los mecanismos patogénicos. Su genoma completo está secuenciado (<http://www.fruitfly.org/>). Posee unos 13600 genes localizados en solo 4 pares de cromosomas, en comparación con los 27000 genes humanos localizados en 23 pares (Adams *et al.*, 2000; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Posee un cerebro lo suficientemente sofisticado (comparado, por ejemplo, con *C. elegans*) pero todavía lo suficientemente pequeño (comparado con el ratón) como para permitir el análisis profundo y detallado de procesos comportamentales complejos como aprendizaje y memoria, sueño y agresión (Heisenberg, 1997). Su mantenimiento en el laboratorio es sencillo y económico. Esto ha permitido el desarrollo sostenido de herramientas genéticas tales como la construcción de transgénicos para la sobre-expresión o silenciamiento de genes mediante ARNi así como una amplia variedad de mutantes (Bernards *et al.*, 2001). Por lo mismo, se posee conocimiento detallado acerca de su

anatomía, fisiología y biología del desarrollo accesible a través de grandes bases de datos (<http://flybase.org/>). Por último aunque no menos importante, si bien en el curso de la evolución, el linaje de los artrópodos se separó del de los vertebrados hace más de 600 millones de años, muchos genes y procesos descubiertos primero en *Drosophila* han probado estar altamente conservados en el humano y otros organismos (Adoutte *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2004). Esto ha derivado en el descubrimiento de principios biológicos fundamentales como la validación de la teoría cromosómica de herencia y la primera descripción experimental del gen como unidad funcional (Sturtevant & Lewis, 2001). El análisis comparativo de todo el genoma secuenciado revela notables similitudes en la composición estructural de genes individuales de *Homo sapiens* y *Drosophila melanogaster* (Rubin *et al.*, 2000).

Muchos de los genes implicados en las formas familiares de neurodegeneración en humanos tienen por lo menos un ortólogo en *Drosophila* y también en ésta causan patologías neurodegenerativas cuando están mutados (revisión en Hirth, 2010). Por ejemplo, las moscas con mutaciones en el gen *parkina* (homólogo al gen humano PARK2 asociado a la enfermedad de Parkinson) tienen acortamiento del largo de vida, deficiencias en la locomoción y pérdida de neuronas dopaminérgicas tal como ocurre en humanos (Scherzer *et al.*, 2003). Asimismo, en algunos casos se ha descubierto que la homología llega al extremo de que el gen humano normal puede compensar la falta de función de su homólogo mutado en la mosca, tal como ocurre por ejemplo en moscas mutantes *parkina*, dónde la expresión transgénica del gen PARK2 elimina el fenotipo neurodegenerativo (Leuzinger *et al.*, 1998; Exner *et al.*, 2007). Estos genes, asociados a neurodegeneración y conservados entre ambos organismos, tienen que ver generalmente con procesos celulares fundamentales como la formación de sinapsis, la comunicación neuronal, el tráfico transmembrana y la muerte celular (revisión en Hirth, 2010). La mayoría están expresados ampliamente: o son ubicuos o están enriquecidos a lo largo del Sistema Nervioso Central (SNC). Por último, los defectos de comportamiento son comunes en las moscas mutantes para estos genes, lo que permite realizar diversos análisis para determinar su asociación con patologías neurodegenerativas con cierta facilidad.

Se pueden distinguir cuatro aproximaciones que han sido aplicadas exitosamente al uso de *Drosophila* para estudiar neurodegeneración: los screens genéticos, la sobre-expresión transgénica (para modelar enfermedades causadas por ganancia de función tóxica o para revertir el efecto de una mutación), la inhibición de genes endógenos (para modelar enfermedades familiares transmitidas en un modo recesivo causadas por un mecanismo de pérdida de función) y el abordaje farmacológico (Lu, 2009; Lessing & Bonini, 2009).

En el primer abordaje para identificar genes de neurodegeneración, los screens genéticos, se seleccionan moscas adultas de linajes mutantes viables con un defecto comportamental (ej. acortamiento del largo de vida) y luego se busca detectar degeneración en el SNC a través de screens histológicos. Estudios pioneros llevados a cabo en el laboratorio de Benzer condujeron a la identificación de un gran

número de mutantes de *Drosophila* como *bubblegum*, *swisscheese*, y *drop-dead* asociados a distintos patrones de degeneración en regiones cerebrales específicas (Rogina *et al.*, 1997; Kretzschmar *et al.*, 1997). Screens recientes han identificado otros genes asociados a neurodegeneración investigando mutantes que reaccionaban anormalmente a un cambio en la temperatura o al estrés mecánico, o con ritmos circadianos alterados o con deficiencias en el reflejo de geotaxis (Palladino *et al.*, 2002; Fergestad *et al.*, 2006; Rezaval *et al.*, 2008). Una desventaja de esta aproximación es que los fenotipos neurodegenerativos en estos mutantes tienden a ser muy generalizados por lo que resulta difícil distinguir una relación directa entre la vulnerabilidad de un tipo celular específico y una enfermedad neurodegenerativa.

La aproximación de un gen candidato es una alternativa a los screens. De este modo han sido identificados y caracterizados genes de *Drosophila* ortólogos a genes de ratón o humanos que causan neurodegeneración (Lessig & Bonini, 2010). En los casos en los cuales una mutación ha sido asociada a un proceso neurodegenerativo, en humanos o mosca, el efecto puede deberse a pérdida de función o a ganancia de función (frecuentemente generando una función "tóxica"). Consecuentemente, modelos de estas enfermedades pueden establecerse en *Drosophila* por expresión transgénica de las proteínas tóxicas. En muchos casos, animales transgénicos sobre-expresando las versiones "normales" de los genes asociados a la enfermedad desarrollan fenotipos casi idénticos a los mutantes (Jackson *et al.*, 1998). Otras enfermedades neurodegenerativas familiares se transmiten recesivamente, sugiriendo que son probablemente causadas por pérdida de función. Más de 40 genes de *Drosophila melanogaster* han sido descubiertos para los cuales mutaciones recesivas con pérdida de función causan degeneración del SNC en adultos (revisión en Lessig & Bonini, 2009). Muchos de ellos son esporádicos sin causa conocida. El método para modelar estas enfermedades es alterar la función de genes de *Drosophila* endógenos homólogos a los genes humanos asociados a la enfermedad a través de técnicas para interrumpir su función (Yang *et al.*, 2003; Rong & Golic, 2000).

Un nuevo paradigma: reversibilidad de un proceso neurodegenerativo

Durante mucho tiempo prevaleció la idea de que los procesos neurodegenerativos son irreversibles. Afortunadamente, evidencia reciente sugiere lo contrario (Cantera *et al.*, 2002).

Cantera y colaboradores investigaron durante varios años la función de ciertas proteínas que se expresan en el SNC durante el desarrollo embrionario en *Drosophila* y otros organismos. Estas proteínas, denominadas Sall, son factores de transcripción con varios dominios dedos de Zinc codificadas por genes de la familia *spalt* (*sall*). En humanos existen 4 genes *SALL* (*SALL1-4*); en *Drosophila*, los dos genes *sall* principales son *spalt major* (*salm*) y *spalt-related* (*salr*). Las mutaciones con pérdida de función en estos genes resultan en malformaciones de diversos tejidos, incluyendo el tejido nervioso, tanto en *Drosophila*

como en humanos (de Celis *et al.*, 2009). En *Drosophila*, estas mutaciones son letales embrionarias en homocigosis, ya que afectan al sistema respiratorio además del sistema nervioso.

Cantera y colaboradores (2002) mostraron que embriones de *Drosophila* homocigotas mutantes nulos *sall* (con una deficiencia que elimina completamente los genes *salm* y *salr*), presentaban en el cerebro un fenotipo neurodegenerativo muy grave en el estadio 16 de desarrollo embrionario (13-16 hs luego de la puesta del huevo). Este fenotipo se caracterizaba por pérdida de adhesión celular, defectos del citoesqueleto neuronal, incremento extraordinario del espacio extracelular y presencia de vacuolas y restos de membrana, tal como muestra la Figura 1 (Cantera *et al.*, 2002). Pocas horas más tarde, en el estadio embrionario 17 (16 a 18 hs), el fenotipo neurodegenerativo de estos mutantes parece revertirse parcialmente (Figura 1), indicando la posibilidad de una reorganización transcripcional del genoma mutante que pudiera compensar la falta de *sall*.

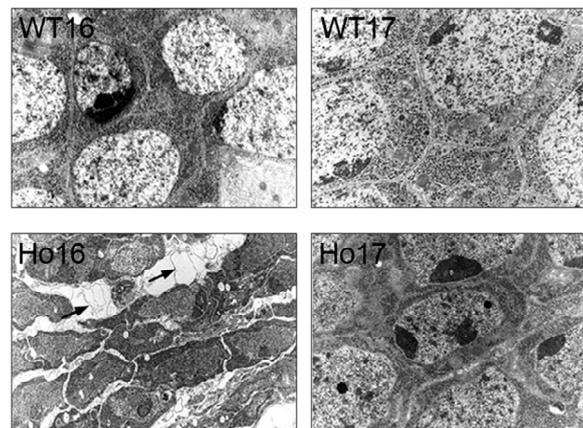


Figura 1. Estadios de neurodegeneración y reversión en embriones de *Drosophila* mutantes *sall*. Comparación ultraestructural del CNS en embriones WT y mutantes *sall* homocigotos en los estadios 16 y 17. Los embriones Ho16 presentan cuerpos celulares más pequeños, separados por espacios extracelulares agrandados, ocupados por vacuolas y otros restos de membrana (flechas), en contraste con los embriones WT16 que presentan un espacio extracelular normal. Unas horas después, este fenotipo no se observa en los embriones Ho17. Figura adaptada de Cantera *et al.*, 2002.

En base a estos antecedentes, Ferreiro y colaboradores (2012), plantearon la hipótesis de que en el estadio 16 el transcriptoma de los embriones mutantes nulos *sall* estaría enriquecido en genes asociados principalmente a la neurodegeneración, mientras que en el estadio 17 estaría enriquecido en genes asociados principalmente a neuroprotección. Para investigar esta hipótesis, secuenciaron los transcriptomas de embriones mutantes *sall* homocigotos, heterocigotos y silvestres (WT) de estadio 16 y 17 por mARN-Seq (Illumina). El análisis de expresión diferencial de todos los genotipos y estadios comparados detectó cambios altamente significativos ($p < 0.001$) en la expresión de cientos de genes, la mayoría de los cuales están sobre-expresados en ambos estadios en el mutante *sall* homocigoto respecto al WT (Figura 2).

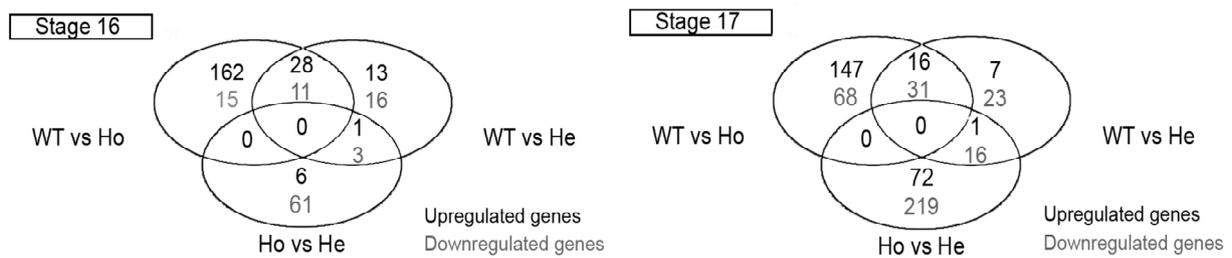


Figura 2. Análisis de expresión diferencial de embriones de *Drosophila* normales y mutantes *sall*. Diagramas de Venn simbolizando el solapamiento de expresión diferencial entre embriones WT, y mutantes *sall* heterocigotos (He) y homocigotos (Ho) a estadio 16 y 17 de desarrollo embrionario (neurodegeneración y reversión respectivamente). Los números representan genes sobre expresados (negro: upregulated) y sub-expresados (gris: downregulated) en el segundo genotipo respecto al primero (ej. WT vs Ho representa el número de genes regulados diferencialmente (misregulated) en los homocigotos *sall* respecto al WT). Figura adaptada de Ferreiro *et al.*, 2012.

Entre estos genes se encontró cerca de un 5 % que ya habían sido asociadas a neurodegeneración o neuroprotección tanto en *Drosophila* como en humanos (revisión en Bonini *et al.*, 2002; Greene *et al.*, 2005; Fernandez-Funez *et al.*, 2007; Gruenewald *et al.*, 2009). El 95 % restante de los genes regulados diferencialmente en el mutante *sall* en los estadios 16 y 17 embrionarios, podrían potencialmente asociarse a neurodegeneración y neuroprotección, respectivamente. Uno de estos genes “candidatos a neuroprotectores” es el gen *white* (CG2759), que aparece sub-expresado en el mutante *sall* homocigota respecto al WT en estadio 17 (estadio de reversión) y respecto al mutante *sall* homocigota de estadio 16 (estadio de neurodegeneración).

El gen *white*

En enero de 1910, Thomas Hunt Morgan descubrió el primer mutante de *Drosophila*: un macho de ojos blancos. Nombró al gen mutante *white* y pronto demostró que residía en el cromosoma sexual X. Esta fue la primera identificación de un gen, la primera localización de un gen específico en un cromosoma particular y el comienzo de la genética moderna. Desde entonces, el gen *white* ha estado asociado a la determinación de varios principios genéticos fundamentales, además de ser utilizado masivamente como marcador para todo tipo de experimentos (revisión en Greene, 2010).

El gen *white* está involucrado en la producción y distribución de los pigmentos omocromo (marrón) y pteridina (rojo) que se encuentran en el ojo de las moscas adultas, así como en la vaina de los testículos en los adultos y en los tubos de Malpighi en la larva. Presenta picos de expresión en estadios larvales tardíos, y principalmente durante el período pupal. Codifica para una proteína que pertenece a la familia de los transportadores ABC (ATP-binding cassette), que se expresa en diversos tejidos (Sullivan & Sullivan, 1975;

O'Hare *et al.*, 1984; Mount, 1987). Estas proteínas usan energía generada por la hidrólisis de ATP para transportar sustratos específicos a través de la bicapa lipídica (Schmitz *et al.*, 2001). En el ojo, White se acopla a Brown o Scarlet para transportar moléculas de pigmento derivadas de guanina o triptófano respectivamente a los gránulos, dando su color rojo característico en las moscas normales (Borycz *et al.*, 2008) (Figura 3). Los alelos extremos de *white* así como las deficiencias remueven tanto los pigmentos marrones como los rojos. Los mutantes *white* son positivamente fototácticos, sin embargo carecen de respuesta optomotora (Kalmus, 1943) y presentan un electroretinograma anormal (Wu & Wong, 1977).

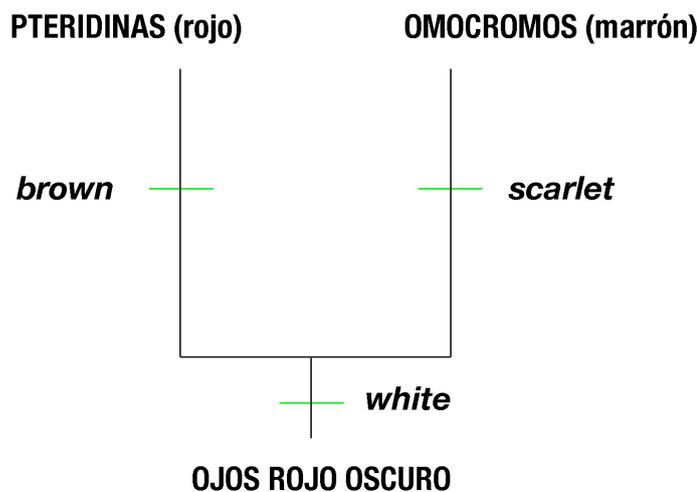


Figura 3. Esquema sobre el rol de los genes *brown*, *scarlet* y *white* en la vía de los omocromos y de las pteridinas. *White* se acopla a *Brown* o *Scarlet* para transportar las moléculas de pigmento a los gránulos dando el color de ojo característico a las moscas normales. En ausencia de *White*, los gránulos no se forman adecuadamente y la mosca no desarrolla el color rojo normal.

Genes de pigmentación y sus efectos pleiotrópicos en el sistema nervioso

Los pigmentos oculares protegen las neuronas fotorreceptoras del exceso de luz (Phillips & Forrest, 1980). Como resultado, los mutantes en pigmentación de ojos tienen visión defectuosa, especialmente a altas intensidades de luz (Borycz, 2008). Estos defectos no son sólo atribuibles a la falta de protección frente a la luz directa. Por ejemplo, se ha demostrado que mamíferos albinos de muchas especies tienen defectos neurológicos además de retinales (Guillery, 1986; Dräger & Balkema, 1987; Jeffery, 1997 citados por Borycz *et al.*, 2008).

En *Drosophila*, varios mutantes de pigmentación presentan defectos neurológicos que no se restringen al sistema visual. Por ejemplo, mutantes para la vía de la kinurenina del metabolismo del triptófano, un precursor en la biosíntesis del pigmento omocromo marrón, exhiben defectos neuronales como déficits en el aprendizaje y memoria y cambios volumétricos en los cuerpos pedunculados (o "Mushroom

bodies”) del cerebro (Phillips & Forrest, 1980; Savvateeva *et al.*, 2000). Otros mutantes de pigmentación muestran disminución de la inmunoreactividad a la CSP (cysteine string protein), proteína regulada por Ca^{2+} que actúa en las etapas tardías de la exocitosis de vesículas sinápticas (Zinsmaier *et al.*, 1990).

En el caso particular de *white*, existe evidencia experimental de que la mutación afecta procesos biológicos extra-oculares en el tejido nervioso como el transporte de cGMP (Evans, 2008), el comportamiento de cortejo en el macho (Zhang & Odenwald, 1995; Hing & Carlson, 1996; Nilsson *et al.*, 2000) y el proceso de síntesis de aminas (Campbell *et al.*, 2001). Se ha demostrado que, en relación a moscas normales (WT), los mutantes *white* poseen menores niveles de aminas biógenas (Borycz *et al.*, 2008; Sitaraman, 2008), muestran decaimiento de la actividad locomotora inicial sobre “open-field” (Liu *et al.*, 2007) y exhiben bajos niveles de desempeño en performances de memoria en heat-box (Sitaraman, 2008) y en aprendizaje espacial (Diegelmann *et al.*, 2006). Además, los machos mutantes *white* presentan resistencia a ciertos anestésicos volátiles, con diferencias comportamentales atribuibles a defectos neuronales (Campbell & Nash, 2001). Por otra parte, mutaciones nulas en el gen *white* agravan el fenotipo de ojo rugoso causado por expresión del gen *gl-tau* en un modelo de tautopatía (Ambegaokar *et al.*, 2010).

El alelo mutante del gen *white* que se utilizará en este trabajo de tesina de fin de carrera es el denominado w^{1118} (mutación espontánea con pérdida de función) (Figura 4), que se asocia a los siguientes fenotipos: color de ojo blanco (Lloyd *et al.*, 2002) resistencia a anestésicos volátiles (Campbell & Nash, 2001), comportamiento de cortejo defectuoso en el macho (Lee *et al.*, 2008), comportamiento locomotor defectuoso (Liu *et al.*, 2007) y deficiencias en la memoria (Sitaraman *et al.*, 2008).



Figura 4. Diferencias fenotípicas entre moscas *Drosophila* adultas silvestres y mutantes *white*. La morfología externa es similar, excepto por el color del ojo: rojo en las moscas wild-type y blanco en los mutantes *white*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar genes que tengan función neuroprotectora en el sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster*, utilizando como modelo la reversión del fenotipo de neurodegeneración de *sall* en el estadio embrionario 17.

Objetivo específico

Determinar si la mutación de falta de función del gen *white* de *Drosophila melanogaster* causa neurodegeneración.

HIPÓTESIS

La mutación de falta de función del gen *white* produce efectos asociados a neurodegeneración.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La estrategia experimental para confirmar la posible asociación del gen *white* con neurodegeneración consistió en el estudio de moscas con mutación de falta de función del gen mediante cuantificación de tres parámetros usados frecuentemente en este tipo de estudios: largo de vida, locomoción e histología del cerebro.

Cepas utilizadas

Se utilizaron moscas adultas machos y hembras de la cepa w^{1118} -mutantes nulos para el gen *white*, mantenidas en incubadora a 25 °C, en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas, en un medio de cultivo consistente en levadura, glucosa, harina de maíz, agar, nipagin y ácido propiónico según receta estándar. Como control se utilizó la cepa salvaje (WT) Oregon-R. Para todos los experimentos se seleccionaron moscas vírgenes (al momento de emergencia de la pupa, 0 días de edad). Durante la colecta las moscas fueron anestesiadas con Óxido Nítrico -generado por un surtidor Inject+Matic Sleeper- y posteriormente identificadas y separadas por sexo bajo lupa estereoscópica. Para los ensayos de locomoción e histología cerebral también se trabajó con moscas adultas de ambos sexos de 5, 25 y 45 días de edad.

Medición del largo de vida

No todas las muertes tempranas se asocian a neurodegeneración, pero todos los fenotipos neurodegenerativos están acompañados de un acortamiento del largo de vida de los individuos que los padecen (Lessing & Bonini, 2009). Una primera aproximación para establecer si una mutación en determinado gen tiene potencial efecto neurodegenerativo consiste en la observación de la curva de vida de los mutantes para dicho gen. Entre las ventajas de esta técnica se encuentra la facilidad con que se puede realizar y correlacionar los resultados con las enfermedades humanas. Como desventajas puede citarse el consumo de tiempo y la escasa información que proporciona esta técnica sobre la patología en sí (Lessing & Bonini, 2009).

Para los ensayos de medición del largo de vida se emplearon 60 moscas de cada genotipo y sexo (machos y hembras mutantes *white* y WT). Estas fueron separadas en grupos de 10 moscas y mantenidas en tubos de cultivo bajo condiciones estándar (25°C, ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas) desde el primer día de vida adulta (momento de emergencia de la pupa). El medio de cultivo fue reemplazado cada 5 días y se contabilizó el número de moscas muertas por tubo día por medio, hasta que todos los individuos murieran. Los datos obtenidos fueron ingresados en tablas Excel (Ver Anexo I), graficados por genotipo y sexo, y sometidos a análisis estadísticos empleando el programa GraphPad Prism 5 (Versión 5.01 GraphPad

Software, Inc.) y los tests Log-rank/Mantel-Cox (Cox, 1959, 1972; Mantel, 1966) y Gehan-Breslow-Wilcoxon (Gehan, 1965 a,b), estableciendo un intervalo de confianza al nivel de 95%, con un $P < 0.0001$.

Ensayo de locomoción

Casi todos los fenotipos neurodegenerativos estudiados en *Drosophila* presentan algún defecto de locomoción cuantificable con el ensayo de “climbing” (también llamado “geotaxis negativa”) (Ali *et al.*, 2011), que consiste básicamente en medir la capacidad de las moscas de trepar por las paredes de un tubo luego de un golpe que induce un reflejo geotáxico negativo que las obliga a caer al fondo del tubo. Este test de movilidad permite observar ataxia, síntoma de algunas enfermedades neurodegenerativas en humanos (ej. Parkinson) y detectar otras deficiencias en la motricidad. Una ventaja de esta técnica es que permite testear gran número de moscas con relativa rapidez y que el comportamiento registrado es robusto (para la mayoría de las cepas ~90% de las moscas comenzarán inmediatamente a trepar por las paredes del tubo luego de haber sido golpeadas hacia el fondo). Entre las desventajas de la técnica puede citarse que la pérdida del reflejo geotáxico observable en moscas mutantes con neurodegeneración puede deberse a otros factores (Lessing & Bonini, 2009).

Para los ensayos de “climbing” se emplearon 30 moscas de cada genotipo y sexo (machos y hembras mutantes *white* y WT). Estas fueron separadas en grupos de 10 moscas y mantenidas en tubos de cultivo bajo condiciones estándar (25°C, ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas) desde el primer día de vida adulta (momento de emergencia de la pupa), y el medio de cultivo fue reemplazado cada 5 días. Como las neurodegeneraciones son progresivas, el ensayo se realizó en tres momentos de la vida de las mismas moscas (5, 25 y 45 días) para investigar un posible efecto de la edad en la locomoción. El procedimiento consistió en registrar el número de moscas de cada genotipo, sexo y edad que traspasaban una marca ubicada a 8 cm de la base de un tubo de 2.5 de diámetro, en los 10 segundos posteriores a ocho golpes que las obligaban a caer hacia el fondo del tubo. Cada tubo de moscas se sometió a 10 pruebas, dejando 1 minuto de aclimatación una vez colocadas las moscas en el tubo y 1 minuto de descanso entre una prueba y otra. Todos los ensayos se realizaron bajo luz roja para descartar efectos de locomoción correspondientes a fototaxis.

Los datos obtenidos fueron ingresados en tablas Excel (Ver Anexo I), graficados por genotipo, sexo y edad, y sometidos a análisis estadísticos empleando el programa STATISTICA Statistics (Versión 7.0 StatSoft, Inc.). Para determinar la distribución normal o no de las muestras se aplicó el test SHAPIRO WILK (Shapiro, Wilk, & Chen, 1968) y para analizar la homogeneidad de varianzas se aplicó el test de Levene (Brown & Forsythe, 1974). Debido a que se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianzas de todas las muestras analizadas en estos ensayos, se emplearon test paramétricos (ANOVA) para finalmente determinar la existencia o no de diferencias estadísticas.

Histología del cerebro

La aproximación más común usada para evaluar neurodegeneración en *Drosophila* es el examen histológico del cerebro (Lessing & Bonini, 2009). Las lesiones más llamativas en los preparados histológicos de cerebro de individuos con neurodegeneración son las vacuolas o agujeros en el neuropilo central o corteza externa donde residen la mayor parte de los cuerpos neuronales y las malformaciones axonales (Lessing & Bonini, 2009). Una ventaja de este método es que es un ensayo directo del defecto del SNC causado por la neurodegeneración. Una desventaja: su relativamente baja resolución, ya que en algunos fenotipos neurodegenerativos no se detecta vacuolización o malformaciones generales del SNC sino solamente eliminación o reducción de poblaciones neuronales específicas, lo cual solo puede ser detectado con marcadores neuronales específicos (Lessing & Bonini, 2009).

Para identificar patrones histológicos asociados a neurodegeneración en los mutantes *white*, se realizó un examen de cerebros montados completos (whole mounting) con microscopía laser confocal. Se compararon entre 5 y 7 moscas mutantes *white* con moscas WT de la misma edad, en dos momentos distintos del ciclo de vida (a los 5 y a los 45 días de edad, moscas jóvenes y envejecidas respectivamente). Para ello se utilizó la técnica de inmunohistoquímica con un anticuerpo primario monoclonal de ratón específico para el tejido nervioso (22C10; del Developmental Studies Hybridoma Bank de la Universidad de Iowa). El antígeno de este anticuerpo -la proteína Futsh- se asocia a los microtúbulos del citoesqueleto axonal de algunas neuronas del SNC y de todas las neuronas del Sistema Nervioso Periférico (SNP), (Fujita, 1982; Zipursky, 1984). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de cabra anti-ratón (ALEXA 488, Molecular Probes A-11029), que fluoresce en verde.

Previo a la incorporación de los anticuerpos, las moscas fueron anestesiadas con Óxido Nítrico generado por un surtidor Inject+Matic Sleeper. Se sumergieron en PBT 1X (Receta en Anexo II) para perder hidrofobicidad, se decapitaron con una aguja y se les quitó la proboscis. Luego, las cabezas se sumergieron en paraformaldehído (PAF) 4% (Receta en Anexo II) sobre hielo. A los 20 minutos se realizó la disección de los cerebros y se volvió al PAF 4% hasta completar las 2 horas de fijación. Luego se realizó la permeabilización de los cerebros con detergente: 3 lavados de 5 minutos con PBT 1X, seguidos de 4 lavados de 15 minutos con PBT 0,1%.

Las muestras se incubaron luego toda la noche en heladera (ON, 18 horas) en el anticuerpo primario 22c10 a una concentración 1:50 (diluído en PBT 0,1%), previo paso por vórtex unos segundos y 30 minutos de agitación en SHAKER. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBT 1X, seguidos de 4 lavados de 15 minutos con PBT 0,1% y las muestras se incubaron en el anticuerpo secundario Anti Mouse ALEXA 488 a una concentración 1:400 (diluído en PBT 0,1%), previo paso por vórtex unos segundos, durante 2 horas en oscuridad (en agitación). Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBT 0,1X y 3 lavados de 10 minutos en PBS 1X y se aclaró durante 15 minutos con Glycerol 50%.

Finalmente, los preparados fueron montados en glicerol 80% y analizados con un equipo de microscopía láser confocal (Olympus Modelo BX61, módulo confocal FV300, Cámara CCDDP70), usando el láser 488 y los objetivos de 20x y 40x. Las imágenes fueron obtenidas con el programa Olympus Fluoview. Se tomaron fotos panorámicas de cada preparado con el objetivo 20X manteniendo el seteadado de fluorescencia (LASER: 15 / RESOLUCIÓN: 1024x1024/ PROYECCIÓN: 3x1 μ m), y se realizaron acercamientos con el objetivo 40X (LASER: 15 / RESOLUCIÓN: 1024x1024/ PROYECCIÓN: 9x 0,5 μ m y 15x0,5 μ m). Las imágenes resultantes de todas las proyecciones por muestra analizada fueron procesadas (montaje de stacks, ajuste de detalles de brillo y color) con el programa Image J (versión 1.42 q del National Institutes of Health).

RESULTADOS

A continuación se exponen los resultados obtenidos con cada uno de los tres abordajes metodológicos empleados para determinar la posible asociación del gen *white* con procesos de neurodegeneración.

Medición del largo de vida

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el largo de vida de las hembras mutantes *white* respecto a las WT (Log-rank (Mantel-Cox) Test, $X^2=43.55$, P valor < 0.0001; Gehan-Breslow-Wilcoxon Test, $X^2=43.55$, P valor < 0.0001. Ver Anexo I): las hembras *white* viven menos. Como se observa en la representación gráfica de la figura 5-A, la curva de vida correspondiente a las hembras *white* se separa sensiblemente de la curva de vida de las hembras WT desde un primer momento, acentuándose la diferencia durante la fase exponencial de las curvas. La última hembra superviviente WT alcanzó los 105 días de edad, mientras que la última hembra *white* vivió 85 días. El primer tubo en alcanzar el 50% de mortalidad correspondió a hembras *white* y lo hizo entre los 61 y 63 días de edad de las moscas.

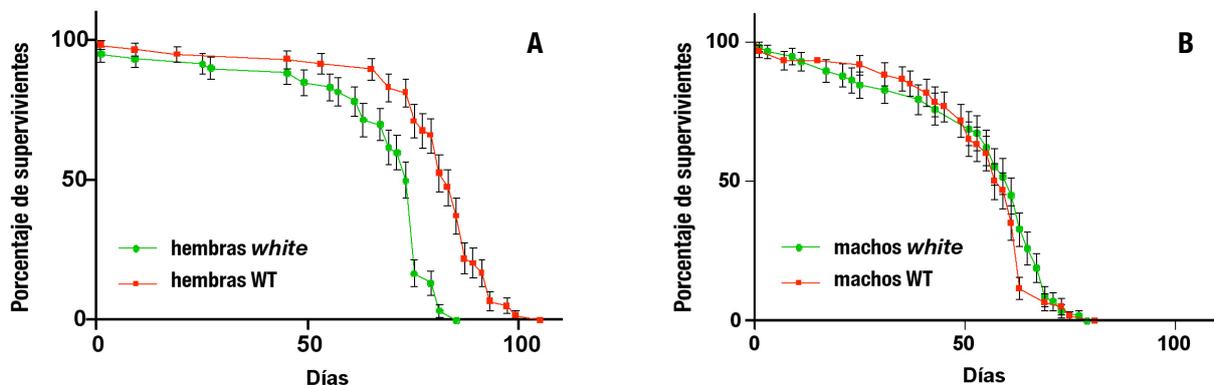


Figura 5. Análisis de largo de vida. Curvas de comparación *white* vs. wild type (A) hembras (B) machos. El largo de vida se muestra como porcentaje de supervivientes (P < 0.05, determinado por Log-rank test). Barras de error = SEM.

La comparación estadística del largo de vida de machos *white* y machos WT, en cambio, no arrojó diferencias significativas, tal como muestra la Figura 5-B (Log-rank (Mantel-Cox) Test, $X^2=0.7183$, P valor = 0.3967, Gehan-Breslow-Wilcoxon Test, $X^2=0.9098$ y P valor=0.3402. Ver Anexo I). El último macho sobreviviente fue WT y alcanzó los 81 días de edad, mientras que el último macho *white* vivió 79 días. El primer tubo en llegar al 50% de mortalidad correspondió a machos *white* (entre los 29 y 31 días de edad de las moscas).

Se registró asimismo una diferencia en el largo de vida entre sexos de un mismo genotipo, con las hembras mostrando vida más larga independientemente del genotipo (Log-rank (Mantel-Cox) Test, Gehan-Breslow-Wilcoxon Test. Ver anexo). Al comparar el total de los datos obtenidos para los ensayos de largo de vida (todos los genotipos y sexos comparados) se observa que la curva de vida correspondiente a hembras con mutación en el gen *white* se sitúa a medio camino entre las curvas de vida de los machos *white* y WT y la de las hembras WT, acercándose en el último tramo a las curvas de vida de los machos de ambos genotipos (Figura 6).

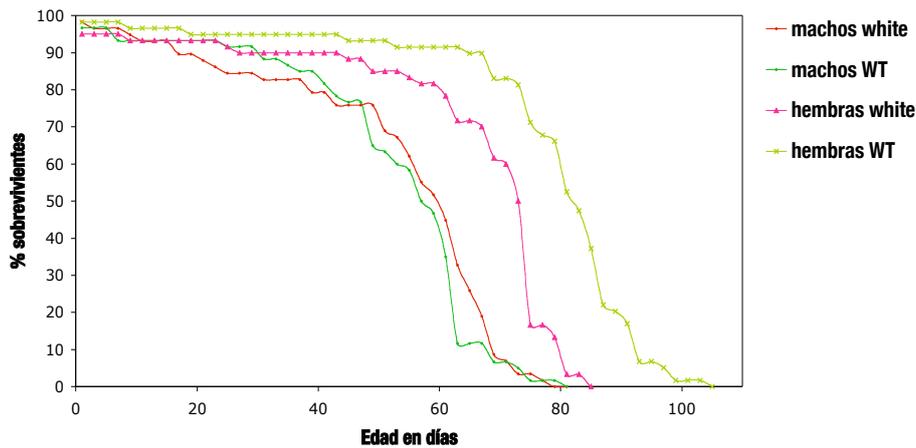


Figura 6. Análisis comparativo del largo de vida de los dos genotipos analizados (*white* y WT) para ambos sexos. El largo de vida se muestra como porcentaje de supervivientes.

La supervivencia media (tiempo en el cual la fracción de supervivencia iguala el 50%) fue de 83 días para las hembras WT y 74 días para las hembras *white*. En los machos, la supervivencia media ascendió a 59 días para los WT y 61 días para los *white* (Figura 7).

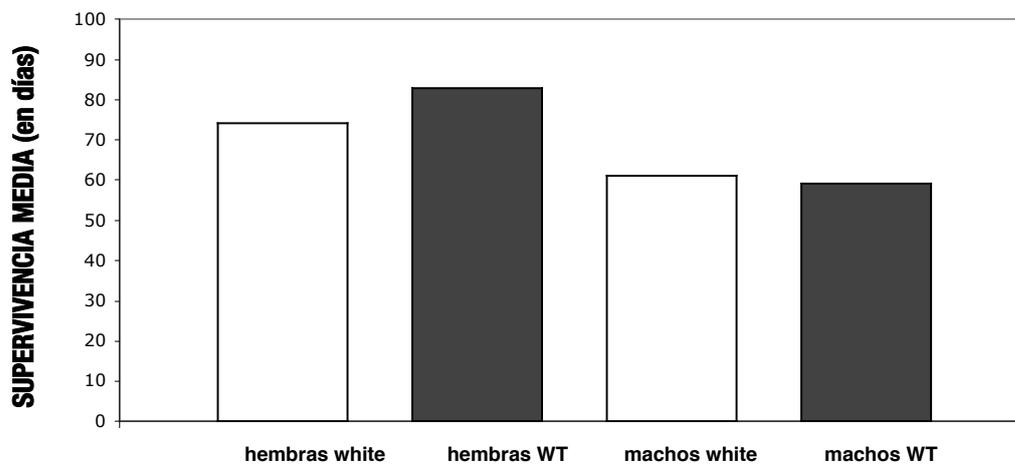


Figura 7. Comparación de la supervivencia media de moscas *white* y *wild-type*. Los gráficos muestran el tiempo en el cual la fracción de supervivencia iguala el 50% en cada genotipo y sexo analizado.

Ensayo de locomoción

Los resultados del análisis comparativo de la habilidad de trepar (ensayo de climbing) de las moscas *white* y WT de ambos sexos mostraron una marcada tendencia de locomoción deficiente en los machos *white*, pero el análisis estadístico no mostró diferencias significativas (ANOVA, $F(1,4)=1,9685$, $p=0,2332$. Ver Anexo I) (Figura 8-B y Figura 9).

En el caso de las hembras, el comportamiento de locomoción tendió a ser similar entre ambos genotipos y por tanto tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $F(1,4)=,01074$, $p=,9224$. Ver Anexo I) (Figura 8-A).

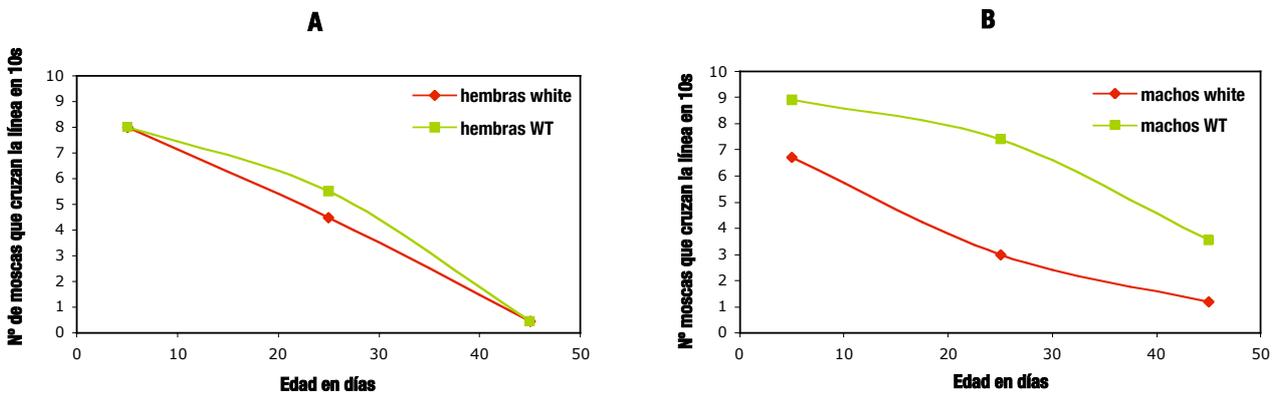


Figura 8. Resultados del ensayo de locomoción (CLIMBING). Curva de 3 puntos: Promedio de moscas que cruzan la línea de 8 cm en 10s posteriores a ocho golpes, para moscas de 5, 25 y 45 días de edad. *White* vs. WT (A) Hembras (B) Machos. Se observa una distancia entre las curvas correspondientes a los machos de las dos cepas que se mantiene durante los tres momentos en que se realizó el ensayo.

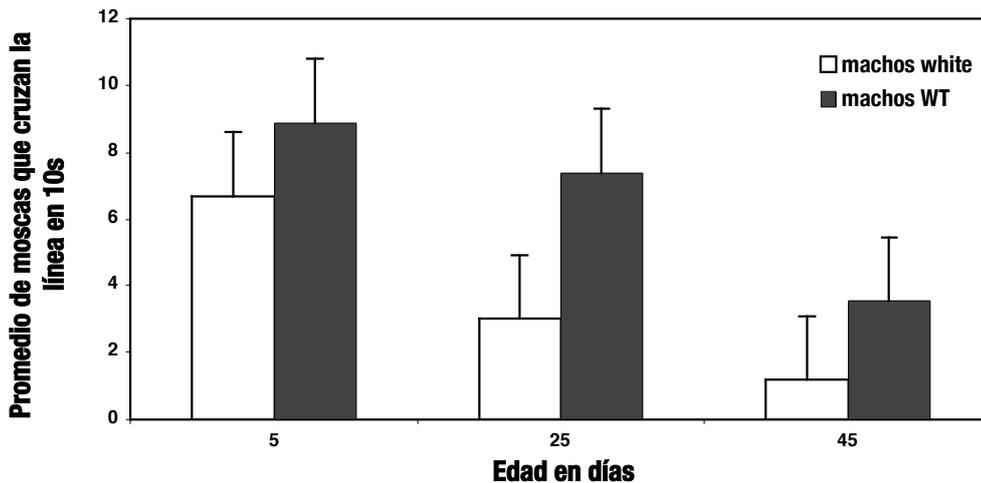


Figura 9. Resultados del ensayo de locomoción (CLIMBING). Las barras representan el promedio de moscas por genotipo que sobrepasan la línea de 8 cm a los 10 segundos posteriores a los ocho golpes, para moscas de 5, 25 y 45 días de edad. Machos *white* vs. WT. En este gráfico es posible visualizar claramente la tendencia que sugiere una diferencia de comportamiento entre los machos de ambas cepas. También se puede observar el progresivo deterioro de las habilidades locomotoras a lo largo de la vida. Barras de error = SEM.

Observamos en todos los casos una progresiva declinación de la actividad de locomoción a lo largo de la vida, independientemente del genotipo (Figuras 9 y 10).

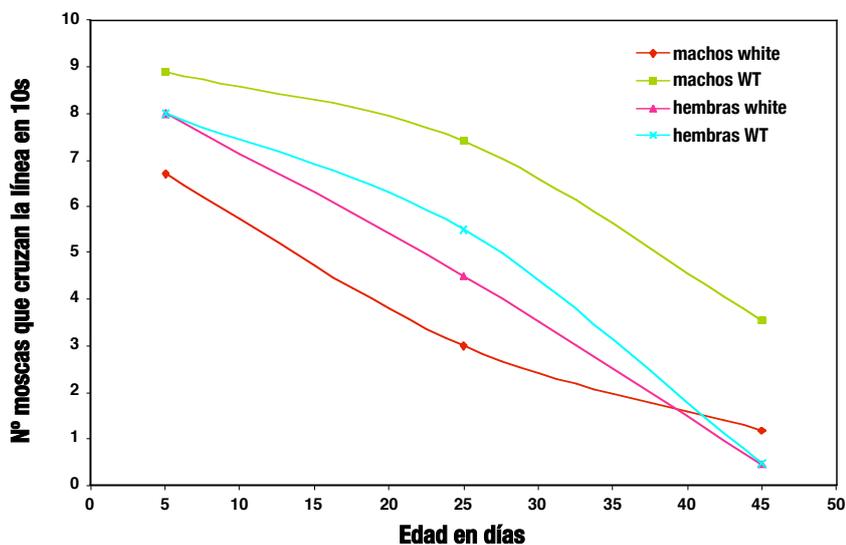


Figura 10. Comparación de los resultados del ensayo de Climbing por sexo y genotipo. La curva correspondiente a machos WT se aparta de las curvas correspondientes a hembras de ambos genotipos y a machos *white*.

Cuando se comparan los resultados totales (agrupados por genotipo, sin discriminar sexo ni momento de la vida) la tendencia de locomoción deficiente en los machos *white* se traslada a toda la población (Figura 11).

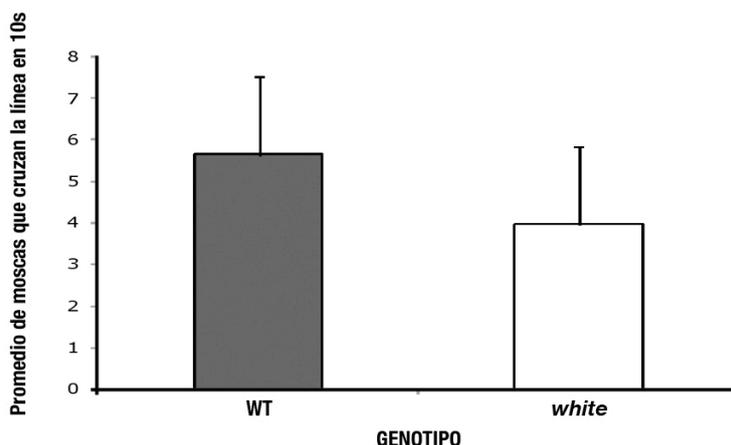


Figura 11. Resultados del ensayo de locomoción (CLIMBING). Comparación de los resultados totales para cada genotipo (WT o *white*) sin discriminar sexo ni edad de las moscas. Las barras representan el promedio de moscas por genotipo que sobrepasan la línea de 8 cm a los 10 segundos posteriores al golpe. La tendencia sugerida por el comportamiento de los machos se traslada a toda la población. Barras de error = SEM.

Histología del cerebro

La comparación histológica de cerebros completos de moscas *white* y WT marcados con un anticuerpo específico de tejido nervioso no mostró diferencias apreciables (Figuras 12 a 14).

No se detectaron fenotipos histológicos relacionados a neurodegeneración en ninguno de los cerebros *white* analizados (ej. presencia de vacuolas), ni se observaron diferencias entre moscas de distinto genotipo o edad analizados (Figura 12).

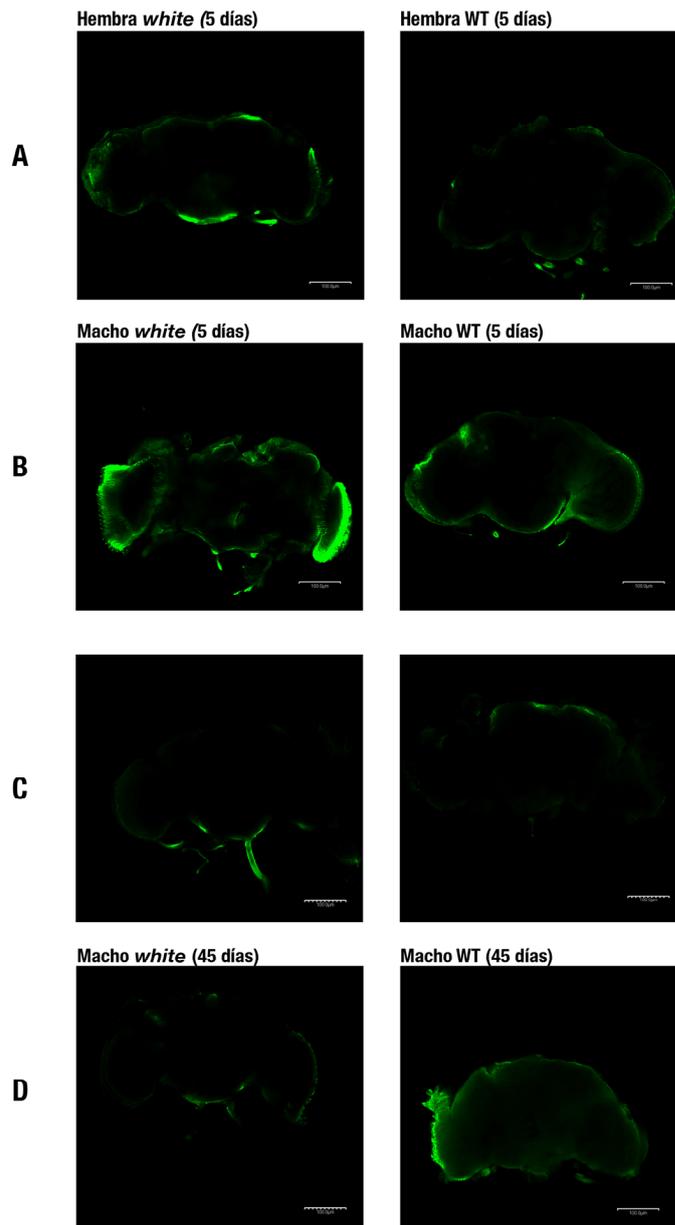
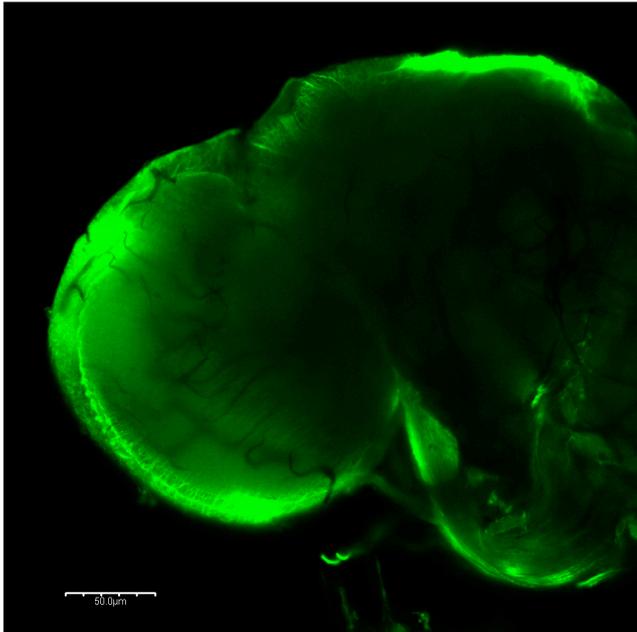


Figura 12. Comparación de la histología de cerebros completos de moscas *white* y WT de 5 y 45 días de edad, sometidos a inmunotinción con anticuerpo específico de tejido nervioso 22C10. (A) Hembras *white* vs. WT a los 5 días de edad de las moscas. (B) Hembras *white* vs. WT a los 45 días de edad de las moscas. (C) Machos *white* vs. WT a los 5 días de edad de las moscas. (D) Machos *white* vs. WT a los 45 días de edad de las moscas. Las fotos fueron tomadas con el objetivo 20X y son producto de 3 proyecciones de 1 micrómetro. Las barras representan 100 micrómetros.

Se observaron diferencias entre cerebros de un mismo genotipo pero de distinta edad (5 días vs 45 días) en relación a la visualización de traqueolas: estas aparecieron nítidamente en la histología practicada a los 5 días pero no a los 45 (Figura 13).

Hembra *white* 5 días

Hembra WT 45 días

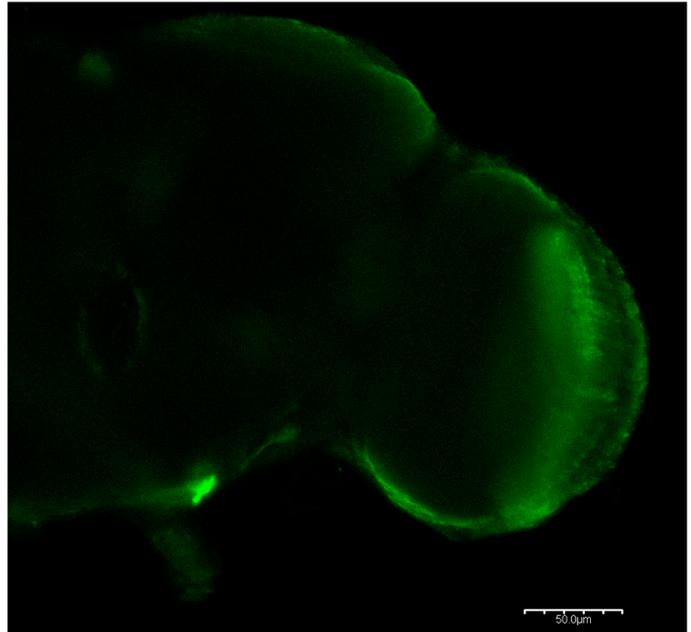


Figura 13. Comparación de la histología de cerebros completos de moscas *white* de 5 y 45 días de edad, sometidos a inmunotinción con anticuerpo específico de tejido nervioso 22C10. Visualización de traqueolas. (A) Hembras *white* de 5 días. (B) Hembras *white* de 45 días. Las fotos fueron tomadas con el objetivo 40X y son producto de 9 proyecciones de 0,5 micrómetros. Las barras representan 50 micrómetros.

En general la inmunofluorescencia resultó de excelente calidad en las zonas más superficiales del cerebro pero de menor calidad en las partes más profundas. Pese a esto fue posible distinguir claramente los axones a lo largo de todo el tejido y no se advirtieron diferencias fenotípicas entre cerebros de moscas *white* y WT (Figura 14).

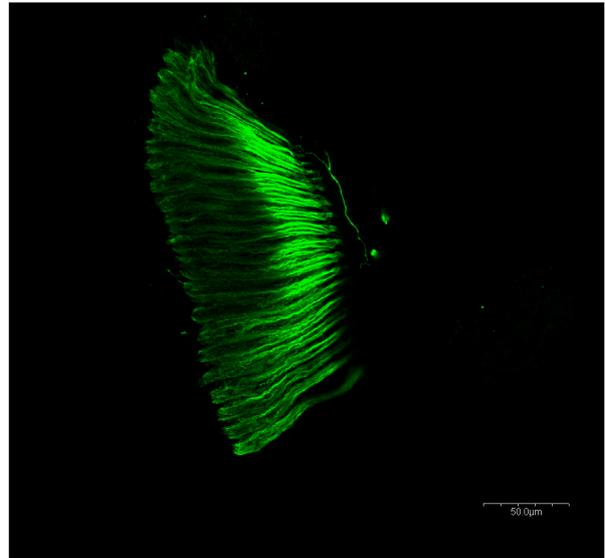
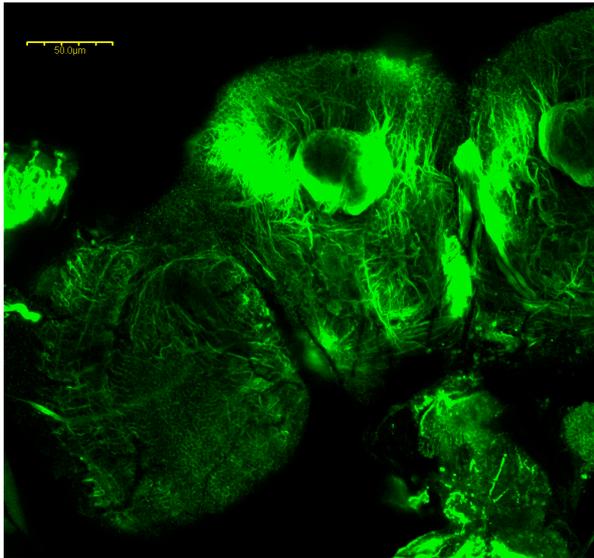
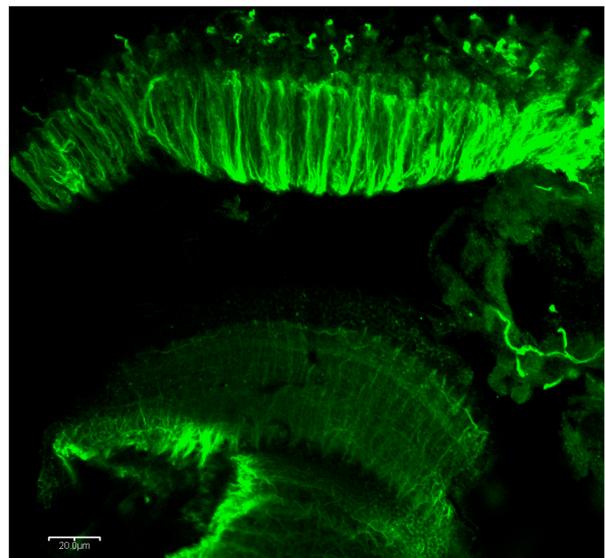
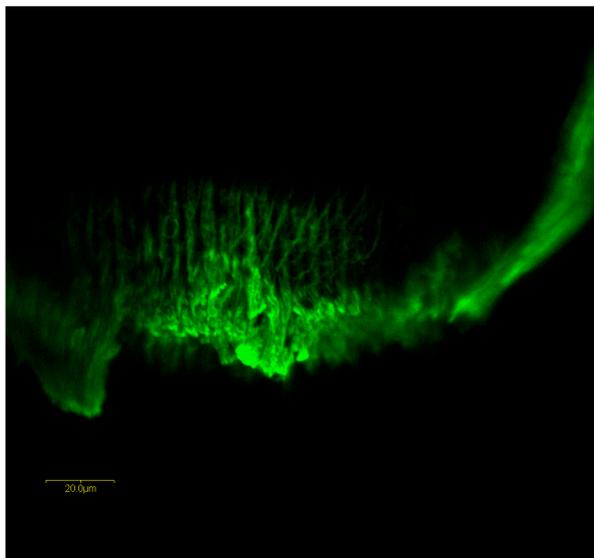
Hembra *white* 5 díasHembra *white* 45 días

Figura 14. . Comparación de la histología de cerebros completos de moscas *white* de 5 y 45 días de edad, sometidos a inmunotinción con anticuerpo específico de tejido nervioso 22C10. Visualización de axones. (A) Hembras *white* de 5 días. (B) Hembras *white* de 45 días. Las fotos fueron tomadas con el objetivo 40X y son producto de 15 proyecciones de 0,5 micrómetros. Las barras representan 20 micrómetros.

DISCUSIÓN

Algunos de los resultados obtenidos en esta tesina, fundamentalmente el acortamiento de vida de los mutantes w^{118} , permiten sugerir preliminarmente la posibilidad de cierto efecto neurodegenerativo de la falta de función del gen *white* en *Drosophila melanogaster*. De demostrarse mediante experimentos adicionales, esto podría tener un gran impacto en lo que refiere a la masiva utilización de la cepa mutante w^{118} (“alelo nulo”) como marcador génico y como background genético para la construcción de cepas transgénicas con las cuales se estudian comúnmente fenotipos neurodegenerativos.

Los datos correspondientes a la comparación del largo de vida entre moscas *white* y WT son robustos –las moscas *white* viven menos que las WT- y se muestran consistentes con observaciones realizadas por otros estudios (Shen *et al.*, 2009) en relación al comportamiento que siguen las curvas de vida: los machos de ambos genotipos analizados mostraron mayor divergencia y menor largo de vida que las hembras.

Para evaluar los resultados del análisis comparativo de la locomoción en moscas *white* y WT (ensayo de climbing) es necesario analizar cuidadosamente algunos aspectos que pudieron afectar los resultados. Estadísticamente no se observaron diferencias en el patrón de locomoción de moscas de ambos genotipos analizados, pero se observó una marcada tendencia a una menor habilidad de trepar en las moscas *white* respecto a las WT, sugiriendo una deficiencia de locomoción entre los machos *white*. La ausencia de diferencias significativas en estas comparaciones podría explicarse en parte por el gran error estándar presente en algunas de las muestras analizadas (Figura 15), lo que podría solucionarse aumentando el número de moscas analizadas de cada genotipo, sexo y edad, o aumentando el número de ensayos o pruebas por tubo (mayor número de réplicas técnicas).

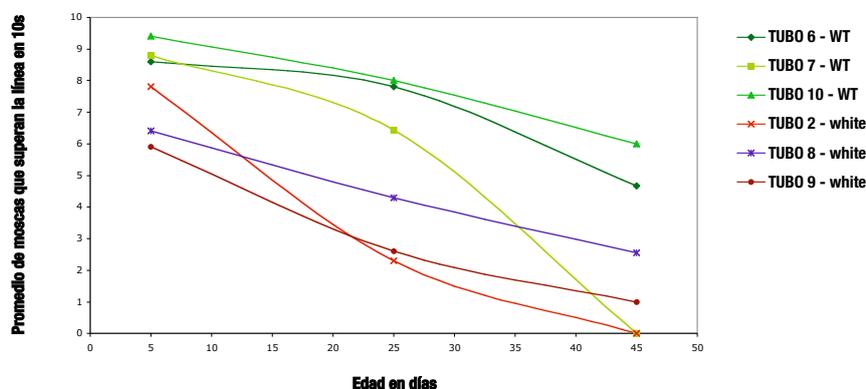


Figura 15. Resultados del ensayo de locomoción (CLIMBING). Curva de 3 puntos: Promedio de moscas que cruzan la línea de 8 cm en 10s posteriores a un golpe, para moscas de 5, 25 y 45 días de edad. Comparación de resultados por tubo en machos *white* y WT. La curva correspondiente al tubo 7 de machos WT se separa abruptamente de los otros dos WT en el ensayo practicado a los 45 días.

Si bien las condiciones de mantenimiento de todas las moscas fueron las mismas, no se descarta la posibilidad de que, pese a los cuidados dispensados, las moscas de alguno de los tubos sufrieran una contaminación o enfermedad que pudiera afectar su locomoción. Otra posible fuente de error puede responder a la vulnerabilidad de este tipo de ensayos a fallas en la manipulación durante el experimento, ya que este se lleva a cabo en condiciones de limitada “visibilidad” (luz roja) y de manera manual y no automatizada. Por otra parte, los resultados generales de nuestros ensayos de locomoción coinciden con evidencia previa sobre la declinación que muestran las moscas en su locomoción en función de la edad, independientemente del genotipo, probablemente debido a la senescencia funcional intrínsecamente relacionada con el deterioro de los sistemas del organismo al envejecer, aunque los circuitos subyacentes aún se desconocen (Le Bourg, 1987; Fernández *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1999; Gargano *et al.*, 2005 citados por White *et al.*, 2010).

En cuanto a los resultados de la comparación histológica de cerebros de moscas *white* y WT, la no detección de vacuolación o malformaciones axonales en el cerebro de los mutantes no es condición suficiente para descartar nuestra hipótesis de asociación del gen *white* con neurodegeneración. En primer lugar, el patrón de fluorescencia observado en todas las muestras, con mayor calidad de tinción en la superficie del cerebro comparado con zonas más profundas, sugiere dificultades en la penetración de los anticuerpos empleados. Esto podría ser subsanado prolongando las incubaciones con anticuerpos primario y secundario o repitiendo la tinción inmunohistoquímica en cortes de cerebro en vez de en cerebros completos. De todas formas, debido a que el grado de tinción fue suficiente para observar claramente las distintas regiones del cerebro y detectar claramente axones en todas las muestras, no consideramos que esta sea la razón principal para no detectar vacuolas, si las hubiera, en los cerebros de moscas *white*. Una segunda posibilidad para explicar la aparente ausencia de histología típica de fenotipo degenerativo en cerebros de moscas *white*, es que estos podrían aparecer a edades más tardías a las analizadas (posteriores a 45 días de edad de las moscas) y que sean indetectables en los momentos en que se realizó el ensayo. Otra posibilidad es que los mutantes *white* presenten fenotipos relacionados a neurodegeneración que no se reconozcan con esta técnica pero sí con otros métodos frecuentemente empleados de manera alternativa para detectar estos fenotipos, por ejemplo mediante el análisis de secciones de cerebro con microscopía electrónica (Lessig & Bonini, 2010). El anticuerpo que se utilizó para la tinción inmunohistoquímica, el 22C10 (Fujita, 1982) se asocia específicamente a microtúbulos del citoesqueleto axonal (reconoce la proteína Futsch). El uso de anticuerpos asociados a otros patrones de fluorescencia, por ejemplo phalloidina conjugada con fluorocromo (Cooper, 1987) para dar lugar a una tinción más general del tejido nervioso, o de anticuerpos específicos para sinápsis, como el Nc82 (Wagh *et al.*, 2006), permitirían visualizar otros aspectos del tejido cerebral, no detectados con el anticuerpo empleado. La degeneración a nivel cerebral puede tener que ver con una disminución de las conexiones sinápticas entre las neuronas, o el establecimiento de circuitos diferentes

entre ellas, y no necesariamente con la presencia de vacuolas, ya que éstas no se encuentran presentes o no alcanzan a ser detectadas en todos los tipos de neurodegeneración ya descritos en *Drosophila*. El conteo de poblaciones específicas de neuronas es otra aproximación posible para detectar diferencias fenotípicas en el cerebro de moscas *white* y WT. Por supuesto, también es posible que las moscas *white* carezcan de fenotipos degenerativos detectables a nivel neuronal.

Resumiendo, queremos destacar dos resultados que consideramos valiosos: la diferencia significativa entre el largo de vida de hembras WT y *white*, y la tendencia esbozada a una habilidad deficiente de trepar en machos *white* respecto a los WT en el ensayo de locomoción. Estos resultados sugieren la posibilidad de un efecto negativo de la mutación de falta de función del gen *white* en la expectativa de vida de las hembras y en la locomoción de los machos mutantes. Ambos resultados apoyan de manera general la hipótesis central planteada en esta tesina de que la mutación de falta de función en el gen *white* podría tener efectos negativos en el sistema nervioso de tipo neurodegenerativo, e indican, de manera particular, un posible efecto de la mutación sexo-dependiente. Estas diferencias ligadas al sexo pueden deberse a la localización del gen *white* en el cromosoma sexual X, ya que las hembras de *Drosophila* presentan dos cromosomas X activos y los machos solo uno (sistema de determinación sexual XY, con una compensación de dosis génica que tiene lugar en el macho por hipertranscripción de su único cromosoma X)(Faizullin, 1973). Otro dato a tener en cuenta para explicar las diferencias de comportamiento entre sexos, son las diferencias en los niveles de expresión del gen *white* entre machos y hembras en el adulto de *Drosophila* (Chintapalli *et al.*, 2007) (Figura 16).

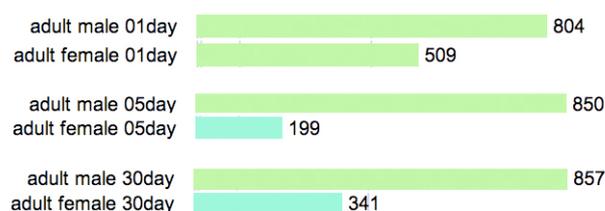


Figura 16. Diferencias en los niveles de expresión del gen *white* entre machos y hembras adultos de *Drosophila melanogaster*. Los machos WT muestran niveles más altos de expresión del gen *white* en las tres edades especificadas. Modificado de Flybase.

Es necesario hacer una precisión: que no se detecten diferencias significativas en el largo de vida entre los machos *white* y WT o entre las hembras *white* y WT en el ensayo de locomoción no quiere decir que estas diferencias no existan. La falta de diferencias detectables en estos parámetros puede deberse simplemente al número de individuos analizados y revelarse aumentando el número de muestra. De hecho, experimentos de largo de vida y climbing en moscas *white* y WT realizados previamente por la Dra. Pérez del laboratorio de Genómica Funcional del Centro de Investigación Cooperativo bioGUNE (datos no publicados,

comunicación personal) empleando mayor número de individuos de ambos sexos sustentan esta posibilidad y apoyan nuestros resultados.

El acortamiento de vida de las hembras mutantes w^{1118} sugeriría preliminarmente una posible asociación del gen *white* con neurodegeneración. De confirmarse esta posibilidad, una primera explicación se relaciona con el rol de la proteína White en el transporte de guanina y triptófano a la célula y sus consecuencias en la producción y/o distribución de aminas biogénicas en el cerebro.

Como se mencionó anteriormente, el gen *white* codifica para un transportador transmembrana dependiente de ATP cuya especificidad está determinada por su 'binding partner' (Ewart & Howells, 1998). Las mutaciones para los genes *white*, *brown* y *scarlet*, además de producir diferentes fenotipos de pigmentación del ojo, tienen efectos en el perfil de aminas en el cerebro: las moscas *white* y *brown* fallan en el transporte de guanina (Sullivan *et al.*, 1979), mientras que los mutantes *white* y *scarlet* presentan fallas relacionadas al transporte de triptófano (Sullivan & Sullivan, 1975). El triptófano es el precursor directo de la serotonina y además es degradado en la vía de la kinurenina dando lugar a metabolitos neuroactivos (Campesan, Green *et al.*, 2011) (Figura 17). El GTP es precursor de la 4-hidroxibiopterina, un cofactor esencial requerido para producir serotonina, dopamina y óxido nítrico (Koshimura *et al.*, 2000; Krishnakumar *et al.*, 2000) (Figura 18).

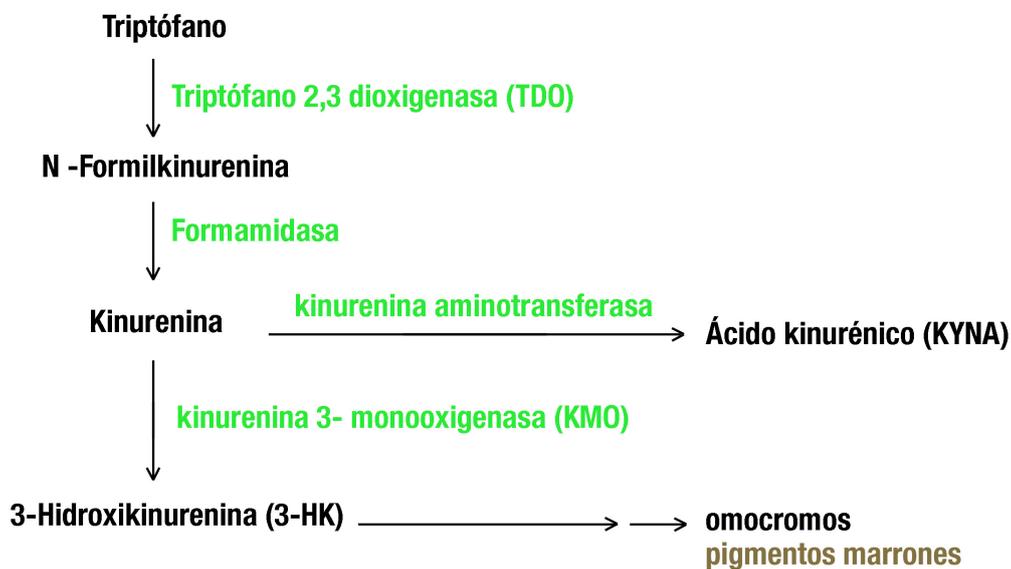


Figura 17. Representación esquemática de la vía de la kinurenina en *Drosophila melanogaster*. Esta vía es esencial en la formación de los omocromos, pigmentos biológicos requeridos para obtener el color de ojo normal. La 3-Hidroxikinurenina (3-HK) y el ácido kinurénico son metabolitos neuroactivos. Modificado de Campesan, 2011.

En un estudio sobre los efectos de la exposición a los anestésicos volátiles, Campbell y Nash descubrieron que los mutantes *white* se ven mucho menos afectados por la anestesia con enflurano y

halotano y sugirieron que este fenotipo se debe a una reducción del transporte de guanina a través del transportador acoplado White/Brown (Campbell & Nash, 2001). Coincidiendo con esto, se ha demostrado que los mutantes *white* (así como los mutantes *brown* y *scarlet*) además de carecer del contenido normal de pigmento en los gránulos de los ojos, carecen del contenido normal de aminas biogénicas en el cerebro (Borycz *et al.*, 2008; Sitaraman, 2008).

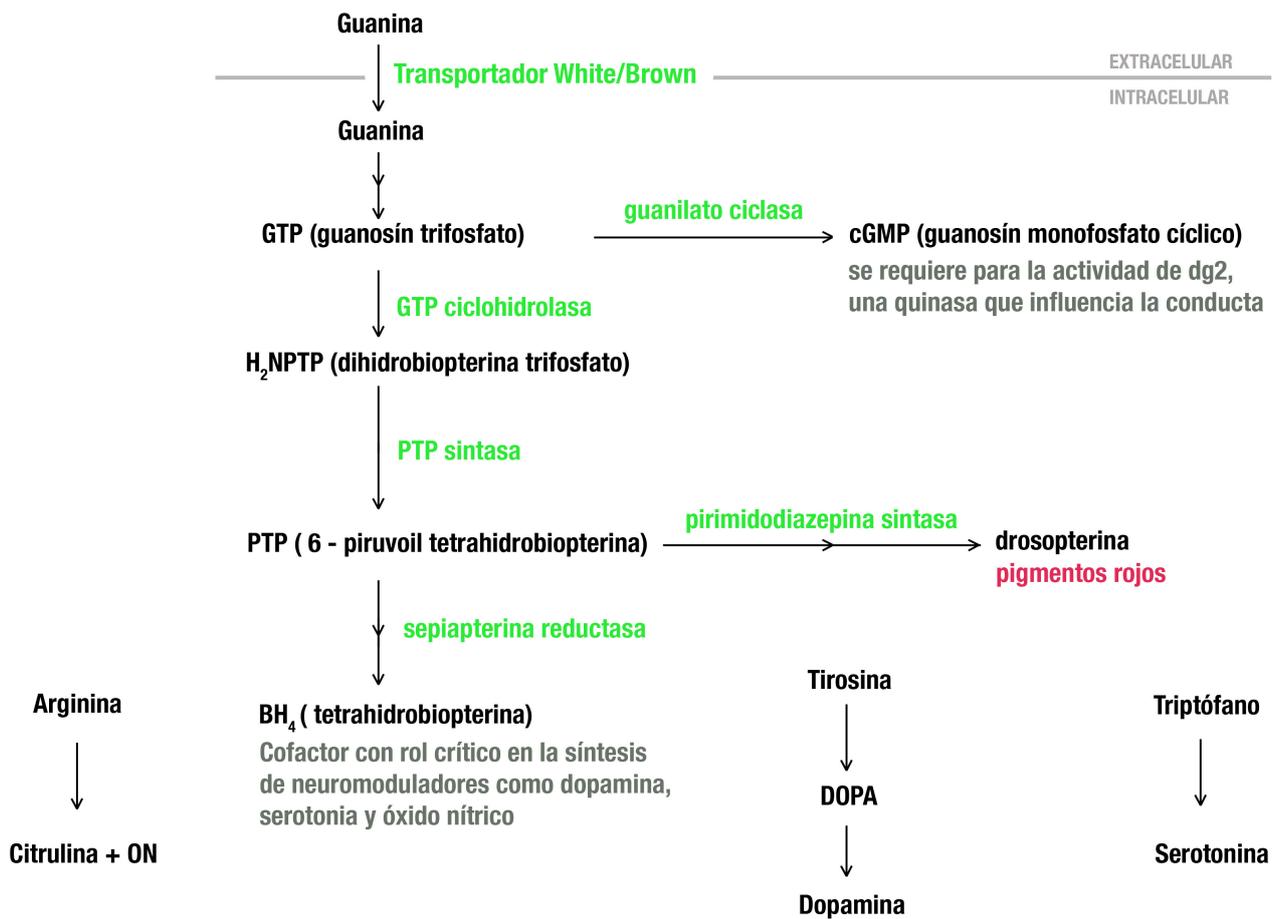


Figura 18. Representación esquemática del rol del Transportador White/Brown en la síntesis de pigmentos rojos y neuromoduladores. Modificado de Campbell *et al.*, 2011.

Sitaraman y colaboradores encontraron que los mutantes *white* presentan el 30% de los niveles de serotonina y dopamina en relación a moscas WT (Sitaraman *et al.*, 2008). Borycz y colaboradores obtuvieron resultados igualmente sorprendentes: la reducción del contenido de aminas en la cabeza de moscas *white* en relación a WT es de 51% menos para Histamina, 61% menos para Dopamina, y 32% menos para Serotonina (Borycz *et al.*, 2008).

La hipótesis manejada por Borycz atribuye a la mutación *white* un descenso en la síntesis, el transporte o la tasa de liberación de las aminas biogénicas (Borycz *et al.*, 2008). Esto es aparentemente contradictorio con la posible correlación entre la disminución en la expresión de *white* y la reversión del

efecto neurodegenerativo en los mutantes nulos homocigotos *sall* (Cantera *et al.*, 2002; Ferreiro *et al.*, 2012). No obstante, es importante notar que la reversión del fenotipo neurodegenerativo del mutante *sall* ocurre antes de la diferenciación de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas, lo cual ocurre tardíamente en el estadio 17 de desarrollo embrionario (Dr. Cantera, comunicación personal).

Diversos estudios han abordado la relación entre el contenido de dopamina en el cerebro y fenotipos comportamentales asociados a neurodegeneración (Riemensperger *et al.*, 2011). Por ejemplo, los modelos de Parkinson en *Drosophila* se caracterizan por dos fenotipos principales: la pérdida específica de neuronas dopaminérgicas en el cerebro envejecido y defectos en la locomoción, cuantificada con el mismo ensayo usado en este estudio y por medio de otros ensayos (Pendelton *et al.*, 2002; Venderova *et al.*, 2009). White y colaboradores estudiaron el sistema dopaminérgico y el comportamiento motor a lo largo de la vida en *Drosophila*. Luego de contar el número de distintos tipos de neuronas dopaminérgicas a partir de tinciones inmunocitoquímicas con anticuerpos específicos para la enzima Tirosina hidrosilasa (*TH>mCD8:GFP*) de expresión exclusiva en neuronas dopaminérgicas, concluyeron que estas neuronas no degeneran con la edad (White *et al.*, 2010). Por otra parte observaron que el reflejo de geotaxis negativa y la locomoción inducida por sobresalto (ensayo de climbing) declinaban con la edad en moscas WT, mientras otros comportamientos, como la marcha y la conducta exploratoria, mostraban una tendencia inversa y se incrementaban a estadios tardíos de la vida de la mosca (White *et al.*, 2010). La ausencia de neurodegeneración dopaminérgica contrasta con el declinamiento de la locomoción inducida por sobresalto y la geotaxis negativa. Una posible explicación a esta paradoja es que la tinción anti-TH, si bien permite cuantificar la población cerebral de neuronas dopaminérgicas, no puede revelar un posible decrecimiento en los niveles de dopamina. White propone que la locomoción inducida por sobresalto y la geotaxis negativa podrían no estar influenciadas por la actividad fisiológica de las neuronas dopaminérgicas; sin embargo Liu sugiere otra posibilidad (Liu, 2006). A partir de la revisión de varias investigaciones y la observación de que a bajos niveles de dopamina la actividad de locomoción aumenta, mientras que a niveles más altos se suprime la actividad espontánea, Liu concluye que la dopamina podría tener un rol dual en la regulación de la actividad (Liu, 2006).

En resumen, las diferencias en los niveles de dopamina afectarían diversos aspectos del comportamiento con efectos aparentemente contradictorios. A partir de esto, podemos conjeturar que la falta de función del gen *white*, y consecuente modificación de los niveles 'normales' de dopamina, podría explicar en parte la deficiencia en la geotaxis negativa observada en nuestros resultados.

Bayersdorfer y colaboradores investigaron la relación entre los niveles de dopamina y neurodegeneración causada por Parkinson en *Drosophila* (Bayersdorfer *et al.*, 2010). Generaron moscas con niveles reducidos de dopamina en las neuronas dopaminérgicas -usando líneas RNAi- y las combinaron con moscas con Parkinson. Observaron que bajos niveles celulares de dopamina causaban reducción de neurotoxicidad y protección de las neuronas dopaminérgicas. Estos resultados son compatibles con el

posible efecto neuroprotector de la disminución en la expresión del gen *white* en el estadio embrionario 17 en los mutantes homocigotas *sall* (Ferreiro *et al.*, 2012). La baja en la expresión de *White* supondría una baja en el nivel de dopamina que podría influir en la reversión del fenotipo neurodegenerativo.

Como se mencionó antes, nuestros resultados sugieren adicionalmente, un posible dimorfismo sexual en el desarrollo de neurodegeneración en mutantes con falta de función en el gen *white*.

Yellman y colaboradores realizaron estudios que asocian el comportamiento sexual dimórfico a diferencias en la sensibilidad a los receptores aminérgicos o en los tipos de receptores expresados (Yellman *et al.*, 1997). Utilizando moscas *w¹¹¹⁸* decapitadas, observaron dimorfismo sexual en la respuesta a varias aminas en presencia del inhibidor de las monoaminooxidasas de vertebrados hidrazalina y al QUINPIROLE - agonista del receptor D2-like (dopaminérgico) de vertebrados. Las enzimas monoamino oxidasas participan en la degradación de dopamina y otras aminas biogénicas (Dewhurst *et al.*, 1972), por tanto la presencia de hidrazalina supone un aumento de aminas disponibles potenciando sus efectos en el comportamiento (Yellman *et al.*, 1997). Yellman y colaboradores (1997) observaron que los machos *white* mostraban mayor actividad que las hembras, acentuándose en presencia de hidrazalina y octopamina. En relación a la dopamina, estos autores observaron un aumento de la locomoción en machos *white* y del grooming en hembras. Los resultados de los experimentos con quinpirole son consistentes con un aumento en la afinidad al receptor dopaminérgico D2 por parte de los machos *white* (Yellman *et al.*, 1997). El procedimiento utilizado por Yellman consistió en la adición de aminas exógenas, hidrazalina y quinpirole en la cadena nerviosa ventral de moscas decapitadas y por tanto los efectos en el cerebro no están contemplados.

Si tenemos en cuenta los datos de Borycz acerca del contenido de aminas en las cabezas de *Drosophila* (Borycz *et al.*, 2008), el dimorfismo sexual en la respuesta a la presencia de aminas puede significar que, frente a bajos niveles de las mismas en el cerebro, los machos de *Drosophila* se vean más afectados que las hembras, en particular en lo que refiere a la locomoción. Esto puede relacionarse con ciertas evidencias que sugieren que los machos tienen 1.5 más de probabilidades de desarrollar Parkinson que las hembras (Lees *et al.*, 2009).

Otra posibilidad para comprender nuestros resultados, involucra la vía de la kinurenina, responsable de más del 95% de la degradación del triptófano en mamíferos (Campesan *et al.*, 2011). El papel de esta vía en la función ocular está conservado de moscas a humanos, donde juega un rol central en la formación de los filtros para la radiación ultravioleta (Campesan *et al.*, 2011). La vía de la kinurenina contiene metabolitos que han mostrado ser neuroactivos: el ácido kinurénico, con propiedades neuroprotectoras como antagonista de los receptores de aminoácidos excitatorios y como eliminador de radicales libres y la 3-hidroxi kinurenina, neurotóxico, potente generador de radicales libres (Foster *et al.*, 1984; Hiraku *et al.*, 1995). Estos dos compuestos tienen como precursor directo a la kinurenina. Campesan, Green y colaboradores observaron que el incremento de los niveles del metabolito neuroprotector ácido kinurénico en relación a los

niveles de la 3-hidroxi kinurenina, a través de la inhibición genética y farmacológica de la kinurenina 3-monooxigenasa (enzima que cataliza la síntesis de kinurenina a 3-hidroxi kinurenina) y de la triptófano 2,3-dioxigenasa (enzima limitante y primera en la vía), disminuye los efectos neurodegenerativos de la enfermedad de Huntington en *Drosophila* (Campesan, Green *et al.*, 2011).

De aquí se desprenden dos posibilidades: suponiendo que el transportador White/Scarlet sea el encargado de transportar el triptófano a la célula a través de la membrana plasmática, la perturbación de este mecanismo podría producir un efecto similar a la inhibición de la triptófano 2,3-dioxigenasa y por tanto dar lugar a un efecto neuroprotector. Sin embargo, experimentos de microscopía inmunoelectrónica realizados por el equipo de Mackenzie sitúan a las proteínas White y Scarlet en las membranas de los gránulos de pigmento dentro de las células pigmentarias y las células de la retina del ojo compuesto, sugiriendo que el complejo White/Scarlet transportaría un metabolito intermedio (como por ejemplo la 3-hidroxi kinurenina) desde el citoplasma a los gránulos de pigmento (Mackenzie *et al.*, 2000). Esto sugiere que, la falla del transportador, por ejemplo por causa de la ausencia de White, podría dar lugar a un exceso de 3-HT en el citoplasma con consecuencias neurodegenerativas, lo que explicaría parte de los resultados obtenidos en esta tesina.

Para concluir, podemos decir que los resultados de este trabajo aportan evidencia sobre posibles fenotipos asociados a neurodegeneración en mutantes *white*. Entre las causas probables de estos fenotipos se encuentra la ausencia de la proteína White en complejos transportadores dependientes de ATP. Esta ausencia interrumpe el transporte de guanina a la célula a través del transportador White/Brown, lo que repercute en la síntesis de un cofactor necesario para la síntesis de triptófano, serotonina y dopamina, teniendo como consecuencia la disminución de las aminas biógenas en el cerebro de los mutantes *white* (Borycz *et al.*, 2008). La falta de White también afecta el dímero White/Scarlet en el transporte de metabolitos neurotóxicos derivados del triptófano a través de la membrana de los gránulos de pigmento, dando lugar a potenciales efectos neurodegenerativos.

El dimorfismo sexual detectado en la afinidad a receptores dopaminérgicos (Yellman *et al.*, 1997) puede dar cuenta de la diferencia observada en el comportamiento entre machos y hembras. Esta diferencia también puede responder a la compensación de dosis por parte de los machos (Faizullin, 1973) y al perfil de expresión diferenciado entre machos y hembras de moscas wild-type (Chintapalli *et al.*, 2007). El macho podría tener mayores requerimientos de aminas biógenas que la hembra para desarrollar el comportamiento normal, lo que podría estar relacionado con el comportamiento durante el cortejo. Es posible que los machos se 'muevan más' a lo largo de la vida con este fin y por tanto se haya favorecido evolutivamente un mayor requerimiento de aminas biógenas en circuitos neuronales o áreas funcionales vinculados a la locomoción.

Para corroborar la hipótesis de este trabajo con mayor contundencia serían necesarios algunos ajustes en el diseño experimental. Por ejemplo, la normalización del background genético de cepas *white* y wild-type permitiría que toda diferencia detectable sea únicamente atribuible al efecto de la falta del gen *white*, evitando fenotipos causados por variaciones genéticas naturales. La utilización de dispositivos más adecuados para el ensayo de locomoción permitiría minimizar los errores debidos a manipulación. A nivel histológico podrían agregarse técnicas que permitan detectar con mayor nitidez un posible fenotipo neurodegenerativo. En todos los casos un aumento del número de individuos analizado daría lugar a resultados estadísticamente más robustos.

Otros enfoques metodológicos podrían aportar información valiosa para validar un posible rol del gen *white* en la neurodegeneración/neuroprotección en *Drosophila*. Por ejemplo, se podría observar si la sobre-expresión del gen *white* en moscas con una mutación neurodegenerativa conocida (ej. mutantes del gen *parkina*) tiene efectos neuroprotectores, realizando la misma tríada de ensayos. También se podría comparar el comportamiento de los mutantes *white* en relación a varias cepas salvajes alternativas a la cepa Oregon R empleada en este trabajo (ej. Vallecas, Canton S).

Para determinar y cuantificar parámetros que pudieran estar asociados a un efecto neurodegenerativo de la falta del gen *white* sexo-dependiente (dimorfismo sexual), se podría contabilizar el número de neuronas dopaminérgicas o medir el contenido de dopamina y otras aminoras en el cerebro por HPLC discriminando por sexo. De hecho, en nuestro laboratorio se han iniciado algunos experimentos en este sentido.

Para profundizar sobre el rol de White en la vía de las kinureninas, se podría proporcionar ácido kinurénico a mutantes *white* a través de la dieta para observar si se revierte el fenotipo, o por el contrario, proporcionar 3-hidroxi kinurenina para observar si se potencian los efectos neurodegenerativos.

Por último, cabe preguntarse la razón por la cual, durante un siglo de investigaciones con mutantes *white*, no se prestó suficiente atención a las notables diferencias en relación al fenotipo salvaje que nuestro estudio confirma. Muchas investigaciones sobre neurodegeneración, que han tomado como parámetro tanto el largo de vida como el ensayo de locomoción, han utilizado a *white* como background genético o incluso como control (White, 2010). Los motivos de esta omisión pueden rastrearse en la variabilidad genética inherente a cualquier ser vivo. Es sabido que muchos aspectos del comportamiento varían dentro de una misma cepa lo que seguramente ha contribuido a enmascarar efectos no convenientes. White es un marcador contundente de color de ojos, aparentemente normal en el resto de su fenotipo. Esto probablemente contribuyó a que prevaleciera una especie de ceguera colectiva respecto a otros efectos. Por otra parte, la mayoría de los estudios que detectaron diferencias significativas en este sentido, eludieron otro factor importante que es la variación entre sexos (Borycz, 2008; Sitamaran, 2008).

Mucho camino queda por recorrer para llegar a una cabal comprensión de las potencialidades de *white* en el estudio de genotipos asociados a neurodegeneración, así como las repercusiones que puede ocasionar la revisión de los innumerables estudios que lo utilizaron sin tener en cuenta los efectos intrínsecos de esta mutación.

ANEXOS

I- Tablas de datos y análisis estadístico

a) LARGO DE VIDA

Tablas de datos.

	machos <i>white</i>			hembras <i>white</i>	
	n=59	1v > n= 58		n=60	
día	vivas	% superv.	voladas	vivas	% superv.
1	57	98.27586		57	95
3	56	96.55172	1	57	95
5	56	96.55172		57	95
7	56	96.55172		57	95
9	55	94.82759		56	93.3333
11	54	93.10345		56	93.3333
13	54	93.10345		56	93.3333
15	54	93.10345		56	93.3333
17	52	89.65517		56	93.3333
19	52	89.65517		56	93.3333
21	51	87.93103		56	93.3333
23	50	86.2069		56	93.3333
25	49	84.48276		55	91.6667
27	49	84.48276		54	90
29	49	84.48276		54	90
31	48	82.75862		54	90
33	48	82.75862		54	90
35	48	82.75862		54	90
37	48	82.75862		54	90
39	46	79.31034		54	90
41	46	79.31034		54	90
43	44	75.86207		54	90
45	44	75.86207		53	88.3333
47	44	75.86207		53	88.3333
49	44	75.86207		51	85
51	40	68.96552		51	85
53	39	67.24138		51	85
55	36	62.06897		50	83.3333
57	32	55.17241		49	81.6667
59	30	51.72414		49	81.6667
61	26	44.82759		47	78.3333
63	19	32.75862		43	71.6667
65	15	25.86207		43	71.6667
67	11	18.96552		42	70
69	5	8.62069		37	61.6667
71	4	6.896552		36	60
73	2	3.448276		30	50
75	2	3.448276		10	16.6667
77	1	1.724138		10	16.6667
79	0	0		8	13.3333
81	0	0		2	3.33333
83				2	3.33333
85				0	0

	machos WT			hembras WT	
	n=61	1 V > n=60	voladas	n=59	
día	vivas	% superv.		vivas	% superv.
1	58	96.66667		58	98.3051
3	58	96.66667		58	98.3051
5	58	96.66667		58	98.3051
7	56	93.33333		58	98.3051
9	56	93.33333		57	96.6102
11	56	93.33333		57	96.6102
13	56	93.33333		57	96.6102
15	56	93.33333	1	57	96.6102
17	56	93.33333		57	96.6102
19	56	93.33333		56	94.9153
21	56	93.33333		56	94.9153
23	56	93.33333		56	94.9153
25	55	91.66667		56	94.9153
27	55	91.66667		56	94.9153
29	55	91.66667		56	94.9153
31	53	88.33333		56	94.9153
33	53	88.33333		56	94.9153
35	52	86.66667		56	94.9153
37	51	85		56	94.9153
39	51	85		56	94.9153
41	49	81.66667		56	94.9153
43	47	78.33333		56	94.9153
45	46	76.66667		55	93.2203
47	46	76.66667		55	93.2203
49	39	65		55	93.2203
51	38	63.33333		55	93.2203
53	36	60		54	91.5254
55	35	58.33333		54	91.5254
57	30	50		54	91.5254
59	28	46.66667		54	91.5254
61	21	35		54	91.5254
63	7	11.66667		54	91.5254
65	7	11.66667		53	89.8305
67	7	11.66667		53	89.8305
69	4	6.666667		49	83.0508
71	4	6.666667		49	83.0508
73	3	5		48	81.3559
75	1	1.666667		42	71.1864
77	1	1.666667		40	67.7966
79	1	1.666667		39	66.1017
81	0	0		31	52.5424
83				28	47.4576
85				22	37.2881
87				13	22.0339
89				12	20.339
91				10	16.9492
93				4	6.77966
95				4	6.77966
97				3	5.08475
99				1	1.69492
101				1	1.69492
103				1	1.69492

105				0	0
-----	--	--	--	---	---

Análisis estadístico GRAPH PAD PRISM 5

Comparison of Survival Curves

HEMBRAS

Log-rank (Mantel-Cox) Test

Chi square 43.55
 df 1
 P value < 0.0001
 P value summary ***
 Are the survival curves sig different? Yes

Gehan-Breslow-Wilcoxon Test

Chi square 34.02
 df 1
 P value < 0.0001
 P value summary ***
 Are the survival curves sig different? Yes

Median survival

Hembras *white* 74
 Hembras WT 83
 Ratio 0.8916
 95% CI of ratio 0.1934 to 1.590

Hazard Ratio

Ratio 5.038
 95% CI of ratio 3.117 to 8.145

	Hembras <i>white</i>	Hembras WT
Number of rows	119	119
# of blank lines	59	60
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	0	0
# deaths/events	60	59
Median survival	74	83

Comparison of Survival Curves

MACHOS

Log-rank (Mantel-Cox) Test

Chi square	0.7183
df	1
P value	0.3967
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No

Gehan-Breslow-Wilcoxon Test

Chi square	0.9098
df	1
P value	0.3402
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No

Median survival

Machos <i>white</i>	61
Machos WT	59
Ratio	1.034
95% CI of ratio	0.3369 to 1.731

Hazard Ratio

Ratio	0.8401
95% CI of ratio	0.5615 to 1.257

	Machos <i>white</i>	Machos WT
Number of rows	106	106
# of blank lines	47	45
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	1	1
# deaths/events	58	60
Median survival	61	59

b) ENSAYO DE LOCOMOCIÓN

Tablas de datos.

Resultados por tubo (promedio de ensayos):

**white
hembras**

TUBO 1	día		
2 enero	5		6
22 enero	25		3.2
10 febrero	45		0.6

TUBO 3	día		
2 enero	5		8.6
22 enero	25		7.8
10 febrero	45		0.7

TUBO 12	día		
2 enero	5		9.4
22 enero	25		5.44
10 febrero	45		0.1

**Wild Type
hembras**

TUBO 4	día		
2 enero	5		8.7
22 enero	25		5.5
10 febrero	45		1

TUBO 5	día		
2 enero	5		8.7
22 enero	25		4.3
10 febrero	45		0.3

TUBO 11	día		
2 enero	5		6.6
22 enero	25		3.9
10 febrero	45		0.1

**white
machos**

TUBO 6	día		
2 enero	5		8.6
22 enero	25		7.8
10 febrero	45		4.6

TUBO 7	día		
2 enero	5		8.8
22 enero	25		6.4
10 febrero	45		0

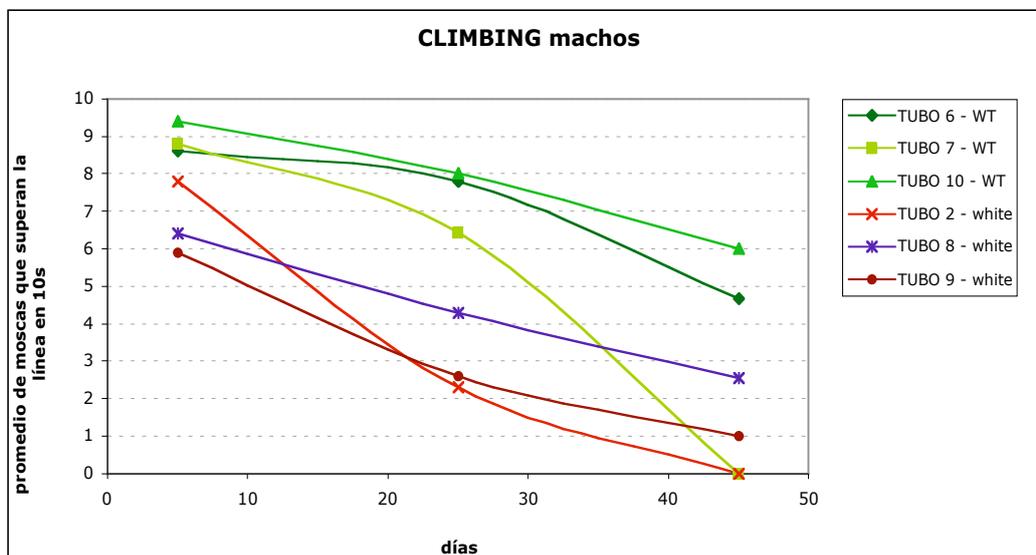
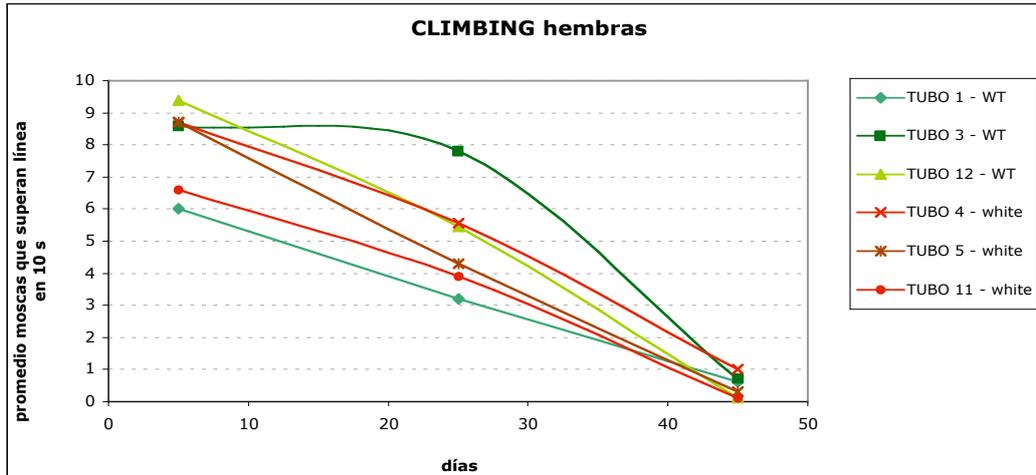
TUBO 10	día		
2 enero	5		9.4
22 enero	25		8
10 febrero	45		6

**Wild Type
machos**

TUBO 2	día		
2 enero	5		7.8
22 enero	25		2.3
10 febrero	45		0

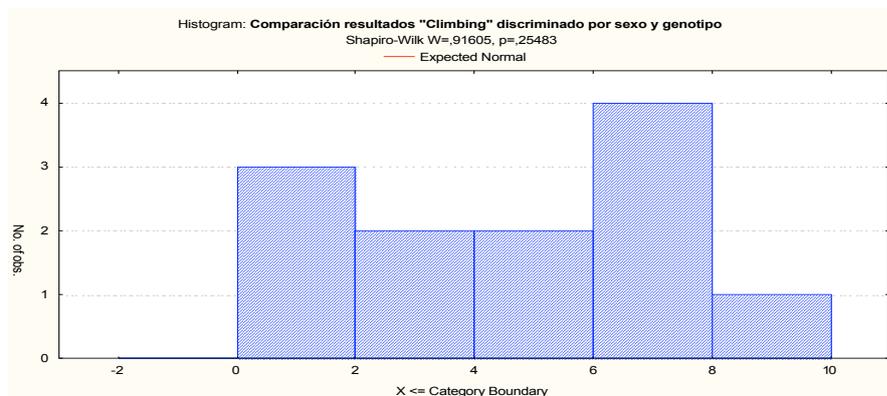
TUBO 8	día		
2 enero	5		6.4
22 enero	25		4.3
10 febrero	45		2.5

TUBO 9	día		
2 enero	5		5.9
22 enero	25		2.6
10 febrero	45		1



Comparación de resultados de climbing discriminando por sexo y genotipo.

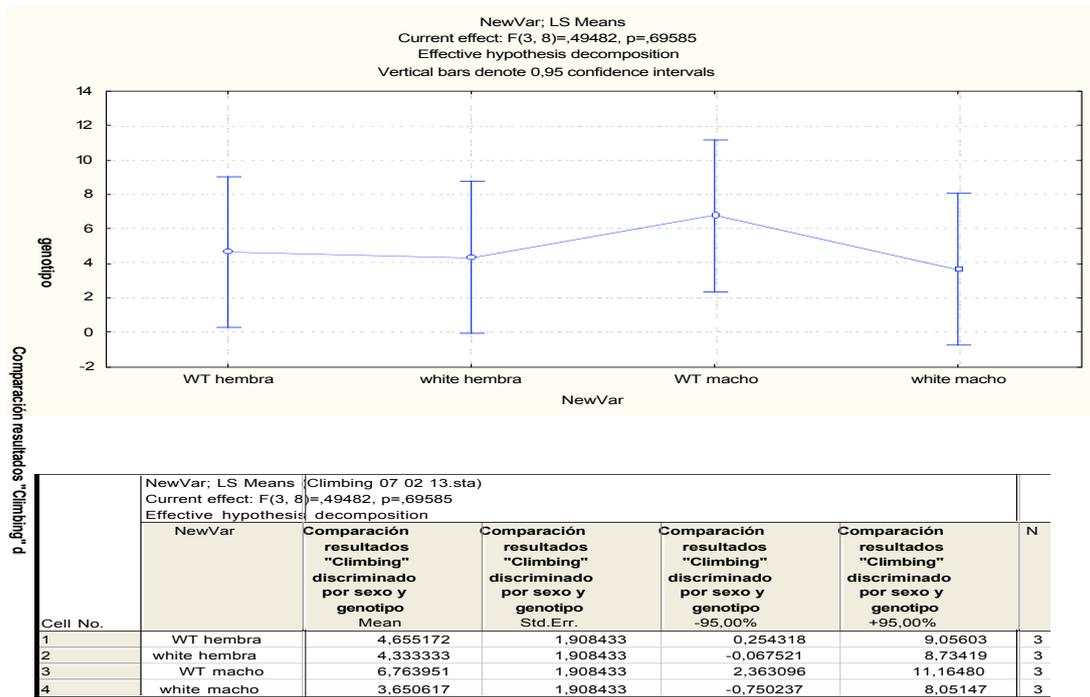
Test de normalidad: Shapiro Wilk



Test homogeneidad de varianzas: Levene

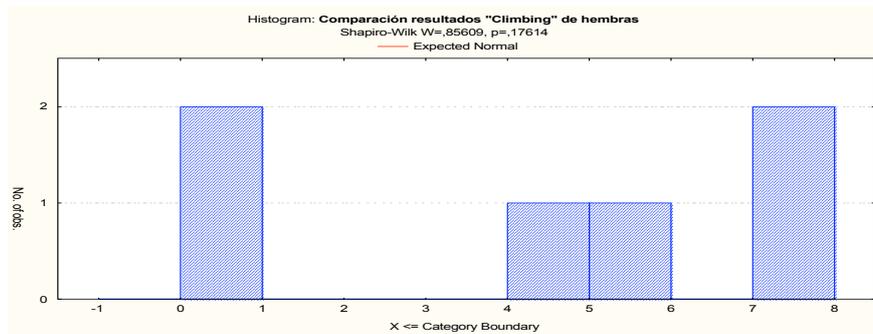
Levene's Test for Homogeneity of Variances (Climbing 07 02 13.sta)				
Effect: NewVar				
Degrees of freedom for all F's: 3, 8				
	MS Effect	MS Error	F	p
Comparación resultados "Climbing" discriminado por sexo y genotipo	0.504472	2.534527	0.199040	0.894162

Resultado del ANOVA



Comparación de resultados de climbing en hembras *white* y WT

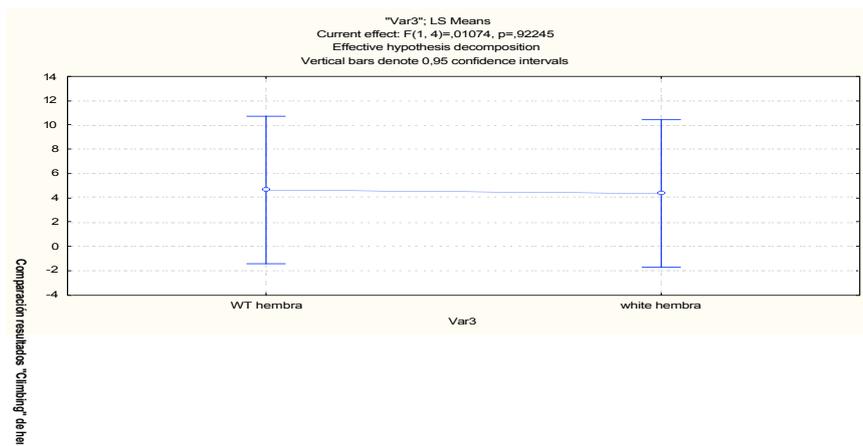
Test de normalidad: Shapiro Wilk



Test homogeneidad de varianzas: Levene

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Climbing 07 02 13.sta)				
Effect: "Var3"				
Degrees of freedom for all F's: 1, 4				
	MS Effect	MS Error	F	p
Comparación resultados "Climbing" de hembras	0,055049	3,632668	0,015154	0,907964

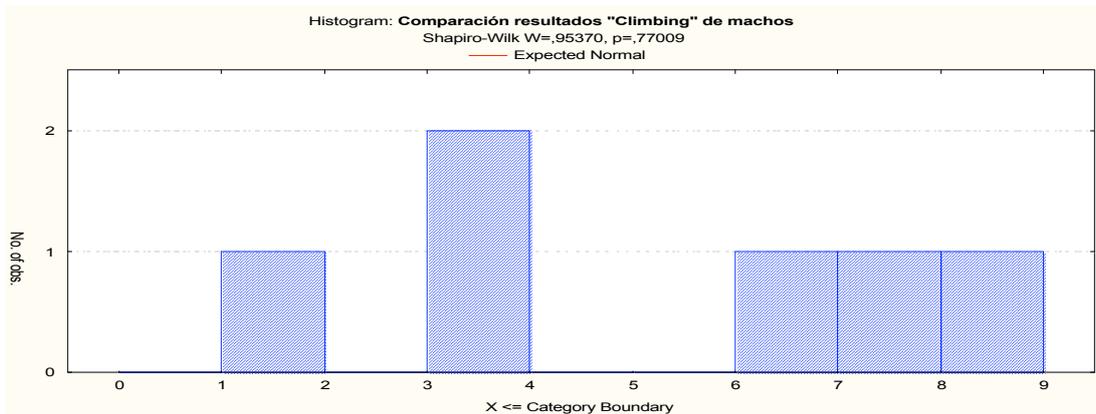
Resultado del ANOVA



"Var3"; LS Means (Climbing 07 02 13.sta) Current effect: F(1, 4)=.01074, p=.92245 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Var3	Comparación resultados "Climbing" de hembras Mean	Comparación resultados "Climbing" de hembras Std.Err.	Comparación resultados "Climbing" de hembras -95.00%	Comparación resultados "Climbing" de hembras +95.00%	N
1	WT hembra	4.655172	2.195974	-1.44183	10.75217	3
2	white hembra	4.333333	2.195974	-1.76367	10.43033	3

Comparación de resultados de climbing en machos *white* y WT

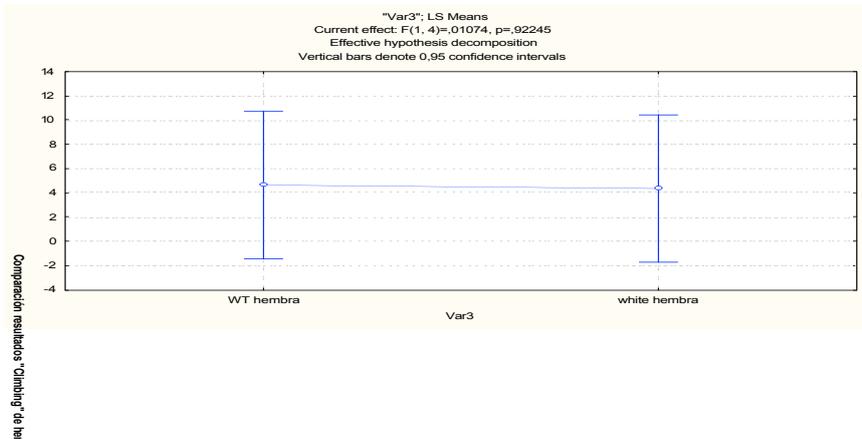
Test de normalidad: Shapiro Wilk



Test homogeneidad de varianzas: Levene

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Climbing 07 02 13.sta) Effect: "Var6" Degrees of freedom for all F's: 1, 4				
	MS Effect	MS Error	F	p
Comparación resultados "Climbing" de machos	0.010489	1.436385	0.007302	0.936008

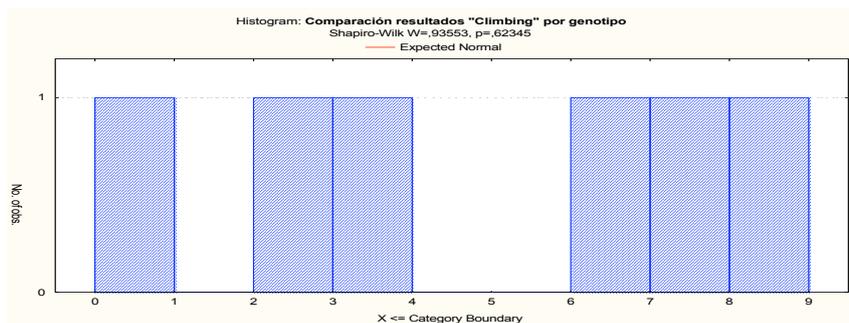
Resultado del ANOVA:



		"Var6"; LS Means (Climbing 07 02 13.sta) Current effect: F(1, 4)=1,9685, p=,23326 Effective hypothesis decomposition				
Cell No.	Var6	Comparación resultados "Climbing" de machos Mean	Comparación resultados "Climbing" de machos Std.Err.	Comparación resultados "Climbing" de machos -95,00%	Comparación resultados "Climbing" de machos +95,00%	N
1	WT macho	6,763951	1,569054	2,407558	11,12034	3
2	white macho	3,650617	1,569054	-0,705775	8,00701	3

Comparación de resultados de climbing por genotipo

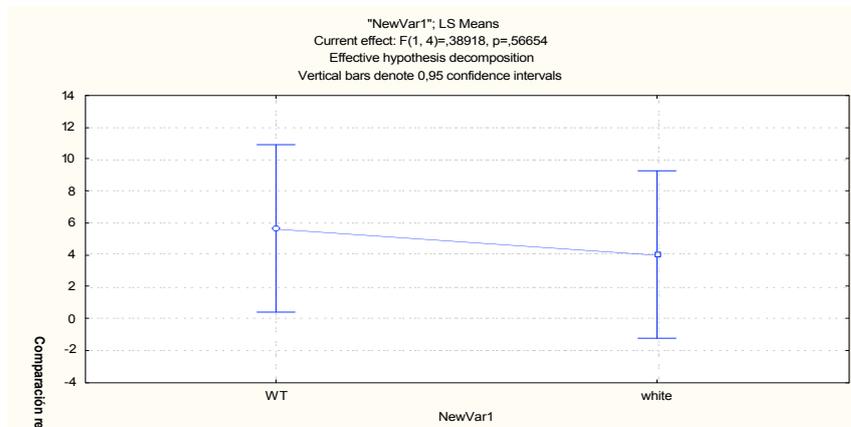
Test de normalidad: Shapiro Wilk



Test homogeneidad de varianzas: Levene

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Climbing 07 02 13.sta) Effect: "NewVar1" Degrees of freedom for all F's: 1, 4				
	MS Effect	MS Error	F	p
Comparación resultados "Climbing" por genotipo	0,042455	2,638931	0,016088	0,905189

Resultado del ANOVA:



		"NewVar1"; LS Means (Climbing 07 02 13.sta) Current effect: F(1, 4)=,38918, p=,56654 Effective hypothesis decomposition				
Cell No.	NewVar1	Comparación resultados "Climbing" por genotipo Mean	Comparación resultados "Climbing" por genotipo Std.Err.	Comparación resultados "Climbing" por genotipo -95,00%	Comparación resultados "Climbing" por genotipo +95,00%	N
1	WT	5,655996	1,895835	0,39232	10,91968	3
2	white	3,983394	1,895835	-1,28029	9,24707	3

II– Materiales y equipos utilizados

Materiales de mesada

- Tubos de plástico de 64x25 mm, con comida para moscas y tapones de algodón.
- Portaobjetos de vidrio de 26x76 mm.
- Cubreobjetos de vidrio 22x22 mm.
- Pincetas de acero inoxidable número 4 y 5.
- Agujas hipodérmicas de 0,5 mmx16 mm.
- Tubos ependorf de 15 ml.
- Placas de Petri de 50 mm de diámetro.
- Placas de plástico con 12 pocillos de aproximadamente 5mL 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 FiberOptic-HeimLQ1100
- Shaker TS-2000AVDRLShaker
- Vortex VoretX-Genie2
- Heladera
- Microscopio confocal de fluorescencia Olympus Modelo BX61, módulo confocal FV300, Cámara CCDDP70
- Computador con los programas ImageJ, Statistica7.0 y Graphpad Prism5 instalados
- Aparato surtidor de ON 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 1 Ox, se disolvieron las siguientes sales en una botella con un volumen pequeño de agua destilada y luego se enrasó a 1000mL con agua destilada:

18,6mM NaH₂PO₄ (2,56 g NaH₂PO₄.H₂O)

84,1mM NaH₂PO₄ (11,9 g NaH₂PO₄)

1750mM NaCl(102,2 g NaCl)

PBST 0,1% (PBS con detergente)

Se hizo una solución 0,1% de TritónX-100mL en PBS1X

PBSTA 0,1% (PBST con albúmina)

Se hizo una solución 0,1% de albúmina de suero bovino en PBST0,1%

Paraformaldehido 4% (PFA)

Se disolvieron 2g de Paraformaldehido en 50mL de PBS1x.- 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 NaOH1N si después de unos minutos no se había aclarado la solución.- Una vez que la solución se aclarase, se ajustó el pH a 7,2-7,4 con HCl.

Glicerol 50% u 80%

Se hizo una solución de 50% u 80% de glicerol en PBS1x

Medio de cultivo para moscas

Para preparar un litro se utilizaron:

1L de agua

80g de Agar

50g de levadura

90g de harina de maíz

100g de glucosa

3mL de ácido propiónico

9mL de Nipagina (preparada en solución, 10g de nipagina en 70mL de alcohol 95% y 30mL de agua destilada).

Se colocaron 750mL de agua fría en una olla y se agregaron el agar y la levadura. Se cocinó a fuego fuerte, revolviendo hasta alcanzar el primer hervor. Por otro lado, se agregó el harina de maíz a 250mL 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

1. Adams, M.D.; Celniker, S.E.; Holt, R.A.; Evans, C.A. *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
2. Adoutte, A.; Balavoine, G.; Lartillot, N.; Lespinet, O.; Prud'homme, B.; de Rosa, R. (2000) The new animal phylogeny: Reliability and implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4453-4465.
3. Ali Y.O., Escala W., Ruan K., Zhai R.G. (2011). Assaying Locomotor, Learning, and Memory Deficits in *Drosophila* Models of Neurodegeneration. *JoVE*. 49.
4. Bernards, A., and Hariharan, I.K. (2001) Of flies and men--studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 11, 274-278.
5. Bonini NM: Chaperoning brain degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:16407-16411.
6. Borycz1, J. *et al.* (2008) *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *The Journal of Experimental Biology* 211: 3454-3466.
7. Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
8. Brown, M. B., & Forsythe, A. B. (1974). Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association*, 69, 264-267.
9. Campbell, J. L. and Nash, H.A. (2001) Volatile General Anesthetics Reveal a Neurobiological Role for the white and brown Genes of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* 49: 339-349.
10. Cantera, R., *et al.* (2002) Mutations in spalt cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* 129, 5577-5586
11. Chintapalli, V. R., J.Wang and J. A. T. Dow (2007) Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat. Genet.* 39, 715-720.
12. Cox, D. R. (1959). The analysis of exponentially distributed life-times with two types of failures. *Journal of the Royal Statistical Society*, 21, 411-421.

13. Cox, D. R. (1972). Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society*, 34, 187-220.
- Mantel, N. (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports*, 50, 163-170.
14. de Celis, J.F., and Barrio, R. (2009) Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int J Dev Biol* 53, 1385-1398
15. Dewhurst, S. A., Croker, S. G., Ikeda, K. & McCaman, R. E. (1972) *Comp. Biochem. Physiol. B* 43, 975–981.
16. Exner N, et al. (2007) Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J. Neurosci* 27, 12413–12418.
17. L. Z. Faizullin, V. A. Gvozdev (1973) Dosage compensation of sex-linked genes in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and General Genetics* 126, 233-245.
18. Fergestad T, Bostwick B, Ganetzky B. *Metabolic disruption in Drosophila bang-sensitive seizure mutants*. *Genetics* 173, 1357–1364.
19. Fernandez-Funez P, Casas-Tinto S, Cepeda-Nieto A, Soto C, Rincon-Limas D: Hsp70 protects *Drosophila* brain neurons against Prion-dependent neurodegeneration. *A Dros Res Conf* 2007, 48: 77
20. Ferreiro *et al.* (2012). Whole transcriptome analysis of a reversible neurodegenerative process in *Drosophila* reveals potential neuroprotective genes. *BMC Genomics* 13:483.
21. Foster, A.C., Vezzani, A., French, E.D., and Schwarcz, R. (1984). Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* 48, 273–278.
22. Gehan, E. A. (1965a). A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples. *Biometrika*, 52, 203-223.
23. Gehan, E. A. (1965b). A generalized two-sample Wilcoxon test for doubly-censored data. *Biometrika*, 52, 650-653.
24. Glenner, G.G.; Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890.
25. Greene JC, Whitworth AJ, Andrews LA, Parker TJ, Pallanck LJ: Genetic and genomic studies of *Drosophila* parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2005, 14:799-811.

26. Green, M.M. (2010) 2010: A Century of *Drosophila* Genetics Through the Prism of the white Gene. *Genetics* 184: 3-7.
27. Gruenewald C, Botella JA, Bayersdorfer F, Navarro JA, Schneuwly S: Hyperoxia-induced neurodegeneration as a tool to identify neuroprotective genes in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med* 2009, 46:1668-1676.
28. Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Quinlan, M.; Tung, Y.C.; Zaidi, M.S.; Wisniewski, H.M. Microtubule-associated protein tau. (1986) A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084-6089.
29. Heisenberg, M. (1997) Genetic approaches to neuroethology. *Bioessays*, 19, 1065-1073.
30. Hiraku, Y., Inoue, S., Oikawa, S., Yamamoto, K., Tada, S., Nishino, K., and Kawanishi, S. (1995). Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by certain tryptophan metabolites. *Carcinogenesis* 16, 349–356.
31. Hirth, Frank. (2010) *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 9: 504-523.
32. Jackson GR, Salecker I, Dong X, et al. (1998) Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron* 21,633–642.
33. Koshimura K, Murakami Y, Tanaka J, Kato Y. 2000. The role of 6R-tetrahydrobiopterin in the nervous system. *Prog Neurobiol* 61, 415–438.
34. Kretschmar D, Hasan G, Sharma S, Heisenberg M, Benzer S. (1997) The swisscheese mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila*. *J Neurosci* 17, 7425–32.
35. Krishnakumar S, Burton D, Rasco J, Chen X, O'Donnell J. (2000). Functional interactions between GTP cyclohydrolase I and tyrosine hydroxylase in *Drosophila*. *J Neurogenet* 14,1–23.
36. Lees, A.J.; Hardy, J.; Revesz, T. , (2009) Parkinson's disease. *The Lancet* 373, 2055-2066.
37. Lessing, D., and Bonini, N.M. (2009) Maintaining the brain: insight into human neurodegeneration from *Drosophila melanogaster* mutants. *Nat Rev Genet* 10, 359-370
38. Leuzinger, S.; Hirth, F.; Gerlich, D.; Acampora, D.; Simeone, A.; Gehring, W.J.; Finkelstein, R.; Furukubo-Tokunaga, K.; Reichert, H. (1998) Equivalence of the fly orthodenticle gene and the human OTX genes in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 125, 1703-1710.
39. Lu, B. (2009) Recent advances in using *Drosophila* to model neurodegenerative diseases. *Apoptosis* 14, 1008-1020
40. Mount, S.M. (1987). Sequence similarity. *Nature* 325: 487.

41. O'Hare, K., Murphy, C., Levis, R., Rubin, G.M. (1984). DNA sequence of the white locus of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 180, 437--455.
42. Palladino MJ, Hadley TJ, Ganetzky B. (2002) Temperature-sensitive paralytic mutants are enriched for those causing neurodegeneration in *Drosophila*. *Genetics* 161, 1197–1208.
43. Pendleton RG, Parvez F, Sayed M, Hillman R. (2002) Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *JPET* 300, 91–96.
44. Peterson, K.J.; Lyons, J.B.; Nowak, K.S.; Takacs, C.M.; Wargo, M.J.; McPeck, M.A. (2004) Estimating metazoan divergence times with a molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6536- 6541.
45. Phillips, J. P. and Forrest, H. S. (1980). Ommochromes and pteridines. *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 2, 541-623.
46. Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H. et al. (2011) Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 108(2), 834-839.
47. Rezaval C, et al. (2008) A functional misexpression screen uncovers a role for *enabled* in progressive neurodegeneration. *PLoS ONE* 3, e3332.
48. Rogina B, Benzer S, Helfand SL. (1997) *Drosophila* drop-dead mutations accelerate the time course of age-related markers. *Proc Natl Acad Sci* 94, 6303–6.
49. Rong YS, Golic KG. (2000) Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* 288, 2013–18.
50. Rubin, G.M.; Yandell, M.D.; Wortman, J.R. et al. (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204-2215.
51. Rusten, T.E., et al. (2001) Spalt modifies EGFR-mediated induction of chordotonal precursors in the embryonic PNS of *Drosophila* promoting the development of oenocytes. *Development* 128, 711-722.
52. Scherzer, C.R., et al. (2003) Gene expression changes presage neurodegeneration in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics* 19, 2457–2466.
53. Shapiro, S. S., Wilk, M. B., & Chen, H. J. (1968). A comparative study of various tests of normality. *Journal of the American Statistical Association*, 63, 1343-1372.
54. Shen, J., Ford, D. Landis, G.N. et al. (2009) Identifying sexual differentiation genes that affect *Drosophila* lifespan. *BMC Geriatrics* 9, 56.
55. Simón-Sánchez, J.; Schulte, C.; Bras, J.M.; Sharma, M. et al. (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 41, 1308-1312.

56. Sitaraman D, et al. (2008) Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 5579–5584.
57. Tanzi, R.E.; McClatchey, A.I.; Lamperti, E.D.; Villa-Komaroff, L.; Gusella, J.F.; Neve, R.L. (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331, 528-530.
58. Venderova, K., Kabbach, G., Abdel-Messih, E. *et al.* (2009) Leucine-rich repeat kinase 2 interacts with Parkin, DJ-1 and PINK-1 in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics* 22, 4390–4404.
59. White, K.E., Humphrey, D.M, & Hirth, F. (2010) The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. *Front. Neurosci.* 4, 205.
60. Winderickx, J.; Delay, C.; De Vos, A.; Klinger, H.; Pellens, K.; Vanhelmont, T.; Van Leuven, F.; Zabrocki, P. (2008) Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1381-1395.
61. Yang Y, Nishimura I, Imai Y, Takahashi R, Lu B. (2003) Parkin suppresses dopaminergic neuronselective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* 37, 911–24.
62. Yellman, C., Tao, H., He, B., and Hirsh, J. (1997). Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4131–4136.