



# **Investigación de la potencial función neuroprotectora del gen *pretaporter* en un modelo de enfermedad de Parkinson**

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas – PEDECIBA Biología

Subárea Biología Celular y Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

**Licenciada en Ciencias Biológicas Constanza Silvera**

**Orientadora:** Dra. María José Ferreiro

**Co-orientador:** Dr. Rafael Cantera

Montevideo, Uruguay

2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Al tribunal.

A mis orientadores: María José y Rafael.

A PEDECIBA.

A la ANII: POS\_NAC\_2020\_1\_163927.

A todos los integrantes del Departamento de Biología del Neurodesarrollo del IIBCE y especialmente a Cristina y Daniel, por siempre ayudarme desde su experiencia.

A las ayudantes técnicas de la Plataforma de Química Analítica del IIBCE.

A mi familia, a mis amigos y a todas las personas que de algún modo contribuyeron y apoyaron la realización de este proyecto.

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

**Figura 1.** Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* a 25°C.

**Figura 2.** Comparación de la organización general del sistema nervioso en humanos y en *Drosophila*.

**Figura 3.** Resumen gráfico de los principales síntomas de la enfermedad de Parkinson.

**Figura 4.** Genes y procesos celulares involucrados en la enfermedad de Parkinson.

**Figura 5.** Representación esquemática de los principales grupos de neuronas dopaminérgicas del cerebro posterior adulto de *Drosophila*.

**Figura 6.** El gen parkina (*park*) y su alelo mutante *park*<sup>25</sup>.

**Figura 7.** El gen *pretaporter* (*prtp*) y su alelo mutante *prtp*Δ1.

**Figura 8.** Fenotipos de los marcadores dominantes de los cromosomas balanceadores empleados en los cruzamientos para la construcción de las moscas experimentales.

**Figura 9.** Representación esquemática de un cruzamiento hipotético entre dos moscas portadoras del alelo mutante recesivo “x” de un gen de interés ubicado en el cromosoma II, en heterocigosis con cromosoma balanceador CyO.

**Figura 10.** Representación esquemática del método para la adquisición de imágenes de fluorescencia de glándula salival de larvas L3 de *Drosophila* por medio de microscopía láser confocal.

**Figura 11.** Ensayo de sobrevida en *Drosophila*.

**Figura 12.** Ensayo de locomoción (*climbing assay*) en *Drosophila* para la evaluación del desempeño locomotor en mutantes de neurodegeneración.

**Figura 13.** El anticuerpo anti-Prtp funciona correctamente.

**Figura 14.** Expresión de Pretaporter (Prtp) en neuronas dopaminérgicas PPL1 de cerebros de machos adultos WT de *Drosophila* de 5 días de edad.

**Figura 15.** Inmunotinción con anti-tirosina-hidroxilasa (anti-TH) para la cuantificación comparativa de neuronas dopaminérgicas PPL1 en cerebros completos de machos adultos de *Drosophila* mutantes dobles *prtp-park* en comparación con mutantes *park* y controles.

**Figura 16.** Comparaciones intergenotípicas del número de neuronas dopaminérgicas PPL1 a 5 y 25 días de edad.

**Figura 17.** Comparaciones intragenotípicas del número de neuronas dopaminérgicas PPL1 en moscas de 5 y 25 días de edad.

**Figura 18.** Cuantificación por HPLC de los niveles de DOPAC en cerebros de machos adultos de 25 días de edad de todos los genotipos analizados.

**Figura 19.** Cuantificación por HPLC de los niveles de HVA en cerebros de machos adultos de 25 días de edad de todos los genotipos analizados.

**Figura 20.** Cuantificación de la supervivencia en machos mediante el método de Kaplan-Meier.

**Figura 21.** Cuantificación de la supervivencia en hembras mediante el método de Kaplan-Meier.

**Figura 22.** Curvas de supervivencia de hembras mutantes dobles *prtp-park* y *park* realizadas por el método Kaplan-Meier con intervalos de confianza.

**Figura 23.** Curvas de supervivencia de hembras mutantes *park* y *w* realizadas por el método Kaplan-Meier con intervalos de confianza.

**Figura 24.** Evaluación de la habilidad motora a través de ensayos de *climbing* en machos.

**Figura 25.** Evaluación de la habilidad motora a través de ensayos de *climbing* en hembras.

**Figura 26.** Decaimiento de la habilidad motora con el envejecimiento.

**Figura 27.** Análisis mediante STRING de posibles interacciones de Prtp.

**Figura 28.** Análisis mediante STRING de posibles interacciones de TXNDC5 (homólogo humano de Prtp).

**Figura 29.** Análisis mediante STRING de la red de interacciones de Prtp y el receptor KDELR.

**Figura 30.** Análisis mediante STRING de la red de interacciones de Prtp, Park y Tip60.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
1.1. Enfermedades neurodegenerativas.....	11
1.2. Drosophila como modelo de estudio de procesos neurodegenerativos .....	14
1.3. La enfermedad de Parkinson y sus modelos en Drosophila.....	19
1.4. Las moscas con mutaciones en el gen <i>parkina</i> como modelo de EP .....	26
1.5. El gen <i>pretaporter</i> : potencial neuroprotector .....	30
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1. Objetivo general .....	35
3.2. Objetivos específicos .....	35
<b>4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>36</b>
4.1. Cepas de Drosophila utilizadas, mantenimiento y colecta.....	37
4.2. Construcción de mutantes dobles <i>pretaporter-parkina</i> y mutantes <i>parkina</i> simples: uso de cromosomas balanceadores .....	38
4.2.1. Diseño de cruzamientos para la construcción de los mutantes dobles <i>prtp-park</i> .....	43
4.2.2. Diseño de cruzamientos para la construcción de los mutantes <i>park</i> simples en contexto <i>w<sup>1118</sup></i> .....	48
4.3. Ensayos histológicos .....	49
4.3.1. Inmunohistoquímica de glándula salival .....	49

4.3.2. Análisis de la expresión de Prtp en neuronas dopaminérgicas PPL1 de cerebros adultos de <i>Drosophila</i> .....	52
4.3.3. Análisis del número de neuronas dopaminérgicas PPL1 en doble mutantes <i>prtp-park</i> en comparación con <i>park</i> y sus controles .....	56
4.3. Cuantificación de los niveles de DA y metabolitos asociados a su degradación.....	59
4.4. Ensayos de sobrevivida.....	61
4.5. Ensayos de locomoción ( <i>climbing assays</i> ) .....	63
4.6. Análisis de interacciones de Prtp.....	66
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
5.1. Construcción de mutantes dobles con alelos de falta de función en los genes <i>prtp</i> y <i>park</i> , potencial combinación neuroprotectora .....	67
5.2. Construcción de mutantes simples <i>park</i> , controles de neurodegeneración.....	68
5.3. El anticuerpo anti-Prtp funciona correctamente en inmunohistoquímica de glándula salival de larva L3 de <i>Drosophila</i> , tejido positivo para la expresión de Prtp .....	69
5.4. Prtp se expresa en neuronas dopaminérgicas PPL1 de adultos WT y colocaliza parcialmente con la enzima TH.....	72
5.5. La ausencia de expresión del Prtp protege contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas PPL1 causada por la mutación del gen <i>park</i> .....	75
5.6. Los mutantes dobles <i>prtp-park</i> exhiben un aumento no significativo de los niveles de DOPAC y HVA en relación con los mutantes <i>park</i> .....	81
5.7. Los machos mutantes dobles para <i>prtp-park</i> sobreviven significativamente más que los mutantes de neurodegeneración <i>park</i> .....	83
5.8. La sobrevivida de las hembras mutantes dobles <i>prtp-park</i> es significativamente mayor que la de las mutantes de neurodegeneración <i>park</i> hasta el día 59 de vida.....	85

5.9. La habilidad motora de los mutantes dobles <i>prtp-park</i> es mayor que la de los mutantes de neurodegeneración <i>park</i> en hembras .....	90
6. <b>DISCUSIÓN</b> .....	101
6.1. Expresión de Prtp en neuronas dopaminérgicas PPL1 .....	103
6.2. Número de neuronas dopaminérgicas PPL1 .....	106
6.3. Niveles de metabolitos de degradación de la DA.....	109
7. <b>CONCLUSIÓN</b> .....	116
8. <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	117

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia y aún no tiene cura ni tratamiento efectivo, lo que vuelve esencial explorar mecanismos de neuroprotección mediante modelos como los mutantes de *Drosophila* para el gen *parkina*, homólogo al gen humano *PARK2*, que exhiben un fenotipo de neurodegeneración bien caracterizado: reducción del número de neuronas dopaminérgicas, bajos niveles de dopamina, menor sobrevida y defectos motores. A través del análisis transcriptómico de un caso excepcional de neurodegeneración reversible en *Drosophila*, nuestro grupo identificó al gen *pretaporter* como candidato a neuroprotector. Aquí, exploramos la hipótesis de que la pérdida de función de *pretaporter*, homólogo al gen humano *TXNDC5*, ejerce una función neuroprotectora en mutantes *parkina*. Esta maestría incluyó la construcción de mutantes dobles *pretaporter-parkina* siguiendo un diseño de cruzamientos genéticos, la determinación de la expresión de Pretaporter en neuronas dopaminérgicas PPL1 de moscas adultas *wild-type* por inmunohistoquímica y microscopía confocal, la cuantificación comparativa de neuronas PPL1 en los mutantes dobles, *parkina* y controles mediante la misma técnica y de los niveles de metabolitos de la dopamina por cromatografía líquida de alta eficacia, análisis de sobrevida y de habilidad motora. Reportamos que Pretaporter se expresa en neuronas PPL1 de individuos *wild-type* y que la ausencia de *pretaporter* en un contexto *parkina* protege contra la pérdida de neuronas PPL1, genera una tendencia al aumento de los metabolitos de la dopamina, aumenta la sobrevida en machos y hembras y protege contra la disminución de la habilidad motora en hembras. Proponemos que la ausencia de Pretaporter podría mitigar la muerte neuronal mediada por Draper, que Pretaporter podría ser un regulador negativo de la mitofagia y que podría estar involucrado en la regulación de la dopamina. En conclusión, este estudio asocia por primera vez a *pretaporter* con la neuroprotección en un contexto de neurodegeneración *parkina*.

## ABSTRACT

Parkinson's Disease, the second most prevalent neurodegenerative disease, has still no cure or effective treatment, making essential to explore mechanisms of neuroprotection through models such as *Drosophila* mutants for the gene *parkin*, homologous to human's *PARK2*, which exhibit a well-characterized neurodegeneration phenotype: loss of dopaminergic neurons, lower dopamine levels, shortened lifespan and motor defects. Through the transcriptomic analysis of an exceptional case of reversible neurodegeneration in *Drosophila* our group identified *pretaporter* as a neuroprotective candidate gene. Here, we explore the hypothesis that the loss-of-function of *pretaporter*, homologous to human's *TXNDC5*, exerts neuroprotection in *parkin* mutants. This master's thesis included the construction of *pretaporter-parkin* double mutants following predesigned genetic crosses, determination of the expression of Pretaporter in PPL1 dopaminergic neurons of adult *wild-type* flies by immunohistochemistry and confocal microscopy, quantification of brain PPL1 neurons in double mutants compared to *parkin* and controls also by immunohistochemistry and confocal microscopy, quantification of dopamine metabolites levels by high-performance liquid chromatography, evaluation of lifespan and motor ability. Here we report that Pretaporter is expressed in PPL1 dopaminergic neurons of *wild-type* individuals and that *pretaporter* loss-of-function ameliorates the *parkin* mutants' phenotype, protecting against the loss of dopaminergic PPL1 neurons, showing a tendency to the increase of dopamine metabolites, extending lifespan greatly in males and females and protecting against the motor ability decay in the case of females. We propose that the loss-of-function of Pretaporter in this context could mitigate neuronal death mediated by the positive regulation of Draper, and that Pretaporter could have a function as a negative regulator of mitophagy and be involved in the regulation pathway of dopamine. To conclude, this study associates *pretaporter* with neuroprotection in a *parkin* mutant context for the first time.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas representan un gran problema para la salud humana, afectando a personas de avanzada edad a nivel personal, familiar, social y económico (United Nations, 2015).

De los diferentes tipos de enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (EP) son las formas más comunes, afectando, en Estados Unidos, a 6 millones y 1 millón de personas, respectivamente (Hussain et al., 2018; Marras et al., 2018; Rajan et al., 2021). En Uruguay, de acuerdo con cifras publicadas por el Ministerio de Salud Pública, actualmente hay aproximadamente 50000 personas que padecen la enfermedad de Alzheimer y 6000 personas afectadas por la EP (Ministerio de Salud Pública, 2022, a; Ministerio de Salud Pública, 2022, b). A su vez, las tendencias demográficas indican que existirá un crecimiento importante de la población envejecida en casi todos los países en las próximas décadas y con ello, aumentará considerablemente la incidencia de estas patologías (United Nations, 2015). El relevamiento más reciente muestra que Uruguay es uno de los países más envejecidos del contexto latinoamericano, a la par de Cuba, con un índice de envejecimiento en constante incremento, una tasa global de fecundidad de 1,98 hijos por mujer, situada por debajo del nivel de reemplazo poblacional y feminización del sector envejecido (Comisión Económica para América Latina y el Caribe, 2017). Las enfermedades neurodegenerativas afectan, además de a las personas que las padecen, a sus cuidadores, en su mayoría mujeres, quienes también experimentan una carga física y emocional y actúan generalmente desde la informalidad, tanto en el contexto

internacional como en nuestro país (Batthyány et al., 2013; Brady, 2017; Carod-Artal et al., 2013; Tan et al., 2012).

Desde el punto de vista biológico, las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de patologías caracterizadas por la degeneración progresiva y hasta ahora irreversible de la estructura y la función del tejido nervioso central y/o periférico, generando la pérdida de grupos específicos de neuronas, lo que se traduce en una variedad de manifestaciones clínicas (Agrawal & Biswas, 2015; Hussain et al., 2018).

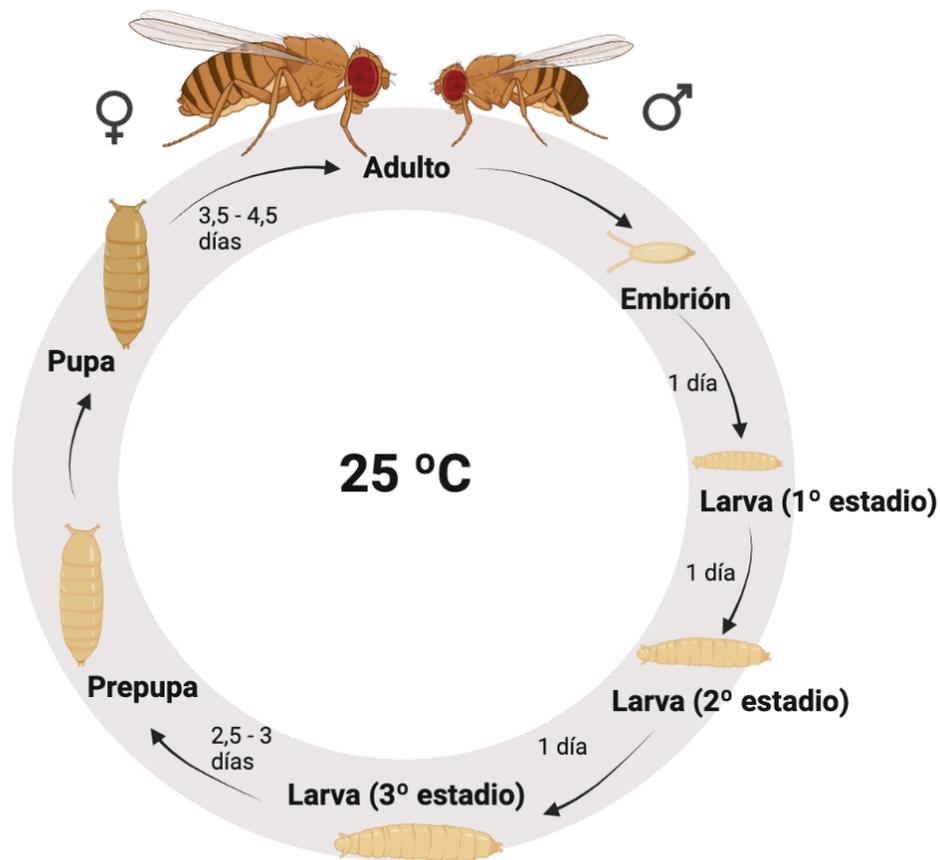
A pesar de esta gran heterogeneidad de manifestaciones, las enfermedades neurodegenerativas comparten mecanismos multifactoriales de aparición y mantenimiento debidos a: 1) **defectos en procesos intracelulares** como la apoptosis, la autofagia, la función mitocondrial, la homeostasis de proteínas a través del sistema ubiquitina-proteasoma; 2) **defectos en mecanismos que involucran el ambiente tisular local** como la adhesión celular, la neurotransmisión, la aparición de priones y factores transmisibles; 3) **cambios en el ambiente sistémico** como lo es la inflamación, defectos en el sistema inmune, cambios endócrinos y/o en el metabolismo lipídico, cambios en el sistema vascular y 4) **cambios en procesos relacionados al desarrollo y al envejecimiento** como el acortamiento de secuencias teloméricas, defectos en la señalización y transporte de factores neurotróficos, así como también mutaciones en los genes que los codifican y cambios epigenéticos (Ramanan & Saykin, 2013). La mayoría de estos mecanismos se encuentran conservados entre humanos y otros organismos, como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Bulus et al., 2020). No existe al momento cura o tratamiento efectivo para las enfermedades neurodegenerativas, volviendo indispensable explorar nuevos mecanismos de “neuroprotección”, definida como el conjunto de procesos que previenen, mitigan o

retrasan los procesos neurodegenerativos (Przedborski et al., 2003) y que también se encuentran conservados en humanos y *Drosophila*.

## 1.2. *Drosophila* como modelo de estudio de procesos neurodegenerativos

*Drosophila melanogaster*, también llamada mosca del vinagre o mosca de la fruta, es un artrópodo díptero, cosmopolita, perteneciente a la familia Drosophilidae y adoptada como modelo animal de experimentación por Thomas Morgan a principios del siglo XX, quien demostró la existencia de genes, su ubicación en los cromosomas y su papel en la herencia, obteniendo el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1933 (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1933/morgan/facts/>).

*Drosophila* es un organismo modelo que ofrece múltiples ventajas en comparación con otros animales utilizados en experimentación. En primer lugar, su ciclo de vida es breve y consta de cuatro etapas fácilmente identificables: embrión, larva (con tres subetapas: L1, L2 y L3), pupa y adulto (**Figura 1**) (Ashburner & Thompson, 1978). A una temperatura de 25°C, el ciclo de vida total dura aproximadamente 10 días (**Figura 1**). Adicionalmente, el largo de vida (en la etapa adulta) es relativamente corto, con una duración de aproximadamente 80 días en moscas de genotipo salvaje bajo condiciones de laboratorio estándar, variando en relación a factores como la temperatura, el estrés y la dieta (Staats et al., 2018). Estas características permiten llevar a cabo experimentos de forma rápida y obtener resultados a corto plazo, incluso tratándose de estudios sobre procesos degenerativos, por naturaleza progresivos, donde el envejecimiento es un factor clave (McGurk et al., 2015).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* a 25°C.** Comienza con la fecundación del huevo, seguido de la formación del embrión. El desarrollo embrionario ocurre en tan solo 24 horas y culmina con la eclosión de la larva del huevo. Durante el desarrollo postembrionario, la larva crece y atraviesa tres subestadios de desarrollo (L1, L2, L3) mediante mudas sucesivas. Luego, hacia el final del tercer subestadio (L3), la larva cesa su alimentación y comienza el estadio de pupa, un estadio sésil donde ocurre la metamorfosis. Finalmente, de la carcasa pupal emerge la mosca adulta. Este proceso ocurre en aproximadamente 10 días. Imagen generada utilizando la herramienta <https://www.biorender.com/>.

El mantenimiento de *Drosophila* en laboratorio es sencillo y económico. Los adultos producen grandes cantidades de descendencia, lo que permite realizar experimentos a gran escala (Bolus et al., 2020).

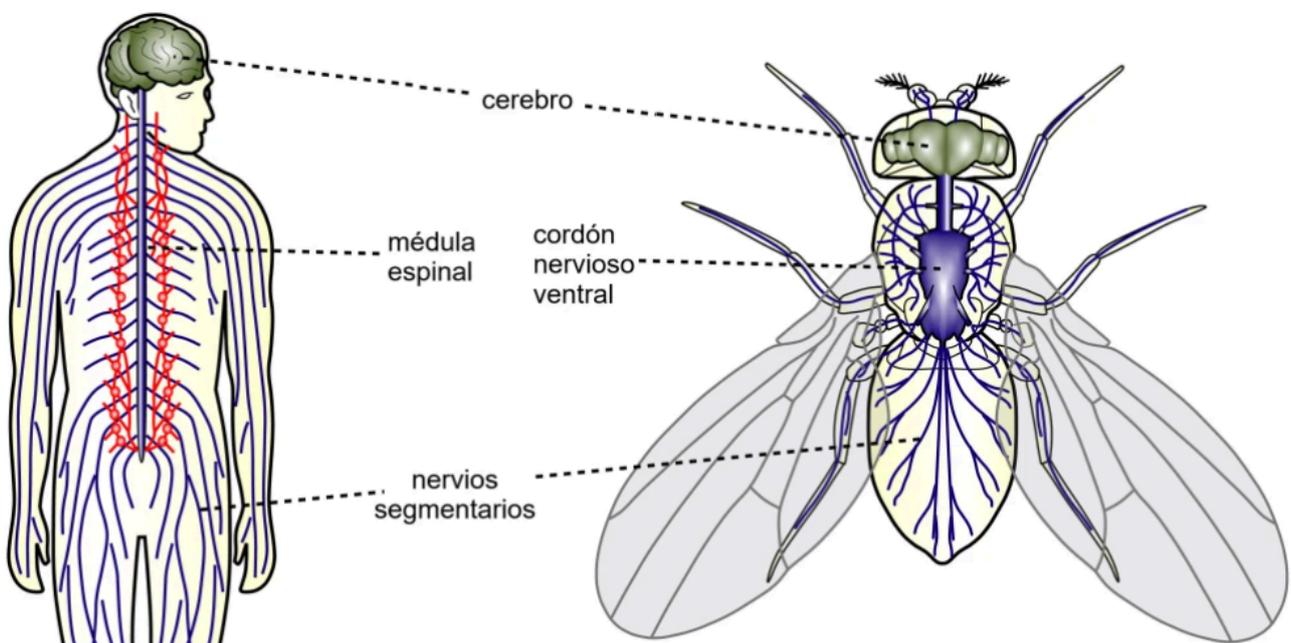
*Drosophila* posee un reducido número de cromosomas (4 pares), lo que facilita su manipulación genética y posee un sistema de cromosomas sexuales XY, similar al de los mamíferos (Morgan, 1910). Su genoma está completamente secuenciado, constando de

aproximadamente 15000 genes, muchos de los cuales presentan homólogos humanos y de otros modelos de experimentación (Adams et al., 2000). Dos estudios de genómica comparativa revelaron una notable conservación de genes entre la mosca y el ser humano, demostrando que *Drosophila* tiene genes ortólogos para alrededor de dos tercios de los genes humanos que, al encontrarse afectados, causan enfermedades (Reiter et al., 2001; Rubin et al., 2000). Sumado a esto, existen bases de datos que compilan información actualizada, centralizada y curada sobre genética y genómica de la mosca, sobre alelos, constructos transgénicos, fenotipos, interacciones físicas y genéticas, ontología, expresión de genes en diferentes tejidos y en diferentes etapas del desarrollo y reactivos utilizados en *Drosophila*. Dos de las bases de datos más relevantes y que utilicé frecuentemente durante mi maestría fueron FlyMine (<https://www.flymine.org>) y FlyBase (<https://flybase.org>) (Gramates et al., 2022; Lyne et al., 2007).

*Drosophila* permite, además, una manipulación genética sofisticada a través del empleo de diversas herramientas genéticas disponibles para la investigación: mutagénesis insercional por elementos P, ARN de interferencia, el sistema GAL4-UAS, CRISPR, entre otros (Brand & Perrimon, 1993; Rubin & Spradling, 1982; Venken et al., 2011). Esto permite generar modelos genéticos que recapitulan aspectos de los procesos neurodegenerativos e investigar el rol de genes individuales en neurodegeneración o neuroprotección en diferentes tipos celulares, generando conocimiento que puede ser trasladado a otros modelos animales y al humano (Bulus et al., 2020).

El sistema nervioso (SN) de *Drosophila* presenta algunas características estructurales generales similares a las de nuestro propio sistema nervioso (**Figura 2**). El sistema nervioso central de la mosca está formado por el cerebro y el cordón nervioso ventral, análogo a la médula espinal (Hartenstein, 1993). El sistema nervioso periférico está compuesto por

ganglios (agrupaciones de neuronas extra-cerebrales) y nervios periféricos que se extienden desde el cerebro y el cordón ventral hacia el resto del cuerpo y están formados por axones de neuronas sensoriales y motoras (Hartenstein, 1993). *Drosophila* posee distintos tipos neuronales, por ejemplo: neuronas colinérgicas, GABAérgicas, serotoninérgicas, glutamatérgicas y dopaminérgicas (Hartenstein, 1993). Existen varias bases de datos que compilan la información acerca de SN de *Drosophila* siendo Virtual Fly Brain (<http://www.virtualflybrain.org/>) la que utilicé reiteradas veces durante mi maestría (Court et al., 2023).



**Figura 2. Comparación de la organización general del sistema nervioso en humanos y en *Drosophila*.** La imagen muestra una comparación entre las principales estructuras del SN de humanos y de *Drosophila*. En la mosca se observa el cerebro en la cabeza, destacándose los lóbulos ópticos y el cerebro central, un cordón nervioso ventral situado en el tórax, análogo a la médula espinal en el tronco de los humanos y los nervios segmentarios. Adaptada de <https://droso4schools.wordpress.com/organs/> y generada por el Dr. Andreas Prokop, *The University of Manchester*.

Debido a que *Drosophila* combina las ventajas de tener un SN relativamente sencillo, tener una alta conservación de genes (como *parkina* y *pretaporter*, que introduciré más adelante)

y ofrecer una gran capacidad para la manipulación genética es, en términos generales, un excelente organismo modelo para el estudio de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (Ye et al., 2023).

### 1.3. La enfermedad de Parkinson y sus modelos en Drosophila

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor prevalencia a nivel mundial (Aryal & Lee, 2019). Sus síntomas principales son temblor, rigidez, bradicinesia, akinisia e inestabilidad postural, pero el cuadro clínico incluye otros síntomas motores no cardinales y síntomas no motores (**Figura 3**) (Balestrino & Schapira, 2020).



**Figura 3. Resumen gráfico de los principales síntomas de la enfermedad de Parkinson.** Los síntomas están agrupados en dos categorías: motores y no motores. La lista está basada en la revisión de Balestrino y Schapira, 2020 (Balestrino & Schapira, 2020). Imagen generada en <https://www.biorender.com/>.

Las características patológicas distintivas de la EP son: la pérdida selectiva y progresiva de neuronas dopaminérgicas en la región mesencefálica denominada sustancia nigra *pars compacta* y la acumulación de conglomerados de proteínas mal plegadas denominados cuerpos de Lewy en el citoplasma de neuronas (Aryal & Lee, 2019).

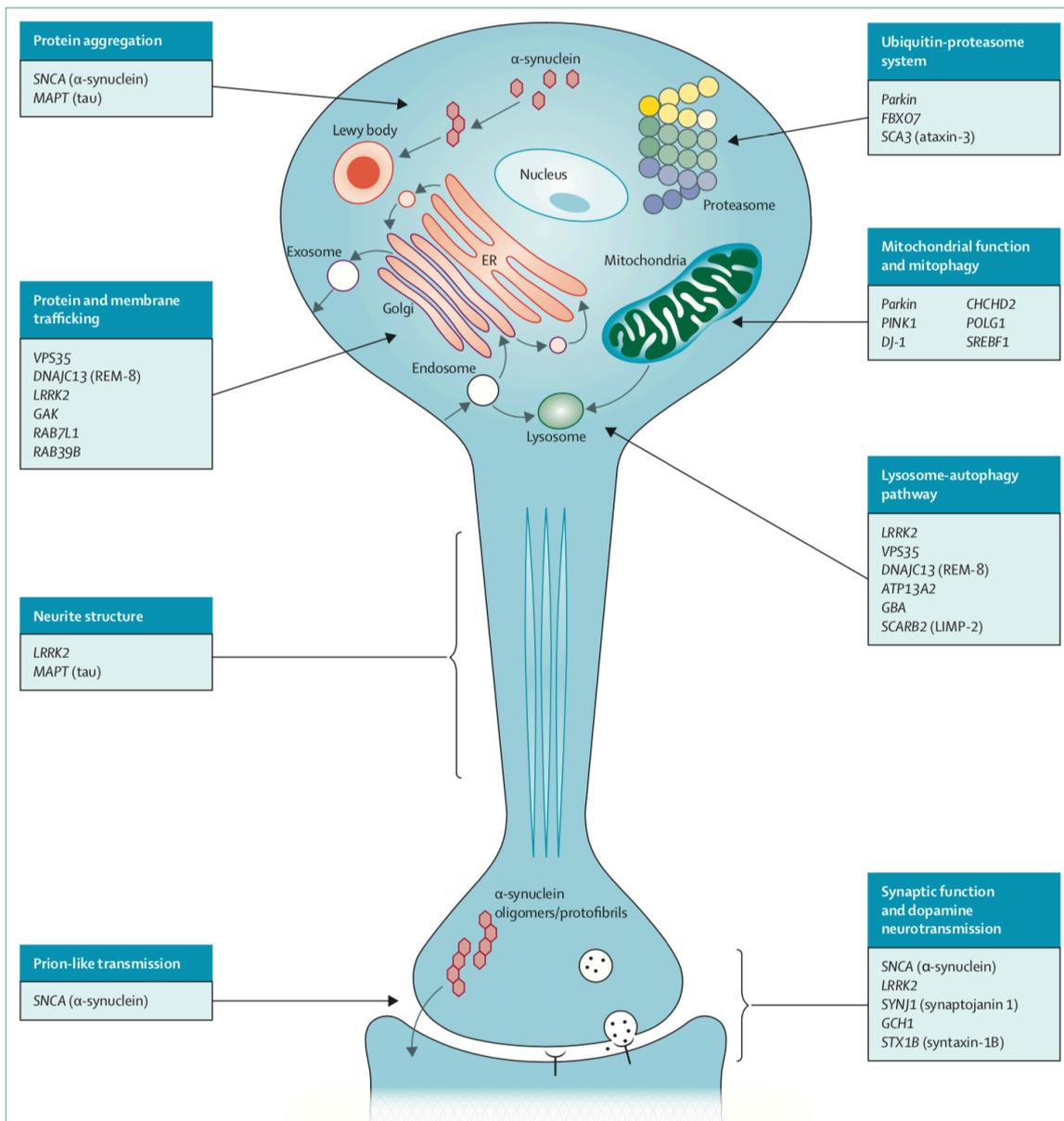
La sustancia nigra *pars compacta* forma parte de la vía nigroestriada de la dopamina (DA), que desempeña un papel crítico en el control y facilitación del movimiento, y se ve afectada en la EP debido a la deficiencia de DA causada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Kish et al., 1988). Los principales componentes de los cuerpos de Lewy son la proteína alfa-sinucleína y el péptido ubiquitina (Spillantini et al., 1997). La alfa-sinucleína es propensa a plegarse de forma inadecuada, volviéndose insoluble y formando agregados fibrilares (Hsu et al., 2000). Los intermediarios de este proceso de agregación son oligómeros y formas proto-fibrilares, ambos citotóxicos, que perjudican las funciones mitocondrial, lisosomal y proteasomal, dañan las membranas biológicas y el citoesqueleto y alteran la función sináptica (Alim et al., 2004; Danzer et al., 2007; Scott et al., 2010; H. Snyder et al., 2003).

La mayoría de los casos de la EP son idiopáticos y los procesos esporádicos que la desencadenan se vinculan al envejecimiento, a la interacción con toxinas ambientales (por ejemplo: pesticidas), a la neuroinflamación, excitotoxicidad, estrés oxidativo y acumulación de proteínas mal plegadas debido al deterioro de las vías de degradación de proteínas con la edad (Aryal & Lee, 2019; Balestrino & Schapira, 2020; T. P. Brown et al., 2006; Whitton, 2007).

Adicionalmente, en el cerebro humano se expresan genes conservados en *Drosophila* y otros modelos animales que cuando se encuentran mutados y no producen sus proteínas correspondientes o cuando sus niveles de expresión no se mantienen dentro de un estrecho

rango finamente regulado, constituyen un factor de riesgo para la aparición de la EP (Cookson, 2012).

Las mutaciones en el gen *SNCA* (Polymeropoulos et al., 1997), que codifica la proteína alfa-sinucleína, *PARK1* (Polymeropoulos et al., 1997), *LRRK2* (Zimprich et al., 2004), *VPS35* (Zimprich et al., 2011), causan formas autosómicas dominantes de EP, mientras que mutaciones en los genes *DJ-1* (*PARK7*) (Bonifati et al., 2003), *PINK1* (Valente et al., 2004) y *PARK2* (Kitada et al., 1998) están asociados a formas autosómicas recesivas y de aparición temprana o juvenil de EP. Los productos de estos genes forman parte de procesos celulares clave cuya disrupción subyace a la patogénesis de la EP (**Figura 4**) (Kalia & Lang, 2015). Estos son solamente algunos ejemplos de genes vinculados a esta patología, ya que existen en la actualidad descritos al menos 19 genes cuya mutación se asocia directamente a EP y muchos otros loci adicionales que constituyen un riesgo genético para el desarrollo de la EP esporádica (Deng et al., 2018).



**Figura 4. Genes y procesos celulares involucrados en la enfermedad de Parkinson.** La imagen muestra una visión general de los genes y procesos celulares involucrados en la patogénesis de la EP, incluyendo transmisión priónica, degeneración de la estructura de las neuritas, disrupción del tráfico intracelular, agregación de proteínas mal plegadas, disfunción mitocondrial e impedimento/disrupción de la mitofagia, impedimento/disrupción de la vía lisosomal y la autofagia y alteración de la función sináptica y de la neurotransmisión de DA. Adaptado de Kalia y Lang, 2015.

Desde una perspectiva evolutiva, los genes que predisponen a la aparición de la EP y su regulación, no fueron contraseleccionados a lo largo de la evolución humana (**Figura 4**)

(Cookson, 2012; Lill et al., 2012; Lücking et al., 2003; UK Parkinson's Disease Consortium et al., 2011). Por el contrario, estos genes codifican proteínas que son beneficiosas y necesarias para el desarrollo normal del cerebro humano, en etapas anteriores a la edad reproductiva (Cookson, 2012). Al manifestarse la neurodegeneración, usualmente en etapas tardías, post-reproductivas, la selección negativa no remueve de la población humana aquellos alelos vinculados a un mayor riesgo de desarrollo de EP. Por lo tanto, mientras la población global envejece, la EP seguirá siendo un problema médico significativo (Cookson, 2012).

Sumado a esto, el tratamiento actual de la EP se basa en la administración de fármacos como Levodopa (precursor de la DA y la droga más efectiva contra los síntomas motores), agonistas de los receptores de DA D1-3, inhibidores de la monoamina oxidasa B, entre otros (Balestrino & Schapira, 2020; Seppi et al., 2011). En etapas posteriores de la enfermedad pueden ser apropiados enfoques alternativos como la estimulación cerebral profunda (Balestrino & Schapira, 2020). Los tratamientos actualmente disponibles ofrecen un control de los síntomas motores, pero no retrasan ni detienen la progresión de la neurodegeneración (Balestrino & Schapira, 2020).

Por lo tanto, es esencial explorar los mecanismos de neurodegeneración que desencadenan la EP y aquellos de neuroprotección que prevengan, mitiguen o reviertan su aparición a través del empleo de modelos biológicos como lo son los modelos toxicológicos y genéticos de *Drosophila* (Aryal & Lee, 2019).

Los modelos toxicológicos de EP en *Drosophila* implican la exposición de las moscas a compuestos químicos que reproducen parcialmente el fenotipo observado en pacientes con EP (Aryal & Lee, 2019). Uno de los compuestos comúnmente utilizados es la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) (Aryal & Lee, 2019). Esta toxina fue descubierta en

la década de 1980 como un contaminante de una droga ilegal que causó un brote de casos de parkinsonismo en sus usuarios (Langston et al., 1983). El modelo de EP por exposición a MPTP en moscas dio lugar a algunos de los primeros trabajos que establecieron una conexión entre la disfunción mitocondrial y la EP (Aryal & Lee, 2019; Schober, 2004). Otros compuestos utilizados son el herbicida de uso agrícola Paraquat y el pesticida rotenona (Snyder & D'Amato, 1985; Tieu, 2011). El Paraquat provoca estrés oxidativo en las células mediante la generación de especies reactivas del oxígeno y la rotenona bloquea la cadena de transporte de electrones a través de la inhibición del complejo I mitocondrial, al igual que el MPTP (Tieu, 2011). El modelo por exposición a rotenona reproduce el fenotipo de la EP, incluyendo la formación intracelular de inclusiones que se asemejan a cuerpos de Lewy, lo que no sucede en los modelos por exposición a MPTP (Sherer et al., 2003; Tieu, 2011).

Tanto las formas esporádicas como las hereditarias de la EP tienen mecanismos etiopatológicos comunes (Cookson, 2012). En este sentido, la utilización de modelos genéticos de EP en *Drosophila* es una estrategia muy útil para comprender los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a esta enfermedad (Aryal & Lee, 2019). Estos modelos, algunos de los cuales ejemplificaré a continuación, se basan en la manipulación genética de las moscas con el fin de alterar la expresión de los genes vinculados a la patología. En primer lugar, la expresión panneuronal de alfa-sinucleína humana portando la mutación A30P o A57T, vinculadas a EP familiar, genera la degeneración de neuronas dopaminérgicas, la formación de cuerpos de Lewy y disfunciones locomotoras (Feany & Bender, 2000). La mutación G2019S del gen *LRRK2* (común en pacientes con EP familiar), genera un incremento en la actividad kinasa de su proteína codificada (normalmente vinculada a autofagia), lo que resulta en toxicidad celular, degeneración de neuronas dopaminérgicas y déficit locomotores (West et al., 2007; D. Yang et al., 2018). El *knockdown* del gen *VPS35*, también asociado a autofagia y al reciclaje de vesículas, impide la degradación lisosomal de

alfa-sinucleína provocando su acumulación en lisosomas, neurotoxicidad, deficiencias locomotoras y desorganización de la estructura de los ojos compuestos (Miura et al., 2014). Los mutantes de pérdida de función del gen mitocondrial *DJ-1* presentan severos defectos locomotores, pero sin pérdida de neuronas dopaminérgicas (Park et al., 2005). Los mutantes *knockout* para el gen *pink1*, que normalmente codifica la kinasa inducida por PTEN 1 (Pink1), no presentan el aumento normal de los niveles de mitofagia, necesario para la prevención de la acumulación de mitocondrias dañadas, que ocurre con el envejecimiento en las células de los músculos del vuelo y en neuronas dopaminérgicas (Cornelissen et al., 2018). Uno de los modelos de EP en *Drosophila* más exitoso, **es el modelo de falta de función en el gen *parkina***, el cual describo detalladamente en la siguiente sección, por ser el modelo que empleé en este trabajo de maestría.

Varios estudios que emplean modelos de EP en *Drosophila* contribuyeron significativamente al conocimiento sobre esta patología en humanos mediante la identificación de genes que potencian o suprimen la neurodegeneración producida por proteínas tóxicas (Jaiswal et al., 2012), revelando cómo genes vinculados a la patología (*parkina* y *pink1*) intervienen en los procesos de mitofagia (Cornelissen et al., 2018; Narendra et al., 2009), de apoptosis (*parkina*) (Greene et al., 2003) de autofagia, en la vía endo-lisosomal y en el reciclaje de vesículas (*LRRK2*) (Matta et al., 2012; Soukup et al., 2016). Otros trabajos dilucidaron que algunos de los genes vinculados a EP interaccionan entre sí, colocando, por ejemplo, a los genes *pink1* y *parkina* en la misma vía de mantenimiento de la integridad mitocondrial (Clark et al., 2006; Park et al., 2006). También, la investigación sobre EP en *Drosophila* llevó a la identificación de compuestos potencialmente terapéuticos, como la vitamina K, con efectos beneficiosos sobre la disfunción mitocondrial (Vos et al., 2012). Actualmente, los potenciales efectos de la vitamina K en pacientes con EP se encuentran en evaluación clínica (Prasuhn et al., 2021; Vos & Klein, 2021).

#### 1.4. Las moscas con mutaciones en el gen *parkina* como modelo de EP

En humanos, la EP causada por mutaciones en el gen *PARK2* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5071>), homólogo humano al gen *parkina* (abreviado *park*) de *Drosophila*, fue inicialmente reportada por Kitada y colaboradores en 1998 (Kitada et al., 1998). El rearrreglo de exones es el tipo más común de mutación en este gen y la deleción de 3 de los exones es la más abundante (Wasner et al., 2020). Incluso en su forma monoalélica, las mutaciones en el gen *PARK2* incrementan el riesgo de desarrollo de EP (Grünewald et al., 2013).

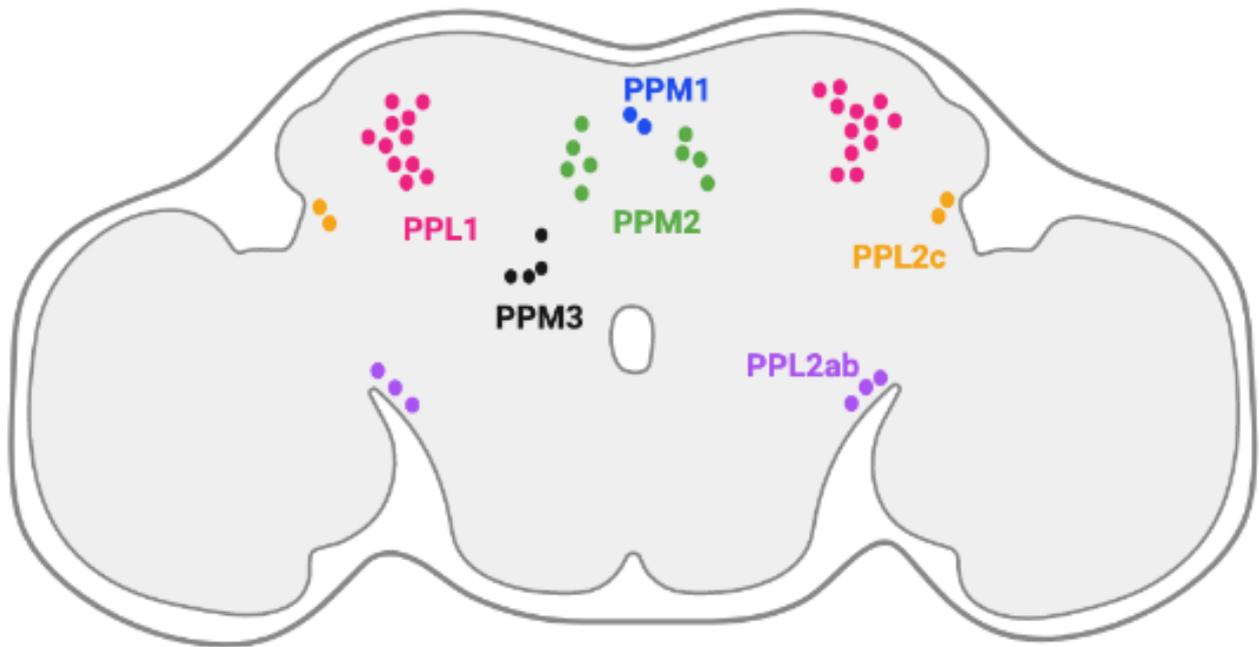
En *Drosophila*, el gen *park* (<https://flybase.org/reports/FBgn0041100>) está localizado en el cromosoma III y codifica la enzima Parkina (Park) con actividad E3 ubiquitín ligasa, que cataliza la transferencia de ubiquitina a proteínas blanco, etiquetándolas para la degradación en el proteasoma (Imai et al., 2000). Además, Park actúa como un regulador del *clearance* mitocondrial, translocándose desde el citosol selectivamente hacia mitocondrias dañadas (despolarizadas) (Narendra et al., 2008). Este reclutamiento es mediado por otra proteína mencionada anteriormente por su vinculación a EP hereditaria, Pink1, la cual se acumula en las mitocondrias como respuesta al descenso de su potencial de membrana (Lazarou et al., 2012). La enzima Park, una vez translocada a las mitocondrias, poliubiquitina varias proteínas de la membrana mitocondrial externa, generando una señal de eliminación mitocondrial que es amplificada por la fosforilación mediada por Pink1 de las cadenas de poliubiquitina (Ham et al., 2020; Rakovic et al., 2013; Sulkshane et al., 2021). La fosfoubiquitina desencadena el reclutamiento de proteínas adaptadoras que atraen complejos activadores de la autofagia, lo que resulta en la formación de autofagosomas conteniendo las mitocondrias dañadas (Onishi et al., 2021).

Park, además de ser responsable del marcaje de mitocondrias disfuncionales para su degradación lisosomal, también está involucrada en la regulación de la separación de las mitocondrias dañadas de la red general de mitocondrias, lo cual ayuda a eliminarlas eficientemente del *pool* general (Wasner et al., 2020). Lo hace a través de la ubiquitinación de proteínas de fusión mitocondrial, marcándolas para su degradación, con lo que el equilibrio dinámico en el cual se encuentran los procesos de fisión y fusión mitocondrial se inclina hacia la fisión, promoviéndola (Wasner et al., 2020).

Park y Pink1 también están involucradas en otra vía de control de calidad mitocondrial que implica la formación de vesículas derivadas de mitocondrias que contienen proteínas dañadas y que posteriormente son dirigidas hacia los lisosomas (McLelland et al., 2014).

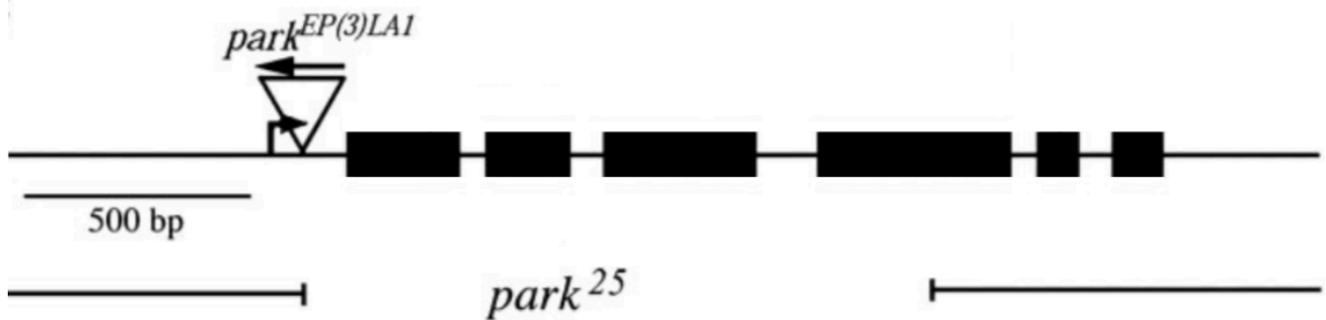
Todos estos procesos ocurren bajo condiciones normales y contribuyen a la homeostasis celular, pero también son promovidos por señales de estrés celular como lo son el daño oxidativo, la hipoxia y el déficit de nutrientes (Lionaki et al., 2015).

Los mutantes para el gen *park* de *Drosophila* exhiben un fenotipo de neurodegeneración claro y bien caracterizado: muerte de las neuronas dopaminérgicas del clúster PPL1 en el cerebro central (**Figura 5**) y disminución de los niveles de expresión de la enzima citosólica tirosina hidroxilasa (TH) (codificada en *Drosophila* por el gen *pale*), que cataliza el paso limitante en la vía de síntesis de catecolaminas, lo que resulta en un menor contenido de DA en el cerebro (Cha et al., 2005; Greene et al., 2003; Wang et al., 2007; Whitworth et al., 2005). Estos mutantes también presentan defectos locomotores, disminución de su sobrevivencia, esterilidad en machos y defectos mitocondriales en tejidos energéticamente demandantes como los músculos y el cerebro (Greene et al., 2003).



**Figura 5. Representación esquemática de los principales grupos de neuronas dopaminérgicas del cerebro posterior adulto de *Drosophila*.** PPM1: Protocerebro posterior medial superior, PPM2: Protocerebro posterior medial inferior, PPM3: Vertiente superior del protocerebro posterior, PPL1: Protocerebro posterior inferiolateral y PPL2ab - PPL2c: Protocerebro posterior lateral. Es en el clúster PPL1 donde Whitworth y colaboradores, 2005, describen la pérdida de neuronas dopaminérgicas en mutantes *parkina*. Imagen generada en <https://www.biorender.com/>.

En particular, en esta tesis de maestría utilicé como modelo de EP uno de los mutantes *park* de *Drosophila* generados por Greene y colaboradores en 2003 a través de la escisión imprecisa del elemento P *EP(3)LA1* inserto en el gen *park* en una línea transgénica (**Figura 6**) (Greene et al., 2003). De los alelos de *park* nulos resultantes del trabajo de estos autores, esta tesis emplea el alelo *park*<sup>25</sup>, letal en homocigosis y portador de una deleción que abarca los tres primeros exones y la mitad del cuarto exón del gen *park* (<https://flybase.org/reports/FBaI0146938>) (**Figura 6**). Las moscas portadoras del alelo *park*<sup>25</sup> en heterocigosis presentan las características fenotípicas descritas anteriormente.



**Figura 6. El gen *parkina* (*park*) y su alelo mutante *park*<sup>25</sup>.** La figura muestra el mapa molecular del gen *park* destacando el lugar de la inserción *park*<sup>EP(3)LA1</sup> y la deleción correspondiente al alelo *park*<sup>25</sup>. La flecha en curva representa el sitio de inicio de la transcripción de *park* y la flecha sobre la inserción designa la orientación del elemento P. Los rectángulos en negro representan las secuencias codificantes de Park. Adaptado de Greene et al., 2003.

Debido al fenotipo neurodegenerativo bien definido que presentan, estos mutantes del gen *park* son ampliamente empleados como controles positivos de neurodegeneración en experimentos de validación de genes individuales con potencial neuroprotector, como lo es el gen *pretaporter* de *Drosophila*, analizado en esta tesis, el cual describiré a continuación.

## 1.5. El gen *pretaporter*: potencial neuroprotector

El gen *pretaporter* (*prtp*) de *Drosophila* (CG1837) (<https://flybase.org/reports/FBgn0030329>) (homólogo al gen humano *TXNDC5*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/81567>), localizado en el cromosoma X, codifica la proteína Pretaporter (Prtp) que pertenece a la familia de las proteínas disulfuro-isomerasas, con 416 residuos de aminoácidos, una secuencia péptido señal en el extremo N-terminal, tres dominios centrales de tipo tiorredoxina y una señal de retención en retículo endoplasmático (RE) en el extremo C-terminal (**Figura 7**) (Kuraishi et al., 2009).

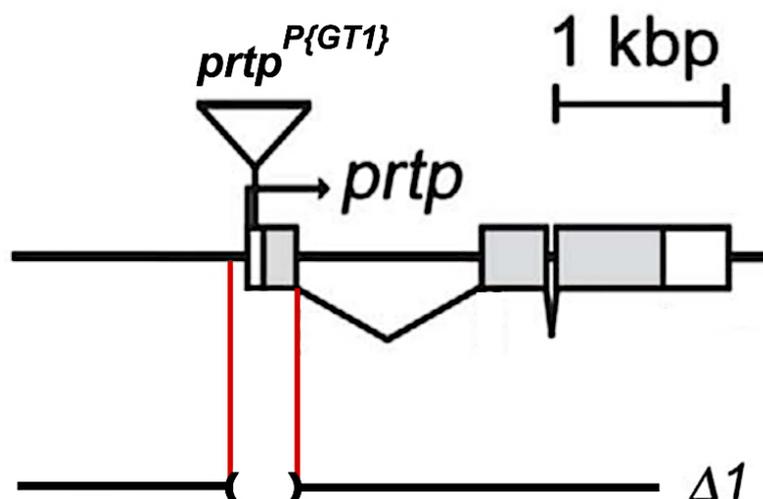
Existen análisis bioinformáticos que permiten inferir que *prtp* podría desempeñar un papel en el plegamiento de proteínas en base a la hipótesis de que un gen ancestral presentaba esta función (<https://www.pantree.org/node/annotationNode.jsp?id=PTN005231188>). Prtp se localiza en el lumen del RE y en el sistema de endomembranas de células del cerebro y otros tejidos (de expresión ubicua en todas las etapas del ciclo de vida, según Kuraishi y colaboradores, 2009 y datos de análisis transcriptómicos reportados en FlyBase) ([https://flybase.org/reports/FBgn0030329#expression\\_sub](https://flybase.org/reports/FBgn0030329#expression_sub)) (Kuraishi et al., 2009; Tan et al., 2012). Durante los procesos apoptóticos que ocurren normalmente en las células en el desarrollo o en respuesta a estresores, Prtp se transloca desde el RE a la membrana plasmática y actúa como ligando del receptor fagocítico Draper (Drpr), homólogo de la proteína humana MEGF10 (Kuraishi et al., 2009). Tras la unión extracelular de Prtp a Drpr, aumenta la fosforilación de tirosinas de un dominio intracelular del receptor, desencadenando una cascada de señalización intracelular que promueve la fagocitosis de la célula apoptótica (Fujita et al., 2012). Prtp cumple una función relevante en la remodelación de circuitos neuronales durante el desarrollo, como señal para la eliminación de neuronas mediante fagocitosis glial y su regulación depende de una vía de control de la

comunicación neurona-glía en la cual intervienen las proteínas *Fragile X mental retardation protein*, *Mothers against decapentaplegic*, el receptor de insulina y la proteína kinasa B (Akt) (Song & Broadie, 2023). Prtp y Drpr participan, además, en la regulación de la autofagia en enterocitos y en el control de la muerte de células madre intestinales del sistema digestivo de *Drosophila* (Aggarwal et al., 2022). Precisamente, la ausencia de expresión de Prtp previene la muerte de células madre intestinales provocada por la pérdida de función del gen *arf1* (Aggarwal et al., 2022).

La condición de candidato a neuroprotector de *prtp* surge del análisis transcriptómico realizado por mi orientadora, la Dra. Ferreiro, en su tesis doctoral (Ferreiro Llanes, 2018; Ferreiro et al., 2012), de un fenómeno excepcional de neurodegeneración reversible en mutantes de falta de función en los genes *sall* de *Drosophila* (factores de transcripción reguladores de otros genes expresados en SN), descrito anteriormente por mi coorientador, el Dr. Cantera (Cantera et al., 2002). Estos mutantes presentan una severa neurodegeneración en el SN central en el estadio embrionario 16 (etapa de neurodegeneración) que, sin embargo, se revierte histológicamente durante el estadio embrionario 17 (etapa de reversión o neuroprotección) (Cantera et al., 2002). Bajo la hipótesis que la reversión de la neurodegeneración es mediada por una reorganización del transcriptoma, que contrarresta la falta de función de los genes *sall*, la Dra. Ferreiro comparó, mediante mRNASeq, el transcriptoma de los embriones mutantes *sall* y *wild-type* (WT) en estadios correspondientes las etapas de neurodegeneración y neuroprotección previamente mencionadas (Ferreiro Llanes, 2018; Ferreiro et al., 2012). Este análisis transcriptómico generó una lista de 633 genes expresados diferencialmente entre las etapas de neurodegeneración y neuroprotección, enriquecida en genes ya previamente asociados empíricamente a neurodegeneración o neuroprotección en *Drosophila* y/o en humanos (32% de la lista), lo que reforzó la idea del potencial de este modelo para detectar nuevos genes

neuroprotectores dentro del 68% restante de genes de esa lista. El gen *prtp* es uno de esos genes candidatos y previamente no había sido asociado a procesos de neurodegeneración o neuroprotección. De manera contraintuitiva a lo esperable, considerando sus funciones biológicas conocidas y anteriormente mencionadas, el gen *prtp*, muestra una reducción significativa de su expresión en la etapa de neuroprotección con respecto a la etapa de neurodegeneración.

Es importante para este trabajo mencionar que existen cepas de *Drosophila* portadoras de alelos de pérdida de función para el gen *prtp* generadas por Kuraishi y colaboradores en 2009 a través de la escisión imprecisa del elemento P  $P\{GT1\}$  inserto en el gen *prtp* de la cepa transgénica BG00450 (**Figura 7**) (Kuraishi et al., 2009). Específicamente, el alelo de pérdida de función *prtp $\Delta$ 1* es de particular relevancia en esta maestría (**Figura 7**).



**Figura 7. El gen *pretaporter* (*prtp*) y su alelo mutante *prtp $\Delta$ 1*.** La figura muestra la estructura del gen *prtp* destacando el lugar de la inserción *prtp $P\{GT1\}$*  y el alelo *prtp $\Delta$ 1* con una deleción que abarca parte de la región reguladora del gen y el primer exón, entre los nucleótidos -45 y +354, con el sitio de inicio de la transcripción (flecha curva) definido como +1. Los rectángulos en gris representan los exones y los rectángulos en blanco representan el péptido señal N-terminal y la señal de retención en retículo endoplasmático. Adaptado de Kuraishi et al., 2009.

A partir de todos estos antecedentes surge la hipótesis de esta maestría, que formulo a continuación.

## 2. HIPÓTESIS

La ausencia de expresión del gen *pretaporter* de *Drosophila* ejerce una función neuroprotectora en moscas con un fenotipo de neurodegeneración causado por una mutación de falta de función en el gen *parkina*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Investigar la potencial función neuroprotectora del gen *prtp* en moscas que sufren neurodegeneración causada por una mutación de falta de función en el gen *parkina*.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Construir mutantes dobles portadores de alelos de falta de función en los genes *prtp* y *park* (*prtp-park*).
2. Analizar si Prtp se expresa normalmente en neuronas dopaminérgicas PPL1 de adultos de *Drosophila* de genotipo salvaje (WT).
3. Cuantificar las neuronas dopaminérgicas del clúster PPL1 en individuos mutantes dobles *prtp-park* en comparación con *park* y en controles.
4. Cuantificar los niveles de DA y sus metabolitos de degradación principales, DOPAC y HVA, en individuos mutantes dobles *prtp-park* en comparación con *park* y en controles.
5. Cuantificar la sobrevida en individuos mutantes dobles *prtp-park* en comparación con *park* y en controles.
6. Cuantificar la habilidad locomotora en individuos mutantes dobles *prtp-park* en comparación con *park* y en controles.

## 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El diseño experimental para investigar la hipótesis principal de esta maestría se basó en la construcción de moscas mutantes dobles para los genes *prtp* y *park* y en la medición de cuatro parámetros utilizados frecuentemente y con buenos resultados en estudios de neurodegeneración y neuroprotección: análisis de la histología de cerebro, análisis de niveles de dopamina y sus metabolitos de degradación y cuantificación de sobrevivencia y función motora.

#### 4.1. Cepas de *Drosophila* utilizadas, mantenimiento y colecta

Utilicé machos y/o hembras vírgenes de las siguientes cepas de *Drosophila melanogaster*: cepa *wild-type Oregon-R* (abreviada WT) (<https://flybase.org/reports/FBsn0000276.html>) como control normal, mutante  $w^{1118}$  (con un alelo de pérdida de función del gen *white* y abreviado *w*) (<https://flybase.org/reports/FBal0018186>), mutante  $w^{1118}prtp\Delta1$  (con el alelo *prtp* $\Delta1$  de pérdida de función del gen *prtp* en un contexto genómico  $w^{1118}$  y abreviado *prtp*, amablemente cedida por el Dr. Nakanishi, Universidad de Kanazawa, Japón), mutante  $w^{1118}; park^{25}$  (con el alelo *park*<sup>25</sup> de pérdida de función del gen *park* también en un contexto genómico  $w^{1118}$  y abreviado *park*, generada a partir de la cepa R48,  $w^{1118}; CyO/Bl; park^{25}/TM6B$ , amablemente cedida por la Dra. Barrio, Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias, Vizcaya, España) (<https://flybase.org/reports/FBal0146938>), la cepa intermedia STN4 (*if/+; RepoGAL4/TM2*, generada en Ferreiro Llanes, 2018) y la cepa experimental *prtp-park* ( $w^{1118}prtp\Delta1; park^{25}$ ), que construí durante la maestría.

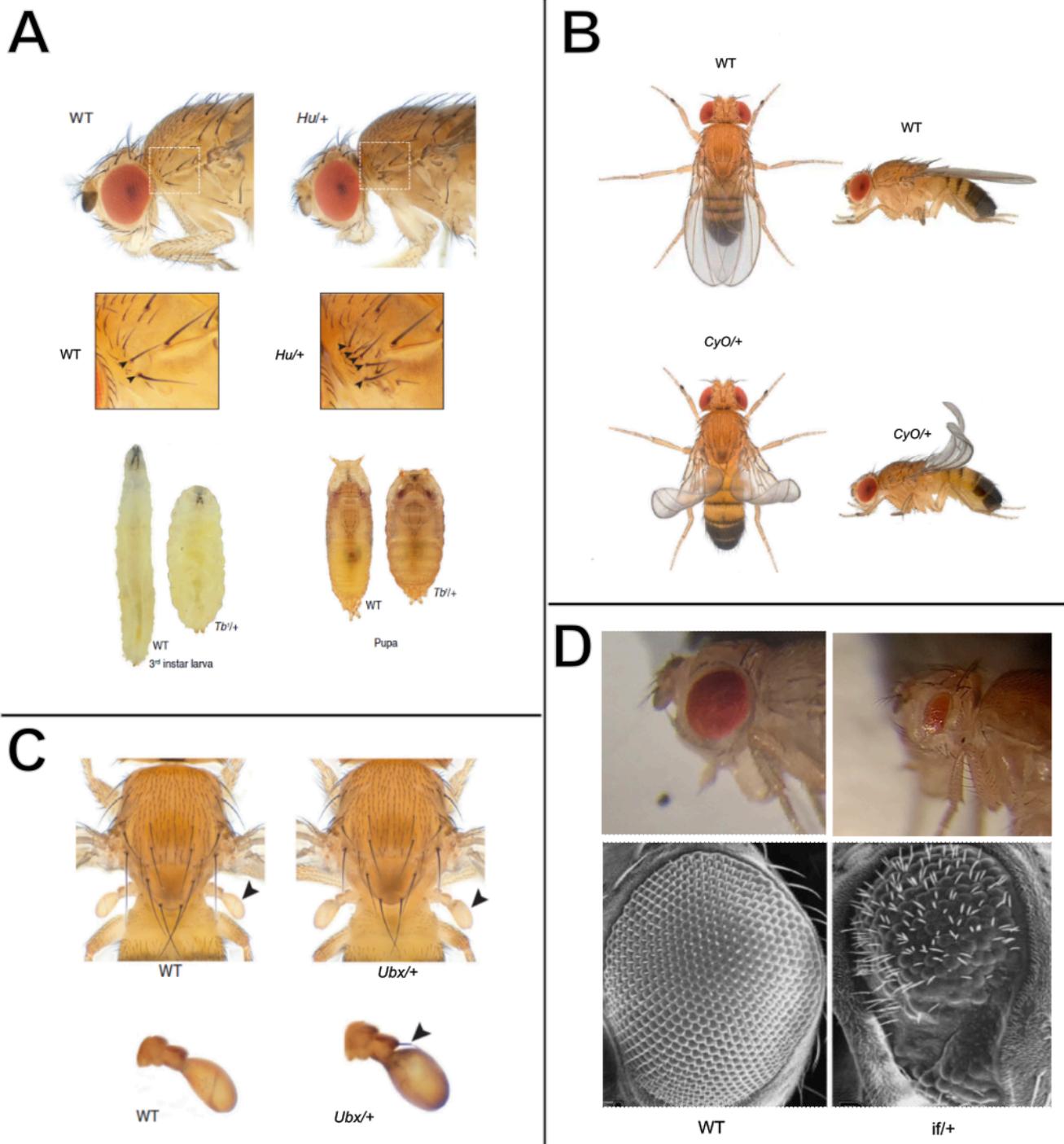
Durante el tiempo que llevaron los experimentos, mantuve las moscas bajo condiciones estándar: en estufa húmeda, a 25°C de temperatura, con ciclo de luz/oscuridad controlado de 12/12 horas y un medio de cultivo estándar consistente en agua, levadura, agar, glucosa, harina de maíz, ácido propiónico y Nipagín. Para mantener las moscas siempre en un medio fresco, libre de contaminantes y a bajas densidades de población, vigilé constantemente los tubos y las botellas de cultivo y los cambié cuando fue necesario. Para sexar pupas o adultos, identificar hembras vírgenes, seleccionar fenotipos y colectar las moscas necesarias para cada experimento, utilicé una lupa estereoscópica (WESO SM-300 SERIES), empleando trietilamina (CARLO ERBA, #489556) como medio de anestesia.

#### 4.2. Construcción de mutantes dobles *pretaporter-parkina* y mutantes *parkina* simples: uso de cromosomas balanceadores

Para realizar la mayoría los experimentos de esta maestría y como primer objetivo de la misma, generé machos y hembras de *Drosophila* mutantes dobles para los genes *prtp* (ubicado en el cromosoma sexual X) y *park* (ubicado en el cromosoma autosómico III) en un contexto  $w^{1118}$  (alelo mutante del gen *white*, ubicado también en el cromosoma X), portadores de los alelos de falta de función *prtp* $\Delta 1$  en homocigosis (hembras) o hemicigosis (machos) y *park*<sup>25</sup> en heterocigosis con su alelo salvaje, de genotipo abreviado  $w^{1118} prtp\Delta 1; park^{25}$  y referidos a lo largo del texto central de esta tesis como mutantes dobles *prtp-park* por simplificación. Además, generé machos y hembras de *Drosophila* mutantes simples para el gen *park*, también en contexto  $w^{1118}$ , de genotipo abreviado  $w^{1118}; park^{25}$ , los cuales utilicé como controles de neurodegeneración. Para construir estas cepas, diseñé los cruzamientos genéticos que describiré en esta sección, a partir de cepas presentes en el stock del Departamento de Biología del Neurodesarrollo del IIBCE, donde realicé esta maestría y basándome en el uso de una herramienta ampliamente utilizada en genética de *Drosophila*: los cromosomas balanceadores.

Los cromosomas balanceadores son una herramienta que permite el mantenimiento de mutaciones recesivas, siendo algunas estériles o letales al presentarse en homocigosis, en una población de *Drosophila* a lo largo del tiempo (Miller et al., 2019). Los balanceadores contienen múltiples inversiones, translocaciones o duplicaciones, lo que evita la recombinación durante la meiosis entre el cromosoma balanceador y su homólogo, que en estos cruzamientos es el cromosoma que porta un alelo mutante del gen de interés (Crown et al., 2018).

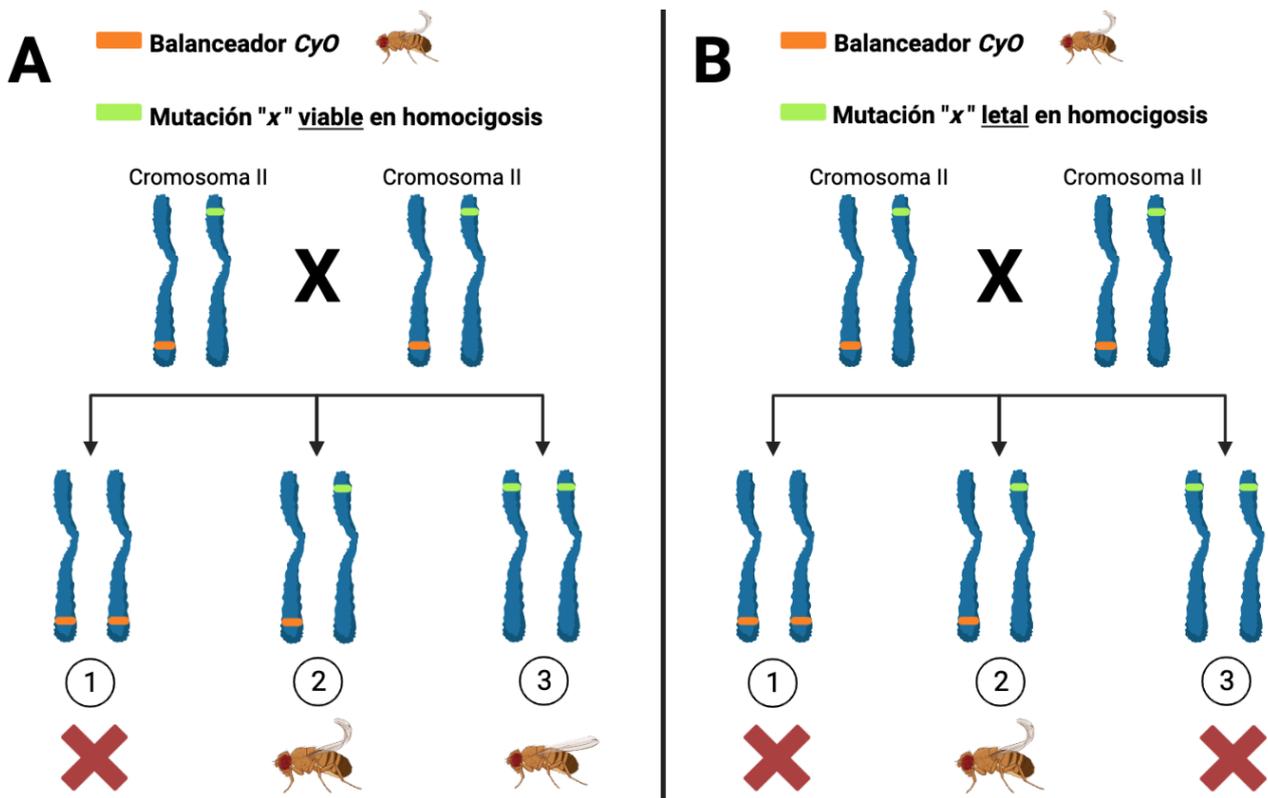
Además, los balaceadores contienen marcadores fenotípicos dominantes que son visibles en las moscas que los portan y son letales en homocigosis (Miller et al., 2019) (**Figura 8**). De esta manera, la mutación se mantiene en el cromosoma original y el alelo mutante se hereda sin recombinar, lo que permite su seguimiento a lo largo de generaciones aún sin expresarse fenotípicamente en la mosca adulta. Así, los cromosomas balaceadores con marcadores dominantes hacen posible seleccionar fácilmente las moscas que portan el balaceador y las que no lo hacen con solo examinar sus fenotipos, mientras que la letalidad de los individuos que portan el balaceador en homocigosis asegura que la mosca que expresa fenotípicamente los marcadores, es portadora del balaceador en heterocigosis y del alelo de interés.



**Figura 8. Fenotipos de los marcadores dominantes de los cromosomas balanceadores empleados en los cruzamientos para la construcción de las moscas experimentales. A.** Balanceador del cromosoma III *TM6B*, portador de las marcas dominantes *Humeral (Hu)* y *Tubby (Tb)*. Las flechas indican la cantidad de quetas observables en la región humeral de la mosca para los fenotipos WT y *Hu*, siendo mayor en las moscas con este balanceador. Los individuos portadores del balanceador *TM6B* son más pequeños que los individuos

WT. **B.** Balanceador del cromosoma II *CyO*, portador de la marca dominante *Curly (CyO)*, que resulta en un fenotipo de alas curvas. **C.** Balanceador del cromosoma III *TM2*, portador de la marca dominante *Ultrabithorax (Ubx)* que se observa como halterios (flechas) de mayor tamaño y usualmente con quetas extra en las moscas *TM2* en relación a las WT. **D.** Balanceador del cromosoma II *if*, portador de la marca dominante *Irregular facets (if)*. Estas moscas presentan un desarrollo anormal de los ojos compuestos, con arreglo irregular de los omatidios. La figura contiene imágenes propias y adaptadas de (Abrell et al., 2000) y de (<https://www.zhihu.com/question/265225592>).

Partiendo de un cruzamiento hipotético entre dos moscas, ambas portadoras del alelo mutante recesivo “x” de un gen de interés, ubicado en el cromosoma II, en heterocigosis con el cromosoma balanceador *CyO* (*CyO/x*) que es letal en homocigosis, se obtiene una filial 1 (F1) de moscas con alas curvas que son heterocigotas para el balanceador (*CyO/x*) y moscas con alas normales, que son homocigotas para la mutación “x” (*x/x*) (**Figura 9.A**). Si la mutación “x” es letal en homocigosis (**Figura 9.B**), en la F1 de este cruzamiento sólo existirían moscas portadoras *CyO/x*, siendo el uso del cromosoma balanceador *CyO* lo que permite conservar esta mutación en heterocigosis a través de las generaciones.



**Figura 9. Representación esquemática de un cruzamiento hipotético entre dos moscas portadoras del alelo mutante recesivo “x” de un gen de interés ubicado en el cromosoma II, en heterocigosis con cromosoma balanceador *CyO*. A. Situación en la que la mutación “x” es viable en homocigosis. B. Situación en la que la mutación “x” es letal en homocigosis. Imagen generada en <https://www.biorender.com/>.**

Así, para cumplir con mi objetivo de construir mutantes dobles portadores de alelos de falta de función en los genes *prtp* y *park* ( $w^{1118} prtp\Delta1$ ;  $park^{25}$  o simplificando, *prtp-park*) y compararlos con el mutante de neurodegeneración  $w^{1118}$ ;  $park^{25}$  (o simplificando, *park*) y sus controles, diseñé una serie de cruzamientos para generar cepas intermedias balanceadas que al cruzarlas, en última instancia, generasen los genotipos de interés.

A continuación, describo en detalle el diseño de estos cruzamientos, resaltando los genotipos y fenotipos parentales y filiales y las cepas intermedias (*stocks*) generadas.

#### 4.2.1. Diseño de cruzamientos para la construcción de los mutantes dobles *prtp-park*

##### CRUZAMIENTO 1

**Nombre del cruzamiento parental y [fenotipos]:**

♀ *prtpΔ1* [ojos blancos] x ♂ STN4 [ojos rojos, *if*, *TM2*]

**Genotipos:**

X<sup>*w1118 prtpΔ1*</sup>/X<sup>*w1118 prtpΔ1*</sup>; +/+; +/+ x X<sup>*w+*</sup>/Y; *if*/+; RepoGAL4/*TM2*

**Selección de individuos F1**

♂ X<sup>*w1118 prtpΔ1*</sup>/Y; *if*/+; *TM2*/+ [ojos blancos, *if*, *TM2*]

Tras obtener estos machos, hice una retrocruza con hembras vírgenes del tipo parental *prtpΔ1* para obtener hembras X<sup>*w1118 prtpΔ1*</sup>/X<sup>*w1118 prtpΔ1*</sup>; *if*/+; *TM2*/+ [ojos blancos, *if*, *TM2*] y generar el *stock* intermedio 1 (STOCK 1) con el alelo *prtpΔ1* en homocigosis (hembras) o hemicigosis (machos) y balanceado en el cromosoma II y en el cromosoma III, tal como detallo a continuación.

##### CRUZAMIENTO 2

**Nombre del cruzamiento parental y [fenotipos]:**

♀ *prtpΔ1* [ojos blancos] x ♂ F1 del cruzamiento 1 seleccionados [ojos blancos, *if*, *TM2*]

**Genotipos:**

X<sup>*w1118 prtpΔ1*</sup>/X<sup>*w1118 prtpΔ1*</sup>; +/+; +/+ x X<sup>*w1118 prtpΔ1*</sup>/Y; *if*/+; *TM2*/+

### Selección de individuos F1, stock intermedio 1 (STOCK 1):

♂ X *w<sup>1118</sup> prtpΔ1/Y; if/+; TM2/+* [ojos blancos, if, TM2]

♀ X *w<sup>1118</sup> prtpΔ1/X<sup>w<sup>1118</sup> prtpΔ1</sup>; if/+; TM2/+* [ojos blancos, if, TM2]

### CRUZAMIENTO 3

#### Nombre del cruzamiento parental y [fenotipos]:

♀ STOCK 1 [ojos blancos, if, TM2] x ♂ R48 [ojos blancos, CyO, TM2]

#### Genotipos:

X *w<sup>1118</sup> prtpΔ1/X<sup>w<sup>1118</sup> prtpΔ1</sup>; if/+; TM2/+* x X *w<sup>1118</sup> /Y; CyO/Bl; park<sup>25</sup>/TM6B*

#### Selección de individuos F1:

A) ♂ X *w<sup>1118</sup> prtpΔ1/Y; CyO/+; park<sup>25</sup>/TM2* [ojos blancos, CyO, TM2]

B) ♂ X *w<sup>1118</sup> prtpΔ1/Y; CyO/+; TM2/TM6B* [ojos blancos, CyO, TM2, TM6B]

C) ♂ X *w<sup>1118</sup> prtpΔ1/Y; CyO/if; TM2/TM6B* [ojos blancos, CyO, if, TM2, TM6B]

En este punto, los machos A los reservé para próximos cruzamientos y a los machos B y C los crucé, en botellas separadas, pero en paralelo, con hembras STOCK 1 que presentaban las marcas fenotípicas *if* y *TM2*, como detallo a continuación.

### CRUZAMIENTOS 4 (realizados en paralelo)

#### Nombres de los cruzamientos parentales y [fenotipos]:

a. ♀ STOCK 1 [ojos blancos, if, TM2] x ♂ F1 B del cruzamiento 3 [ojos blancos, CyO, TM2, TM6B]

b. ♀ STOCK 1 [ojos blancos, *if*, *TM2*] x ♂ F1 C del cruzamiento 3 seleccionados [ojos blancos, *CyO*, *if*, *TM2*, *TM6B*]

### Genotipos:

a. X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>; *if*/+; *TM2*/+ x ♂ X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/Y; *CyO*/+; *TM2*/*TM6B*

b. X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>; *if*/+; *TM2*/+ x ♂ X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/Y; *CyO*/*if*; *TM2*/*TM6B*

### Selección de individuos F1 a partir de ambos cruzamientos:

♂ X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/Y; *CyO*/*if*; *TM2*/*TM6B* [ojos blancos, *CyO*, *if*, *TM2*, *TM6B*]

♀ X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/Y; *CyO*/*if*; *TM2*/*TM6B* [ojos blancos, *CyO*, *if*, *TM2*, *TM6B*]

Tras seleccionar individuos F1 de estos fenotipos a partir de ambos cruzamientos (para obtener un mayor número de moscas de ambos sexos con los genotipos requeridos), los crucé entre sí para obtener el *stock* intermedio 2 (STOCK 2) con el alelo *prtpΔ1* en homocigosis (hembras) o hemicigosis (machos) y balanceado en el cromosoma II y en el cromosoma III. Empleé individuos STOCK 2 en el cruzamiento que detallo a continuación.

## CRUZAMIENTO 5

### Nombre del cruzamiento parental y [fenotipos]:

♀ STOCK 2 [ojos blancos, *CyO*, *if*, *TM2*, *TM6B*] x ♂ F1 A del cruzamiento 3 [ojos blancos, *CyO*, *TM2*]

### Genotipos:

X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>; *CyO*/*if*; *TM2*/*TM6B* x ♂ X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/Y; *CyO*/+; *park*<sup>25</sup>/*TM2*

## Selección de individuos F1:

Por un lado, seleccioné:

♂  $X^{w^{1118} prtp\Delta 1}/Y$ ;  $CyO/+$ ;  $park^{25}/TM2$  [ojos blancos,  $CyO$ ,  $TM2$ ]

♀  $X^{w^{1118} prtp\Delta 1}/X^{w^{1118} prtp\Delta 1}$ ;  $CyO/+$ ;  $park^{25}/TM2$  [ojos blancos,  $CyO$ ,  $TM2$ ]

Y, por otro lado, seleccioné:

♂  $X^{w^{1118} prtp\Delta 1}/Y$ ;  $CyO/+$ ;  $park^{25}/TM6B$  [ojos blancos,  $CyO$ ,  $TM6B$ ]

♀  $X^{w^{1118} prtp\Delta 1}/X^{w^{1118} prtp\Delta 1}$ ;  $CyO/+$ ;  $park^{25}/TM6B$  [ojos blancos,  $CyO$ ,  $TM6B$ ]

Tras seleccionar estos individuos machos y hembras F1, crucé entre sí aquellos del mismo fenotipo para obtener el *stock* intermedio 3 (STOCK 3),  $prtp\Delta 1; park^{25}$  balanceado en el cromosoma III con  $TM2$  y el *stock* intermedio 4 (STOCK 4),  $prtp\Delta 1; park^{25}$  balanceado en el cromosoma II con  $TM6B$ . Esto lo realicé con el fin de obtener redundancia y variedad de marcas fenotípicas en el cromosoma III, ya que la expresividad del marcador  $TM2$  varía en las generaciones y no siempre es fácilmente detectable.

## CRUZAMIENTO 6: obtención de individuos experimentales doble mutantes *prtp-park*

Para la obtención de los individuos experimentales doble mutantes *prtp-park*, elegí partir del STOCK 4 y no del STOCK 3.

## Nombre del cruzamiento parental y [fenotipos]:

♀ STOCK 4 [ojos blancos,  $CyO$  o no  $CyO$ ,  $TM6B$ ] x ♂  $prtp\Delta 1$  [ojos blancos]

Si bien la direccionalidad del cruzamiento es teóricamente indiferente, siempre elegí hembras vírgenes STOCK 4 y no viceversa, para evitar los problemas de fertilidad descritos para machos portadores del alelo mutante *park*<sup>25</sup> (Greene et al., 2003).

### Genotipos:

X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>; CyO/+; *park*<sup>25</sup>/TM6B x ♂ X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/Y; +/+; +/+

### Selección de F1 experimentales (doble mutantes *prtp-park*):

♂ X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/Y; +/+; *park*<sup>25</sup>/+ [ojos blancos, no CyO, no TM6B]

♀ X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>/X<sup>w1118 prtpΔ1</sup>; +/+; *park*<sup>25</sup>/+ [ojos blancos, CyO, TM6B]

#### 4.2.2. Diseño de cruzamientos para la construcción de los mutantes *park* simples en contexto $w^{1118}$

Crucé hembras de una cepa de *Drosophila* mutante *park* balanceada en los cromosomas II y III ( $X^{w^{1118}}/X^{w^{1118}}; CyO/+; park^{25}/TM2$ ) y machos mutantes *w* ( $X^{w^{1118}}/Y; +/+; +/+$ ). Si bien la direccionalidad del cruzamiento es teóricamente indiferente, mantuve el criterio empleado anteriormente para evitar los problemas de fertilidad asociados a los machos portadores del alelo *park*<sup>25</sup> (Greene et al., 2003). Posteriormente, seleccioné las hembras y los machos F1 que no presentaban las marcas fenotípicas *CyO* ni *TM2*, es decir, con genotipos  $X^{w^{1118}}/X^{w^{1118}}; +/+; park^{25}/+$  y  $X^{w^{1118}}/Y; +/+; park^{25}/+$ . Estos fueron los individuos que usé como control positivo de neurodegeneración en los experimentos.

### 4.3. Ensayos histológicos

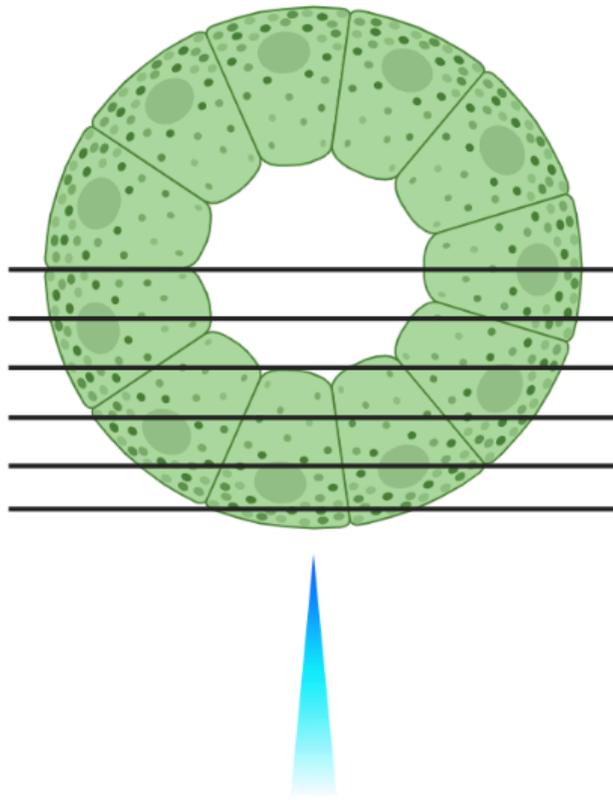
#### 4.3.1. Inmunohistoquímica de glándula salival

Datos de transcriptómica disponibles en FlyBase indican que el gen *prtp* se expresa en la glándula salival de larvas a niveles similares que en cerebro de individuos adultos (FlyAtlas-RNA a través de [https://flybase.org/reports/FBgn0030329#expression\\_sub](https://flybase.org/reports/FBgn0030329#expression_sub)) (Robinson et al., 2013).

Para corroborar el correcto funcionamiento del anticuerpo primario anti-Prtp (Kuraishi et al., 2009) generosamente cedido por el Dr. Nakanishi, previo a emplearlo para analizar la expresión de Prtp en cerebro adulto, disequé glándulas salivales de larvas macho de estadio L3 (*wandering larvae*) de las cepas WT y *prtpΔ1* (mutantes simples *prtp*, como control negativo) (n = 3 por genotipo) con pinzas de precisión DUMONT 5 bajo lupa estereoscópica WESO SM-300 SERIES en PBS 1X frío. Fijé las glándulas utilizando paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X durante 30 minutos, a temperatura ambiente y sin agitación. Luego, realicé dos lavados en PBS 1X de 15 minutos cada uno y un lavado de permeabilización en PBS-Triton X-100 0,5% (PBS-T), manteniendo las muestras siempre en hielo y con agitación suave. Posteriormente, incubé las muestras con la solución del anticuerpo primario anti-Prtp de rata (dilución 1:300) en PBS-T 0,5% durante dos horas, a 4°C y con agitación suave. Pasado este tiempo, retiré la solución del anticuerpo primario, lavé las muestras tres veces en PBS-T 0,5% y las incubé en una solución que contenía el anticuerpo secundario anti-rata-Cy3 de cabra (Molecular Probes, dilución 1:1000), el marcador lipofílico DiOC<sub>18</sub> (Invitrogen, dilución 1:1000) para la marcación de membranas y una dilución 1:5000 del marcador de ADN verde de metilo (Prieto et al., 2014) partiendo de un *stock* de verde de metilo al 2% (gentilmente cedido por el Dr. Prieto, IIBCE) en PBS-T 0,5%. Esta segunda incubación la hice en las mismas condiciones de temperatura y agitación que la incubación primaria y la

realicé en oscuridad. Finalmente, lavé las muestras tres veces con PBS-T 0,1% y dos veces con PBS 1X manteniendo las condiciones de temperatura, agitación y oscuridad. Para el montaje de las muestras, construí cámaras sobre un portaobjetos utilizando cinta aisladora negra, dentro de las cuales deposité y orienté las glándulas salivales bajo lupa estereoscópica. Utilicé glicerol diluido al 80% en Tris pH=8,8 como solución de montaje, cubrí los preparados con cubreobjetos (22x22 mm) y los sellé con esmalte de uñas transparente.

Para la adquisición de las imágenes de fluorescencia por medio de microscopía láser confocal, utilicé el microscopio LSM ZEISS 800 AiryScan del IIBCE, empleando los láseres 488 nm para visualizar la marca DiOC<sub>18</sub>, 561 nm para visualizar el fluoróforo Cy3 y 640 nm para visualizar el verde de metilo. Durante la adquisición de las imágenes de las muestras de ambos genotipos mantuve los mismos parámetros de intensidad y ganancia. Para adquirir las imágenes, primero examiné las glándulas con el objetivo 20X (aire; AN=0,5) y localicé su lumen, al cual tomé como referencia anatómica para el comienzo de la adquisición. Luego tomé las imágenes utilizando el mismo objetivo y generé series de aproximadamente 30 planos focales en el eje Z, a intervalos de 1,45  $\mu\text{m}$ , comenzando en la región del lumen de la glándula y finalizando sobre la región proximal al objetivo (**Figura 10**). Finalmente, analicé las imágenes utilizando el software de acceso libre FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012).



**Figura 10. Representación esquemática del método para la adquisición de imágenes de fluorescencia de glándula salival de larvas L3 de *Drosophila* por medio de microscopía láser confocal.** La figura muestra de manera esquemática una vista transversal de una glándula salival, con su lumen central rodeado de un monoepitelio cuyos núcleos están localizados basalmente. Las líneas paralelas representan de modo esquemático los planos confocales adquiridos y la cña azul indica el láser que incide sobre la muestra.

#### 4.3.2. Análisis de la expresión de Prtp en neuronas dopaminérgicas PPL1 de cerebros adultos de *Drosophila*

Kuraishi y colaboradores (2009) reportaron que Prtp se expresa de forma ubicua en *Drosophila* y durante todos los estadios del desarrollo (Kuraishi et al., 2009). Además, a través de análisis con microensayos de ARNm, se observó que Prtp se expresa en el cerebro de mosca adulta (FlyAtlas-RNA; [https://flybase.org/reports/FBgn0030329#expression\\_sub](https://flybase.org/reports/FBgn0030329#expression_sub)) (Robinson et al., 2013).

Para investigar si Prtp se expresa normalmente en las neuronas dopaminérgicas PPL1 (cuyo número se ve reducido en mutantes *park*) disequé, en PBS 1X frío, 3 cerebros de machos adultos de *Drosophila* WT de 5 días de edad, usando pinzas de precisión DUMONT 5, bajo lupa estereoscópica WESO SM-300 SERIES. Fijé los cerebros sumergiéndolos en PFA al 4% en PBS 1X durante 2 horas, a temperatura ambiente y sin agitación. Luego, realicé dos lavados con PBS 1X de 15 minutos cada uno y un lavado de permeabilización con PBS-T 0,5%, manteniendo las muestras siempre en hielo y con agitación suave. Incubé las muestras en solución de bloqueo PBS-Triton X-100 0,5% y albúmina de suero bovino (BSA) disuelta al 0,1% en PBSTA durante una hora, a 4°C y con agitación suave. Posteriormente, incubé las muestras en la solución del anticuerpo primario anti-Prtp de rata (diluído al 1:300 en PBSTA) durante 48 horas, a 4°C y con agitación suave. Pasado este tiempo, retiré la solución del anticuerpo primario y lavé cuatro veces con PBSTA, a 4°C y con agitación suave. Incubé las muestras con una solución de un segundo anticuerpo primario que detecta la tirosina hidroxilasa y marca específicamente neuronas dopaminérgicas (anti-TH de ratón de DiaSorin, dilución 1:500 en PBSTA) durante 48 horas, a 4°C, con agitación suave y repetí el procedimiento de los cuatro lavados con PBSTA.

Posteriormente, incubé las muestras con el anticuerpo secundario anti-rata-Cy3 (para detectar el anticuerpo primario anti-Prtp) de cabra (Invitrogen, dilución 1:1000 en PBSTA con suero normal de cabra al 2%, durante dos horas, a 4°C, con agitación suave y en oscuridad. Pasado ese tiempo, repetí el procedimiento de los cuatro lavados con PBSTA e incubé las muestras con el anticuerpo secundario anti-ratón-Cy5 (para detectar el anticuerpo primario anti-TH) (Invitrogen) diluido 1:100 en PBSTA con suero normal de cabra al 2%, durante dos horas a 4°C, con agitación suave y oscuridad. Finalmente, realicé tres lavados con PBS-T 0,5% y dos lavados con PBS 1X, de cinco minutos cada uno. Para el montaje de los cerebros enteros, generé una cámara con cinta aisladora negra sobre cada lámina cubreobjetos (22x40 mm) y deposité y orienté los cerebros dentro de las cámaras usando glicerol al 80% en Tris pH=8 y trabajando bajo lupa estereoscópica. Finalmente cubrí los preparados con otra lámina cubreobjetos (22x22 mm) y los sellé con esmalte de uñas transparente.

Para adquirir las imágenes de microscopía láser confocal, utilicé el microscopio institucional del IIBCE LSM ZEISS 800 AiryScan, empleando los láseres 561 nm para visualizar el fluoróforo Cy3 y 640 nm para visualizar el fluoróforo Cy5. Localicé el grupo de neuronas dopaminérgicas PPL1 en el cerebro posterior, usando como referencia anatómica al *cálix* de la *corpora pedunculata* y mapas anatómicos existentes (**Figura 4**) y tomé imágenes utilizando el objetivo 40X (aire; AN = 0,95). Luego adquirí imágenes utilizando el objetivo 63X (inmersión en aceite; AN = 1,4) y *zoom* digital de 5X, con una apertura del *pinhole* de 0,8 y generando series en el eje Z de 3 planos focales a intervalos de 0,30  $\mu\text{m}$ .

Para mejorar la calidad de las imágenes y superar parte de las limitaciones de la resolución óptica del sistema elegí un método de deconvolución de imágenes que permite una mejor discriminación y cuantificación de la colocalización de las dos señales fluorescentes (Landmann, 2002) usando el *software* Huygens Professional (Scientific Volume Imaging, The

Netherlands, <http://svi.nl>). Analicé la colocalización de las señales correspondientes a Prtp y TH en siete neuronas dopaminérgicas PPL1 utilizando el *software* FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012). Para ello, ejecuté el *plug-in* JACoP que calcula los coeficientes de colocalización de Pearson (R) y de Manders, que miden aspectos diferentes de una posible colocalización (Manders et al., 1993; Pearson, 1992).

Brevemente, el coeficiente R cuantifica la relación lineal entre la fluorescencia proveniente de dos canales, basándose en la distribución de intensidades de los píxeles de cada canal y proporciona información sobre la intensidad y la dirección de la correlación entre las señales. El coeficiente R varía entre los valores 1 y -1, donde los dos valores extremos representan una correlación positiva (1) o negativa (-1) perfecta (teórica) y donde 0 representa la ausencia de correlación entre los valores de intensidad de fluorescencia de los dos canales (Adler & Parmryd, 2010). Por consenso, en el contexto del análisis de imágenes biológicas, coeficientes R mayores a 0,5 o menores a -0,5 revelan correlaciones positivas o negativas sólidas, respectivamente. Por otro lado, el coeficiente de colocalización de Manders estima la fracción de área de fluorescencia de un canal que se superpone al área del otro canal y viceversa, teniendo en cuenta la ubicación espacial de los píxeles (Adler & Parmryd, 2010; Manders et al., 1993). A partir de los valores que obtuve para ambos coeficientes calculé la media y el desvío estándar para proporcionar, descriptivamente, una idea de la magnitud y la variabilidad de la colocalización de las señales correspondientes a Prtp y TH en las neuronas analizadas.

Para facilitar la visualización gráfica de los resultados de colocalización, tracé una línea recta diametralmente sobre las células a analizar ( $n = 7$ ) usando el *software* FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012) y extraje los datos del perfil de intensidad de fluorescencia bajo las rectas para cada canal. A través de la ejecución de líneas de código, me aseguré de trazar

exactamente la misma recta sobre cada canal en cada una de las neuronas analizadas. Luego cargué los datos en el *software* de acceso libre RStudio (<http://www.rstudio.com>) y generé un *script* para graficar el perfil de intensidad de fluorescencia de ambos canales en función de la distancia en micras, equivalente al largo de la línea trazada previamente.

### **4.3.3. Análisis del número de neuronas dopaminérgicas PPL1 en doble mutantes *prtp-park* en comparación con *park* y sus controles**

Para cuantificar el número de neuronas dopaminérgicas PPL1, en primer lugar, disequé cerebros de machos de 5 y 25 días de edad, de genotipos mutantes *w*, *prtp*, *park* y *prtp-park* (n = 10, por genotipo y edad) con pinzas de precisión DUMONT 5 bajo lupa estereoscópica WESO SM-300 SERIES en PBS 1X frío. Fijé los cerebros en PFA 4% en PBS 1X a temperatura ambiente y sin agitación durante dos horas. Luego, lavé dos veces en PBS 1X durante 15 minutos, sobre hielo y con agitación suave y realicé un último lavado de permeabilización en PBS-T (0,5%) bajo las mismas condiciones. Coloqué las muestras en solución de bloqueo PBSTA (Triton X-100 0,5%, BSA 0,1%) durante una hora, sobre hielo y con agitación suave. Posteriormente, las incubé en una solución del anticuerpo primario anti-TH (DiaSorin, dilución 1:500 en PBSTA) durante 48 horas, a 4°C y con agitación. Pasadas las 48 horas, realicé cuatro lavados en PBS-T (0,5%) durante 15 minutos, a 4°C y con agitación e incubé las muestras con una solución del anticuerpo secundario anti-ratón- Cy5 (Invitrogen; dilución 1:1000) a 4°C, con agitación y en oscuridad durante dos horas. Finalmente, realicé tres lavados con PBS-T 0,1% de cinco minutos cada uno, en frío, con agitación y en oscuridad y dos lavados en PBS 1X en las mismas condiciones que los anteriores. Almacené las muestras a 4°C en glicerol al 80% en Tris pH=8,8 hasta realizar el montaje de los cerebros el día siguiente. Construí una cámara con cinta aisladora negra sobre una lámina cubreobjetos (22x40 mm), monté los cerebros en las cámaras trabajando bajo lupa estereoscópica y completé los preparados al igual que en la sección 4.3.2.

Para adquirir las imágenes de microscopía láser confocal, utilicé el microscopio institucional del IIBCE LSM ZEISS 800 AiryScan, empleando el láser 640 nm para visualizar el fluoróforo Cy5. Localicé el grupo de neuronas dopaminérgicas PPL1 en cada hemisferio cerebral

(Figura 5) y tomé imágenes utilizando los objetivos 20X (aire; AN = 0,5) y 40X (aire; AN = 0,95). Generé series de planos confocales a intervalos de 1  $\mu\text{m}$  a lo largo del eje Z, asegurándome de que cada serie abarcara por completo el grupo PPL1.

Cuantifiqué las neuronas PPL1 en ambos hemisferios de cada cerebro, en un total de 10 cerebros por genotipo y edad, mediante inspección visual de cada plano confocal, de la misma forma descrita por Whitworth y colaboradores, 2005 (Whitworth et al., 2005). Siempre corroboré que los cerebros estuvieran íntegros, a través de una previa visualización de los mismos por microscopía de contraste de fases. En caso de encontrar cerebros con algún hemisferio dañado o cubierto por tráqueas en la zona del grupo PPL1, solamente contabilicé las neuronas PPL1 en el hemisferio sano.

Para realizar el análisis estadístico y las representaciones gráficas de este conteo comparativo de las PPL1 y de todos los experimentos posteriores de mi tesis, aprendí a usar el *software* de acceso libre Rstudio (<http://www.rstudio.com>). Realicé pruebas de normalidad de las distribuciones de los datos de la cuantificación de PPL1 para cada genotipo y edad utilizando la prueba estadística de Shapiro-Wilk (Shapiro et al., 1968). Ese análisis solamente confirmó una distribución de normalidad en los datos de los mutantes *prtp*, *park* y *prtp-park* de 25 días de edad. Posteriormente, realicé un análisis de homogeneidad de varianzas empleando la Prueba de Levene (M. B. Brown & Forsythe, 1974), considerando únicamente los grupos de datos para los cuales no rechacé la hipótesis de normalidad anteriormente. Los resultados de este análisis indicaron que las varianzas no eran homogéneas. Debido al incumplimiento de los dos preceptos fundamentales para el empleo de pruebas estadísticas paramétricas, realicé el análisis estadístico de las comparaciones entre grupos mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon (Mann & Whitney, 1947). Esta prueba se emplea para comparar distribuciones de datos de grupos

independientes y de muestras con Ns menores a 30, como es nuestro caso. Por último, creé representaciones visuales de los resultados de las cuantificaciones para cada genotipo y edad, combinando gráficos de caja y bigotes (*box-plots*) con gráficos de puntos (*dot-plots*). Además, agregué capas de significancia estadística para cada comparación en el *script* de los gráficos en RStudio. Esto permite visualizar de manera clara las distribuciones de los datos y los resultados de la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon en los gráficos, utilizando barras de significancia.

### 4.3. Cuantificación de los niveles de DA y metabolitos asociados a su degradación

Con el objetivo de cuantificar los niveles del neurotransmisor DA y sus principales metabolitos de degradación, el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC, por su sigla en inglés) y el ácido homovanílico (HVA, por su sigla en inglés), en colaboración con la Plataforma de Química Analítica del IIBCE, llevamos a cabo mediciones por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para comparar cerebros de individuos machos adultos de 25 días de edad mutantes dobles *prtp-park* con cerebros del mutante *park*, así como cerebros de los genotipos de control, siguiendo el protocolo publicado por Ayajuddin y colaboradores, en el capítulo 63 del libro *Experiments with Drosophila for Biology Courses* (Lakhotia, S.C., 2021).

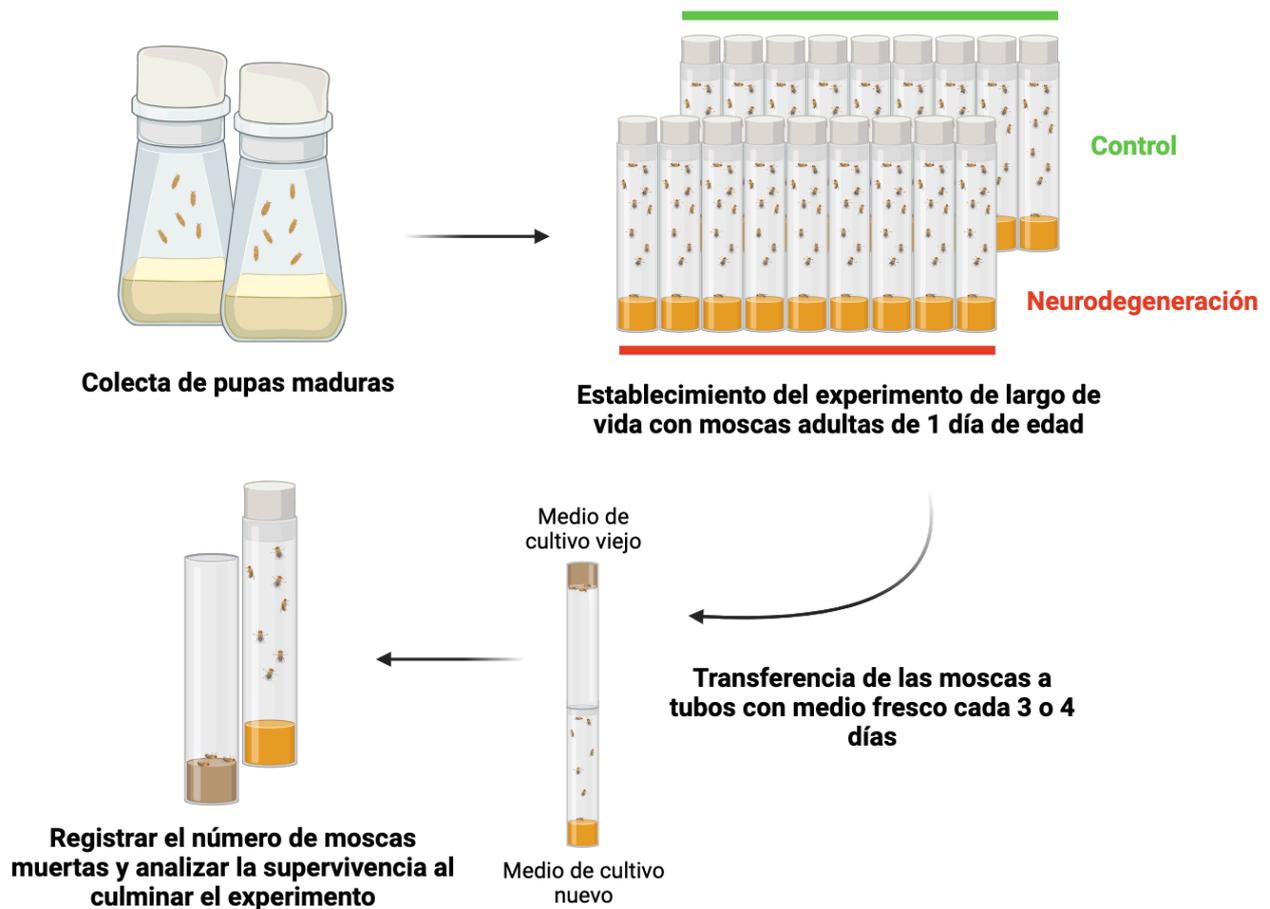
Para ello, disequé y congelé a  $-80^{\circ}\text{C}$ , 45 cabezas (triplicados de 15 cabezas por genotipo) de mutantes *w*, *prtp*, *park* y *prtp-park*, con pinzas de precisión DUMONT 5 y tijeras de disección bajo lupa estereoscópica WESO SM-300 SERIES en seco. Para evitar la degradación de DA durante la colecta de muestras, disequé las cabezas en tandas y las fui almacenando una a una en tubos Eppendorf previamente colocados en hielo hasta llegar a un máximo de 5 cabezas por tubo (una tanda). Inmediatamente luego de completar una tanda, guardé el tubo correspondiente a  $-80^{\circ}\text{C}$  y repetí el procedimiento hasta obtener 45 cabezas por genotipo. Las muestras permanecieron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento inmediatamente anterior a su procesamiento para HPLC por parte de las asistentes técnicas de la Plataforma de Química Analítica del IIBCE.

Para el análisis estadístico de los resultados de HPLC y realizar las representaciones gráficas correspondientes, utilicé el *software* libre Rstudio (<http://www.rstudio.com>). Analicé la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos de cada grupo, aplicando las pruebas de Shapiro-Wilk (Shapiro et al., 1968) y Levene (M. B. Brown & Forsythe, 1974), respectivamente. Posteriormente, apliqué la prueba paramétrica t de Student como método

estadístico para realizar las comparaciones entre grupos (Student, 1908). Finalmente, generé gráficos combinando diagramas de caja y bigotes (*box-plots*) para cada genotipo con la técnica de *jittering*. Esta combinación proporciona una visualización más precisa de los datos, ya que cada punto individual queda representado claramente en el contexto del diagrama. Además, agregué capas de significancia estadística para cada comparación en el *script* de los gráficos en RStudio. Esto permite visualizar de manera clara los resultados de la prueba de t de Student en los gráficos, utilizando barras de significancia.

#### 4.4. Ensayos de sobrevivencia

Los fenotipos neurodegenerativos en *Drosophila*, humanos y otras especies se caracterizan por un acortamiento significativo de la sobrevivencia de la población afectada en comparación con una población control y en *Drosophila*, esta diferencia es fácilmente cuantificable a través de ensayos de sobrevivencia (**Figura 11**).



**Figura 11. Ensayo de sobrevivencia en *Drosophila*.** La figura muestra una representación esquemática del procedimiento seguido en un ensayo de sobrevivencia donde se mide (en días) la supervivencia de individuos mutantes (conjunto de tubos en rojo) e individuos del grupo control (conjunto de tubos en verde). Se espera que las moscas mutantes, si sufren procesos neurodegenerativos, sobrevivan significativamente menos que las moscas control.

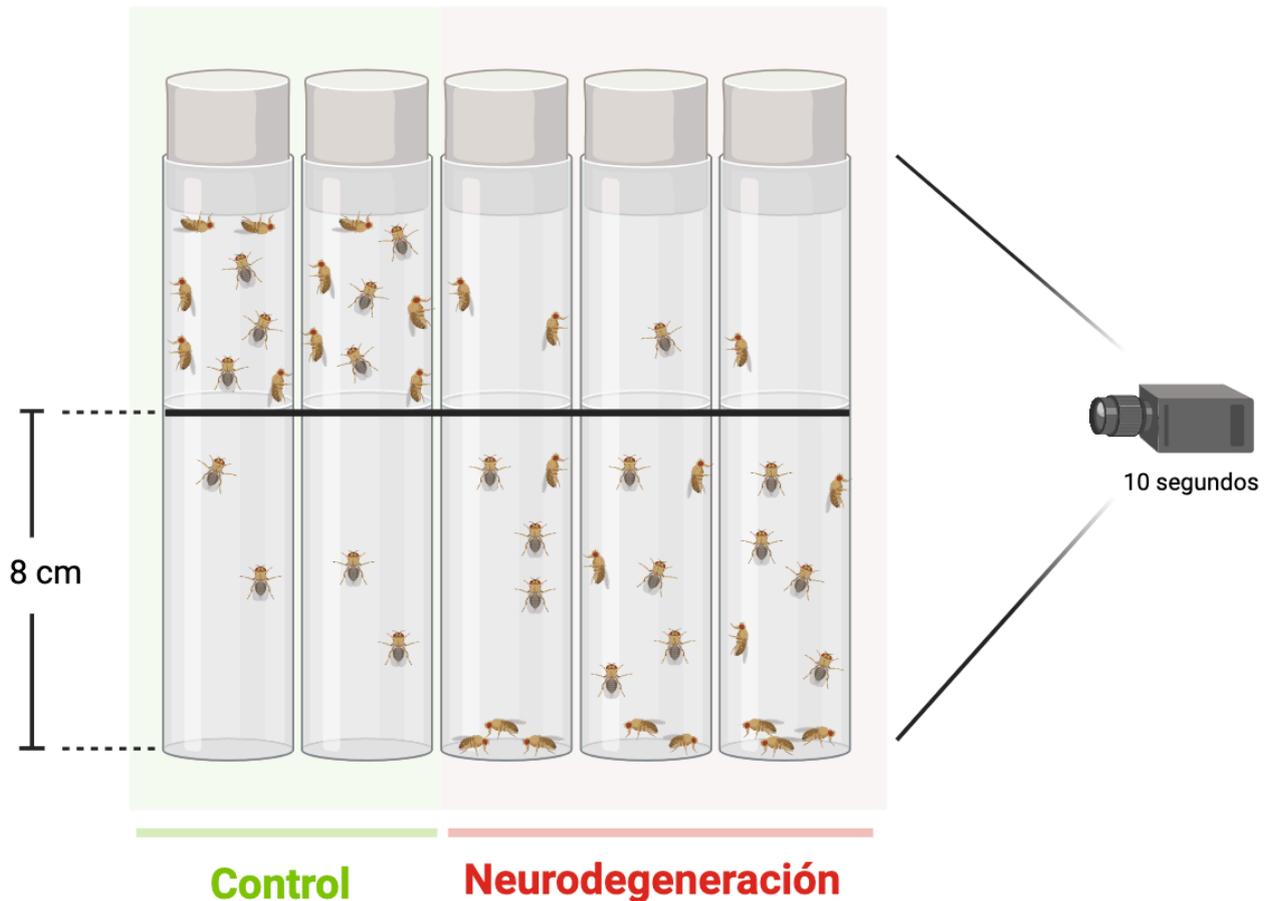
En particular, para realizar los ensayos de sobrevivencia de esta tesis, utilicé moscas hembras y machos vírgenes de genotipos mutantes *w*, *prtp*, *park* y mutantes dobles *prtp-park*, seleccionados inmediatamente luego de su eclosión desde las pupas, previamente sexadas y separadas en cada genotipo para optimizar la colecta. Seleccioné 100 moscas por genotipo y sexo, separando a las mismas en tubos de aproximadamente 10 individuos. Desde el primer día de vida adulta y durante todo el experimento, mantuve las moscas en tubos de cultivo bajo condiciones estándar (25°C y ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas) y cada 3 o 4 días las transferí a tubos con medio de cultivo fresco. Registré día por día el número de moscas muertas en cada tubo, hasta registrar la muerte de todos los individuos.

Registré los datos en tablas de Excel a medida que los recopilaba y grafiqué las curvas de sobrevivencia para cada genotipo y sexo empleando el *software* libre RStudio (<http://www.rstudio.com>). Realicé la estadística correspondiente empleando el método de Kaplan-Meier y la prueba de *log-rank* (Mantel-Cox) (Cox, 1972; Jager et al., 2008; Mantel, 1966).

#### 4.5. Ensayos de locomoción (*climbing assays*)

La neurotransmisión dopaminérgica es un elemento importante del control que ejerce el cerebro sobre la actividad motora, tanto en vertebrados como en invertebrados (Beninger, 1983; Giros et al., 1996; Riemensperger et al., 2011; Zhou & Palmiter, 1995). En 2011, Riemensperger y colaboradores demostraron que las moscas de una cepa de *Drosophila* que carecen de DA neuronal presentan una capacidad de escalada o *climbing* disminuida (Riemensperger et al., 2011).

Si bien el decline progresivo en el desempeño motor es un fenómeno que forma parte del envejecimiento normal, la mayoría de los fenotipos neurodegenerativos en *Drosophila* presentan un declive más acelerado y defectos motores adicionales, que se pueden cuantificar mediante el ensayo de *climbing* (Ali et al., 2011; Jaiswal et al., 2012). Este ensayo mide la capacidad de escalada de las moscas y es muy robusto porque se basa en un reflejo de geotaxis negativa que las induce a escalar por las paredes de un tubo. Se colocan las moscas en tubos y luego, mediante un golpe suave de la base de los tubos sobre la mesada, se induce el reflejo geotáxico negativo y las moscas comienzan a escalar. Esto se registra en un video que permite posteriormente cuantificar cuántas moscas, en cada tubo, llegan a escalar hasta una altura de 8 centímetros en los primeros 10 segundos posteriores a la inducción del reflejo (Ali et al., 2011; Ferreira Llanes, 2018) (**Figura 12**).



**Figura 12. Ensayo de locomoción (*climbing assay*) en *Drosophila* para la evaluación del desempeño locomotor en mutantes de neurodegeneración.** La figura muestra una representación esquemática del ensayo en el que se registra la escalada de moscas controles y mutantes con neurodegeneración. En los grupos mutantes se espera una reducción en la proporción de moscas que sobrepasen la línea trazada a 8 cm de la base del tubo en los primeros 10 segundos, respecto a las moscas control.

Para llevar a cabo los ensayos de *climbing*, colecté 30 moscas de cada genotipo (abreviados *w*, *prtp*, *park* y mutantes dobles *prtp-park*) y sexo, desde su emergencia de la pupa, para dejarlas envejecer hasta las edades de las mediciones (5 y 25 días). Las separé en tubos de 10 individuos cada uno (3 tubos por genotipo y sexo) y las mantuve en condiciones estándar de cultivo (25°C, ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas), reemplazando el medio cada 5 días para mantenerlo fresco.

Filmé y cuantifiqué el número de moscas de cada tubo (por genotipo, sexo y edad de evaluación) que pasaban una marca ubicada a 8 cm de la base, durante los 10 segundos posteriores a la inducción del reflejo de escalada. Realicé 10 iteraciones en cada experimento, dejando 30 segundos de descanso entre una iteración y otra. Todos los ensayos los realicé bajo las mismas condiciones de iluminación para eliminar posibles interferencias por efectos de fototaxis. Ingresé los datos obtenidos a tablas de Excel, clasificándolos por genotipo, sexo y edad. Posteriormente, utilicé el *software* libre Rstudio (<http://www.rstudio.com>) para llevar a cabo el análisis estadístico y las representaciones gráficas correspondientes.

Para evaluar la normalidad y la homogeneidad de las varianzas en cada grupo, condiciones para la aplicación de pruebas paramétricas para la comparación estadística, apliqué las pruebas de Shapiro-Wilk (Shapiro et al., 1968) y Levene (M. B. Brown & Forsythe, 1974), respectivamente. Finalmente, debí emplear las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney-Wilcoxon (para la comparación pareada *post hoc*) (Kruskal & Wallis, 1952; Mann & Whitney, 1947). Finalmente, generé gráficos que combinan diagramas de caja y bigotes con diagramas de violín para cada genotipo. Esta combinación brinda una comprensión de la tendencia central y la dispersión de cada grupo, además de permitir visualizar la forma y la simetría de las distribuciones de datos dentro de cada grupo. Tal como muestro en la sección de Resultados, esta información es especialmente relevante para analizar e interpretar los resultados de los ensayos de *climbing*. Además, incorporé capas de significancia estadística para cada comparación en el *script* de los gráficos en RStudio. Esto permite una representación visual clara de los resultados estadísticos mediante el uso de barras de significancia en los gráficos.

#### **4.6. Análisis de interacciones de Prtp**

Si bien un análisis de las posibles interacciones de Prtp con otras proteínas no estaba previsto dentro de los objetivos específicos de esta tesis, durante mis actividades de posgrado me pareció pertinente llevar a cabo un trabajo de este tipo, pensando que podría enriquecer la interpretación y discusión de los resultados. Con este fin, realicé varios análisis de interacción de Prtp con otras proteínas utilizando la base de datos STRING (<https://string-db.org/>) (Szkłarczyk et al., 2023), que sistemáticamente recoge e integra datos sobre interacciones físicas entre proteínas y sobre asociaciones funcionales. Primero, analicé la red de interacciones teóricas de Prtp, seleccionándolo como único término inicial e hice lo mismo con TXNDC5, su homólogo humano. Luego, en base a bibliografía que será mencionada en la Discusión de este trabajo, seleccioné otras proteínas las cuales seleccioné junto a Prtp como términos iniciales para la búsqueda de posibles redes de interacción entre ellas. Analicé la red de interacciones correspondientes a la combinación de términos Prtp y KDEL-R y la red de interacción correspondiente a la combinación Prtp, Park y Tip60.

Restringí los análisis de forma que las redes de interacción abarcaran solamente datos provenientes de resultados experimentales, análisis de co-expresión y bases de datos curadas. Finalmente, anoté y comenté las funciones de proteínas relevantes para mi tesis.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Construcción de mutantes dobles con alelos de falta de función en los genes *prtp* y *park*, potencial combinación neuroprotectora

Para investigar nuestra hipótesis de que una mutación en *prtp* (*prtpΔ1*) mitigaría el fenotipo neurodegenerativo causado por una mutación en *park* (*park<sup>25</sup>*) decidimos construir el doble mutante *park-prtp* (Objetivo específico 1). Realicé cruzamientos dirigidos entre moscas de diversos genotipos, siguiendo cuidadosamente el diseño detallado previamente en la sección 4.2.1. Los fenotipos resultantes de cada cruzamiento fueron siempre los esperados y obtuve los individuos experimentales *prtp-park* cuyos genotipos completos son  $X^{w1118} prtpΔ1/X; +/+; park^{25}/+$  (hembras) y  $X^{w1118} prtpΔ1/Y^{w1118} prtpΔ1; +/+; park^{25}/+$  (machos). Además, generé exitosamente varios *stocks* intermedios mutantes *prtp* o *park* balanceados (ver sección 4.2.1). Cumplir este primer objetivo fue esencial para evaluar el potencial neuroprotector de *prtp* con el plan experimental de esta maestría.

## 5.2. Construcción de mutantes simples *park*, controles de neurodegeneración

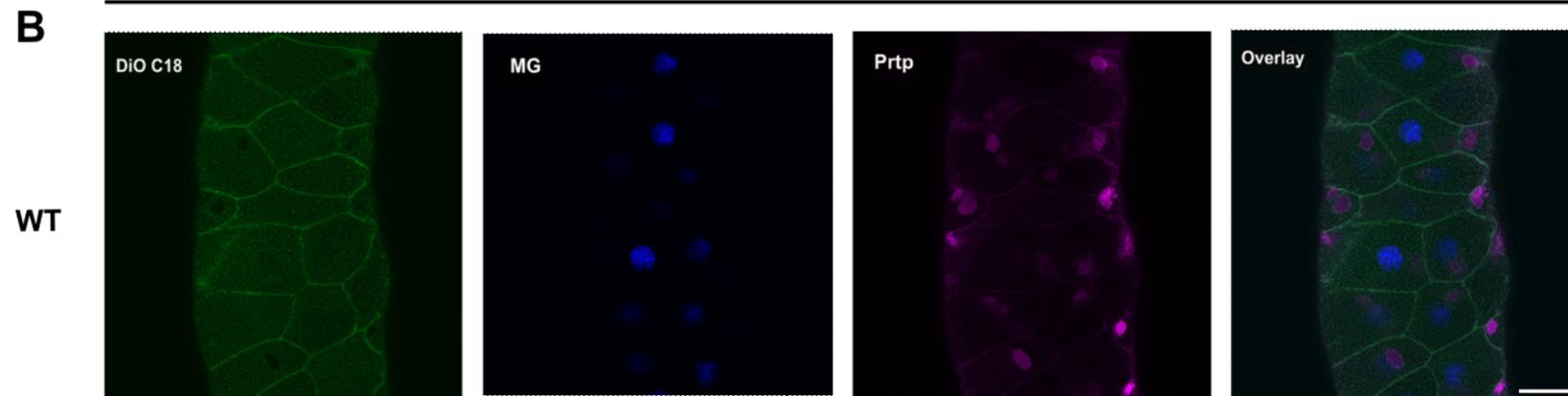
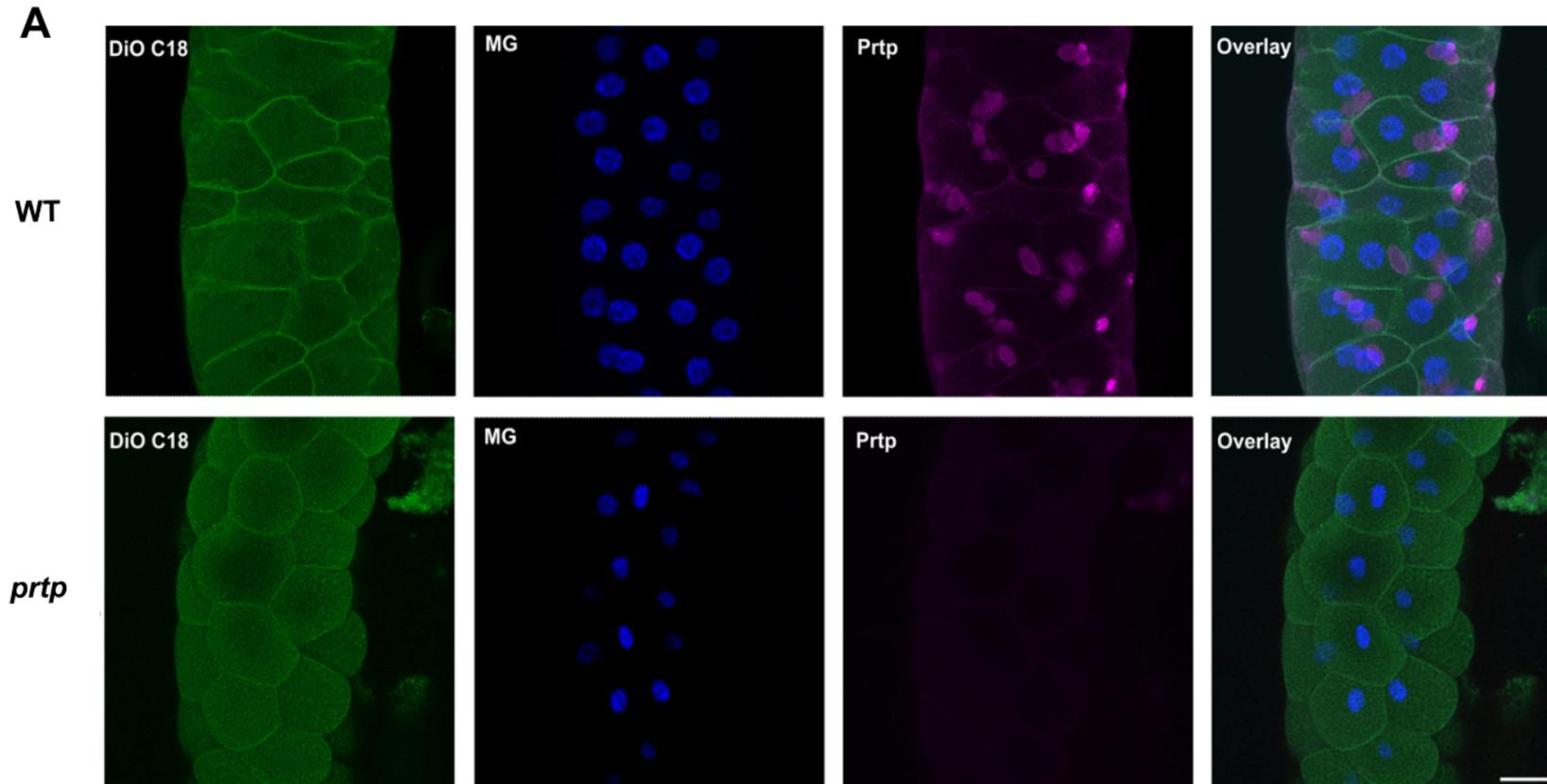
Para investigar nuestra hipótesis de que una mutación en *prtp* mitigaría el fenotipo neurodegenerativo causado por la mutación en *park* decidimos usar como control positivo del fenotipo neurodegenerativo a moscas portadoras del alelo con falta de función *park*<sup>25</sup> en heterocigosis con el alelo salvaje (+) y en un contexto genómico mutante *w*, haciendo cruzamientos dirigidos siguiendo paso a paso el diseño detallado en la sección 4.2.2.

Los fenotipos resultantes de cada cruzamiento fueron exactamente los esperados y obtuve los individuos de interés con los genotipos  $X^{w1118}/X^{w1118}; +/+; park^{25}/+$  (hembras) y  $X^{w1118}/Y; +/+; park^{25}/+$  (machos).

### 5.3. El anticuerpo anti-Prtp funciona correctamente en inmunohistoquímica de glándula salival de larva L3 de *Drosophila*, tejido positivo para la expresión de Prtp

Para corroborar el correcto funcionamiento del anticuerpo anti-Prtp (Kuraishi et al., 2009) que sería empleado para analizar la expresión normal de Prtp en cerebro adulto, realicé una tinción inmunohistoquímica de glándula salival de larvas L3 de *Drosophila*, tejido positivo para la expresión de Prtp ([https://flybase.org/reports/FBgn0030329#expression\\_sub](https://flybase.org/reports/FBgn0030329#expression_sub)) (Robinson et al., 2013). Empleé esta técnica utilizando glándulas de machos WT (n = 3), como control positivo y mutantes nulos *prtp* (n = 3 por cada genotipo), como control negativo. La **Figura 13.A** presenta imágenes representativas del resultado de este experimento, donde obtuve una nítida respuesta, con inmunofluorescencia en las glándulas salivales de larvas WT y ausencia de inmunofluorescencia en las glándulas de larvas mutantes, demostrando que el anticuerpo anti-Prtp funciona correctamente.

Secundariamente, encontré un patrón de distribución intracelular de Prtp aún no descripto para esta proteína. Como se muestra en la **Figura 13.B**, en este estadio del desarrollo las células glandulares acumulan Prtp en el sistema de membranas y en el interior de estructuras vacuolares.

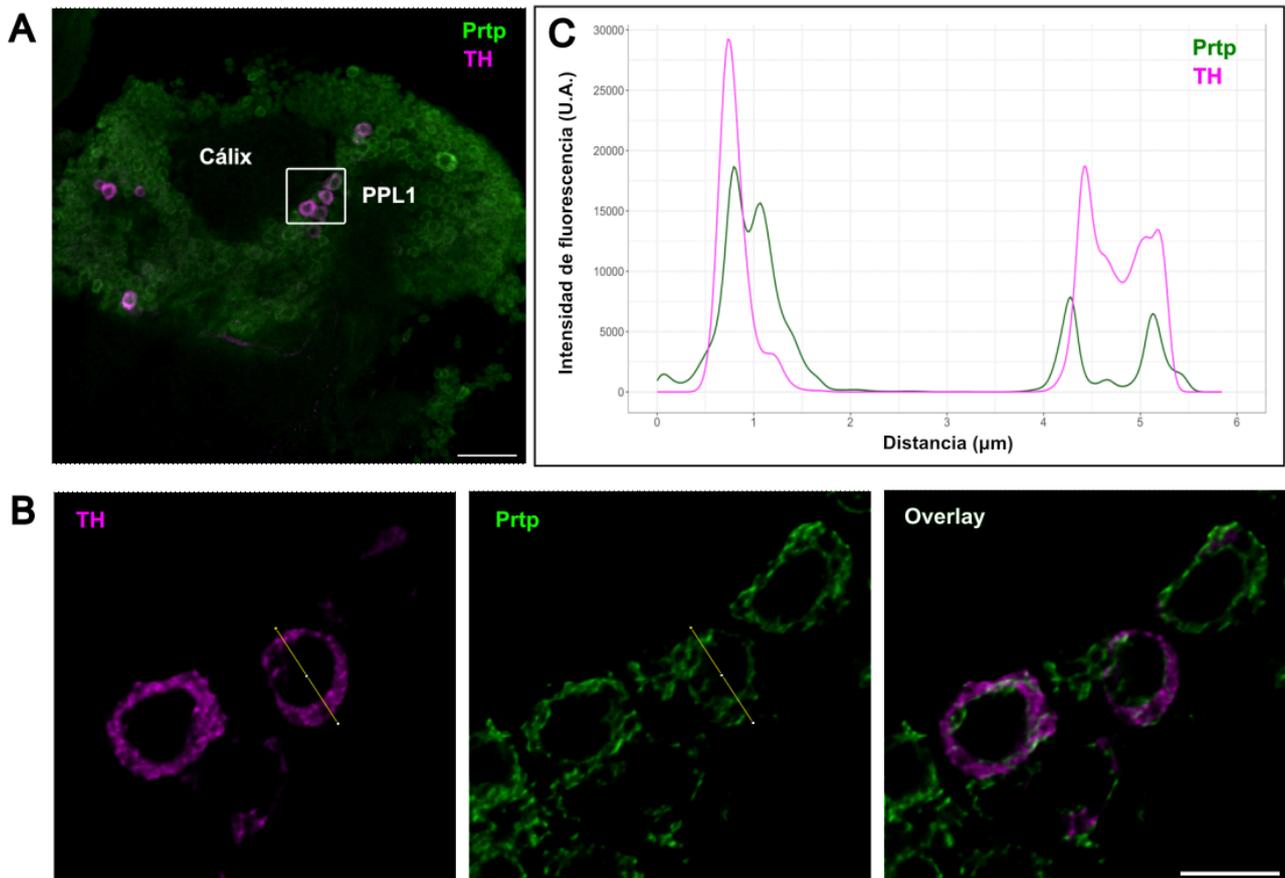


**Figura 13. El anticuerpo anti-Prtp funciona correctamente. A.** La figura muestra imágenes de varios planos confocales proyectados en el eje Z de glándulas salivales de larvas L3 de *Drosophila* WT y mutantes nulos *prtp* (*prtpΔ1*), teñidas con DiO C18 para el marcaje de membranas (en verde), con verde de metilo (MG, por su sigla en inglés) para la detección de núcleos (en azul) y con anti-Prtp para la detección de la proteína Prtp (en magenta). **B.** La imagen muestra un plano confocal de una glándula salival de larva L3 WT donde se observa más claramente la distribución subcelular de Prtp, con acumulación en membranas y estructuras vacuolares. N=3 machos por genotipo. Aumento de 20X. Barras de escalas: 50 μm.

#### 5.4. Prtp se expresa en neuronas dopaminérgicas PPL1 de adultos WT y colocaliza parcialmente con la enzima TH

Para investigar si Prtp se expresa normalmente en neuronas dopaminérgicas PPL1 de adultos de *Drosophila* (Objetivo específico 2), usé una tinción inmunohistoquímica específica para la enzima TH, que es un excelente marcador de las neuronas dopaminérgicas. Analicé el cerebro de tres machos adultos de 5 días de edad de la cepa WT y los resultados demostraron claramente la expresión de la proteína Prtp en neuronas dopaminérgicas PPL1 (Figura 14).

Adicionalmente, el análisis de la colocalización de Prtp con TH, que realicé como describí en la sección de metodología 4.3.2., reveló una correlación positiva sólida entre la intensidad de las señales correspondientes a TH y a Prtp a nivel de la célula completa (coeficiente de correlación de Pearson ( $R$ ) = 0.501, en promedio, **Tabla 1**). De manera descriptiva, el 53% de la señal de TH se superpuso con la señal de Prtp (Coeficiente de Manders M1 promedio), y el 40% de la señal de Prtp se superpuso con la señal de TH (Coeficiente de Manders M2 promedio). La colocalización parcial de Prtp con el marcador dopaminérgico TH se observó también claramente al estudiar la correspondencia topográfica entre la distribución de intensidades de ambas fluorescencias, como se ilustra gráficamente en la **Figura 14.C**. En este caso, los dos perfiles de intensidad de fluorescencia a lo largo de una línea trazada a través de la imagen de la célula también revela que los picos de intensidad de fluorescencia de la señal de Prtp se encuentran por dentro de la distribución de intensidad de fluorescencia bajo la recta de la señal de TH, flanqueados por los picos de esta última (**Figura 14.C**).



**Figura 14. Expresión de Pretaporter (Prtp) en neuronas dopaminérgicas PPL1 de cerebros de machos adultos WT de *Drosophila* de 5 días de edad.** **A.** Proyecciones en Z de tres planos confocales del hemisferio derecho del cerebro central (vista posterior), teñido con anti-Prtp (en verde) y anti-TH (en magenta). La imagen muestra parte de las neuronas dopaminérgicas (magenta) pertenecientes al grupo PPL1 (dentro del marco blanco) a un nivel del protocerebro donde se ve el cáliz del *corpora pedunculata*, referencia anatómica usada para la localización del grupo PPL1. Aumento de 40X. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . **B.** Ampliación de la región de neuronas PPL1 mostradas dentro del marco blanco en **A**, utilizando el objetivo de 63X, zoom digital 5X y procesamiento de deconvolución. La línea amarilla muestra exactamente dónde se ubicó el vector usado para registrar la intensidad de fluorescencia en ambos canales, tal como se grafica en **C**. Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ . **C.** Imagen representativa del análisis de intensidad de fluorescencia a lo largo de la línea trazada en cada canal (línea amarilla en la figura B), que muestra de forma gráfica la colocalización parcial de los marcadores Prtp y TH. N = 3 cerebros (7 neuronas PPL1 analizadas).

**Tabla 1. Análisis de colocalización de los marcadores Prtp y TH en neuronas dopaminérgicas PPL1 de cerebros de machos adultos de Drosophila de 5 días de edad.**

Neurona	Coeficiente de correlación de Pearson (R)	Coeficiente de Manders (M1)	Coeficiente de Manders (M2)
1	0,424	0,419	0,597
2	0,323	0,309	0,315
3	0,594	0,633	0,468
4	0,602	0,924	0,309
5	0,468	0,455	0,386
6	0,541	0,471	0,324
7	0,556	0,511	0,403
<b>Promedios</b>	0,501	0,532	0,400
<b>Desvíos estándar</b>	0,102	0,199	0,104

**M1:** Fracción de área de la marca TH superpuesta a la marca Prtp. **M2:** fracción de área de la marca Prtp superpuesta a la marca TH.

## 5.5. La ausencia de expresión del Prtp protege contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas PPL1 causada por la mutación del gen *park*

A partir de nuestra hipótesis principal, adelantamos la hipótesis de que la falta de función de *prtp* en mutantes con falta de función en *park* alivia la pérdida de neuronas dopaminérgicas causada por la mutación en *park*. En consecuencia, propusimos cuantificar las neuronas dopaminérgicas del clúster PPL1 en individuos mutantes dobles *prtp-park* y compararlos con mutantes *park* y controles (Objetivo específico 3). Usé la tinción inmunohistoquímica específica para TH con el fin de cuantificar las neuronas PPL1 en los diferentes genotipos (**Figura 15**) y el resultado reveló que, en moscas de 25 días de edad, el número de neuronas PPL1 en los mutantes dobles *prtp-park* es significativamente mayor en comparación con los mutantes *park* (Figura 16.B,  $p < 0,05$ ), en apoyo a nuestra hipótesis.

Además de ese resultado principal, observé que a los 25 días de edad el número de neuronas PPL1 en moscas con mutación en *park* también es significativamente menor en comparación con moscas de todos los otros genotipos analizados (**Figura 16.B**,  $p < 0,05$  para todas las comparaciones restantes) incluyendo el genotipo WT ( $p < 0,01$ ), no mostrado en la figura. En cambio, en moscas de 5 días de edad no observé diferencias significativas entre los mutantes *park* y ninguno de los otros genotipos analizados, incluyendo WT, no mostrado en la figura (**Figura 16.A**, NS). Además, tampoco detecté diferencias significativas en el número de neuronas PPL1 al comparar mutantes dobles *prtp-park* con sus controles *prtp* y *w* en moscas de 5 y 25 días de edad (**Figura 17.A y B**, NS). Finalmente, tampoco observé diferencias significativas en el número de neuronas PPL1 entre mutantes simples *prtp* y mutantes *w* en moscas de ambas edades analizadas (**Figura 17 A y B**, NS).

Respecto a las comparaciones intragenotípicas, las moscas *park* de 25 días de edad presentaron significativamente menos neuronas PPL1 que las moscas *park* de 5 días de

edad (**Figura 17.C**,  $p < 0,01$ ). Esta diferencia entre moscas del mismo genotipo, pero de dos edades distintas no fue observada en moscas de los otros genotipos (**Figura 17 (A, B y D)**, NS), incluyendo también a WT, no mostrado en la figura.

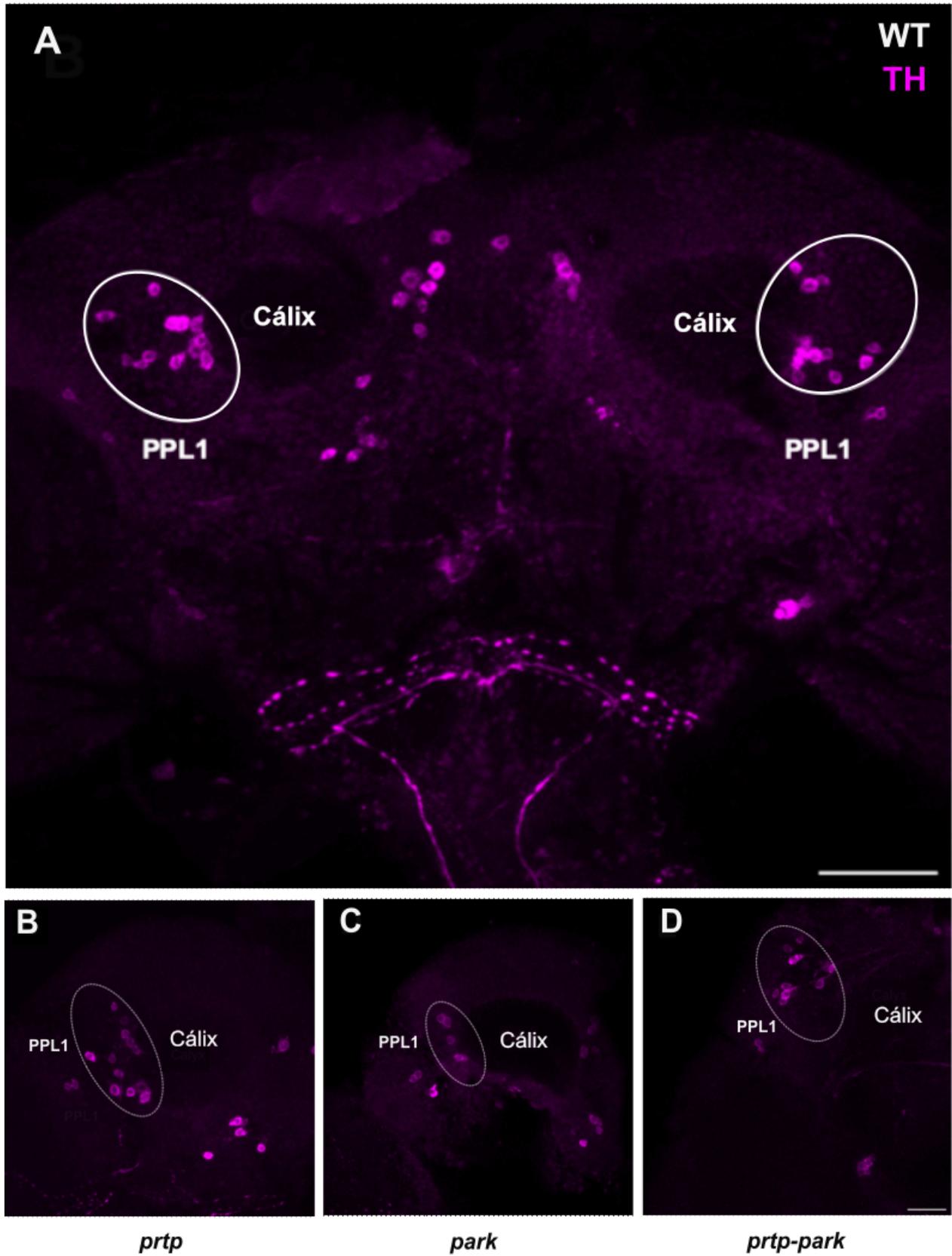


Figura 15. Inmunotinción con anti-tirosina-hidroxilasa (anti-TH) para la cuantificación comparativa de neuronas dopaminérgicas PPL1 en cerebros completos de machos adultos de *Drosophila* mutantes

**dobles *prtp-park* en comparación con mutantes *park* y controles. A.** Planos confocales proyectados en Z de cerebro de macho adulto WT de 25 días de edad teñido con anti-TH (magenta). Obsérvese que la imagen muestra el cáliz del *corpora pedunculata*, usado como referencia anatómica para la localización del grupo PPL1. Las neuronas del grupo PPL1 están enmarcadas por un anillo blanco en ambos hemisferios cerebrales (vista posterior). Aumento de 20X. Barra de escala: 40  $\mu$ m. También se observan neuronas dopaminérgicas pertenecientes a otros grupos, que no fueron considerados en nuestra cuantificación. **B-D.** Imágenes representativas del grupo PPL1 en moscas de tres genotipos mutantes estudiados (imágenes correspondientes al hemisferio cerebral izquierdo de machos adultos de 25 días de edad teñidos con anti-TH (magenta). Aumento de 40X. Barra de escala: 20  $\mu$ m.



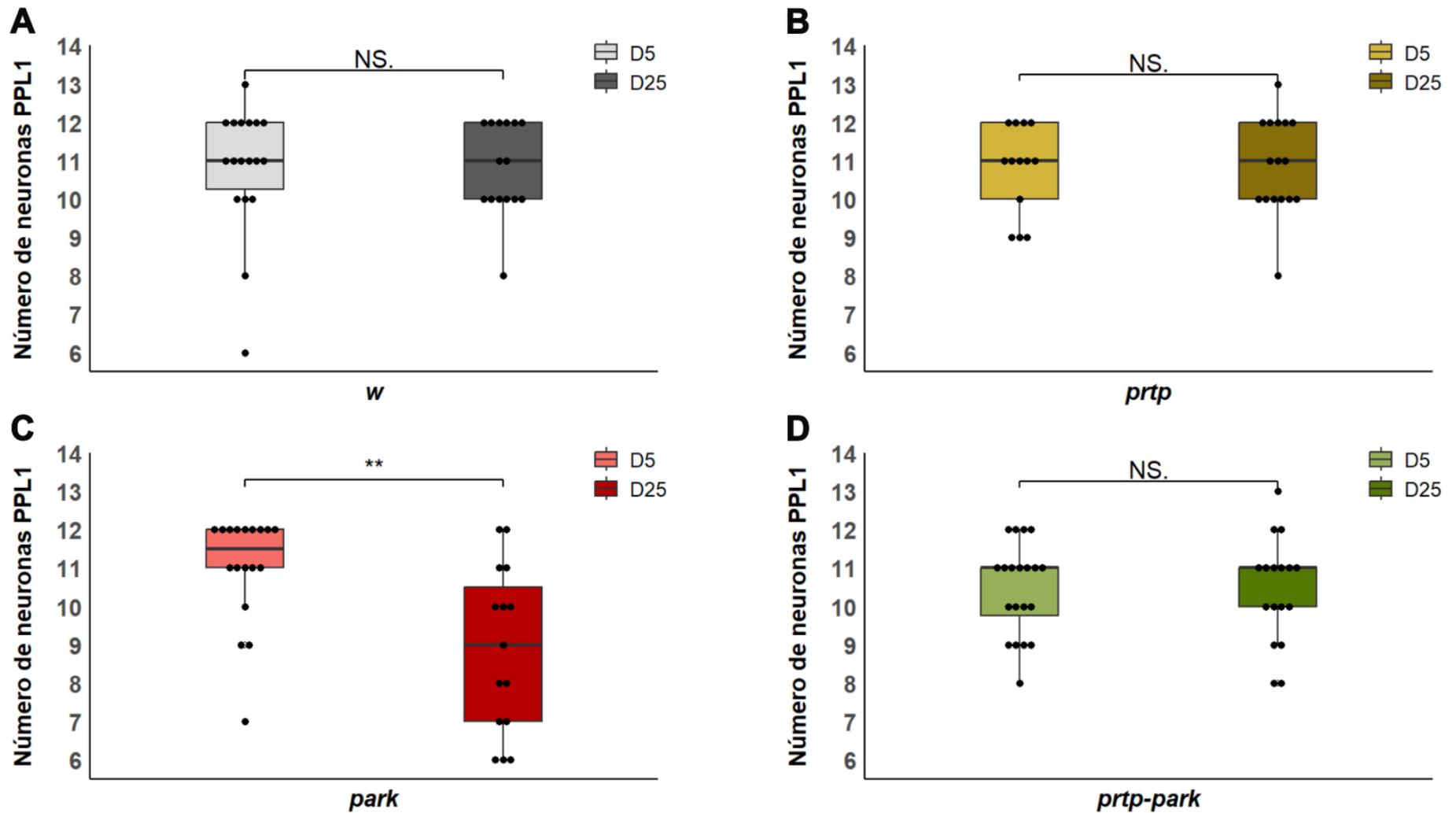


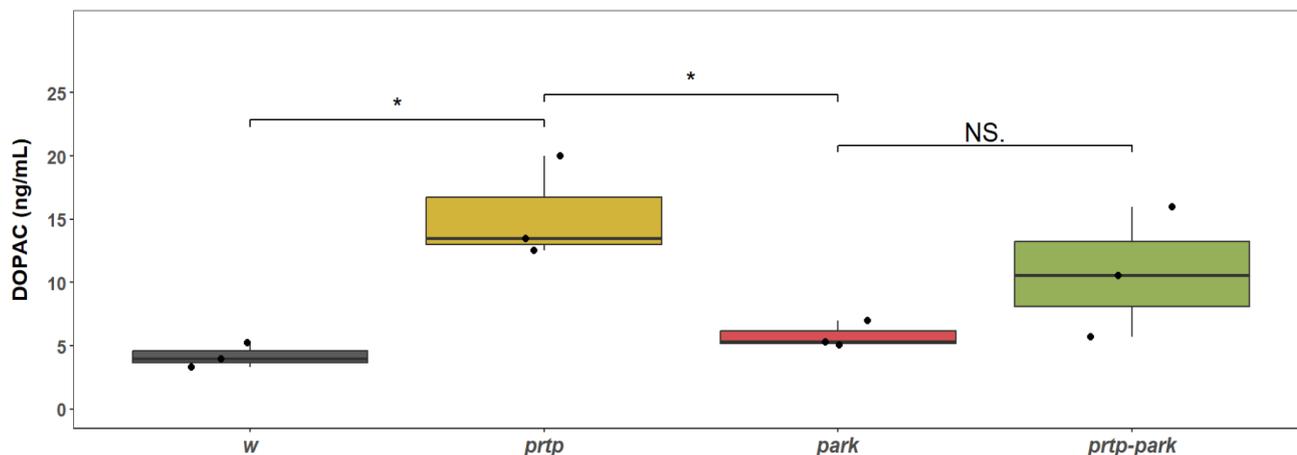
Figura 17. Comparaciones intragenotípicas del número de neuronas dopaminérgicas PPL1 en moscas de 5 y 25 días de edad. Los ejes de las abscisas muestran los genotipos analizados y los ejes de las ordenadas representan el número de neuronas PPL1 contabilizadas para cada edad analizada (A-D). Prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon  $p < 0,01$  (\*\*), NS: No significativo. N = 10 machos por genotipo y edad.

## 5.6. Los mutantes dobles *prtp-park* exhiben un aumento no significativo de los niveles de DOPAC y HVA en relación con los mutantes *park*

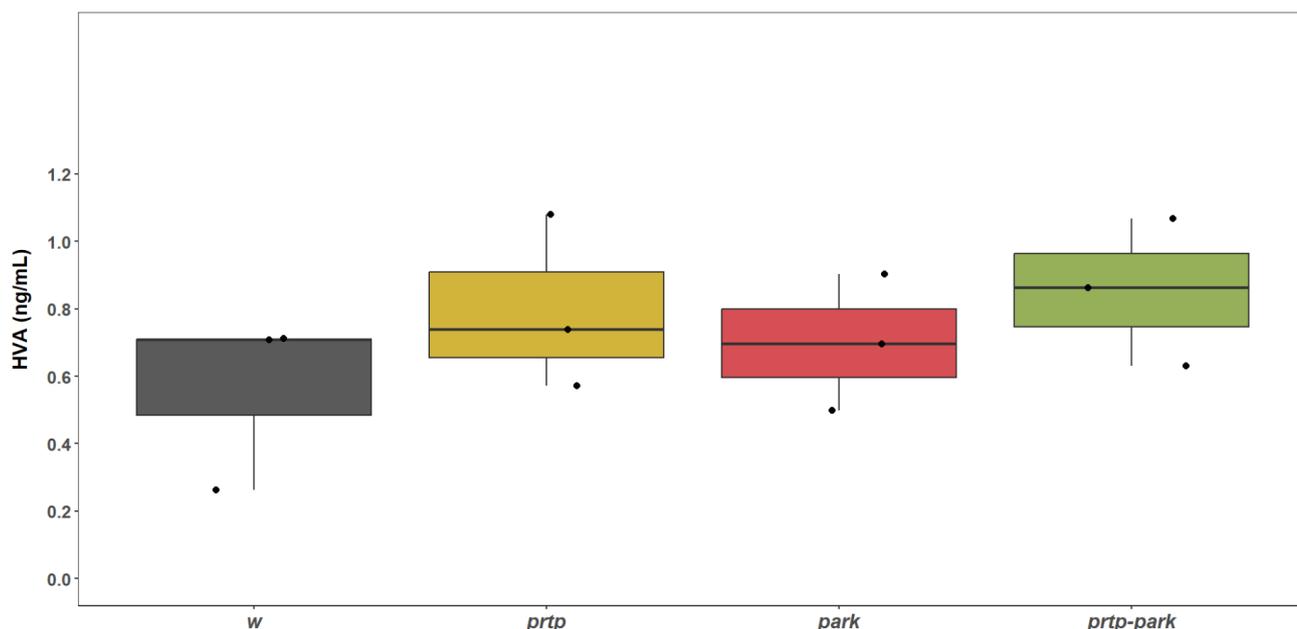
Para investigar si la falta de función de *prtp* alivia la reducción de los niveles de DA observada en mutantes *park* y si genera un cambio en los niveles de DOPAC y HVA, los principales metabolitos de degradación de la DA (Objetivo específico 4), en conjunto con la Plataforma de Química Analítica del IIBCE analizamos por HPLC los niveles de estos compuestos en cabezas machos de 25 días de edad mutantes dobles *prtp-park*, mutantes *park* y controles. No logramos medir los niveles de DA, pero los resultados del análisis de sus metabolitos mostraron que existe una tendencia no significativa hacia el aumento de los niveles de DOPAC y HVA en los mutantes dobles *prtp-park* en comparación a los mutantes *park* (Figuras 18 y 19).

Los niveles de DOPAC resultaron significativamente mayores en los mutantes *prtp* simples en relación a mutantes *w* y *park* (Figura 18,  $p < 0,05$  para ambas comparaciones). Además, fueron significativamente mayores en las moscas WT que en las moscas de los demás genotipos analizados ( $p < 0,01$  para todas las comparaciones, dato no incluido en figura).

En cuanto a los resultados para HVA, además de lo previamente mencionado, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos analizados, aunque se observaron las mismas tendencias que para DOPAC (Figura 19, NS para todas las comparaciones).



**Figura 18. Cuantificación por HPLC de los niveles de DOPAC en cerebros de machos adultos de 25 días de edad de todos los genotipos analizados.** El eje de las abscisas menciona los genotipos analizados y el eje de las ordenadas representa los valores de concentración de DOPAC (ng/mL). Sólo se muestran los resultados de las comparaciones estadísticamente significativas y la comparación no significativa relevante *prtp-park* vs *park*. Prueba t de Student.  $p < 0,05$  (\*), NS: No significativo. N = 45 machos por genotipo (3 réplicas de 15 individuos por muestra).



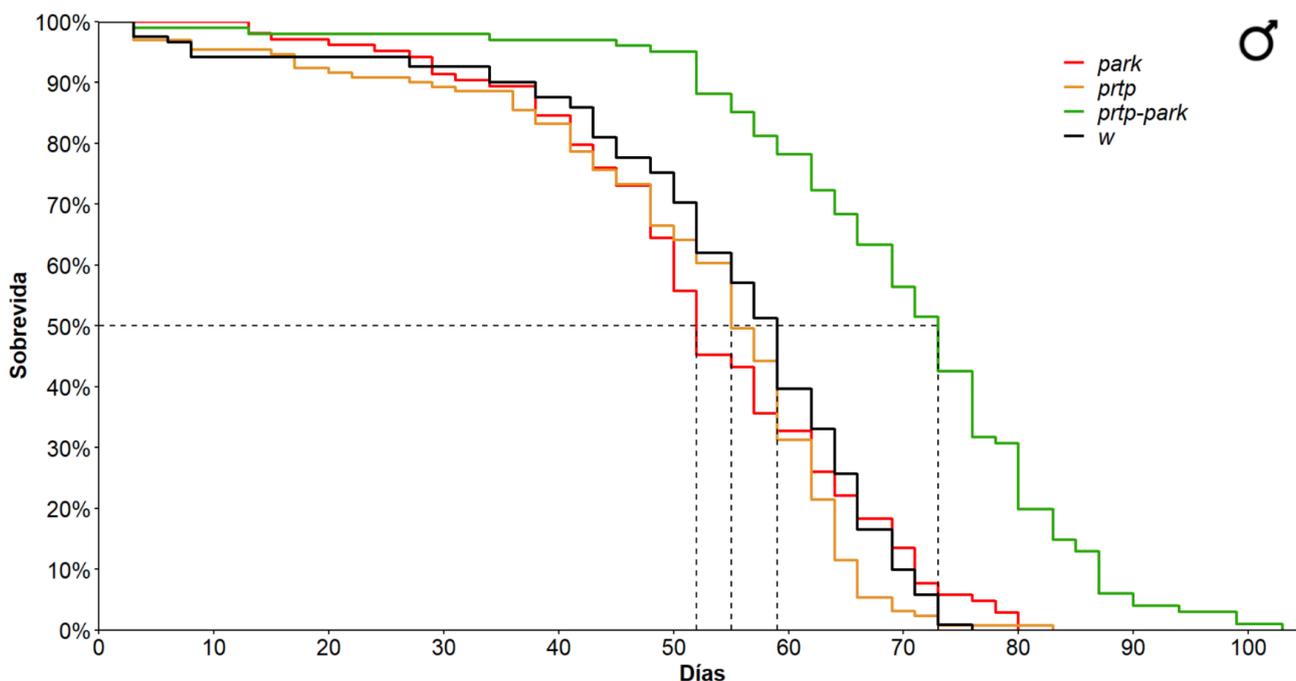
**Figura 19. Cuantificación por HPLC de los niveles de HVA en cerebros de machos adultos de 25 días de edad de todos los genotipos analizados.** El eje de las abscisas menciona los genotipos analizados y el eje de las ordenadas representa los valores de concentración de HVA (ng/mL). La prueba t de Student no arrojó diferencias significativas entre las diferentes comparaciones. N = 45 machos por genotipo (3 réplicas de 15 individuos por muestra).

### 5.7. Los machos mutantes dobles para *prtp-park* sobreviven significativamente más que los mutantes de neurodegeneración *park*

Con el objetivo de investigar si la falta de función de *prtp* protege contra la reducción de la sobrevivencia observada en los mutantes *park*, propusimos cuantificar la sobrevivencia de los mutantes dobles *prtp-park* en relación a los *park* y en comparación con el resto de los controles (Objetivo específico 5), mediante ensayos de sobrevivencia realizados tanto en machos como en hembras. En esta sección informo sobre los resultados encontrados para los machos, mientras que en la próxima sección informaré sobre los resultados de las hembras.

En primer lugar y en apoyo a la hipótesis central de esta tesis, encontré que los machos mutantes dobles *prtp-park* sobreviven significativamente más que los mutantes de neurodegeneración *park* (**Figura 20**,  $p < 0,0001$ ). Inesperadamente, las moscas con la doble mutación sobreviven significativamente más que las de todos los grupos control (**Figura 20**,  $p < 0,0001$ ). Sorprendentemente, también encontré que los machos mutantes *prtp* tienen una menor sobrevivencia que los machos *w*, pero no respecto a los *park*, los cuales no se diferencian de los *w* (**Figura 20**,  $p < 0,05$ , NS, NS, respectivamente).

La **Figura 20** también muestra la vida media, definida como el tiempo (expresado en días) cuando sobrevive el 50% de las moscas de cada genotipo, siendo 52 días para los machos mutantes *park*, 55 días para los *prtp*, 59 días para los *w* y 73 días para los doble mutantes *prtp-park*.



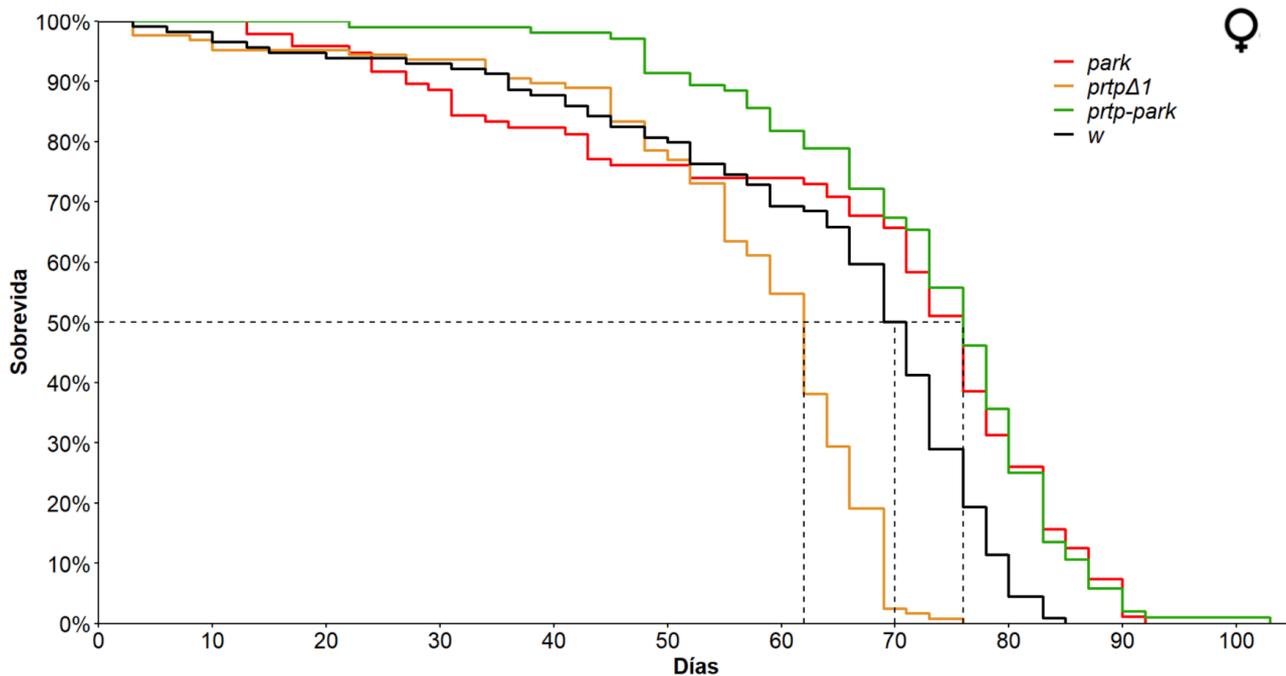
**Figura 20. Cuantificación de la supervivencia en machos mediante el método de Kaplan-Meier.** El eje de las abscisas muestra el tiempo en días y el eje de las ordenadas representa la supervivencia (expresada en porcentajes). Los doble mutantes *prtp-park* (en verde) sobreviven significativamente más que los mutantes simples *park* (en rojo). Prueba de *log-rank* (Mantel-Cox).  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). También sobreviven significativamente más que el resto de los controles analizados. Prueba de *log-rank* (Mantel-Cox).  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Los mutantes *park* (en contexto *w*) (en rojo) no muestran diferencias significativas en relación con los mutantes *w* (en negro) ni con los mutantes *prtp* (también en contexto *w*) (en anaranjado). Sin embargo, estos últimos sobreviven significativamente menos que *w*. Prueba de *log-rank* (Mantel-Cox).  $p < 0,05$  (\*). Las líneas punteadas muestran los valores de vida media para cada genotipo. N = 100 machos por genotipo.

**5.8. La sobrevida de las hembras mutantes dobles *prtp-park* es significativamente mayor que la de las mutantes de neurodegeneración *park* hasta el día 59 de vida**

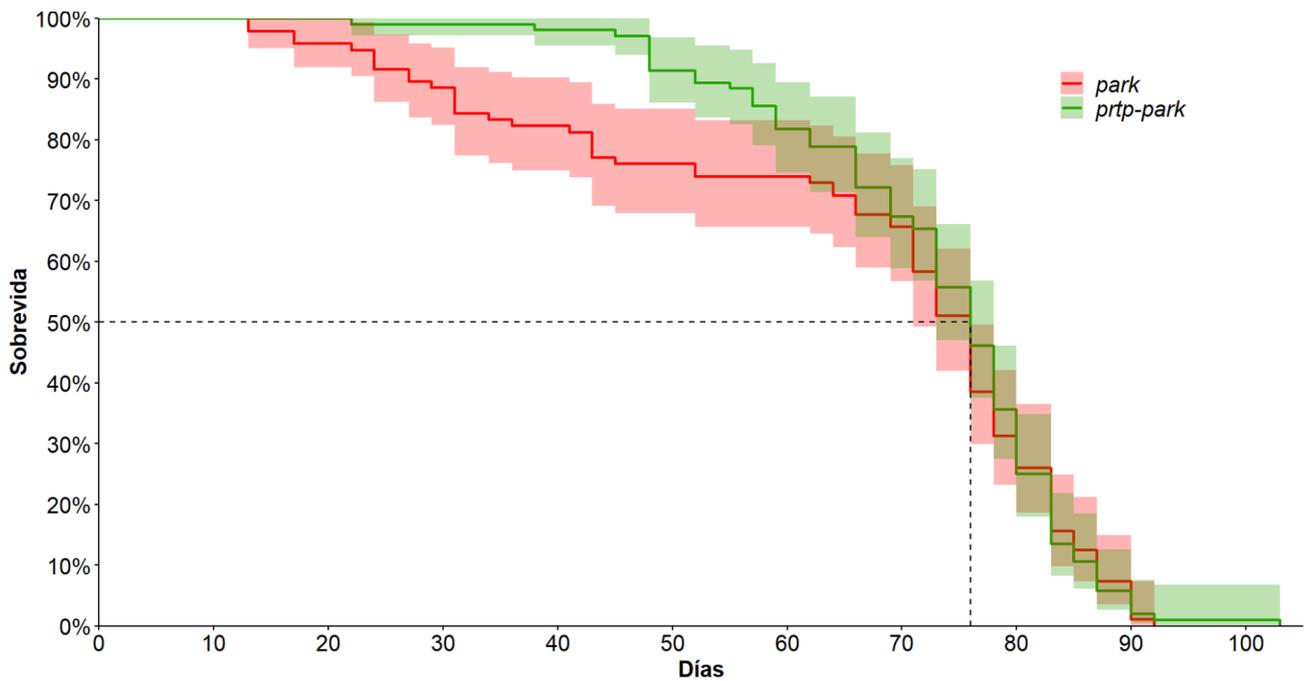
En un primer análisis de la sobrevida en hembras de los distintos genotipos, los resultados no mostraron diferencias significativas de sobrevida entre las mutantes *prtp-park* y las mutantes *park*, a pesar de que sus curvas de sobrevida (verde y roja) son aparentemente diferentes (**Figura 21**, NS). Esta observación me estimuló a analizar los datos desde otro punto de vista, acotando la prueba de Mantel Cox desde el tiempo inicial del ensayo (día 0) hasta los puntos temporales en los cuales los intervalos de confianza para las curvas de sobrevida de ambos mutantes comienzan a solaparse (**Figura 22**). A través de este análisis, determiné que la probabilidad de supervivencia de las hembras mutantes dobles *prtp-park* es significativamente mayor que la de las *park* hasta el día 59 de vida, lo que equivale aproximadamente a 2/3 de la vida máxima del grupo (**Figura 22**,  $p < 0,05$ ).

Sumado a esto, las mutantes *prtp-park* presentaron una mayor sobrevida respecto a todos los demás controles analizados (**Figura 21**,  $p < 0,0001$  para todas las comparaciones). Interesantemente, los datos mostraron que la probabilidad de sobrevida de las hembras mutantes *prtp* (en contexto mutante *w*) es significativamente menor que la de las hembras mutantes en *w* o en *park* (en contexto mutante *w*) (**Figura 21**,  $p < 0,0001$ ). A diferencia de los machos, las hembras mutantes *park* presentaron una mayor sobrevida que las mutantes *w* (**Figura 21**,  $p < 0,0001$ ), que cambia de sentido en torno al día 55. Para analizar esto, empleé nuevamente un análisis de Mantel-Cox acotado en el tiempo (**Figura 23**). Encontré que desde el día 0 hasta el día 70 de vida, no existen diferencias significativas en la sobrevida de ambos genotipos. Sin embargo, pasados los 70 días, la probabilidad de sobrevida de las mutantes *park* es significativamente mayor que la de las *w* (**Figura 23**,  $p < 0,0001$ ).

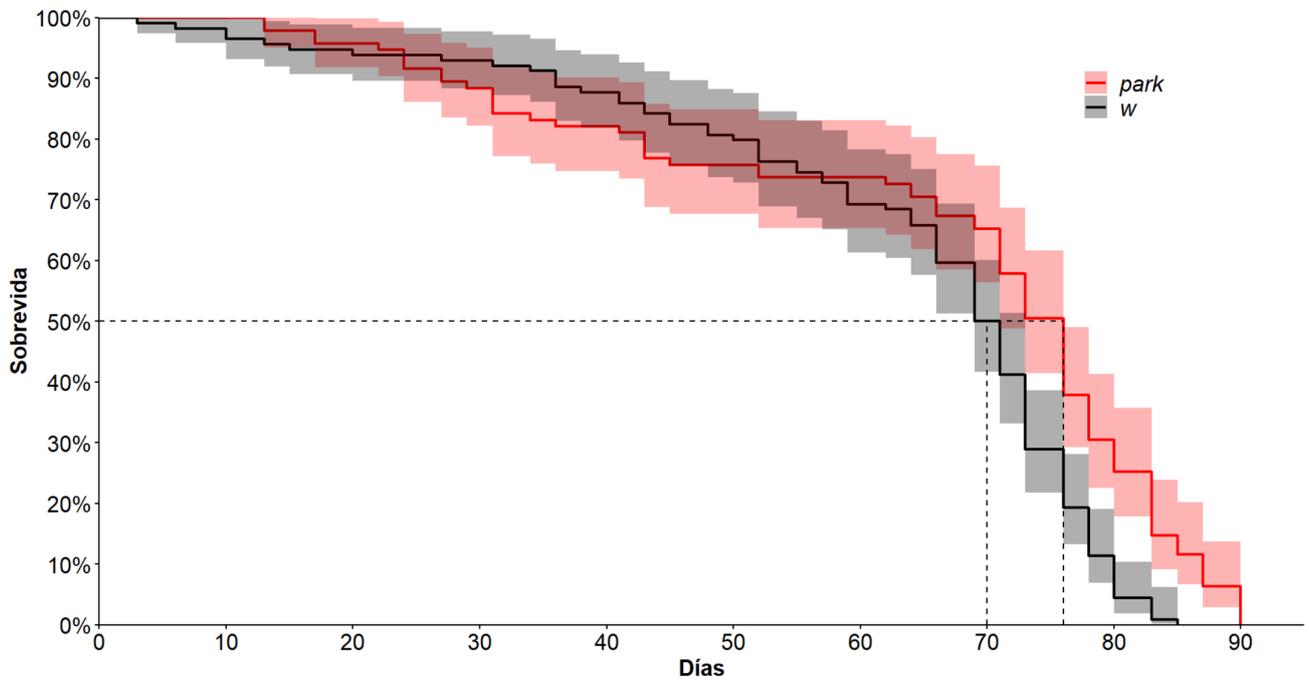
Por último, las **Figuras 21-23** también muestran la vida media de las hembras de cada genotipo, siendo 76 días para las mutantes *park* y para las doble mutantes *prtp-park*, 62 días para las mutantes *prtp* y 70 días para *w*.



**Figura 21. Cuantificación de la sobrevivida en hembras mediante el método de Kaplan-Meier.** El eje de las abscisas muestra el tiempo en días y el eje de las ordenadas representa la sobrevivida (expresada en porcentajes). La figura muestra que, si bien las curvas de sobrevivida de las hembras doble mutantes *prtp-park* (en verde) y de las mutantes *park* (en rojo) visualmente parecen muy diferentes, no existen diferencias estadísticas entre estos dos genotipos. Prueba de *log-rank* (Mantel-Cox),  $p = 0,5$ . Las hembras doble mutantes *prtp-park* tuvieron mejor sobrevivida que las de los controles *w* y *prtp* (en negro y anaranjado, respectivamente). Prueba de *log-rank* (Mantel-Cox),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) para las dos comparaciones. Los mutantes *park* tienen una probabilidad de sobrevivida significativamente mayor que la de las mutantes *w*. Prueba de *log-rank* (Mantel-Cox),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Los mutantes *prtp* también sobreviven significativamente menos que los mutantes *w* (en negro). Prueba de *log-rank* (Mantel-Cox),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Las líneas punteadas muestran los valores de vida media para cada genotipo. N = 100 hembras por genotipo.



**Figura 22. Curvas de supervivencia de hembras mutantes dobles *prtp-park* y *park* realizadas por el método Kaplan-Meier con intervalos de confianza.** La figura muestra las curvas de supervivencia de los genotipos *park* y *park-prtp* y los intervalos de confianza asociados a las mismas. El eje de las abscisas muestra el tiempo en días y el eje de las ordenadas representa la supervivencia expresada en porcentajes. La probabilidad de supervivencia de las hembras doble mutantes *prtp-park* es significativamente mayor que la de las hembras *park* hasta el día 59 de vida, lo que equivale aproximadamente a 2/3 de la vida máxima registrada en ese grupo. Prueba de *log-rank* (Mantel-Cox) acotada al espacio temporal entre los días 0 y 59,  $p < 0,05$  (\*). La línea punteada muestra el valor de vida media para cada genotipo, que en este caso es el mismo para ambos genotipos. N = 100 hembras por genotipo.



**Figura 23. Curvas de supervivencia de hembras mutantes *park* y *w* calculadas con el método Kaplan-Meier con intervalos de confianza.** El eje de las abscisas muestra el tiempo en días y el eje de las ordenadas representa la supervivencia expresada en porcentajes. La figura muestra las curvas de supervivencia para los genotipos especificados y los intervalos de confianza asociados a las mismas, que son significativamente diferentes entre los días 70 y 90 de vida. Prueba de *log-rank* (Mantel-Cox) acotada al espacio temporal entre los días 70 y 90,  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Las líneas punteadas muestran el valor de vida media para cada genotipo. N = 100 hembras por genotipo.

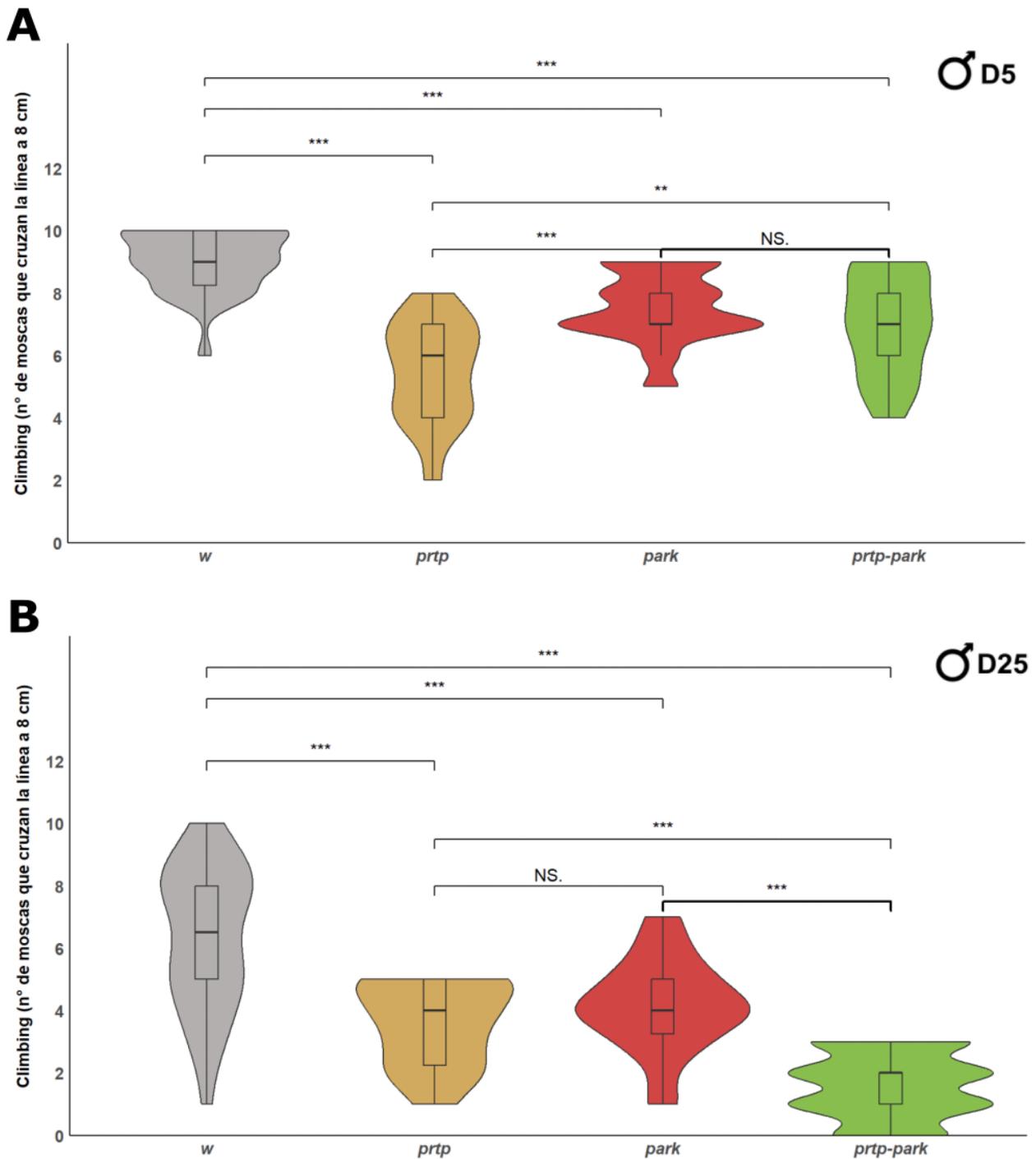
### 5.9. La habilidad motora de los mutantes dobles *prtp-park* es mayor que la de los mutantes de neurodegeneración *park* en hembras

Para investigar si la ausencia de *prtp* protege contra la reducción de la habilidad locomotora observada en los mutantes *park*, propusimos cuantificar la habilidad locomotora de individuos *prtp-park* en comparación a *park* y controles (Objetivo específico 6), mediante ensayos de *climbing* realizados en machos y hembras y a dos edades (5 y 25 días). No encontré diferencias entre los genotipos *park* y *park-prtp* cuando comparé machos y hembras de 5 días de edad (**Figuras 24.A**, NS y **25.A**, NS). A los 25 días de edad, por el contrario, encontré diferencias entre genotipos. La habilidad motora de las hembras mutantes *prtp-park* fue significativamente mayor que la de las hembras *park* (**Figura 25.B**,  $p < 0,001$ ) y en machos ocurre lo contrario (**Figura 24.B**,  $p < 0,001$ ).

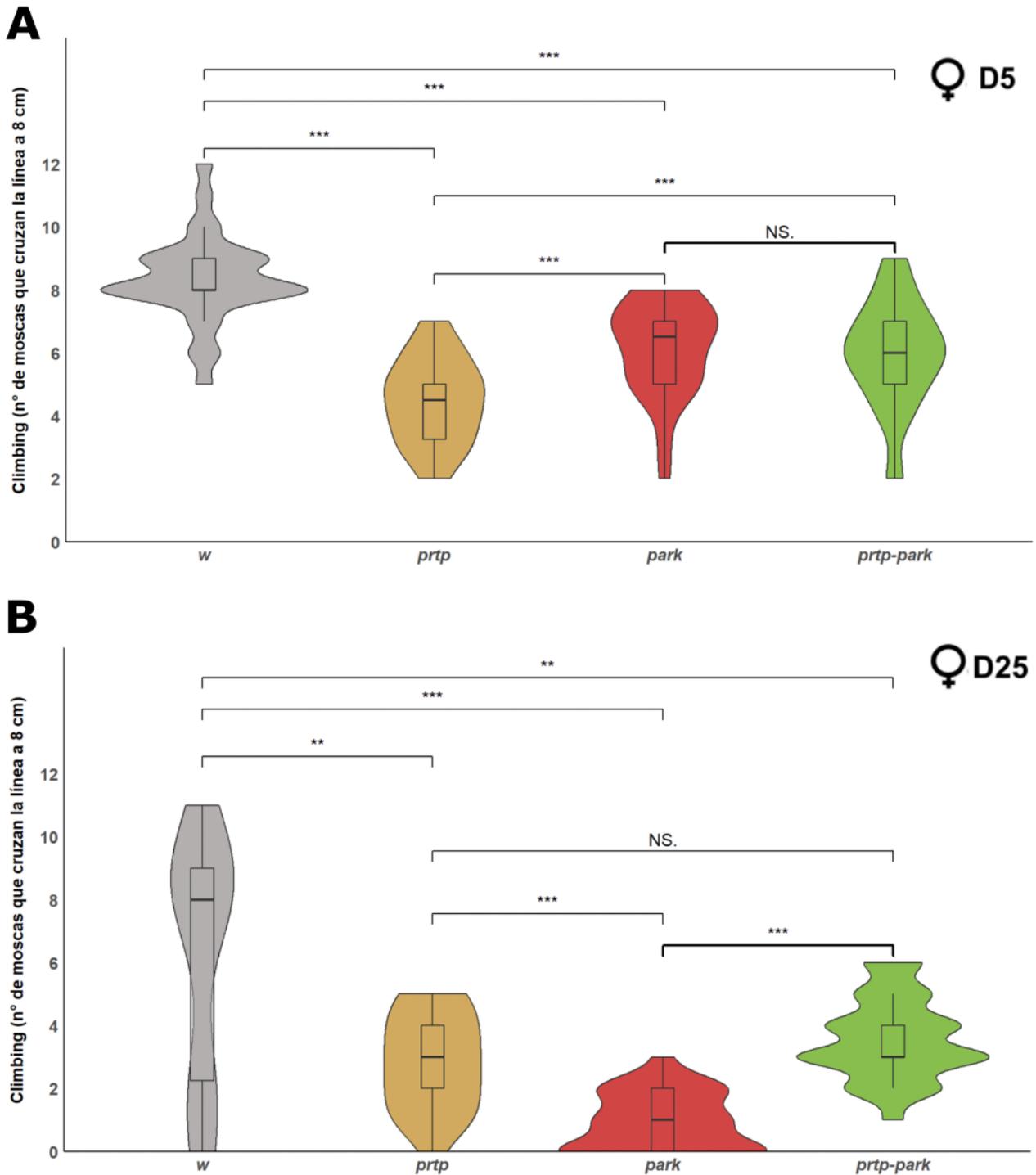
A los 5 días, los machos mutantes *prtp*, *park* y *prtp-park* (todos ellos en contexto mutante *w*) presentaron una habilidad motora significativamente menor que el control *w* (**Figura 24.A**,  $p < 0,001$  para todas las comparaciones). A los 25 días, estas diferencias se mantienen (**Figura 24.B**,  $p < 0,001$  para todas las comparaciones). Entre las hembras encontré exactamente lo mismo (**Figuras 25.A**,  $p < 0,001$  para todas las comparaciones y **25.B**,  $p < 0,01$  para *w* vs *prtp-park* y  $p < 0,001$  para el resto).

Interesantemente, las moscas mutantes *prtp* tuvieron un desempeño motor significativamente menor que las moscas *park* a la edad de 5 días, en ambos sexos (**Figuras 24.A**,  $p < 0,001$  y **25.A**,  $p < 0,001$ ). Al comparar moscas de 25 días, encontré que esta diferencia no es significativa en los machos (**Figura 24.B**, NS) mientras que en hembras esta relación se invierte (**Figura 25.B**,  $p < 0,001$ ).

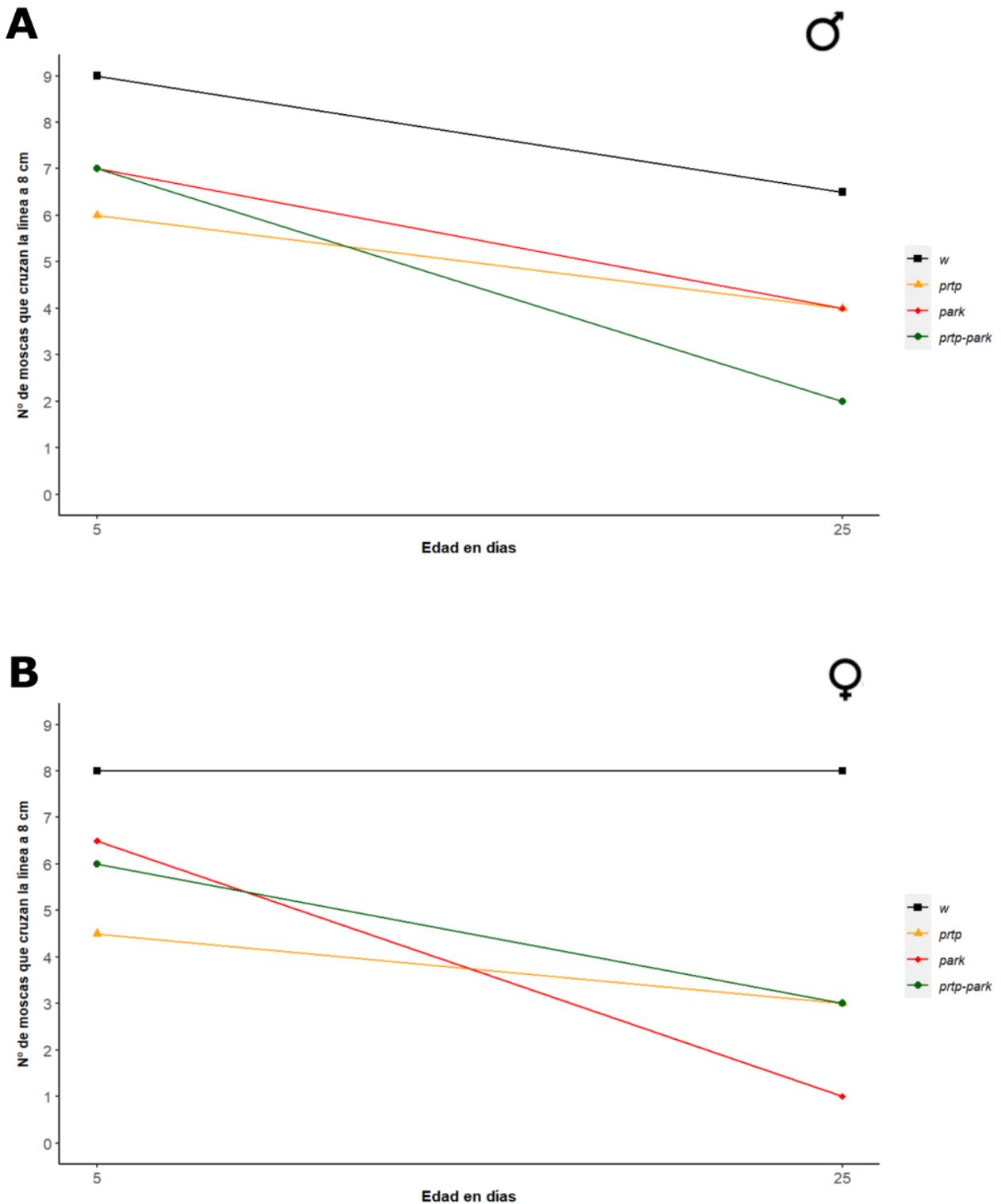
Finalmente, la **Figura 26** muestra una comparación de la habilidad motora entre moscas de 5 y 25 días de edad (**A** y **B**). Observé que el desempeño motor disminuye con la edad en todos los genotipos y en ambos sexos, excepto en las hembras de la cepa *w* (**Figura 26.B**). Es interesante que el decaimiento de la capacidad de escalada con el envejecimiento de los machos doble mutantes *prtp-park* parece comportarse de la misma forma que el de las hembras *park* (curva verde en machos y curva roja en hembras) y lo mismo sucede con el decaimiento en las hembras *prtp-park* y en los machos *park* (curva verde en hembras y curva roja en machos). La pendiente de las curvas de decaimiento (tasa de disminución de la actividad locomotora con la edad) de los machos *park* y de las hembras *prtp-park* es exactamente la misma (-0,150) y la de las hembras *park* y machos *prtp-park* es muy similar (-0,275 y -0,250, respectivamente).



**Figura 24. Evaluación de la habilidad motora a través de ensayos de *climbing* en machos.** La figura muestra los resultados de los ensayos de *climbing* de machos de (A) 5 y (B) 25 días de edad, de cada uno de los cuatro genotipos comparados aquí. El eje de las abscisas muestra el genotipo y el de las ordenadas el número de moscas que cumplieron la prueba (trepar en no más de 10 segundos una distancia previamente definida, ver detalles en Estrategia Experimental). Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*). NS: No Significativo. N = 30 por genotipo y edad.



**Figura 25. Evaluación de la habilidad motora a través de ensayos de *climbing* en hembras.** La figura muestra los resultados de los ensayos de *climbing* hechos con hembras de (A) 5 y (B) 25 días de edad, de los cuatro genotipos comparados. El eje de las abscisas muestra el genotipo y el de las ordenadas el número de moscas que pasaron la línea en un periodo de 10 segundos. Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*). NS: No Significativo. N = 30 por genotipo y edad.



**Figura 26. Decaimiento de la habilidad motora con el envejecimiento.** La figura presenta los resultados de la comparación de la habilidad motora en moscas de los genotipos evaluados de dos edades. El eje de las abscisas muestra la edad (5 y 25 días) y el eje de las ordenadas muestra las medianas del número de machos (A) y hembras (B), de 5 y 25 días de edad, que cruzaron la línea en un periodo de 10 segundos.

## 5.10. Análisis de interacciones de Prtp

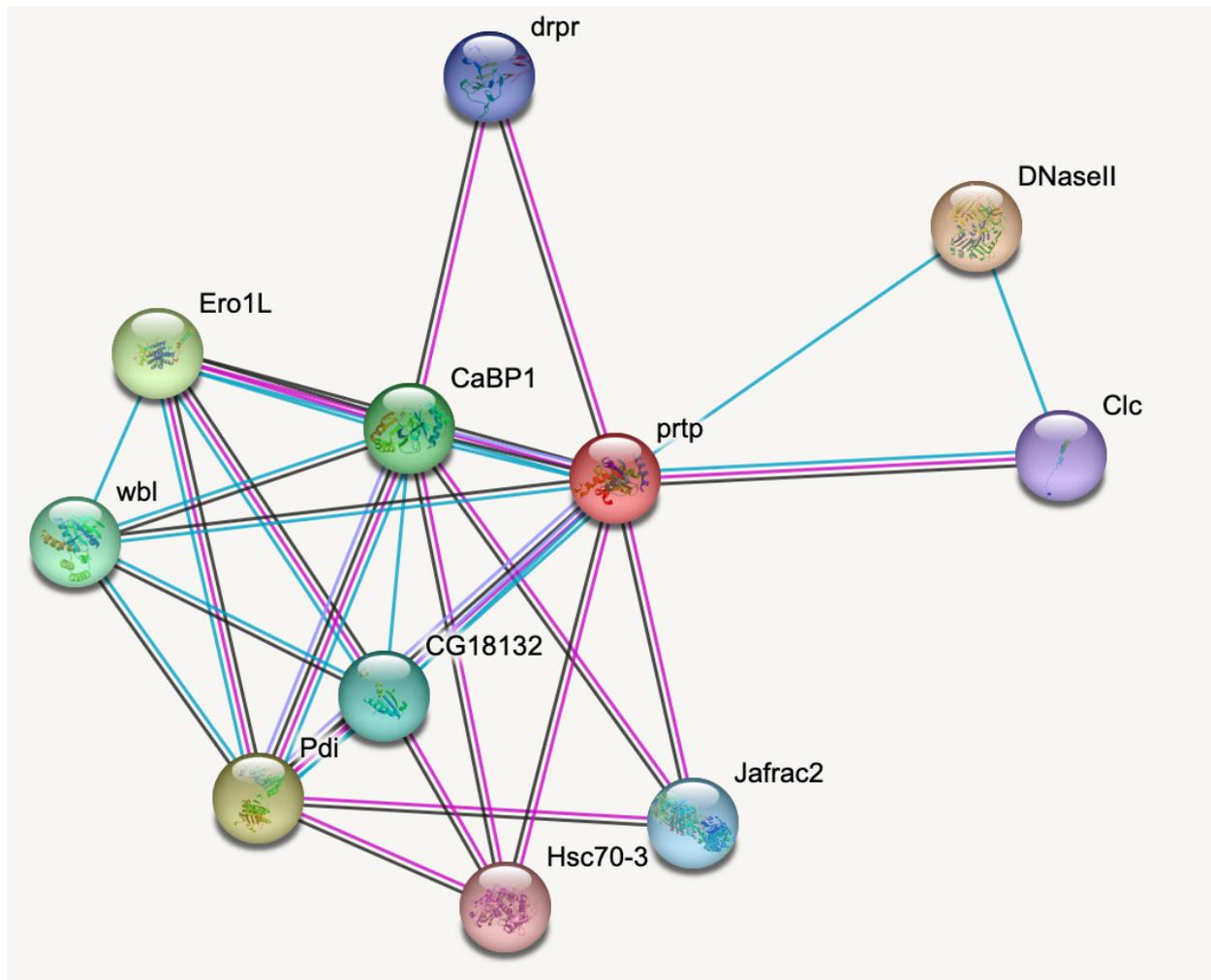
En el análisis de las posibles interacciones de Prtp con otras proteínas que realicé utilizando la base de datos STRING (<https://string-db.org/>) (Szkłarczyk et al., 2023) observé, en primer lugar, que Prtp interaccionaría con 10 proteínas y que muchas de estas asociaciones están sustentadas en datos experimentales. Algunas de estas proteínas están relacionadas a funciones de plegamiento de proteínas como Jafrac2, una peroxidasa redoxina responsable de la regulación de los niveles de peróxido de hidrógeno y con un papel en la formación de enlaces disulfuro durante el plegamiento de proteínas (<https://flybase.org/reports/FBgn0040308>), Hsc70-3, una chaperona residente en el RE (<https://flybase.org/reports/FBgn0001218>), Ero1L, una oxidasa de tioles (<https://flybase.org/reports/FBgn0261274>) y las disulfuro isomerasas Pdi (<https://flybase.org/reports/FBgn0286818>) y Wbl (<https://flybase.org/reports/FBgn0004003>) (**Figura 27**). También encontré que Prtp había sido vinculada a proteínas relacionadas a mitofagia, como lo es la Dnasall (localizada en lisosomas y responsable de la degradación de ADN mitocondrial durante la autofagia; <https://flybase.org/reports/FBgn0000477>) y a proteínas vinculadas al transporte intracelular y ensamblaje de vesículas, como Clc, que codifica la cadena liviana de clatrina (<https://flybase.org/reports/FBgn0024814>).

En segundo lugar, en el análisis para el homólogo humano de Prtp, TXNDC5 (**Figura 28**), observé que la red de interacciones contiene varias proteínas vinculadas a la biogénesis lisosomal y al transporte vesicular, como las proteínas BLOC1S4, DTNBP1, BLOC1S6 y NAPA, respectivamente.

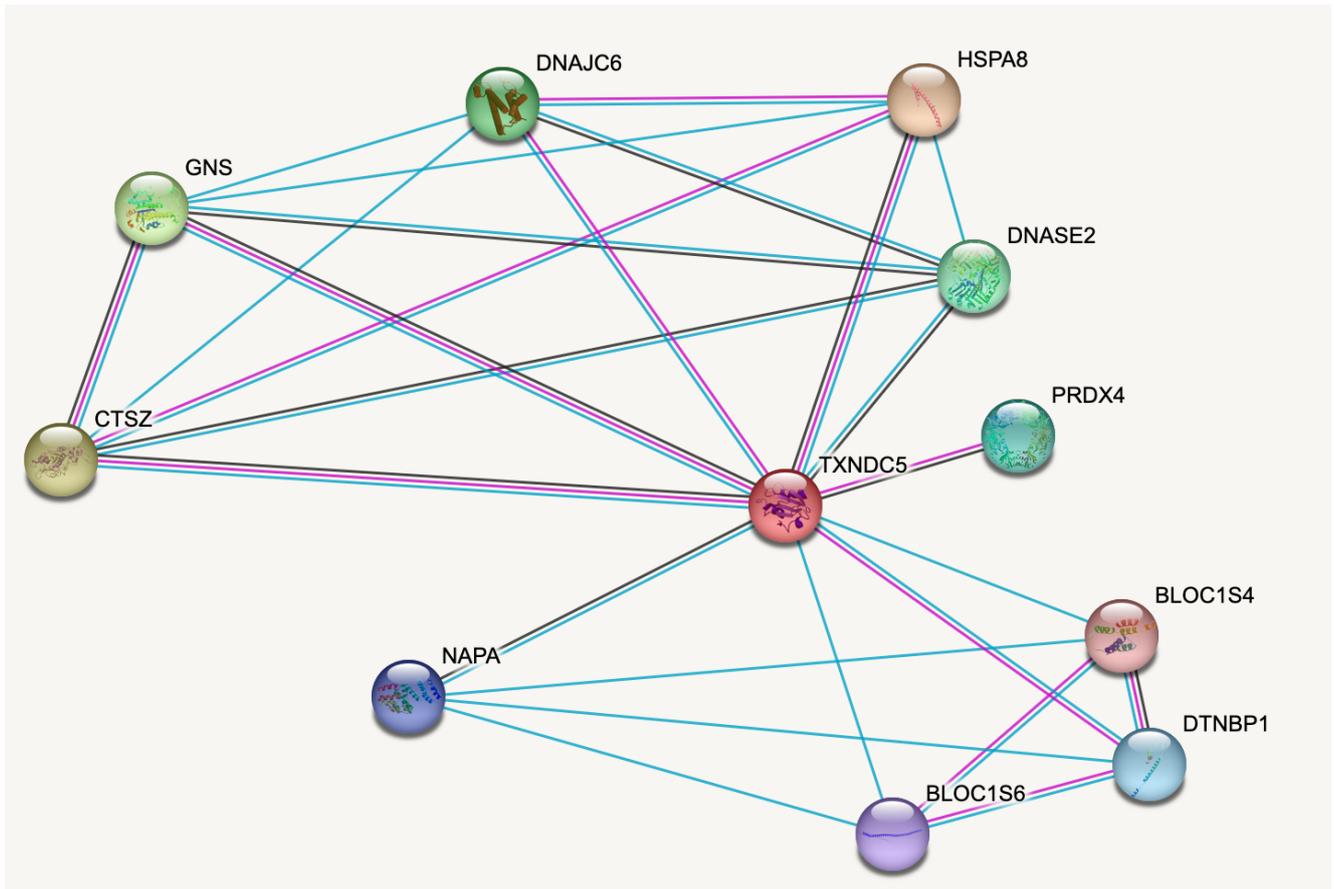
En tercer lugar, observé que en la red de interacciones para Prtp y el receptor KDELR (**Figura 29**) se encuentra la proteína Manf, un factor neurotrófico evolutivamente

conservado, relevante para la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas y asociado a la regulación del metabolismo de DA (<https://flybase.org/reports/FBgn0027095#expression>).

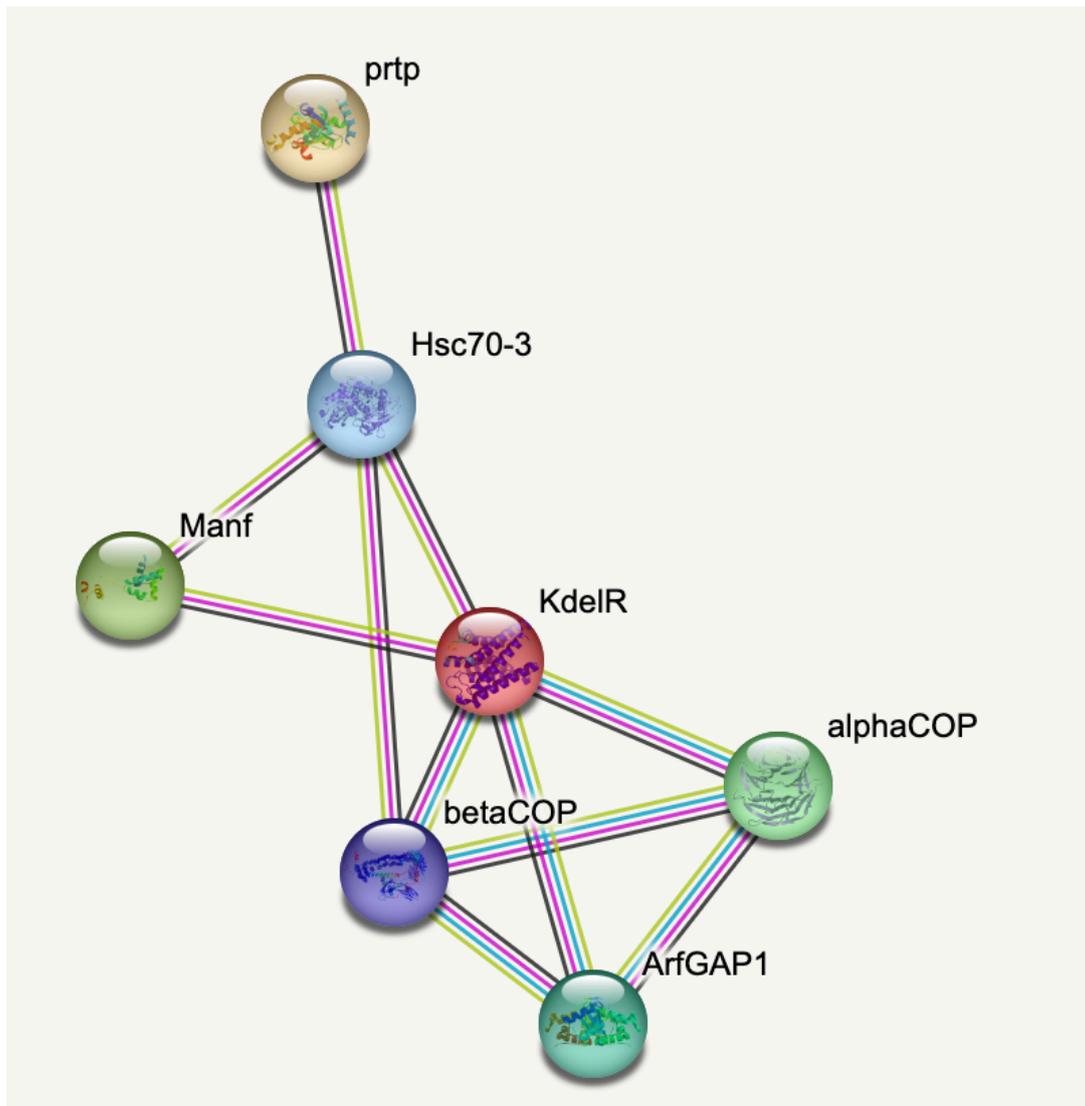
Por último, como muestra la **Figura 30**, en la red de interacciones proteína-proteína para Prtp, Park y Tip60 se encuentra la proteína *Dynammin-related Protein* (Drp1 en la imagen), que codifica una GTPasa *Dynammin-like* involucrada en la fisión mitocondrial (<https://flybase.org/reports/FBgn0026479>), proceso necesario para la correcta eliminación de mitocondrias defectuosas y la proteína Shibire (shi en la imagen), nombre de la dinamina de *Drosophila*, involucrada en el reciclaje de vesículas sinápticas a través endocitosis mediada por clatrina (<https://flybase.org/reports/FBgn0003392>).



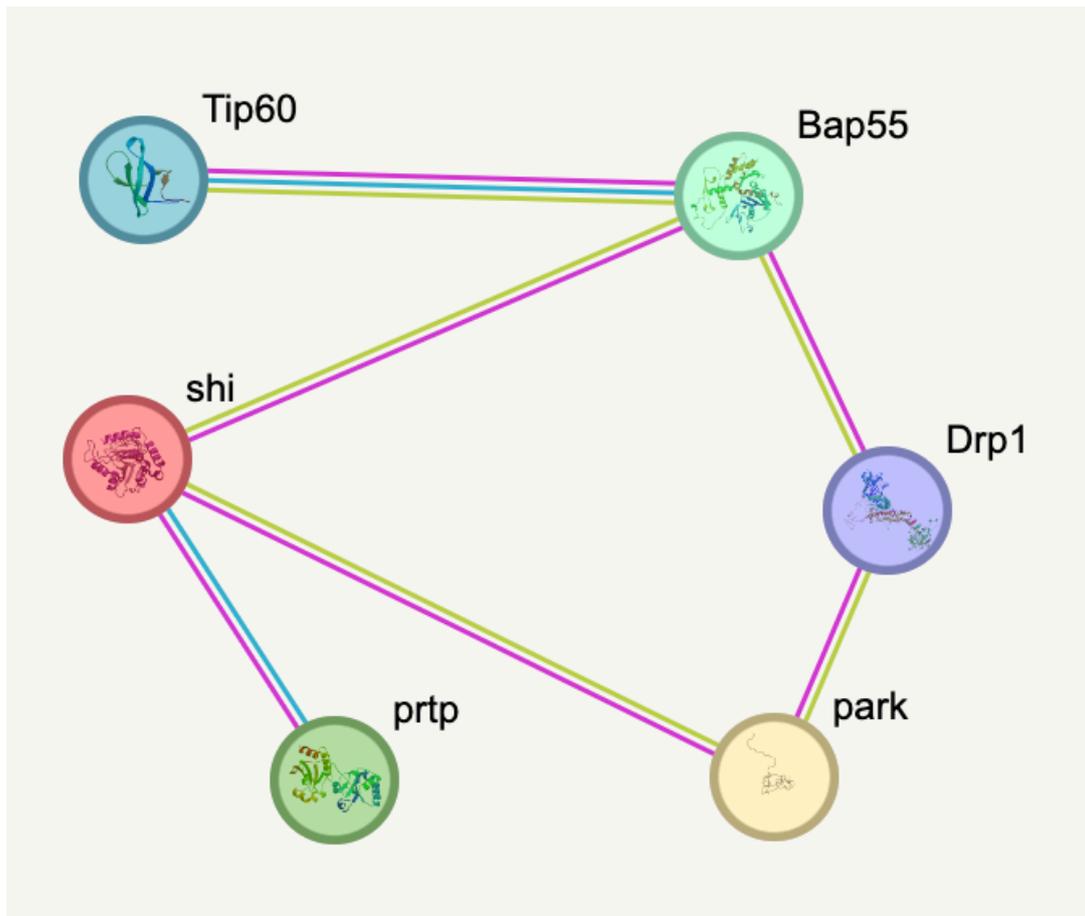
**Figura 27. Análisis mediante STRING de posibles interacciones de Prtp.** Las esferas representan proteínas asociadas a Prtp. Los colores de la líneas representan el tipo de evidencia usada para predecir la interacción: experimental (magenta), bases de datos curadas (Reactome, KEGG) (celeste) y co-expresión (negro). Imagen obtenida en <https://string-db.org/>



**Figura 28. Análisis mediante STRING de posibles interacciones de TXNDC5 (homólogo humano de Prtp).** Las esferas representan a las proteínas actualmente asociadas a TXNDC5. Los colores de la líneas representan el tipo de evidencia usada para predecir la interacción: experimental (magenta), bases de datos curadas (Reactome, KEGG) (celeste) y co-expresión (negro). Imagen obtenida en <https://string-db.org/>



**Figura 29. Análisis mediante STRING de la red de interacciones de Prtp y el receptor KDEL-R.** Las esferas representan las seis proteínas actualmente asociadas a Prtp y KDEL-R. Los colores de la líneas representan el tipo de evidencia usada para predecir la interacción: experimental (magenta), bases de datos curadas (Reactome, KEGG) (celeste), análisis de co-expresión (negro), *textmining* (verde). Imagen obtenida en <https://string-db.org/>



**Figura 30. Análisis mediante STRING de la red de interacciones de Prtp, Park y Tip60.** Las esferas representan las cinco proteínas asociadas a Prtp, Park y Tip60. Los colores de la líneas representan el tipo de evidencia usada para predecir la interacción: experimental (magenta), bases de datos curadas (Reactome, KEGG) (celeste), co-expresión (negro) y *textmining* (verde). Imagen obtenida en <https://string-db.org/>

## 6. DISCUSIÓN

En esta tesis, investigamos la hipótesis de que la falta de expresión del gen *prtp* tiene un efecto neuroprotector frente a la neurodegeneración observada en moscas mutantes *park*, modelo clásico de EP. Los resultados obtenidos a través del plan experimental dirigido a cumplir los objetivos específicos planteados proporcionaron información relevante que da un fuerte apoyo a esta hipótesis. Que la ausencia de expresión de *prtp* proteja al menos parcialmente contra la neurodegeneración causada por la falta de función en *park* nos permite sugerir una relación funcional entre ambos genes.

El cuarto objetivo específico proponía cuantificar los niveles de DA y sus dos metabolitos de degradación principales, pero no pudimos cumplirlo en su totalidad, ya que no logramos medir los niveles de DA. Debo resaltar que nos basamos estrictamente en un protocolo ya puesto a punto por otros grupos y específico para la medición de DA en el cerebro adulto de *Drosophila*. Una posible explicación sería que la DA podría haber sufrido degradación a lo largo del procesamiento de las muestras pero, como estas siempre estuvieron en frío, desde la colecta hasta el momento de entregárselas a la Plataforma, esta opción parece poco probable. Las técnicas de la Plataforma también nos mencionaron que la DA podría haber sufrido cierta degradación en la fase final, durante el procesamiento en paralelo de todas las muestras o durante el tiempo previo a la inyección de cada muestra en el equipo. Otra posible explicación podría ser que en el cromatograma el pico correspondiente a la DA estuviese enmascarado por el del DOPAC, que se encontraba en abundancia y tiene un tiempo de elusión cercano al de la DA. De ser este el problema, quizás podría ser solucionado por medio de nuevos ensayos diseñados para tratar de mejorar el método de medición de DA a partir de muestras de *Drosophila*, pero consideramos que el objetivo no justificaría el tiempo demandado por esa actividad dentro de los plazos de mi proyecto de

tesis y luego de realizar tres intentos decidimos conformarnos con las mediciones obtenidas para DOPAC y HVA, que resultaron informativas.

## 6.1. Expresión de Prtp en neuronas dopaminérgicas PPL1

Durante la puesta a punto del método inmunohistoquímico elegido para analizar la expresión de Prtp en neuronas dopaminérgicas PPL1, hicimos algunas observaciones que merecen ser mencionadas y serán discutidas más adelante, hacia el final de esta sección.

Nuestro análisis inmunohistoquímico de la expresión de Prtp en el cerebro de moscas normales y mutantes con falta de función en *prtp* reveló la presencia de esta proteína en neuronas dopaminérgicas PPL1. Las imágenes obtenidas fueron de alta calidad (**Figura 14**), lo cual permite sacar conclusiones firmes. Los datos de transcriptómica y de single-cell disponibles al comienzo de este proyecto constituían una firme evidencia sobre la expresión de *prtp* (detección de su ARNm) en neuronas no identificadas y en determinados subtipos celulares. Nuestro resultado representa un avance considerable porque reporta, por primera vez, la expresión de Prtp en neuronas del subtipo neuronal “dopaminérgicas”. Más específicamente para esta tesis, nuestra identificación de Prtp en las neuronas del grupo PPL1 da fuerte respaldo a nuestra idea de que esta proteína podría desempeñar un papel en la función normal de estas neuronas. Al llevar el análisis un poco más lejos, con tinciones dobles y análisis de co-localización de fluorescencia obtuve datos cuya interpretación más sencilla es que en las neuronas PPL1 las proteínas Prtp y TH colocalizan parcialmente (**Figura 14 y Tabla 1**).

El análisis de la co-localización de las dos marcas fluorescentes también mostró que la señal de Prtp se encuentra flanqueada por la señal de TH en cerebros normales. A modo de perspectiva, sería interesante investigar qué sucede con la colocalización de estas dos señales en cerebros con neurodegeneración, como los de mutantes *park*. En tal caso, esperaríamos encontrar a la señal de Prtp flanqueando a la de TH en al menos algunas PPL1, sugiriendo la translocación de Prtp hacia la membrana plasmática, donde funcionaría como

señal para la fagocitosis glial (Kuraishi et al., 2009) de las neuronas alteradas por la degeneración. Comprobar la posible localización subcelular de Prtp en la membrana plasmática de las PPL1 en los mutantes *park* requeriría del uso adicional de marcadores específicos de membrana plasmática, nuevos análisis de colocalización y probablemente el uso de técnicas ópticas que permitan superar los límites de la resolución espacial permitida por la microscopía confocal, como la Transferencia de Energía por Resonancia de Förster en combinación con microscopía confocal (Deal et al., 2020).

Adelanté anteriormente que durante la puesta a punto del método inmunohistoquímico empleado para probar el funcionamiento del anticuerpo anti-Prtp hice algunas observaciones interesantes sobre la distribución subcelular de Prtp en glándula salival de larvas L3. Encontré que estas células parecerían acumular Prtp en membranas y en el interior de vacuolas de gran tamaño (**Figura 13**). Si bien este resultado no aporta al tema central de la tesis, lo considero novedoso e interesante *per se*, ya que es el primer reporte histológico de la distribución de Prtp en este tejido y será incluido posteriormente a la defensa de mi tesis en una micropublicación. Por un lado, las larvas L3 tienen una actividad endocítica extraordinaria en las glándulas salivales, lo que genera la formación de vacuolas ácidas, que luego aumentan de tamaño mediante tráfico endosomal y posteriormente se neutralizan (Farkaš et al., 2015). Por otro lado, la señal de retención en RE de Prtp es una secuencia HDEL (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9VYV3/entry>), capaz de unirse al receptor transmembrana KDEL-R de *Drosophila*, pero cuando el pH es relativamente neutro, como ocurre en el lumen del RE, la afinidad de esta unión es baja (Abrams et al., 2013; Alberts et al., 2002). Sin embargo, la afinidad de este receptor por la secuencia HDEL aumenta a menor pH, como el del complejo de Golgi y las agrupaciones túbulo-vesiculares. Esto permite que las proteínas residentes del RE sean devueltas eficientemente al lumen de este organelo mediante transporte vesicular (Alberts et al., 2002). Considerando que se desconoce el

mecanismo por el cual Prtp se transloca a la membrana plasmática tras estímulos apoptóticos (Kuraishi et al., 2009) y que durante los procesos apoptóticos ocurre un descenso general del pH intracelular (Gottlieb et al., 1995), creo que mis resultados permiten sugerir que el mecanismo de translocación de Prtp podría involucrar, al menos en parte, la disrupción de su retención en el lumen del RE mediante su unión a receptores KDEL-R transmembrana debido a la disminución general del pH intracelular.

## 6.2. Número de neuronas dopaminérgicas PPL1

Uno de los resultados más relevantes en apoyo de nuestra hipótesis es que la ausencia de expresión del gen *prtp* mitiga la pérdida de neuronas PPL1 causada por la falta de función en *park* (**Figura 17**). Esto refuerza nuestra idea inicial de que la falta de función en *prtp* tendría una función neuroprotectora.

Una posible interpretación sería a través de una interacción entre Prtp y Drpr. Cuando existe daño neuronal, ocurre una regulación positiva de Drpr (MacDonald et al., 2013) y la sobreexpresión de Drpr en cerebros de *Drosophila* causa la pérdida de neuronas dopaminérgicas por fagoptosis (fagocitosis de neuronas vivas) mediada por la glía hiperreactiva. El enmascaramiento de la fosfatidilserina, otro ligando de Drpr, no basta para detener la fagoptosis de neuronas dopaminérgicas (Hakim-Mishnaevski et al., 2019). A partir de estos antecedentes y dado que la ausencia de Prtp es suficiente para prevenir la muerte celular en otro tejido (Aggarwal et al., 2022), sugerimos que la ausencia de Prtp podría mitigar la muerte de neuronas dopaminérgicas en los mutantes *park* debida a una regulación positiva de Drpr glial.

Adicionalmente, podríamos sugerir una segunda función, a nivel de mitocondrias. Como fue mencionado antes, los mutantes *park* presentan defectos mitocondriales en tejidos energéticamente demandantes como el cerebro (Greene et al., 2003). Y dentro del cerebro, las neuronas dopaminérgicas son extremadamente susceptibles al daño por estresores mitocondriales (Haddad & Nakamura, 2015). Por esto, otra posible explicación para la neuroprotección observada sobre las PPL1 sería la existencia de una función de Prtp en el mantenimiento mitocondrial. Uno de los análisis de interacciones que realicé utilizando la plataforma STRING (<https://string-db.org/>) proporcionó datos a favor de esta opción, al

revelar posibles interacciones de Prtp y su homólogo humano con proteínas vinculadas a la mitofagia, a la biogénesis lisosomal y al transporte vesicular (**Figuras 27 y 28**).

Además, en los mutantes *park* la vía de señalización intracelular por fosfatidilinositol 3 kinasa/proteína kinasa B (PI3K/Akt), vinculada a autofagia (que involucra a la mitofagia), está impedida (Liang, 2010; Y. Yang et al., 2005) y la disminución en los niveles de Akt es responsable de un aumento en la expresión de Prtp (Song & Broadie, 2023).

Por lo antedicho, sugerimos que Prtp podría tener una nueva función, como potencial regulador negativo de la mitofagia en condiciones normales, con su expresión posiblemente aumentada un contexto de neurodegeneración *park*, donde su ausencia promovería la degradación y eliminación de las mitocondrias dañadas. Postulamos, además, a la kinasa Akt como un posible nexo entre Prtp y Park.

Varios laboratorios han reportado que la falta de función en *park* resulta en una disminución del número de neuronas PPL1 (Celardo et al., 2017; Lehmann et al., 2016; Tain et al., 2009; Whitworth et al., 2005), pero debe recordarse que esta afirmación ha sido contrastada por una serie de experimentos del laboratorio del Dr. José Botella (Navarro et al., 2014). Esta disonancia podría explicarse, al menos parcialmente, por la variedad de métodos empleados, como por ejemplo: el conteo de neuronas en cortes de cerebro en parafina o en cerebros completos escaneados con microscopía confocal. En nuestro caso, elegimos un método usado ampliamente (Celardo et al., 2017; Lehmann et al., 2016; Tain et al., 2009; Whitworth et al., 2005) y nuestros resultados confirman que la falta de *park* causa una reducción del número de neuronas PPL1 (**Figura 17**).

Finalmente, es importante destacar que la mera ausencia de expresión de *prtp* no tiene ningún efecto sobre el número de neuronas PPL1 (**Figura 16 A y B**). Como mencioné en la

Introducción, Prtp cumple un rol en la remodelación de circuitos neuronales durante el desarrollo, como señal para la fagocitosis glial (Song & Broadie, 2023). Este resultado nos permite inferir que, durante el desarrollo, Prtp no sería necesario para el establecimiento del estereotípico número de neuronas de este grupo.

### 6.3. Niveles de metabolitos de degradación de la DA

Nuestro registro por HPLC de los niveles de DOPAC y HVA en cerebros adultos de los diferentes genotipos mostró una tendencia no significativa hacia el aumento de ambos metabolitos en los cerebros de mutantes dobles *prtp-park* en comparación a los mutantes *park* (**Figuras 18 y 19**). Esto podría ser una evidencia indirecta de que los niveles de partida de DA en los mutantes de neurodegeneración *park* podrían no reducirse tanto cuando se combinan con la falta de *prtp*, sugiriendo un posible efecto neuroprotector. Es interesante que los mutantes simples *prtp* presentan niveles más altos de DOPAC en comparación con los *w* y *park*. Esta observación permite formular dos nuevas hipótesis:

1. Los mutantes *prtp* tienen mayores niveles de DOPAC porque presentan mayores niveles de DA de partida, en comparación con los bajos niveles de DA registrados tanto en los mutantes *w* (Borycz et al., 2008) como en los mutantes *park* (Cha et al., 2005; Greene et al., 2003; Whitworth et al., 2005).
2. El gen *prtp* podría desempeñar una función en la regulación del metabolismo de la DA, posiblemente actuando como un promotor de su síntesis o inhibidor de su degradación.

En línea con estas hipótesis, como revela la **Figura 29**, en la red de interacciones proteína-proteína para Prtp y el receptor KDEL-R se encuentra la proteína Manf, que cumple una función en regulación del metabolismo de DA (Lindström et al., 2013), lo que refuerza la idea de que Prtp puede estar involucrado en el metabolismo de este neurotransmisor.

Además, la observación sobre la comparación de los niveles de DOPAC en mutantes *prtp* y *w* nos permite plantear una tercer hipótesis:

3. La ausencia de expresión de *prtp* no solo ejerce neuroprotección en un contexto mutante *park*, sino que también podría aliviar la reducción en los niveles de DA observada en mutantes *w*.

El supuesto relativo a los niveles de DA es algo que debe ser posteriormente confirmado con nuevos intentos de mediciones por HPLC que permitan detectar la DA y logren o no detectar diferencias significativas del neurotransmisor y de sus metabolitos entre los genotipos analizados.

Es posible, además, que el método utilizado para medir los niveles de HVA no sea lo suficientemente sensible para detectar pequeñas diferencias entre los genotipos analizados. Los niveles de HVA son relativamente bajos en general, lo que puede estar dificultando la detección de diferencias pequeñas pero significativas.

Finalmente, también observé que los individuos WT presentan mayores niveles de DOPAC en comparación con todos los otros genotipos, lo que es lógico y esperable de un genotipo normal con mayores niveles de DA de partida y una regulación normal de su metabolismo.

#### 6.4. Ensayos de sobrevivencia

Habiendo encontrado resultados histológicos y neuroquímicos que apoyan un posible efecto neuroprotector de la falta de expresión del gen *prtp* en los mutantes de neurodegeneración *park*, analicé también la posible mejora en otros parámetros que usualmente se encuentran disminuidos en procesos de neurodegeneración: supervivencia y locomoción, referenciados en la introducción. En el caso de los ensayos de supervivencia, encontré que los machos mutantes dobles *prtp-park* sobreviven significativamente más que los *park*, mientras que las hembras lo hacen hasta el día 59 de vida (primeros 2/3 de su vida), en concordancia con la hipótesis (**Figuras 20-22**).

Existe evidencia en la literatura sobre la acción diferencial que tienen las proteínas de la familia de las Sirtuinas sobre la sobrevivencia de machos y hembras de *Drosophila* (Salekeen et al., 2021). Específicamente, las proteínas Sirtuina1 y Sirtuina3 interactúan con las proteínas Pink-1 y Park, promoviendo la mitofagia (Li et al., 2018; Wan et al., 2022) y están principalmente asociadas a la sobrevivencia de machos, pero proporcionan un beneficio para la de las hembras después de la edad reproductiva (Salekeen et al., 2021). En hembras, la ausencia de expresión de *prtp* en el contexto neurodegenerativo *park* podría estar atenuando la falta del efecto beneficioso de las Sirtuinas sobre la sobrevivencia al principio de la vida, volviéndose este efecto notorio hacia el final de la vida de las mutantes de neurodegeneración *park*, donde ya no existen diferencias en la sobrevivencia entre las hembras de ambos genotipos.

No detecté diferencias en la sobrevivencia de los mutantes *park* en relación con los *w* en machos, ni tampoco en hembras hasta el día 70 de vida (**Figuras 20, 21 y 23**). Esto puede deberse a que en este trabajo los mutantes *park* empleados son heterocigotos para el alelo de falta de función, presentando una dosis de Park. Es probable que la presencia de Park en

heterocigosis haya sido suficiente para mitigar la gran disminución de la supervivencia observada en los mutantes *park* en trabajos que combinan diferentes alelos de pérdida de función para sortear los problemas de letalidad que tiene *park*<sup>25</sup> en homocigosis (Greene et al., 2003). Sumado a esto, el azar también es un gran componente de la supervivencia de las moscas y podría estar interviniendo en este caso. En 2021, Hoffman y colaboradores observaron que pequeños cambios dentro de un mismo laboratorio conducen a cambios significativos en la supervivencia dentro de los genotipos (Hoffman et al., 2021).

Adicionalmente, observé que los machos mutantes simples *prtp* tienen una menor supervivencia que los *w* (**Figura 20**) y que la supervivencia de las hembras mutantes simples *prtp* es significativamente menor que la de las *w* y las *park* (**Figura 21**). Esto podría significar que las funciones normales de Prtp ya descritas en la literatura (Kuraishi et al., 2009) son fundamentales para la supervivencia de las moscas, cuando el contexto no es el de neurodegeneración dada por la mutación *park*.

## 6.5. Ensayos de habilidad locomotora

En relación a los ensayos de locomoción, encontré que las hembras mutantes dobles *prtp-park* de 25 días de edad presentan un mejor desempeño locomotor que las hembras *park* (**Figura 25**). Esto está de acuerdo con la hipótesis de este trabajo, pero no sucede en el caso de los machos (**Figura 24**). La actividad locomotora en *Drosophila* depende parcialmente de la DA (Riemensperger et al., 2011). Sin embargo, gran parte del decaimiento de la capacidad locomotora de los mutantes *park* se debe a los defectos mitocondriales que presentan a nivel muscular (Greene et al., 2003). Los resultados obtenidos en los ensayos de locomoción podrían sugerir que la falta de *prtp* (posible regulador negativo de la mitofagia) en un contexto de neurodegeneración *park* promueve de manera más efectiva la eliminación de mitocondrias defectuosas en hembras que en machos a nivel muscular. Esta disparidad puede estar involucrando cambios genéticos específicos de sexo. Por ejemplo, en trabajos que emplean modelos de trauma cerebral y de enfermedad de Alzheimer en *Drosophila*, donde se registró este mismo dimorfismo en la actividad locomotora de las moscas, los autores observaron que existe un aumento en los niveles del transcripto *tip60* (gen ubicado en el cromosoma X y que codifica una histona acetiltransferasa involucrada en procesos de control epigenético) en hembras, pero no en machos (Johnson et al., 2013; Shah et al., 2020). Como muestra la **Figura 30**, en la red de interacciones proteína-proteína para Prtp, Park y Tip60 se encuentran proteínas vinculadas a la fisión mitocondrial y al reciclaje de vesículas sinápticas a través endocitosis mediada por clatrina, siendo el primer proceso necesario para la correcta eliminación de mitocondrias defectuosas y el segundo proceso bloqueado cuando la función mitocondrial está reducida (Rikhy et al., 2007).

Sumado a lo anterior, encontré que a ambas edades analizadas, los mutantes *prtp*, *park* y *prtp-park* (todos en contexto mutante *w*) tanto machos como hembras, presentan una habilidad motora significativamente menor que el control *w* (**Figuras 24 y 25**). Esto reproduce el resultado de que los mutantes de *park* exhiben una reducción en la habilidad locomotora (Greene et al., 2003) pero, además, en línea a lo mencionado para los resultados de sobrevivencia, sugiere que la presencia de las funciones de Prtp también serían de gran relevancia para locomoción de las moscas.

Un resultado que me pareció interesante fue que las moscas mutantes *prtp* tuvieron un peor desempeño motor con respecto a las moscas *park* (a la edad de 5 días, en ambos sexos; **Figuras 24.A y 25.A**). Esta diferencia motora se vuelve no significativa en machos de 25 días (**Figura 24.B**), y se invierte caso de hembras de 25 días (**Figura 25.B**). Esto se debe a que en las moscas *prtp* la capacidad de escalada decae con el envejecimiento de forma más lenta que en los mutantes *park*, como muestra la **Figura 26**. Encontré que la pendiente de las curvas de decaimiento de los machos *park* y de las hembras *prtp-park* es exactamente la misma y la de las hembras *park* y machos *prtp-park* es extremadamente similar. A modo de perspectiva, contando con más datos a otras edades, por ejemplo 10, 15 y 20 días, podría aplicar un modelo de regresión lineal a cada curva y comparar las pendientes de las rectas entre los diferentes genotipos, sobre todo para evaluar si hay diferencias significativas en la velocidad de decaimiento de la actividad locomotora entre las curvas de machos *park* en relación a hembras *prtp-park* de hembras y de hembras *park* en relación a machos *prtp-park*. Una forma de hacer esto sería calculando los intervalos de confianza para cada pendiente y compararlos para ver si se superponen. Si los intervalos de confianza se superponen, se podría interpretar que no hay una diferencia significativa entre las pendientes de las curvas analizadas.

Finalmente, la observación de que las hembras mutantes  $w$  mantienen su desempeño motor en el intervalo de 5 a 25 días de edad se debe a que lo que está graficado (**Figura 26.B**) son los valores de las medianas de las distribuciones para cada edad. Al observar las distribuciones de los datos de desempeño motor de las hembras  $w$  en las **Figuras 25 A y B**, se ve claramente que, para hembras de 25 días, el número de la variable *Climbing* toma valores de 1 a 5 que no aparecen en el caso de hembras de 5 días de edad

## 7. CONCLUSIÓN

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio respaldan la hipótesis planteada, demostrando que la ausencia de expresión del gen *prtp* desempeña una función neuroprotectora en moscas con neurodegeneración causada por una mutación de falta de función en el gen *park*, efecto evidenciado a nivel histológico, neuroquímico y comportamental. Además, estos resultados confirman y validan, una vez más, el trabajo de selección de genes candidatos a partir del modelo de neurodegeneración reversible en *Drosophila*.

Este estudio establece, por primera vez, una asociación directa del gen *prtp* con la neuroprotección. Propone que la ausencia de Prtp en este contexto mitiga la muerte neuronal mediada por la regulación positiva de Drpr y sugiere que Prtp podría tener una función como regulador negativo de la mitofagia y estar involucrado en el metabolismo de la DA.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abrams, E. W., Cheng, Y. L., & Andrew, D. J. (2013). Drosophila KDEL Receptor Function in the Embryonic Salivary Gland and Epidermis. *PLOS ONE*, 8(10), e77618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077618>

Abrell, S., Carrera, P., & Jäckle, H. (2000). A modifier screen of ectopic Krüppel activity identifies autosomal Drosophila chromosomal sites and genes required for normal eye development. *Chromosoma*, 109(5), 334-342. <https://doi.org/10.1007/s004120000092>

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Venter, J. C. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>

Adler, J., & Parmryd, I. (2010). Quantifying colocalization by correlation: The Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry Part A*, 77A(8), 733-742. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20896>

Aggarwal, P., Liu, Z., Cheng, G. Q., Singh, S. R., Shi, C., Chen, Y., Sun, L. V., & Hou, S. X. (2022). Disruption of the lipolysis pathway results in stem cell death through a sterile immunity-like pathway in adult *Drosophila*. *Cell Reports*, 39(12), 110958. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110958>

Agrawal, M., & Biswas, A. (2015). Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2, 54. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00054>

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Garland Science.

Ali, Y. O., Escala, W., Ruan, K., & Zhai, R. G. (2011). Assaying Locomotor, Learning, and Memory Deficits in *Drosophila* Models of Neurodegeneration. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 49, 2504. <https://doi.org/10.3791/2504>

Alim, M. A., Ma, Q.-L., Takeda, K., Aizawa, T., Matsubara, M., Nakamura, M., Asada,

A., Saito, T., Kaji, H., Yoshii, M., Hisanaga, S., & Uéda, K. (2004). Demonstration of a role for alpha-synuclein as a functional microtubule-associated protein. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 6(4), 435-442; discussion 443-449. <https://doi.org/10.3233/jad-2004-6412>

Aryal, B., & Lee, Y. (2019). Disease model organism for Parkinson disease: *Drosophila melanogaster*. *BMB Reports*, 52(4), 250-258. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.4.204>

Ashburner, M., & Thompson, J. N. J. (1978). The laboratory culture of *Drosophila*. *Genetics and Biology of Drosophila*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=laboratory+culture+of+Drosophila&author=Ashburner%2C+M.&publication\\_year=1978](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=laboratory+culture+of+Drosophila&author=Ashburner%2C+M.&publication_year=1978)

Balestrino, R., & Schapira, A. h. v. (2020). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, 27(1), 27-42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>

Batthyány, K., Genta, N., & Perrotta, V. (2013). Un mirada de género a las representaciones sociales del cuidado de las personas mayores. *Revista Latinoamericana de Población*, 7(13), 149-172.

Beninger, R. J. (1983). The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Research*, 287(2), 173-196. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(83\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0165-0173(83)90038-3)

Bolus, H., Crocker, K., Boekhoff-Falk, G., & Chtarbanova, S. (2020). Modeling Neurodegenerative Disorders in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3055. <https://doi.org/10.3390/ijms21093055>

Bonifati, V., Rizzu, P., Squitieri, F., Krieger, E., Vanacore, N., van Swieten, J. C., Brice, A., van Duijn, C. M., Oostra, B., Meco, G., & Heutink, P. (2003). DJ-1( PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 24(3), 159-160. <https://doi.org/10.1007/s10072-003-0108-0>

Borycz, J., Borycz, J. A., Kubów, A., Lloyd, V., & Meinertzhagen, I. A. (2008). *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *Journal of Experimental Biology*, 211(21), 3454-3466. <https://doi.org/10.1242/jeb.021162>

Brady, J. E. (2017). *Meanings of Parkinson's Disease from the Perspectives of People Diagnosed and their Partner-carers Living in an Australian Community Setting* [Thesis]. <https://ses.library.usyd.edu.au/handle/2123/16896>

Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, *118*(2), 401-415. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>

Brown, M. B., & Forsythe, A. B. (1974). Robust Tests for the Equality of Variances. *Journal of the American Statistical Association*, *69*(346), 364-367. <https://doi.org/10.1080/01621459.1974.10482955>

Brown, T. P., Rumsby, P. C., Capleton, A. C., Rushton, L., & Levy, L. S. (2006). Pesticides and Parkinson's Disease—Is There a Link? *Environmental Health Perspectives*, *114*(2), 156-164. <https://doi.org/10.1289/ehp.8095>

Cantera, R., Lüer, K., Rusten, T. E., Barrio, R., Kafatos, F. C., & Technau, G. M. (2002). Mutations in spalt cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development*, *129*(24), 5577-5586. <https://doi.org/10.1242/dev.00158>

Carod-Artal, F. J., Mesquita, H. M., Ziolkowski, S., & Martinez-Martin, P. (2013). Burden and health-related quality of life among caregivers of Brazilian Parkinson's disease patients. *Parkinsonism & Related Disorders*, *19*(11), 943-948. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.06.005>

Celardo, I., Lehmann, S., Costa, A. C., Loh, S. H., & Miguel Martins, L. (2017). dATF4 regulation of mitochondrial folate-mediated one-carbon metabolism is neuroprotective. *Cell Death & Differentiation*, *24*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.158>

Cha, G.-H., Kim, S., Park, J., Lee, E., Kim, M., Lee, S. B., Kim, J. M., Chung, J., & Cho, K. S. (2005). Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(29), 10345-10350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500346102>

Clark, I. E., Dodson, M. W., Jiang, C., Cao, J. H., Huh, J. R., Seol, J. H., Yoo, S. J., Hay, B. A., & Guo, M. (2006). *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and

interacts genetically with parkin. *Nature*, 441(7097), Article 7097. <https://doi.org/10.1038/nature04779>

Comisión Económica para América Latina y el Caribe. (2017, noviembre 16). *El proceso de envejecimiento demográfico en el Uruguay y sus desafíos* [Text]. CEPAL. <https://www.cepal.org/es/enfoques/proceso-envejecimiento-demografico-uruguay-sus-desafios>

Cookson, M. R. (2012). The evolution of neurodegeneration. *Current biology: CB*, 22(17), R753-R761. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.008>

Cornelissen, T., Vilain, S., Vints, K., Gounko, N., Verstreken, P., & Vandenberghe, W. (2018). Deficiency of parkin and PINK1 impairs age-dependent mitophagy in *Drosophila*. *eLife*, 7, e35878. <https://doi.org/10.7554/eLife.35878>

Court, R., Costa, M., Pilgrim, C., Millburn, G., Holmes, A., McLachlan, A., Larkin, A., Matentzoglou, N., Kir, H., Parkinson, H., Brown, N. H., O'Kane, C. J., Armstrong, J. D., Jefferis, G. S. X. E., & Osumi-Sutherland, D. (2023). Virtual Fly Brain-An interactive atlas of the *Drosophila* nervous system. *Frontiers in Physiology*, 14, 1076533. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1076533>

Cox, D. R. (1972). Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 34(2), 187-202. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1972.tb00899.x>

Crown, K. N., Miller, D. E., Sekelsky, J., & Hawley, R. S. (2018). Local Inversion Heterozygosity Alters Recombination throughout the Genome. *Current Biology: CB*, 28(18), 2984-2990.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.004>

Danzer, K. M., Haasen, D., Karow, A. R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., & Kostka, M. (2007). Different Species of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers Induce Calcium Influx and Seeding. *The Journal of Neuroscience*, 27(34), 9220-9232. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2617-07.2007>

Deal, J., Pleshinger, D. J., Johnson, S. C., Leavesley, S. J., & Rich, T. C. (2020). Milestones in the development and implementation of FRET-based sensors of intracellular signals: A biological perspective of the history of FRET. *Cellular Signalling*, 75, 109769.

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109769>

Deng, H., Wang, P., & Jankovic, J. (2018). The genetics of Parkinson disease. *Ageing Research Reviews*, 42, 72-85. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.007>

Farkaš, R., Beňová-Liszeková, D., Mentelová, L., Mahmood, S., Ďatková, Z., Beňo, M., Pečeňová, L., Raška, O., Šmigová, J., Chase, B. A., Raška, I., & Mechler, B. M. (2015). Vacuole dynamics in the salivary glands of *Drosophila melanogaster* during prepupal development. *Development, Growth & Differentiation*, 57(1), 74-96. <https://doi.org/10.1111/dgd.12193>

Feany, M. B., & Bender, W. W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 404(6776), 394-398. <https://doi.org/10.1038/35006074>

Ferreiro Llanes, M. J. (2018). *Identificación de genes con potencial neuroprotector en un modelo de reversión de neurodegeneración en drosophila melanogaster*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/21459>

Ferreiro, M. J., Rodríguez-Ezpeleta, N., Pérez, C., Hackenberg, M., Aransay, A. M., Barrio, R., & Cantera, R. (2012). Whole transcriptome analysis of a reversible neurodegenerative process in *Drosophila* reveals potential neuroprotective genes. *BMC Genomics*, 13(1), 483. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-483>

Fujita, Y., Nagaosa, K., Shiratsuchi, A., & Nakanishi, Y. (2012). Role of NPxY motif in Draper-mediated apoptotic cell clearance in *Drosophila*. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 6(6), 291-297.

Giros, B., Jaber, M., Jones, S. R., Wightman, R. M., & Caron, M. G. (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, 379(6566), 606-612. <https://doi.org/10.1038/379606a0>

Gottlieb, R. A., Giesing, H. A., Zhu, J. Y., Engler, R. L., & Babior, B. M. (1995). Cell acidification in apoptosis: Granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H(+)-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), 5965-5968.

Gramates, L. S., Agapite, J., Attrill, H., Calvi, B. R., Crosby, M. A., dos Santos, G.,

Goodman, J. L., Goutte-Gattat, D., Jenkins, V. K., Kaufman, T., Larkin, A., Matthews, B. B., Millburn, G., Strelets, V. B., & the FlyBase Consortium. (2022). FlyBase: A guided tour of highlighted features. *Genetics*, 220(4), iyac035. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac035>

Greene, J. C., Whitworth, A. J., Kuo, I., Andrews, L. A., Feany, M. B., & Pallanck, L. J. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 4078-4083. <https://doi.org/10.1073/pnas.0737556100>

Grünewald, A., Kasten, M., Ziegler, A., & Klein, C. (2013). Next-generation phenotyping using the parkin example: Time to catch up with genetics. *JAMA Neurology*, 70(9), 1186-1191. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.488>

Haddad, D., & Nakamura, K. (2015). Understanding the susceptibility of dopamine neurons to mitochondrial stressors in Parkinson's disease. *FEBS letters*, 589(24 0 0), 3702-3713. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.021>

Hakim-Mishnaevski, K., Flint-Brodsky, N., Shklyar, B., Levy-Adam, F., & Kurant, E. (2019). Glial Phagocytic Receptors Promote Neuronal Loss in Adult *Drosophila* Brain. *Cell Reports*, 29(6), 1438-1448.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.086>

Ham, S. J., Lee, D., Yoo, H., Jun, K., Shin, H., & Chung, J. (2020). Decision between mitophagy and apoptosis by Parkin via VDAC1 ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(8), 4281-4291. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909814117>

Hartenstein, V. (1993). *Atlas of Drosophila Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hoffman, J. M., Dudeck, S. K., Patterson, H. K., & Austad, S. N. (2021). Sex, mating and repeatability of *Drosophila melanogaster* longevity. *Royal Society Open Science*, 8(8), 210273. <https://doi.org/10.1098/rsos.210273>

Hsu, L. J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M., & Masliah, E. (2000). Alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *The American Journal of Pathology*, 157(2), 401-410. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64553-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64553-1)

Hussain, R., Zubair, H., Pursell, S., & Shahab, M. (2018). Neurodegenerative Diseases: Regenerative Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. *Brain Sciences*, 8(9), 177. <https://doi.org/10.3390/brainsci8090177>

Imai, Y., Soda, M., & Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 35661-35664. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000447200>

Jager, K. J., van Dijk, P. C., Zoccali, C., & Dekker, F. W. (2008). The analysis of survival data: The Kaplan–Meier method. *Kidney International*, 74(5), 560-565. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.217>

Jaiswal, M., Sandoval, H., Zhang, K., Bayat, V., & Bellen, H. J. (2012). Probing Mechanisms That Underlie Human Neurodegenerative Diseases in Drosophila. *Annual Review of Genetics*, 46(1), 371-396. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155456>

Johnson, A. A., Sarthi, J., Pirooznia, S. K., Reube, W., & Elefant, F. (2013). Increasing Tip60 HAT Levels Rescues Axonal Transport Defects and Associated Behavioral Phenotypes in a Drosophila Alzheimer's Disease Model. *Journal of Neuroscience*, 33(17), 7535-7547. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3739-12.2013>

Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), 896-912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)

Kish, S. J., Shannak, K., & Hornykiewicz, O. (1988). Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *The New England Journal of Medicine*, 318(14), 876-880. <https://doi.org/10.1056/NEJM198804073181402>

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605-608. <https://doi.org/10.1038/33416>

Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>

Kuraishi, T., Nakagawa, Y., Nagaosa, K., Hashimoto, Y., Ishimoto, T., Moki, T., Fujita, Y., Nakayama, H., Dohmae, N., Shiratsuchi, A., Yamamoto, N., Ueda, K., Yamaguchi, M., Awasaki, T., & Nakanishi, Y. (2009). Pretaporter, a *Drosophila* protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. *The EMBO Journal*, *28*(24), 3868-3878. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.343>

Lakhotia, S.C., R., H. A. (2021). *Experiments with Drosophila for Biology Courses | e-Books | Publications | Indian Academy of Sciences*. Indian Academy of Sciences. [https://www.ias.ac.in/public/Resources/Other\\_Publications/e-Publications/018/Experiments\\_with\\_Drosophila\\_for\\_Biology\\_Courses.pdf?v=1.1#page=447](https://www.ias.ac.in/public/Resources/Other_Publications/e-Publications/018/Experiments_with_Drosophila_for_Biology_Courses.pdf?v=1.1#page=447)

Landmann, L. (2002). Deconvolution improves colocalization analysis of multiple fluorochromes in 3D confocal data sets more than filtering techniques. *Journal of Microscopy*, *208*(2), 134-147. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2002.01068.x>

Langston, J. W., Ballard, P., Tetrad, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, *219*(4587), 979-980. <https://doi.org/10.1126/science.6823561>

Lazarou, M., Jin, S. M., Kane, L. A., & Youle, R. J. (2012). Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Developmental Cell*, *22*(2), 320-333. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.014>

Lehmann, S., Costa, A. C., Celardo, I., Loh, S. H. Y., & Martins, L. M. (2016). Parp mutations protect against mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in a PARKIN model of Parkinson's disease. *Cell Death & Disease*, *7*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.72>

Li, Y., Ma, Y., Song, L., Yu, L., Zhang, L., Zhang, Y., Xing, Y., Yin, Y., & Ma, H. (2018). SIRT3 deficiency exacerbates p53/Parkin-mediated mitophagy inhibition and promotes mitochondrial dysfunction: Implication for aged hearts. *International Journal of Molecular Medicine*, *41*(6), 3517-3526. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3555>

Liang, C. (2010). Negative regulation of autophagy. *Cell death and differentiation*, *17*(12), 1807-1815. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.115>

Lill, C. M., Roehr, J. T., McQueen, M. B., Kavvoura, F. K., Bagade, S., Schjeide, B.-M. M., Schjeide, L. M., Meissner, E., Zauft, U., Allen, N. C., Liu, T., Schilling, M., Anderson, K. J., Beecham, G., Berg, D., Biernacka, J. M., Brice, A., DeStefano, A. L., Do, C. B., ... Bertram, L. (2012). Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genetics*, *8*(3), e1002548. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002548>

Lindström, R., Lindholm, P., Kallijärvi, J., Yu, L., Piepponen, T. P., Arumäe, U., Saarma, M., & Heino, T. I. (2013). Characterization of the Structural and Functional Determinants of MANF/CDNF in Drosophila In Vivo Model. *PLOS ONE*, *8*(9), e73928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073928>

Lionaki, E., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2015). Mitochondria, autophagy and age-associated neurodegenerative diseases: New insights into a complex interplay. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1847*(11), 1412-1423. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.04.010>

Lücking, C.-B., Chesneau, V., Lohmann, E., Verpillat, P., Dulac, C., Bonnet, A.-M., Gasparini, F., Agid, Y., Dürr, A., & Brice, A. (2003). Coding Polymorphisms in the Parkin Gene and Susceptibility to Parkinson Disease. *Archives of Neurology*, *60*(9), 1253-1256. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.9.1253>

Lyne, R., Smith, R., Rutherford, K., Wakeling, M., Varley, A., Guillier, F., Janssens, H., Ji, W., McLaren, P., North, P., Rana, D., Riley, T., Sullivan, J., Watkins, X., Woodbridge, M., Lilley, K., Russell, S., Ashburner, M., Mizuguchi, K., & Micklem, G. (2007). FlyMine: An integrated database for Drosophila and Anopheles genomics. *Genome Biology*, *8*(7), R129. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r129>

MacDonald, J. M., Doherty, J., Hackett, R., & Freeman, M. R. (2013). The c-Jun kinase signaling cascade promotes glial engulfment activity through activation of draper and phagocytic function. *Cell Death & Differentiation*, *20*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.30>

Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., & Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*, *169*(3), 375-382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x>

Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1), 50-60. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177730491>

Mantel, N. (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports*, 50(3), 163-170.

Marras, C., Beck, J. C., Bower, J. H., Roberts, E., Ritz, B., Ross, G. W., Abbott, R. D., Savica, R., Van Den Eeden, S. K., Willis, A. W., & Tanner, C. M. (2018). Prevalence of Parkinson's disease across North America. *Npj Parkinson's Disease*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41531-018-0058-0>

Matta, S., Van Kolen, K., da Cunha, R., van den Bogaart, G., Mandemakers, W., Miskiewicz, K., De Bock, P.-J., Morais, V. A., Vilain, S., Haddad, D., Delbroek, L., Swerts, J., Chávez-Gutiérrez, L., Esposito, G., Daneels, G., Karran, E., Holt, M., Gevaert, K., Moechars, D. W., ... Verstreken, P. (2012). LRRK2 Controls an EndoA Phosphorylation Cycle in Synaptic Endocytosis. *Neuron*, 75(6), 1008-1021. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.022>

McGurk, L., Berson, A., & Bonini, N. M. (2015). Drosophila as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics*, 201(2), 377-402. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.179457>

McLelland, G.-L., Soubannier, V., Chen, C. X., McBride, H. M., & Fon, E. A. (2014). Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *The EMBO Journal*, 33(4), 282-295. <https://doi.org/10.1002/emboj.201385902>

Miller, D. E., Cook, K. R., & Hawley, R. S. (2019). The joy of balancers. *PLoS Genetics*, 15(11), e1008421. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008421>

Miura, E., Hasegawa, T., Konno, M., Suzuki, M., Sugeno, N., Fujikake, N., Geisler, S., Tabuchi, M., Oshima, R., Kikuchi, A., Baba, T., Wada, K., Nagai, Y., Takeda, A., & Aoki, M. (2014). VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of  $\alpha$ -synuclein and exacerbates neurotoxicity in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 71, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.07.014>

Morgan, T. H. (1910). Sex Limited Inheritance in Drosophila. *Science*, 32(812), 120-

122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology*, 183(5), 795-803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., & Youle, R. J. (2009). Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy*, 5(5), 706-708. <https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8505>

Navarro, J. A., Heßner, S., Yeniseti, S. C., Bayersdorfer, F., Zhang, L., Voigt, A., Schneuwly, S., & Botella, J. A. (2014). Analysis of dopaminergic neuronal dysfunction in genetic and toxin-induced models of Parkinson's disease in *Drosophila*. *Journal of Neurochemistry*, 131(3), 369-382. <https://doi.org/10.1111/jnc.12818>

Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., & Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO Journal*, 40(3), e104705. <https://doi.org/10.15252/emj.2020104705>

Park, J., Kim, S. Y., Cha, G.-H., Lee, S. B., Kim, S., & Chung, J. (2005). *Drosophila* DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene*, 361, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.06.040>

Park, J., Lee, S. B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.-M., & Chung, J. (2006). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*, 441(7097), Article 7097. <https://doi.org/10.1038/nature04788>

Pearson, K. (1992). On the Criterion that a Given System of Deviations from the Probable in the Case of a Correlated System of Variables is Such that it Can be Reasonably Supposed to have Arisen from Random Sampling. En S. Kotz & N. L. Johnson (Eds.), *Breakthroughs in Statistics: Methodology and Distribution* (pp. 11-28). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9_2)

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C.,

Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, *276*(5321), 2045-2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>

Prasuhn, J., Kasten, M., Vos, M., König, I. R., Schmid, S. M., Wilms, B., Klein, C., & Brüggemann, N. (2021). The Use of Vitamin K2 in Patients With Parkinson's Disease and Mitochondrial Dysfunction (PD-K2): A Theranostic Pilot Study in a Placebo-Controlled Parallel Group Design. *Frontiers in Neurology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2020.592104>

Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E., & Zolessi, F. R. (2014). A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and Cell Biology*, *142*(3), 335-345. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1215-0>

Przedborski, S., Vila, M., & Jackson-Lewis, V. (2003). Neurodegeneration: What is it and where are we? *The Journal of Clinical Investigation*, *111*(1), 3-10. <https://doi.org/10.1172/JCI17522>

Rajan, K. B., Weuve, J., Barnes, L. L., McAninch, E. A., Wilson, R. S., & Evans, D. A. (2021). Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020–2060). *Alzheimer's & Dementia*, *17*(12), 1966-1975. <https://doi.org/10.1002/alz.12362>

Rakovic, A., Shurkewitsch, K., Seibler, P., Grünewald, A., Zanon, A., Hagenah, J., Krainc, D., & Klein, C. (2013). Phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1)-dependent ubiquitination of endogenous Parkin attenuates mitophagy: Study in human primary fibroblasts and induced pluripotent stem cell-derived neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(4), 2223-2237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.391680>

Ramanan, V. K., & Saykin, A. J. (2013). Pathways to neurodegeneration: Mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, *2*(3), 145-175.

Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, *11*(6), 1114-1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>

Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iché-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., Hirsh, J., & Birman, S. (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(2), 834-839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010930108>

Rikhy, R., Kamat, S., Ramagiri, S., Sriram, V., & Krishnan, K. S. (2007). Mutations in dynamin-related protein result in gross changes in mitochondrial morphology and affect synaptic vesicle recycling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Genes, Brain and Behavior*, *6*(1), 42-53. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00218.x>

Robinson, S. W., Herzyk, P., Dow, J. A. T., & Leader, D. P. (2013). FlyAtlas: Database of gene expression in the tissues of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue), D744-750. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1141>

Rubin, G. M., & Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science (New York, N.Y.)*, *218*(4570), 348-353. <https://doi.org/10.1126/science.6289436>

Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., ... Lewis, S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5461), 2204-2215. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2204>

Salekeen, R., Diaconeasa, A. G., Billah, M. M., & Islam, K. M. D. (2021). Energy Metabolism Focused Analysis of Sexual Dimorphism in Biological Aging and Hypothesized Sex-specificity in Sirtuin Dependency. *Mitochondrion*, *60*, 85-100. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.07.007>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 215-224. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0938-y>

Scott, D. A., Tabarean, I., Tang, Y., Cartier, A., Masliah, E., & Roy, S. (2010). A Pathologic Cascade Leading to Synaptic Dysfunction in  $\alpha$ -Synuclein-Induced Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*, 30(24), 8083-8095. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1091-10.2010>

Seppi, K., Weintraub, D., Coelho, M., Perez-Lloret, S., Fox, S. H., Katzenschlager, R., Hametner, E.-M., Poewe, W., Rascol, O., Goetz, C. G., & Sampaio, C. (2011). The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 26(0 3), S42-S80. <https://doi.org/10.1002/mds.23884>

Shah, E. J., Gurdziel, K., & Ruden, D. M. (2020). Drosophila Exhibit Divergent Sex-Based Responses in Transcription and Motor Function After Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Neurology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2020.00511>

Shapiro, S. S., Wilk, M. B., & Chen, H. J. (1968). A Comparative Study of Various Tests for Normality. *Journal of the American Statistical Association*, 63(324), 1343-1372. <https://doi.org/10.1080/01621459.1968.10480932>

Sherer, T. B., Betarbet, R., Testa, C. M., Seo, B. B., Richardson, J. R., Kim, J. H., Miller, G. W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., & Greenamyre, J. T. (2003). Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(34), 10756-10764. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-34-10756.2003>

Snyder, H., Mensah, K., Theisler, C., Lee, J., Matouschek, A., & Wolozin, B. (2003). Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 11753-11759. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208641200>

Snyder, S. H., & D'Amato, R. J. (1985). Predicting Parkinson's disease. *Nature*, 317, 198-199. <https://doi.org/10.1038/317198a0>

Song, C., & Broadie, K. (2023). Fragile X mental retardation protein coordinates neuron-to-glia communication for clearance of developmentally transient brain neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(12), e2216887120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2216887120>

Soukup, S.-F., Kuenen, S., Vanhauwaert, R., Manetsberger, J., Hernández-Díaz, S., Swerts, J., Schoovaerts, N., Vilain, S., Gounko, N. V., Vints, K., Geens, A., Strooper, B. D., & Verstreken, P. (2016). A LRRK2-Dependent EndophilinA Phosphoswitch Is Critical for Macroautophagy at Presynaptic Terminals. *Neuron*, 92(4), 829-844. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.037>

Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839-840. <https://doi.org/10.1038/42166>

Staats, S., Lüersen, K., Wagner, A. E., & Rimbach, G. (2018). *Drosophila melanogaster* as a Versatile Model Organism in Food and Nutrition Research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(15), 3737-3753. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05900>

Student. (1908). The Probable Error of a Mean. *Biometrika*, 6(1), 1-25. <https://doi.org/10.2307/2331554>

Sulkshane, P., Ram, J., Thakur, A., Reis, N., Kleifeld, O., & Glickman, M. H. (2021). Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia. *Redox Biology*, 45, 102047. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102047>

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: Protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638-D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>

Tain, L. S., Mortiboys, H., Tao, R. N., Ziviani, E., Bandmann, O., & Whitworth, A. J. (2009). Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss.

*Nature Neuroscience*, 12(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nn.2372>

Tan, S., Williams, A. F., & Morris, M. E. (2012). Experiences of caregivers of people with Parkinson's disease in Singapore: A qualitative analysis. *Journal of Clinical Nursing*, 21(15-16), 2235-2246. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2702.2012.04146.x>

Tieu, K. (2011). A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a009316-a009316. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009316>

UK Parkinson's Disease Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Spencer, C. C. A., Plagnol, V., Strange, A., Gardner, M., Paisan-Ruiz, C., Band, G., Barker, R. A., Bellenguez, C., Bhatia, K., Blackburn, H., Blackwell, J. M., Bramon, E., Brown, M. A., Brown, M. A., Burn, D., Casas, J.-P., Chinnery, P. F., ... Wood, N. W. (2011). Dissection of the genetics of Parkinson's disease identifies an additional association 5' of SNCA and multiple associated haplotypes at 17q21. *Human Molecular Genetics*, 20(2), 345-353. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq469>

United Nations. (2015). *World Population Ageing 2015* [Report]. United Nations. [https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015\\_Report.pdf](https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf)

Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., ... Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674), 1158-1160. <https://doi.org/10.1126/science.1096284>

Venken, K. J. T., Simpson, J. H., & Bellen, H. J. (2011). Genetic manipulation of genes and cells in the nervous system of the fruit fly. *Neuron*, 72(2), 202-230. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.021>

Vos, M., Esposito, G., Edirisinghe, J. N., Vilain, S., Haddad, D. M., Slabbaert, J. R., Van Meensel, S., Schaap, O., De Strooper, B., Meganathan, R., Morais, V. A., & Verstreken, P. (2012). Vitamin K2 Is a Mitochondrial Electron Carrier That Rescues Pink1 Deficiency.

*Science*, 336(6086), 1306-1310. <https://doi.org/10.1126/science.1218632>

Vos, M., & Klein, C. (2021). The Importance of *Drosophila melanogaster* Research to UnCover Cellular Pathways Underlying Parkinson's Disease. *Cells*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cells10030579>

Wan, W., Hua, F., Fang, P., Li, C., Deng, F., Chen, S., Ying, J., & Wang, X. (2022). Regulation of Mitophagy by Sirtuin Family Proteins: A Vital Role in Aging and Age-Related Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2022.845330>

Wang, C., Lu, R., Ouyang, X., Ho, M. W. L., Chia, W., Yu, F., & Lim, K.-L. (2007). *Drosophila* overexpressing parkin R275W mutant exhibits dopaminergic neuron degeneration and mitochondrial abnormalities. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(32), 8563-8570. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0218-07.2007>

Wasner, K., Grünewald, A., & Klein, C. (2020). Parkin-linked Parkinson's disease: From clinical insights to pathogenic mechanisms and novel therapeutic approaches. *Neuroscience Research*, 159, 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.09.001>

West, A. B., Moore, D. J., Choi, C., Andrabi, S. A., Li, X., Dikeman, D., Biskup, S., Zhang, Z., Lim, K.-L., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2007). Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Human Molecular Genetics*, 16(2), 223-232. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl471>

Whitton, P. S. (2007). Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology*, 150(8), 963-976. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707167>

Whitworth, A. J., Theodore, D. A., Greene, J. C., Beneš, H., Wes, P. D., & Pallanck, L. J. (2005). Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(22), 8024-8029. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501078102>

Yang, D., Thomas, J. M., Li, T., Lee, Y., Liu, Z., & Smith, W. W. (2018). *Drosophila* hep pathway mediates Lrrk2-induced neurodegeneration. *Biochemistry and cell biology* =

*Biochimie et biologie cellulaire*, 96(4), 441-449. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0262>

Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M. E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M. F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R., & Lu, B. (2005). Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13670-13675. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504610102>

Ye, C., Behnke, J. A., Hardin, K. R., & Zheng, J. Q. (2023). *Drosophila melanogaster* as a model to study age and sex differences in brain injury and neurodegeneration after mild head trauma. *Frontiers in Neuroscience*, 17. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2023.1150694>

Zhou, Q. Y., & Palmiter, R. D. (1995). Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell*, 83(7), 1197-1209. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90145-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90145-0)

Zimprich, A., Benet-Pagès, A., Struhal, W., Graf, E., Eck, S. H., Offman, M. N., Haubenberger, D., Spielberger, S., Schulte, E. C., Lichtner, P., Rossle, S. C., Klopp, N., Wolf, E., Seppi, K., Pirker, W., Presslauer, S., Mollenhauer, B., Katzenschlager, R., Foki, T., ... Strom, T. M. (2011). A mutation in *VPS35*, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *American Journal of Human Genetics*, 89(1), 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.06.008>

Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Müller-Myhsok, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., ... Gasser, T. (2004). Mutations in *LRRK2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44(4), 601-607. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.005>