

Análisis del potencial efecto neuroprotector del silenciamiento de un gen vinculado al metabolismo del acetil-coA en un modelo de Enfermedad de Parkinson

**PROYECTO DE TESINA PARA OPTAR POR LA
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

FCIEN-UdelaR

Bch. Oriana Brunella Caggiani

Orientadora: Dra MaríaJosé Ferreiro Llanes

Co-orientadora: Dra Analía Richeri

Departamento de Neurofarmacología Experimental

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay

2024

ÍNDICE:

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

1. Enfermedades neurodegenerativas. La Enfermedad de Parkinson
2. *Drosophila melanogaster* como modelo biológico para el estudio de la Enfermedad de Parkinson
3. Mutantes de *Drosophila melanogaster* del gen *parkina*, homólogo al gen *PARK2* humano asociado a la Enfermedad de Parkinson
4. El gen *CG10932* como potencial neuroprotector

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

1. Objetivo general
2. Objetivos específicos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de *Drosophila melanogaster* empleadas y su mantenimiento
2. Diseño de cruzamientos genéticos para la construcción de combinaciones mutantes.
Uso del sistema GAL4-UAS y balanceadores genéticos
3. Cuantificación de neuronas dopaminérgicas PPL1
 - 3.1 Disección de cerebros adultos e inmunohistoquímica con anticuerpos anti-TH
 - 3.2 Microscopía de fluorescencia confocal, análisis de imágenes y estadística
4. Evaluación de parámetros locomotores y de la histología del músculo de vuelo
 - 4.1 Ensayo de locomoción (climbing)
 - 4.2 Disección del músculo de vuelo y puesta a punto del doble marcaje músculo mitocondrias
 - 4.3 Microscopía de fluorescencia confocal, mediciones de parámetros musculares y análisis estadísticos
5. Evaluación de la tolerancia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno
 - 5.1 Ensayo de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno
 - 5.2 Análisis estadístico de la supervivencia

RESULTADOS

1. El número de neuronas dopaminérgicas PPL1 de los doble mutantes *RNAiCG10932-parkina* es significativamente mayor al de los mutantes *parkina* y similar al de moscas normales de la misma edad
2. Los mutantes *parkina* presentan una deficiencia locomotora y alteraciones morfológicas en los músculos de vuelo, mientras que los doble mutantes *RNAiCG10932-parkina* tienen una movilidad y estructura muscular más similares al de moscas normales de la misma edad

2.1 Resultados del ensayo de locomoción (climbing)

2.2 Puesta a punto del doble marcaje músculo-mitocondrias en el músculo de vuelo de *Drosophila melanogaster*

2.3 Análisis comparativo del número de miofibrillas musculares

2.4 Análisis comparativo del diámetro de las miofibrillas y la distancia entre miofibrillas

2.5 Análisis comparativo de la longitud de los sarcómeros

2.6 Análisis comparativo del área mitocondrial entre las miofibrillas musculares

3. Los doble mutantes *RNAiCG10932-parkina* no muestran mayor tolerancia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, respecto a los mutantes *parkina*

DISCUSIÓN

El silenciamiento colinérgico de *CG10932* en un contexto mutante *parkina* evita la pérdida de neuronas dopaminérgicas PPL1 respecto a los mutantes *parkina*

El silenciamiento colinérgico de *CG10932* en un contexto mutante *parkina* mejora la movilidad y la estructura del músculo de vuelo respecto a los mutantes *parkina*

El silenciamiento colinérgico de *CG10932* en un contexto mutante *parkina* no genera cambios significativos en la tolerancia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno respecto a los mutantes *parkina*

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXO

RESUMEN:

La Enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común a nivel mundial, caracterizado principalmente por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas, lo que resulta en síntomas motores y no motores. Entre los genes implicados en la EP, el gen *park* en *Drosophila melanogaster*, homólogo al gen humano *PARK2* asociado con la EP juvenil, es de particular importancia. Este gen codifica una ubiquitina ligasa E3 esencial para procesos involucrados en la regulación mitocondrial, como la mitofagia. Los mutantes en este gen son ampliamente utilizados como modelos para estudiar la neurodegeneración en la EP, presentando características como la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el clúster PPL1, alteraciones significativas en la integridad muscular, defectos mitocondriales, trastornos locomotores y un aumento en el estrés oxidativo.

En este contexto, mi tesis explora el potencial efecto neuroprotector del silenciamiento del gen *CG10932* en neuronas colinérgicas dentro de un modelo de neurodegeneración causado por la mutación *park* en *Drosophila melanogaster*. *CG10932* es un gen vinculado al metabolismo del acetil-CoA y es homólogo al gen humano *ACAT1*. Sin embargo, los mecanismos específicos de acción y su impacto en la neurodegeneración aún no han sido completamente explorados ni comprendidos.

Para ello, se evaluaron el número de neuronas dopaminérgicas PPL1, parámetros locomotores como el climbing, la histología muscular y la tolerancia al estrés oxidativo. Los resultados sugieren que el silenciamiento colinérgico de *CG10932* en un contexto de neurodegeneración *park* promueve el mantenimiento del número de neuronas dopaminérgicas en el clúster PPL1, mejora la capacidad locomotora y preserva la integridad de los músculos de vuelo. Estos efectos podrían estar relacionados con cambios en los niveles de neurotransmisores como dopamina y acetilcolina, así como con alteraciones en la regulación del calcio, el metabolismo de lípidos y una reducción del estrés oxidativo en las mitocondrias.

Estudios adicionales podrían confirmar estos hallazgos y profundizar en los mecanismos subyacentes al potencial efecto neuroprotector observado. Este trabajo también abre nuevas preguntas sobre las interacciones entre el metabolismo del acetil-CoA y la neurodegeneración, lo que podría conducir al desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson.

INTRODUCCIÓN:

1. *ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON*

El término "enfermedades neurodegenerativas" deriva del griego "neuro" (nervio) y del latín "degenerare" (deteriorarse). Estas enfermedades, cada vez más reconocidas como principales causas de muerte y discapacidad a nivel mundial, se caracterizan por la pérdida progresiva de neuronas selectivamente vulnerables (Dugger& Dickson, 2017). Aunque varían en cada caso, la mayoría comparten la característica de la acumulación y agregación de proteínas anormales o mal plegadas, lo cual contribuye a su naturaleza progresiva e irreversible. (Bertram&Tanzi, 2005; Raman & Saykin, 2013; Dugger& Dickson, 2017).

Las enfermedades neurodegenerativas surgen y se mantienen por alteraciones en procesos biológicos compartidos y evolutivamente muy conservados, según muestran estudios de asociación del genoma completo (GWAS) (Ramanan&Saykin, 2013). Estas alteraciones asociadas a procesos de neurodegeneración incluyen:

1. **Mecanismos intracelulares:** Alteraciones en la función mitocondrial normal, en los mecanismos de apoptosis, autofagia y de mantenimiento de la homeostasis general de las proteínas a través del sistema ubiquitina-proteasoma.
2. **Entorno tisular local:** Influencias que alteren el microambiente neuronal, como modificaciones en la adhesión celular, la neurotransmisión y el efecto de factores transmisibles como por ejemplo los priones.
3. **Circulación sistémica:** Influencia de factores que afectan el cerebro, como la respuesta de inflamación, presencia de defectos en el sistema inmunológico y cambios endocrinos y metabólicos.
4. **Desarrollo y envejecimiento:** Modificaciones genéticas y cambios principalmente relacionados con el avance de la edad, como el surgimiento de mutaciones, el acortamiento de telómeros, la deficiencia o modificación de factores neurotróficos y alteraciones epigenéticas.

La Enfermedad de Parkinson (EP) se destaca como la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel de la población mundial, después de la Enfermedad de Alzheimer (AD). Según un estudio reciente, la EP experimentó el mayor aumento en prevalencia, discapacidad y mortalidad, incrementándose aproximadamente 2.44 veces entre 1990 y 2016. ([GBD Parkinson's Disease Collaborators 2016](#)). Este mismo

estudio reveló que en 2016, la EP causó 211296 muertes y también resultó en 3.2 millones de Años de Vida Ajustados por Discapacidad (AVAD) ya que se asocia a un amplio espectro de síntomas. Aunque se define comúnmente como un trastorno motor caracterizado por la presencia de movimientos lentos, inestabilidad postural, temblor y déficits del habla, también presenta una variedad de síntomas no motores (NM) en prácticamente todos los pacientes. Estos síntomas NM incluyen hiposmia, estreñimiento, disfunción urinaria, hipotensión ortostática, pérdida de memoria, depresión, dolor y trastornos del sueño (Safarpour et al., 2015; Tolosa et al., 2021; Zhu et al., 2022). En etapas avanzadas de la enfermedad, estos síntomas pueden llevar a la hospitalización e institucionalización de los pacientes. Esto subraya que la EP no solo afecta la mortalidad, sino también la calidad de vida y la capacidad funcional, lo que destaca su impacto significativo en la vida de los pacientes, su entorno cercano y el Sistema de Salud en general, volviendo prioritario abordar una mejor comprensión de esta enfermedad y de los mecanismos para evitarla o revertirla.

La EP puede surgir debido a factores genéticos (ej. mutaciones en genes o alteraciones en los procesos biológicos antes mencionados), ambientales (ej. efecto de los agrotóxicos y metales pesados, Kalia & Lang, 2015) o una combinación de estos factores, que resultan principalmente en la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la región *pars compacta* de la *sustancia nigra* del cerebro, que forman parte de la vía nigroestriada de la dopamina (DA), esencial para el control motor, especialmente en el movimiento intencional (Gómez-Chavarín et al., 2014). Una gran cantidad de evidencia sugiere que, junto con la pérdida dopaminérgica, la disfunción colinérgica juega un papel sustancial en muchas manifestaciones clínicas de la EP (Pasquini et al., 2021), incluyendo reducciones del entorno del 20% en el número de terminales nerviosas colinérgicas (Kuhl et al., 1996). Usualmente se caracteriza también por la presencia de cuerpos de Lewy y por la generación de neuroinflamación (Albin et al., 1989; Wang et al., 2015; Tolosa et al., 2021). Los cuerpos de Lewy se forman debido a la acumulación anormal y el mal plegamiento de la proteína alfa-sinucleína (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P37840/entry>), que en condiciones fisiológicas se localiza en las terminales presinápticas, pero en la EP se acumula en las neuronas y las sinapsis (Spillantini et al., 1997). Estas agregaciones desencadenan una cascada de eventos tóxicos para las células nerviosas, aún no completamente identificados, que interfieren con el funcionamiento neuronal normal y contribuyen a la muerte neuronal (Cookson & van der Brug, 2008; Scott et al., 2010).

Entre el 5 y el 10% de los casos de EP son causados por factores genéticos, principalmente mutaciones en un solo gen específico, mientras que el resto son idiopáticos y esporádicos, es decir, de causa desconocida. (Deng et al., 2018; Zhu et al., 2022). Se han

identificado unos 20 genes cuyas mutaciones están implicadas en el surgimiento de EP (Funayama et al., 2023). Entre los casos surgidos por mutaciones autosómicas dominantes puntuales o duplicaciones o triplicaciones, se encuentran los genes de la alfa-sinucleína (*SNCA*) y el gen de la quinasa 2 rica en repeticiones de leucina (*LRRK2*). En la herencia autosómica recesiva, los genes *parkin* (ligasa de ubiquitina E3, *PARK2*) y *PINK1* (PTEN-induced kinase 1, *PARK6*), que se abordarán en detalle más adelante, están relacionados con la EP de inicio temprano y progresión lenta. Estos genes y sus funciones ilustran la diversidad de los mecanismos genéticos subyacentes a la EP (Kalia & Lang, 2015; Deng et al., 2018; Zhu et al., 2022). Otros diversos estudios han mostrado la influencia adicional de factores ambientales que aumentan el riesgo de desarrollar EP, como los pesticidas, la contaminación del aire, los disolventes industriales, la presencia de un traumatismo craneal (Tolosa et al., 2021; WorldHealthOrganization 2022).

El diagnóstico de la EP sigue siendo un desafío significativo. A pesar de la identificación de marcadores biológicos prometedores, como la presencia de alfa-sinucleína fosforilada y agregada, el uso de marcadores diagnósticos aún no se ha integrado ampliamente en la práctica clínica. Actualmente, el diagnóstico se basa en la evaluación de síntomas clínicos, el historial médico del paciente y criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Parkinson y Trastornos del Movimiento (MDS), derivados del Banco de Cerebros del Queen Square (QSBB) (Tolosa et al., 2021; WorldHealthOrganization, 2022).

El descubrimiento de que la EP estaba asociada a un déficit dopaminérgico, marcó un avance significativo en el desarrollo de terapias farmacológicas para elevar los niveles de DA (WorldHealthOrganization, 2006). Entre los tratamientos más utilizados, que ofrecen mayor alivio y menores efectos secundarios, se encuentra la administración de levodopa (precursor de DA) en combinación con carbidopa, que evita la conversión de levodopa a DA en los tejidos periféricos, permitiendo su transporte eficiente al sistema nervioso central (SNC) (Cotzias et al., 1969; Connolly & Lang, 2014; Lees et al., 2015; Church, 2021). Otros medicamentos que actúan indirectamente a través de mecanismos dopaminérgicos incluyen los agonistas de la DA, que simulan su acción al unirse a sus receptores en el SNC; los inhibidores de la monoaminoxidasa B (MAO-B), que previenen la degradación de la DA y los inhibidores de la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT), que prolongan la vida media de la levodopa (Church, 2021). Otra opción terapéutica importante en etapas avanzadas es la estimulación cerebral profunda (Balestrino & Schapira, 2020). Además del tratamiento farmacológico, el manejo integral de la EP incluye otras alternativas terapéuticas complementarias, como establecer cambios en el estilo de vida, la incorporación de ejercicio (van der Kolk et al., 2019) y otras prácticas

saludables como llevar una dieta equilibrada, realizar fisioterapia y terapias ocupacionales (Agarwal et al., 2018).

La combinación de tratamientos farmacológicos y modificaciones en el estilo de vida permite abordar la EP de manera más completa, atendiendo tanto los síntomas motores como los NM y promoviendo un bienestar general de los pacientes (WorldHealthOrganization, 2022). Sin embargo, estas terapias sólo ralentizan la progresión de esta enfermedad sin lograr una detención completa ni una cura definitiva, lo que sigue siendo un desafío significativo (Church, 2021).

El empleo de modelos biológicos animales de EP, como roedores o la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, modelo empleado en esta tesina, han colaborado en la comprensión de los mecanismos subyacentes a la EP y en la búsqueda de potenciales estrategias terapéuticas para combatir esta enfermedad.

2. DROSOPHILA MELANOGASTER COMO MODELO BIOLÓGICO PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los modelos animales más comúnmente empleados en la investigación de enfermedades neurodegenerativas como la EP abarcan tres grupos principales: roedores, primates no humanos y organismos no mamíferos como el gusano *Ceanoarbitis elegans*, la mosca de la fruta o del vinagre *Drosophila melanogaster* y el pez cebra *Daniorerio*. Asimismo, los modelos basados en cultivos celulares también se han consolidado como una alternativa factible en este campo. Cada uno de estos tipos de modelos presenta ventajas y limitaciones que deben considerarse al seleccionar el más apropiado para un estudio específico (Chia et al., 2020).

Drosophila melanogaster es una especie de artrópodo del orden Díptera, perteneciente a la familia Drosophilidae. Presenta numerosas ventajas que la convierten en un modelo biológico ideal para el estudio de la EP y otras enfermedades humanas. Una de las principales ventajas radica en que su genoma y su genética están ampliamente caracterizados. Tiene aproximadamente 15.000 genes identificados (Adams et al., 2000), distribuidos principalmente en 4 pares de cromosomas incluyendo el par sexual XX o XY (Morgan, 1910). Además, el 77% de los genes humanos asociados con enfermedades hereditarias humanas tienen genes homólogos en su genoma (Reiter et al., 2001), y existen numerosas bases de datos gratuitas en línea que proporcionan una amplia recopilación

acerca de su información genética y molecular y otros tipos de información asociados, como pueden ser <http://www.flymine.org/>, <http://flybase.org/>, entre otras.

Otra de las principales ventajas de utilizar *Drosophila melanogaster* en investigaciones científicas radica en su corto ciclo de vida, caracterizado por una metamorfosis completa (Figura 1). Este ciclo se inicia con la embriogénesis en el huevo, que eclosiona aproximadamente un día después de la puesta por parte de la hembra adulta fertilizada por el macho. La larva recién emergida atraviesa tres estadios larvarios, L1, L2 y L3, experimentando dos mudas durante su desarrollo en un medio de cultivo adecuado, donde se alimenta y mueve activamente. Alrededor del cuarto día de vida larval, la larva abandona su medio de alimentación y se inmoviliza, dando inicio al estado de pre-pupa que luego dará lugar al estadio de pupa. Durante este último período, tiene lugar la metamorfosis, que implica la transformación de la larva en un adulto o imago, un proceso que se extiende por aproximadamente cinco días. Finalmente, el adulto emerge rompiendo el pupario, desplegando sus alas en el transcurso de aproximadamente una hora. Bajo condiciones estándar de laboratorio, las moscas de genotipo salvaje (Wild type, *w⁺*) tienen una esperanza de vida de alrededor de 80 días (Ashburner & Thompson, 1978). Sin embargo, este tiempo puede variar debido a diversos factores, entre los cuales la temperatura juega un papel crucial. Temperaturas de 27 a 30°C pueden inducir esterilidad y reducir la viabilidad de las moscas, mientras que temperaturas superiores a los 32°C pueden resultar letales para ellas (Ashburner & Thompson, 1978). Otra ventaja significativa de trabajar con *Drosophila melanogaster* en el laboratorio es la posibilidad de llevar a cabo experimentos a gran escala. Esto se debe a que su mantenimiento es sencillo, no requiere grandes costos ni espacio y las moscas tienen una alta capacidad reproductiva, lo que resulta en una descendencia numerosa (Bolus et al., 2020).

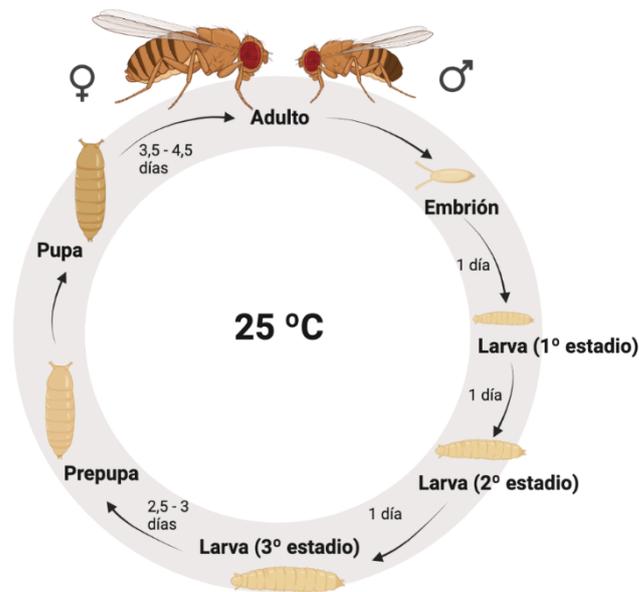


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* 25°C. Representación del ciclo de vida completo que incluye todas las etapas de desarrollo desde embrión a mosca adulta. Imagen obtenida de la tesis de Silvera, 2023.

Estos factores combinados, facilitan la manipulación genética de *Drosophila melanogaster*, utilizando métodos como el sistema GAL4-UAS de expresión ectópica (Brand & Perrimon, 1993) que será mencionado en detalle en la metodología de esta tesina (Figura 7), por ser el sistema empleado en nuestros cruzamientos, o el uso de ARN de interferencia (VDCR: <https://stockcenter.vdrc.at/control>) o transposones y mutaciones puntuales inducidas, entre otras técnicas (Rubin & Spradling, 1982; Venken et al., 2011; Silvera, 2023). Esto permite activar, sobre-expresar, reducir o inhibir la expresión de genes específicos de manera sencilla y tejido o célula-específico, lo que posibilita estudiar el papel de genes individuales en enfermedades humanas en general y en procesos de neurodegeneración como los ocurridos en la EP, como es de interés para esta tesina.

Otra característica crucial que permite el empleo de *Drosophila melanogaster* como modelo para el estudio de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas, es que su sistema nervioso presenta un cerebro y ganglio torácico ventral (Figura 2).

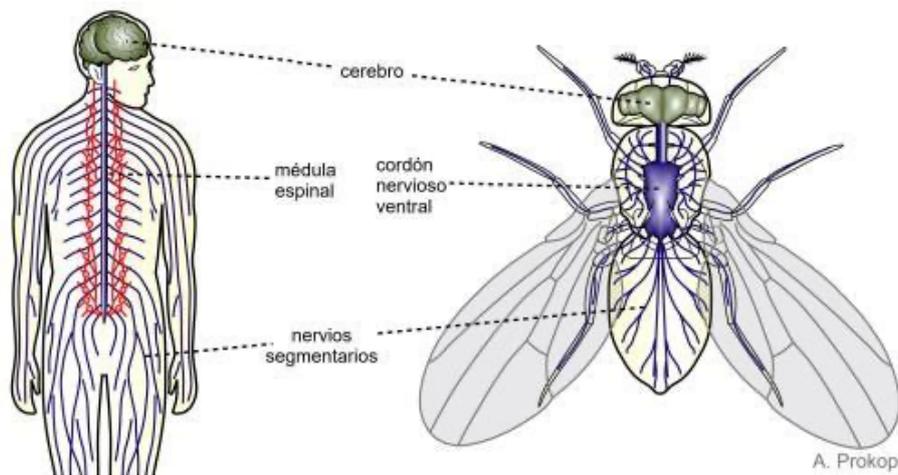


Figura 2. Comparación de la organización del sistema nervioso en humanos y en *Drosophila melanogaster*. En *Drosophila melanogaster*, el cerebro se encuentra en la cabeza e incluye los lóbulos ópticos y el cerebro central. La cadena nerviosa ventral se sitúa en el tórax. Ambos organismos cuentan con nervios que permiten la comunicación entre el SNC y el resto del cuerpo. Imagen obtenida de <https://droso4schools.wordpress.com/organs/>,

En ambas especies, se encuentran presentes los nervios motores, encargados de transmitir información desde el SNC hacia los músculos, así como los nervios sensoriales, responsables de llevar señales desde la periferia hacia el SNC (Manchester FlyFacility, 2015). Adicionalmente, las unidades fundamentales en el sistema nervioso de ambos organismos son las células nerviosas o neuronas, las cuales se comunican mediante la acción de neurotransmisores (Figura 3) como la DA, el ácido gamma aminobutírico (GABA), el glutamato (Glu), la acetilcolina (ACh) y la serotonina (Ser), cuya presencia y función varían según la región del sistema nervioso (Shin et al., 2018). Una diferencia distintiva radica en que las moscas no convierten la DA en noradrenalina ni adrenalina, sino que emplean neurotransmisores estructuralmente similares, tales como la tiramina y la octopamina (OA) (Deshpande et al., 2020; Torres & Guzmán, 2023), clasificados como trazas de aminas en los mamíferos (Borowsky et al., 2001). También existen en *Drosophila melanogaster* diferentes tipos de glía (Yildirim et al., 2019). Asimismo, la similitud funcional del sistema nervioso de ambas especies, permite el estudio de comportamientos comparables, tales como la agresión, el procesamiento sensorial, la memoria, el aprendizaje, la locomoción entre otros (Tissenbaum, 2015).

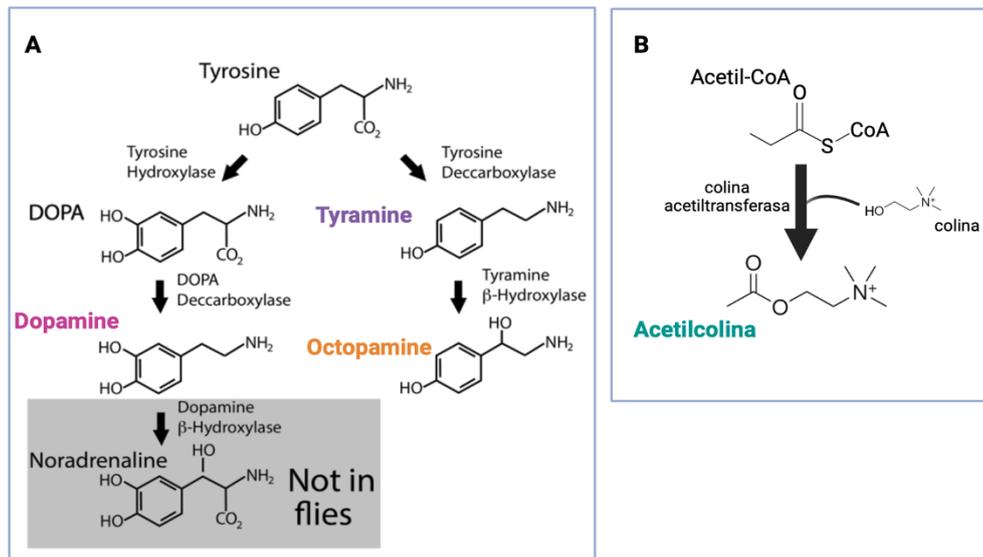


Figura 3. Síntesis de neurotransmisores dopamina y acetilcolina en *Drosophila melanogaster*. **A.** Síntesis de DA. **B.** Síntesis de ACh. Imagen adaptada de Deshpande et al., 2020 y de Torres & Guzmán, 2023.

En base a estas y otras características, *Drosophila melanogaster* ha sido ampliamente utilizada como modelo biológico de enfermedades neurodegenerativas, realizando significativos aportes (Nitta&Sugie, 2022). Particularmente para el modelado de la EP, existen varias alternativas experimentales en *Drosophila melanogaster*(Aryal& Lee, 2019). Una de las más usadas, es el empleo de moscas mutantes para el gen *parkina*, que desarrollaré a continuación.

3. MUTANTES DE DROSOPHILA MELANOGASTER DEL GEN PARKINA HOMÓLOGO AL GEN PARK2 HUMANO ASOCIADO A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

El gen *parkina* (*park*) de *Drosophila melanogaster* (<https://flybase.org/reports/FBgn0041100>), homólogo al gen *PARK2* humano, fue identificado como un gen cuya mutación se encuentra asociada con el Parkinsonismo Juvenil autosómico recesivo, (Kitada et al., 1998). Está localizado en el cromosoma III. Codifica para una proteína ubiquitina ligasa E3, Parkina (Park), que cataliza la transferencia final de ubiquitina a proteínas blanco para promover principalmente su degradación (Shimura et al., 2000; Imai et al., 2000). Esta reacción puede desencadenar varios efectos sobre la proteína a la que se une, como su degradación a través del proteasoma, promover la autofagia, alterar su actividad biológica, generar cambios en su localización celular o modificar sus interacciones con otras proteínas (Seirafi et al., 2015; Wasner et al., 2020). Además, Park es crucial en la regulación de la función mitocondrial

(Figura 4). Promueve la biogénesis mitocondrial aumentando la actividad de factores reguladores y facilitando la degradación de factores inhibitorios (Leduc-Gaudet et al., 2022), (Figura 4A). También regula la dinámica mitocondrial al influir en la fusión y fisión de mitocondrias (Figura 4B). Inhibe la fusión mitocondrial mediante la regulación negativa de las proteínas mitofusina (Mfn) y la GTPasa relacionada a dinamina Opa1, y promueve la fisión mitocondrial mediante la regulación positiva de la proteína relacionada a dinamina-1 (Drp1) y la proteína de fisión-1 (Fis1) (Deng et al., 2008; Wasner et al., 2020; Leduc-Gaudet et al., 2022). Park actúa además en conjunto con la proteína PINK1 para regular la mitofagia, es decir, la autofagia de mitocondrias para promover el reciclaje de sus componentes funcionales y eliminar las mitocondrias alteradas, previniendo así la acumulación de mitocondrias disfuncionales, lo que desencadenaría el mal funcionamiento celular y el surgimiento de varias enfermedades como la EP (Lemasters, 2005), (Figura 4D). Esta interacción entre ambas proteínas fue descrita primeramente en *Drosophila melanogaster* y posteriormente confirmada en otros organismos (Park et al., 2009). Durante este proceso, las mitocondrias experimentan una despolarización de la membrana externa mitocondrial (en inglés OMM), lo que impide la importación de PINK1 y conduce a su acumulación. PINK1, a su vez fosforila varias proteínas, incluyendo Park (localizada inicialmente en el citosol), activándola y facilitando su reclutamiento hacia las mitocondrias. Una vez allí, Park ubiquitina proteínas presentes en la OMM, marcando de esta forma a la superficie externa de la mitocondria para su degradación mediante autofagia. (Narendra et al., 2010; Onishi et al., 2021; Leduc-Gaudet et al., 2022). Asimismo, Park y PINK1 coordinan la formación de vesículas derivadas de mitocondrias (MDVs), transportadores vesiculares que llevan proteínas y lípidos mitocondriales a los peroxisomas y lisosomas para la eliminación de macromoléculas dañadas (McLelland et al., 2014; Leduc-Gaudet et al., 2022), (Figura 4C). Todos estos procesos regulados por Park son fundamentales para el mantenimiento celular en condiciones normales y se intensifican en respuesta a señales de estrés, por lo que cualquier alteración en la función de Park puede perturbar este equilibrio (Lionaki et al., 2015).

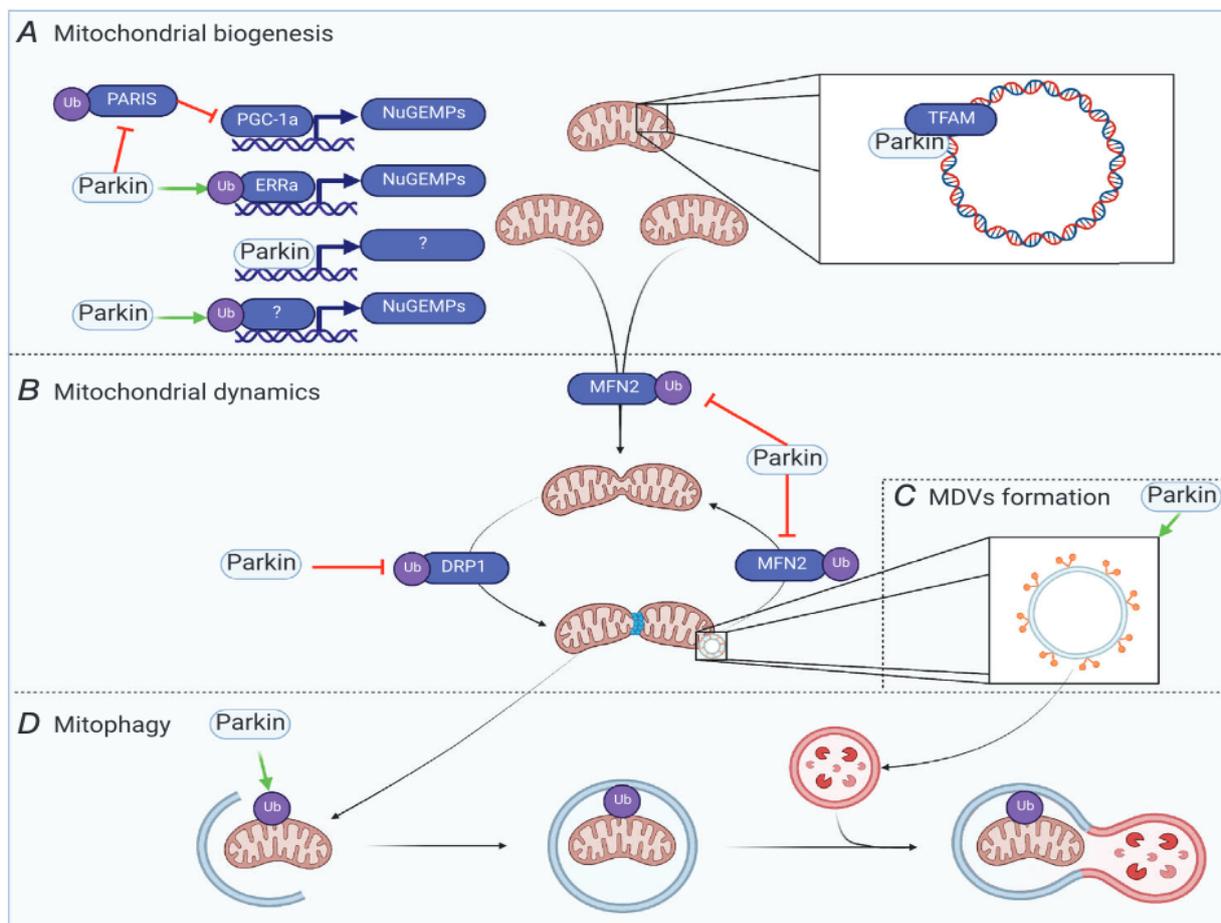


Figura 4. Participación de Parkina en la generación, el mantenimiento y el reciclado de las mitocondrias. A. Regula la biogénesis mitocondrial **B.** Regula la dinámica mitocondrial **C.** Regula la formación de vesículas derivadas de las mitocondrias (MDV) **D.** Regula la mitofagia. Imagen tomada de Leduc-Gaudet et al., 2022.

Los mutantes de *Drosophila melanogaster* para el gen *park* son utilizados como modelos de neurodegeneración, principalmente EP, debido a que presentan características como la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el clúster PPL1 (protocerebro posterior lateral 1), (Figura 5) y disminución de los niveles de expresión de la enzima citosólica tirosina hidroxilasa (TH) que conduce a un menor contenido de DA en el cerebro (Greene et al., 2003; Cha et al., 2005; Whitworth et al., 2005; Wang et al., 2007). Esta pérdida de neuronas es significativa desde los primeros días de edad y se intensifica aún más luego de los 20 días de edad en comparación con las moscas *wt* (Whitworth et al., 2005; Cha et al., 2005; Silvera, 2023).

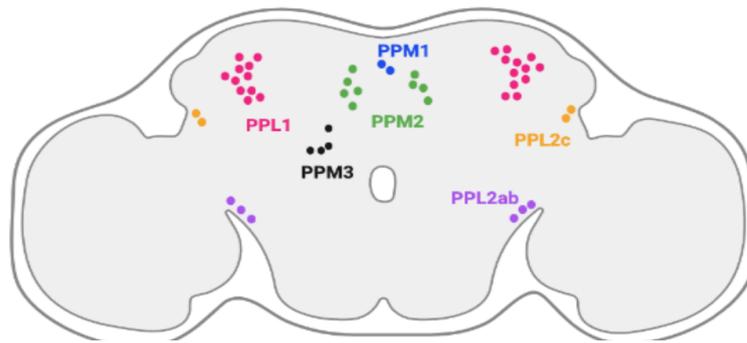


Figura 5. Representación esquemática de los principales grupos de neuronas dopaminérgicas del cerebro posterior adulto de *Drosophila melanogaster*. PPM1: Protocerebro posterior medial superior, PPM2: Protocerebro posterior medial inferior, PPM3: Vertiente superior del protocerebro posterior, PPL1: Protocerebro posterior lateral 1 y PPL2ab - PPL2c: Protocerebro posterior lateral. Imagen obtenida de Silvera, 2023.

Además, estas moscas mutantes *park* muestran defectos locomotores evidentes en la caminata y el vuelo, como una capacidad de escalada geotáctica deteriorada, que empeora progresivamente con la edad (Wang et al., 2007). Esta disfunción locomotora es consistente con una alteración significativa de la integridad muscular, más claramente evidenciada en tejidos musculares de mayor uso y de gran demanda energética como los músculos empleados durante el vuelo. Los músculos de vuelo indirectos (IFMs) en moscas mutantes *park* de 1 a 2 días de edad presentan ya una disminución general en la densidad y una disposición irregular y dispersa de las miofibrillas con líneas Z difusas (Greene et al., 2003; Moehlman et al., 2003). Presentan además defectos mitocondriales, manifestados en mitocondrias extremadamente hinchadas, con morfología alterada y malformaciones, además de desintegración de las crestas. Estos fenotipos mitocondriales son progresivos y preceden a la degeneración de las miofibrillas musculares que conforman los IFMs (Greene et al., 2003; Moehlman et al., 2003; Yang et al., 2006; Wang et al., 2007).

Las moscas mutantes *park* también exhiben otros diversos fenotipos normalmente asociados a procesos neurodegenerativos, destacándose una disminución en la supervivencia, una reducción en la esterilidad de los machos (Greene et al., 2003), así como la presencia de niveles significativamente elevados de especies reactivas del oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el óxido nítrico (NO) (Adedara et al., 2022; Xiao et al., 2022) y una menor tolerancia a diversas formas de estrés (Adedara et al., 2022).

En esta tesis, se utilizaron moscas portadoras del alelo mutante nulo *park*²⁵ (<https://flybase.org/reports/FBal0146938>), caracterizado por la delección de los tres primeros exones y la mitad del cuarto exón del gen *park* normal, lo que impide la producción de la proteína Park. Este alelo se empleó en su forma heterocigota *park*^{25/+}, ya que es letal en homocigosis. Los heterocigotas *park* presentan todos los fenotipos anteriormente descritos con una menor severidad respecto a los homocigotos, (Chambers et al., 2013; Cackovic et al., 2018). Estas moscas fueron empleadas como controles de neurodegeneración para comparar diversos parámetros fundamentalmente con moscas transgénicas de la combinación genotípica que postulamos como neuroprotectora: el silenciamiento colinérgico del gen *CG10932*, que introduciremos a continuación.

4. EL GEN *CG10932* COMO POTENCIAL NEUROPROTECTOR

La búsqueda de genes con potencial neuroprotector puede contribuir a comprender y combatir a las enfermedades neurodegenerativas como la EP. La investigación que realicé durante mi tesina de grado, busca contribuir a la caracterización de uno de estos genes de *Drosophila melanogaster*, conservado en humanos, el gen *CG10932*, que pertenece a una lista de "genes candidatos a neuroprotectores", obtenida en la Tesis de Doctorado de mi tutora (Ferreiro Llanes, 2018) mediante análisis transcriptómico de un proceso excepcional de neurodegeneración reversible (Ferreiro et al., 2012), descrito previamente por Cantera y colaboradores (Cantera et al., 2002). El análisis experimental previo a esta tesina, de otros genes candidatos pertenecientes a esta lista (ej. *white* y *pretaporten*), ha logrado caracterizar exitosamente una función neuroprotectora de estos genes (Ferreiro et al., 2018; Silvera, 2023).

El gen *CG10932* de *Drosophila melanogaster*, ortólogo del gen que codifica a la Acetoacetil-CoA tiolasa mitocondrial humana *ACAT1* (con una máxima puntuación de homología y conservación según DIOPT) (Silva et al., 2022), codifica una enzima Acetil-CoA-acetiltransferasa, que cataliza la reacción reversible entre dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. Esta reacción, conocida como tiolisis en analogía con el proceso de hidrólisis, puede involucrar acetil-CoA y otro tipo de acil-CoA. La familia de enzimas tiolasas catalizan la formación de enlaces carbono-carbono mediante una condensación de Claisen dependiente de tioéster (Heath & Rock, 2002). Esta enzima está involucrada en diversos procesos biológicos relacionados con el metabolismo del acetil-CoA, como la β -oxidación de ácidos grasos, la vía del mevalonato y la formación de cuerpos cetónicos, entre otros (Figura 6). (Faust et al., 2012; Nelson et al., 2021). La β -

oxidación de ácidos grasos es crucial para el metabolismo cerebral y la salud del cerebro, impactando en la homeostasis lipídica, el envejecimiento cerebral y trastornos neurodegenerativos (Szrok-Jurga et al., 2023). Se han identificado señales de direccionamiento mitocondrial en la proteína CG10932, sugiriendo su localización en las mitocondrias (Murphy et al., 2013). Sin embargo, debido a su terminación de secuencia –EKL, también existe la posibilidad de que pueda localizarse en los peroxisomas (Faust et al., 2012).

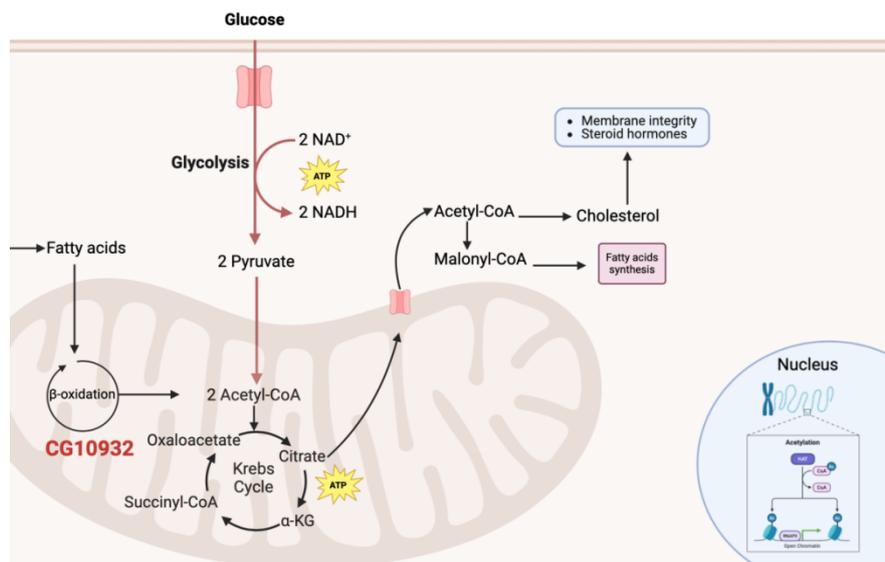


Figura 6. Vías metabólicas en las que está involucrado el gen *CG10932*. La imagen muestra, de forma resumida, las vías metabólicas en donde está implicado el gen *CG10932* y el acetil-coA. Imagen realizada con biorender <https://www.biorender.com>.

El gen *CG10932* fue elegido como candidato a neuroprotector para evaluar experimentalmente, porque se encontraba significativamente sub-expresado respecto a los controles, en la etapa en la que ocurría una reversión histológica de un proceso de neurodegeneración (Ferreiro Llanes, 2018), sugiriendo que su silenciamiento o reducción en su expresión podría neuroproteger frente a mutaciones como *park*. Estudios en ratones han demostrado que la inactivación genética de su homólogo *ACAT1* ofrecería beneficios en la AD, reduciendo los niveles de amiloide- β y mejorando la función cognitiva (Hutter-Paier et al., 2004; Huttunen et al., 2010; Murphy et al., 2013). Además, el silenciamiento de *ACAT1* en células humanas de neuroblastoma también muestra promesas en la reducción de la toxicidad por β -amiloide, destacando su potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas (Chen et al., 2018).

En este marco y dado que el acetil-coA es además el precursor de la síntesis del neurotransmisor ACh (Figura 3B), en esta tesina nos propusimos investigar si el silenciamiento específico colinérgico de *CG10932* logra mejorar o evitar algunos de los fenotipos asociados a neurodegeneración presentes en los mutantes *park*, típicamente empleados como modelo de EP.

HIPÓTESIS

El silenciamiento colinérgico del gen *CG10932* de *Drosophila melanogaster*, homólogo al gen *ACAT1* humano, ejerce un efecto neuroprotector en los mutantes de neurodegeneración *parkina*, típicamente empleados como modelo de Enfermedad de Parkinson.

OBJETIVOS:

1. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el potencial neuroprotector del silenciamiento colinérgico del gen del metabolismo del acetilco *CG10932* de *Drosophila melanogaster*, conservado en humanos, empleando un modelo clásico de enfermedad de Parkinson dado por la mutación en el gen *parkina* (homólogo a *PARK2* humano).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Diseñar y realizar cruces de moscas transgénicas para obtener moscas que presenten silenciamiento específico colinérgico del gen *CG10932* en un contexto genético mutante *park*, normalmente asociado a neurodegeneración (*RNAiCG10932-park*).

2. Determinar si el silenciamiento colinérgico de *CG10932* evita o atenúa la reducción en el número de neuronas dopaminérgicas característica de los mutantes *park*, analizando comparativamente el número de neuronas dopaminérgicas PPL1 en el cerebro adulto de moscas *RNAiCG10932-park* respecto a las *park*.

3. Determinar si el silenciamiento colinérgico de *CG10932* evita o atenúa el déficit motor y el fenotipo muscular característicos de los mutantes *park*, analizando comparativamente el desempeño locomotor y el músculo de vuelo, en moscas *RNAiCG10932-park* respecto a las *park*.

4. Determinar si el silenciamiento colinérgico de *CG10932* aumenta la resistencia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en las moscas *RNAiCG10932-park* respecto a las *park*.

MATERIALES Y MÉTODOS:

1. CEPAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* EMPLEADAS Y SU MANTENIMIENTO

Se utilizaron moscas *Drosophila melanogaster* que fueron mantenidas en tubos tapados con algodón y con medio de cultivo fresco que contiene levadura, glucosa, harina de maíz, agar, nipagin y ácido propiónico, según receta estándar. Estos fueron almacenados en incubadora a 25 °C, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Las moscas fueron anestesiadas utilizando trietilamina (CARLO ERBA, #489556) y utilicé una lupa estereoscópica (WESO SM-300 SERIES) para poder sexar, identificar hembras vírgenes y seleccionar los fenotipos deseados.

Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando moscas adultas que fueron envejecidas durante 25 días después de la emergencia de la pupa. Durante este período, se aseguró que el medio de cultivo se mantuviera fresco y libre de contaminaciones

2. DISEÑO DE CRUZAMIENTOS GENÉTICOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE COMBINACIONES MUTANTES. USO DEL SISTEMA GAL4-UAS Y BALANCEADORES GENÉTICOS

Toda la tesina se basó en utilizar moscas en las cuales se silenció el gen *CG10932* específicamente en las neuronas colinérgicas, en un contexto genético asociado a neurodegeneración, dado por la mutación en el gen *park*. Para poder silenciar la expresión de este gen de interés exclusivamente en este grupo de células neuronales, se utilizó el sistema transgénico de expresión ectópica Gal4-UAS (Brand & Perrimon, 1993). Este sistema consiste en dos componentes principales: GAL4 que es un factor de transcripción que puede ser expresado selectivamente en células específicas utilizando promotores regulados por tejido (en nuestro caso: *cha*, promotor específico colinérgico). Estos promotores controlan dónde y cuándo se expresa el GAL4 en el organismo y se encuentran corriente arriba a la secuencia que codifica para la proteína GAL4 de levadura (Brand y Perrimon, 1993; Duffy, 2002). El segundo componente es el UAS (Upstream Activating Sequence) que es un elemento regulador que contiene secuencias específicas reconocidas por GAL4, corriente arriba de una secuencia codificante de interés (en nuestro caso: un fragmento de ADN que codifica el ARNi del gen *CG10932*). Cuando GAL4 se une al UAS, activa la transcripción de los genes cercanos que están bajo control del promotor, en nuestro caso, activará la producción del ARNi de

CG10932 exclusivamente en las neuronas colinérgicas, silenciando únicamente allí al gen *CG10932* (Figura 7).

Cuando se usan métodos de transformación genética, como el sistema GAL4/UAS, se deben usar marcadores genéticos que sean visibles a nivel de la mosca adulta resultante, para asegurar la integración de los transgenes deseados. El gen *mini-white* es uno de los marcadores más utilizados (Pirrotta, 1988) y está presente en uno de los plásmidos de elementos P más utilizados para construir líneas Gal4/UAS, el pP{UAST} (Brand y Perrimon, 1993), que se inyecta usualmente a embriones mutantes *white*. La mutación en el gen *white* resulta en ojos blancos en lugar del color rojo característico de las moscas wt, y así las moscas transformadas se seleccionan por la recuperación del fenotipo de ojos rojos.

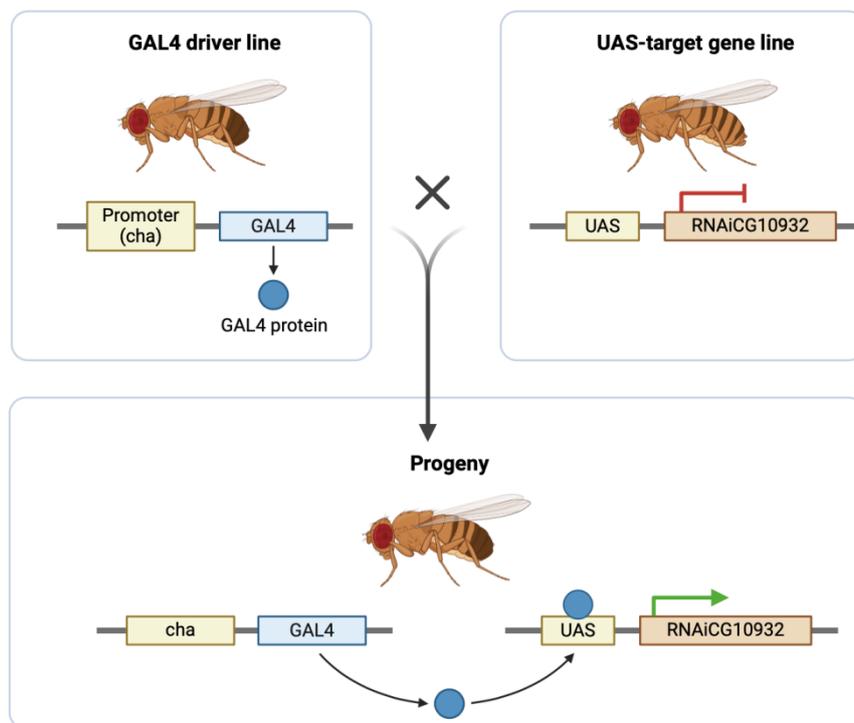


Figura 7. Uso del sistema Gal4-UAS. La imagen muestra el silenciamiento del gen *CG10932* en neuronas colinérgicas mediante el uso del sistema Gal4-UAS. Imagen generada utilizando la herramienta <https://www.biorender.com>.

Para realizar el silenciamiento específico colinérgico de *CG10932* en un contexto genético mutante *park*, se cruzaron moscas transgénicas con secuencias GAL4 unidas al promotor colinérgico *cha-GAL4* (Bloomington #6798) con moscas *UAS-ARNi* específicas para el gen *CG10932*, que se combinaron con la mutación *park*. Dichas moscas, tienen un genotipo $X^{w^{1118}}/Y$ o $X^{w^{1118}}$; *cha-GAL4/UAS-RNAiCG10932*; $+/park^{25}$, y para los genes que nos interesan son dobles mutantes, ya que presentan la secuencia transgénica para el silenciamiento

del gen *CG10932* (cromosoma autosómico II) y la mutación *park*²⁵ en heterocigosis (cromosoma autosómico III). Presentan un contexto genético *w*¹¹¹⁸ (cromosoma X), al igual que el resto de los controles no *wt*. A lo largo de la tesis, empleamos solo machos y abreviamos el genotipo de estos mutantes como *RNAiCG10932-park* para simplificar la lectura.

Como controles se utilizaron: moscas *wt*, de la cepa Oregon R, con genotipo *X/Y; +/+; +/+*, moscas con la mutación *park* con genotipo *X^{w1118}/Y; +/+; park²⁵/+*, y moscas con el silenciamiento colinérgico del gen *CG10932* pero sin la mutación *park*, con genotipo *X^{w1118}/Y; cha-GAL4/UAS-RNAiCG10932; +/+*. Se abrevian en esta tesina como *wt park* y *RNAiCG10932* respectivamente para simplificar la lectura.

En todos los cruces se emplearon cromosomas balanceadores, como CyO e If (en II), TM6B (en III), entre otros para poder seguir la segregación de mutaciones recesivas. Estos balanceadores son cromosomas modificados genéticamente que portan marcadores visibles y letales recesivos, permitiendo la identificación de moscas con el genotipo deseado y asegurando la estabilidad genética en las poblaciones experimentales. Contienen múltiples inversiones, translocaciones o duplicaciones, evitando la recombinación durante la meiosis entre el cromosoma balanceador y su homólogo (Crown et al., 2018; Miller et al., 2019).

Cruce para generar el control *RNAiCG10932*.

Genotipos:

X^{w1118}/Y; UAS-RNAiCG10932/UAS-RNAiCG10932; +/+ X^{w1118}/X^{w1118}; cha-GAL4/cha-GAL4; +/+

Selección de individuos F1

X^{w1118}/Y; cha-GAL4/UAS-RNAiCG10932; +/+

Cruce para generar el control mutante *park*.

Genotipos:

X^{w1118}/Y; +/+; +/+ X^{w1118}X^{w1118}; +/+; park²⁵/TM2

Selección de individuos F1

X^{w1118}/Y; +/+; park²⁵/+

Cruces para generar los experimentales *RNAiCG10932-park*.

CRUZAMIENTO 1

Genotipos:

X^{w1118}/Y; cha-GAL4/Cy; +/+ X^{w1118}/X^{w1118}; +/+; +/TM6B

Selección de individuos F1

$X^{w^{1118}}/Y; cha-GAL4/Cy; +/TM6B$

CRUZAMIENTO 2

Genotipos:

$X^{w^{1118}}/Y; cha-GAL4/Cy; +/TM6B$ (F1 cruce 1) $\times X^{w^{1118}}/X^{w^{1118}}; if/Cy; park^{25}/TM2$

Selección de individuos F1

$X^{w^{1118}}/X^{w^{1118}}; cha-GAL4/Cy; TM6B/park^{25}$

CRUZAMIENTO 3

Genotipos:

$X^{w^{1118}}/Y; UAS-RNAiCG10932/UAS-RNAiCG10932; +/+ \times X^{w^{1118}}/X^{w^{1118}}; cha-GAL4/Cy; park^{25}/TM6B$ (F1 cruce 2)

Selección de individuos F1

$X^{w^{1118}}/Y; cha-GAL4/UAS-RNAiCG10932; +/park^{25}$

3. CUANTIFICACIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS PPL1

3.1 Disección de cerebros adultos e inmunohistoquímica con anticuerpos anti-TH:

Para cuantificar las neuronas dopaminérgicas PPL1, se siguió el protocolo puesto a punto en Silvera, 2023. Se disecaron los cerebros enteros (wholemout) de machos adultos de 25 días de edad de los genotipos mutantes experimental *RNAiCG10932-park* y control *RNAiCG10932* (n = 10 por genotipo) para compararlos con los resultados de muestras de mutantes *parky* y *wt* de la misma edad. La disección se realizó con pinzas de precisión bajo lupa estereoscópica en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X frío. Los cerebros se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X a temperatura ambiente durante dos horas. Luego, se lavaron dos veces en PBS 1X durante 15 minutos, sobre hielo y con agitación suave, seguido de un lavado de permeabilización en PBS-T (Tritón X-100 0.5%) bajo las mismas condiciones. Las muestras se bloquearon en PBSTA (Tritón X-100 0.5%, BSA 0.1%) durante una hora, sobre hielo y con agitación suave. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario anti-tirosina hidroxilasa (TH) (DiaSorin, dilución 1:500 en PBSTA) durante 48 horas a 4°C. Después de 48 horas, se realizaron cuatro lavados en PBS-T (0.5%) durante 15 minutos a 4°C con agitación, y las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón-Cy5 (Invitrogen; dilución 1:1000) sobre hielo, con agitación y en oscuridad durante dos horas. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS-T 0.1% de cinco minutos cada uno, en frío, con agitación y en oscuridad,

seguidos de dos lavados en PBS 1X bajo las mismas condiciones. Las muestras se almacenaron a 4°C en glicerol al 80% en Tris pH=8,8 hasta el montaje de los cerebros el día siguiente en cámaras generadas con cinta aisladora negra sobre una lámina cubreobjetos.

3.2 Microscopía de fluorescencia confocal, análisis de imágenes y análisis estadístico:

Para adquirir las imágenes se utilizó el microscopio confocal institucional del IIBCE LSM ZEISS 800 AiryScan, empleando el láser de 640 nm para visualizar el fluoróforo Cy5. Para la captura se emplearon exactamente los mismos parámetros que en Silvera, 2023. Se utilizó el objetivo de 10x (aire; NA = 0.3) para localizar y evaluar el estado general del cerebro. Posteriormente, se empleó el objetivo de 20x (aire; AN=0.5) para identificar el grupo de neuronas dopaminérgicas PPL1 en cada hemisferio cerebral. Se tomó una imagen de cada hemisferio utilizando el objetivo de 20x, y se realizaron capturas a 40x (aire; AN = 0.95) de planos confocales a intervalos de 1 μm a lo largo del eje Z, asegurándose de que cada stack abarcara por completo el grupo PPL1. Las imágenes se almacenaron en carpetas por genotipo y se analizaron posteriormente empleando el software libre FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012). Se cuantificaron las neuronas PPL1 en ambos hemisferios de cada cerebro, del genotipo *RNAiCG10932-park*. Tanto las imágenes representativas de neuronas PPL1 del control *wt* y mutante *park* como los datos de la cuantificación de estas neuronas en ambos genotipos fueron obtenidas de la tesis de maestría de Silvera, 2023, realizada bajo la orientación de mi orientadora mediante el mismo procedimiento, utilizando el mismo stock *park* los mismos reactivos y anticuerpos, el mismo microscopio y parámetros de captura, la misma metodología de cuantificación y análisis estadístico.

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software de acceso libre Rstudio (<http://www.rstudio.com>) y para las representaciones gráficas se empleó Graphpad (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Se llevaron a cabo pruebas de normalidad de las distribuciones de los datos utilizando la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro et al., 1968) y un análisis de homogeneidad de varianzas empleando la prueba de Levene (Brown & Forsythe, 1974). Debido al incumplimiento de estas condiciones, se realizó un análisis estadístico no paramétrico utilizando el test de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) y el test de Dunn (Dunn, 1964) para comparaciones post hoc pareadas. Finalmente, se generaron gráficos de barras representando la mediana (95% CI) del número de neuronas PPL1 por genotipo, incorporando la significancia estadística para cada comparación,

cuando correspondía. En todos los casos, los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS LOCOMOTORES Y DE LA HISTOLOGÍA DEL MÚSCULO DE VUELO

4.1 Ensayo de locomoción (climbing)

El ensayo de climbing en *Drosophila melanogaster* mide la capacidad de escalada de las moscas, evaluando su habilidad para moverse en dirección contraria al vector gravitacional de la Tierra cuando son perturbadas, comportamiento conocido como geotaxis negativa (Ali et al., 2011; Ferreiro Llanes, 2018). Este comportamiento permite detectar posibles deficiencias en su capacidad para trepar, proporcionando información valiosa sobre su condición neuromuscular y otros factores.

Se usaron machos de los genotipos *park*, *RNAiCG10932*, experimental *RNAiCG10932-park* y *wt* de 25 días de edad. Estos individuos fueron seleccionados al nacer y mantenidos en medio de cultivo fresco para envejecerlas hasta el día de los experimentos. Se analizaron $n=30-50$ machos por genotipo, separados en tubos de 7 a 10 individuos c/u por condición. Utilicé un dispositivo que consta de cinco tubos posicionados uno al lado del otro y fijados en una estructura (Figura 8). Estos tubos tienen una línea negra marcada a 8 cm de altura en el eje vertical. Se colocaron las moscas y luego se dieron tres golpes suaves contra la mesa para forzar a las moscas a caer al fondo del tubo, lo que las incita a trepar de inmediato. Este comportamiento se registró en video y posteriormente se cuantificó el número de moscas que superan la línea negra en los primeros 10 segundos luego del último golpe. Este procedimiento se repitió 10 veces consecutivas para cada tubo, con un intervalo de 30 segundos de pausa entre cada uno de los 10 registros. Todo el procedimiento se basa en el protocolo puesto a punto en Ferreiro Llanes, 2018 y también empleado en Silvera, 2023.

Ingresé los datos obtenidos a tablas de Excel, clasificándolos por genotipo y edad. Posteriormente, utilicé el *software* libre Rstudio (<http://www.rstudio.com>) para llevar a cabo el análisis estadístico. Las representaciones gráficas fueron realizadas en Graphpad (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Se evaluó la normalidad con el test de Shapiro-Wilk (Shapiro et al., 1968) y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene (Brown & Forsythe, 1974) para determinar si se debían aplicar pruebas paramétricas o no paramétricas. En los casos en que se cumplían los requisitos de

normalidad y homogeneidad de varianza, se aplicó test paramétrico de ANOVA (Girden, 1992) y el test de Tukey para comparaciones post hoc pareadas (Keselman & Rogan, 1977). Cuando no se cumplían las condiciones, se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) y Test de Dunn para comparaciones post hoc pareadas (Dunn, 1964).

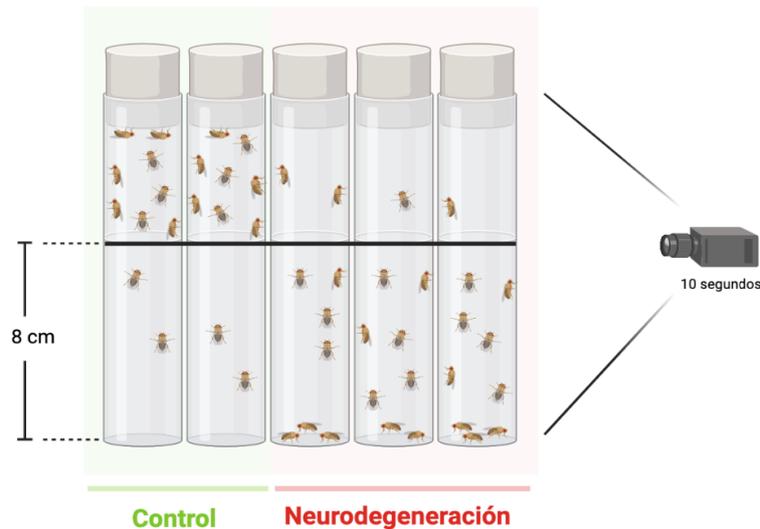


Figura 8. Ensayo de locomoción (*climbing*) en *Drosophila melanogaster* para la evaluación del desempeño locomotor. Se muestra una representación esquemática del ensayo en el que se registra la escalada de moscas controles y mutantes con neurodegeneración. Imagen obtenida de Silvera, 2023.

4.2 Disección de músculos de vuelo y puesta a punto del doble marcaje músculo-mitocondrias:

Para la observación de las mitocondrias y las fibras musculares del músculo de vuelo, se procedió de la siguiente manera. Primero, se anestesiaron las moscas utilizando trietilamina (CARLO ERBA, #489556) y se dispusieron individualmente en una gota de paraformaldehído sacarosa al 1% , 0.25% Tritón (PFS-T) para su disección. Esta gota se colocó sobre un portaobjetos, el cual fue apoyado sobre una placa de Petri con hielo para mantener las condiciones adecuadas durante el procedimiento. Posteriormente, se realizó la disección de los músculos de vuelo indirectos (IFMs) del tórax de machos adultos de 25 días de edad (n=5 por genotipo). Este procedimiento se repitió con otros 2-3 músculos rápidamente, y todas las muestras se transfirieron a un soporte con una profundidad adecuada para garantizar que quedaran completamente sumergidas en la

misma solución de PFS-T al 1% durante 15 minutos, para asegurar una fijación adecuada y permeabilización. Después de este tiempo, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno en PBS 1X.

Para realizar el co-marcaje específico de músculos y mitocondrias, en preparaciones wholemount, nos basamos en diversos protocolos descritos en la literatura y realizamos muchas pruebas hasta lograr poner a punto el protocolo definitivo que empleamos, que se detalla a continuación. Para el marcaje específico de los músculos, las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con Faloidina conjugada con Rodamina a una dilución 1:500 (Molecular Probes, Inc). Posteriormente, se añadió a la misma gota de incubación, el marcador MitoTracker® Green FM (500 nM, Molecular Probes) que es un colorante que marca específicamente las mitocondrias funcionales por un intervalo de tiempo prudente, y se dejó incubando durante 1 hora a 37 grados Celsius, asegurándose de tapar la solución y controlar que no se secase. Finalmente, las muestras se montaron en glicerol al 80% en cámaras previamente preparadas con cinta aislante negra sobre portaobjetos. Los hemitórax se dispusieron en estas cámaras bajo lupa, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con esmalte de uñas transparente para su inmediata visualización al microscopio, para asegurar el mantenimiento del marcaje mitocondrial, principal desafío de este nuevo protocolo que pusimos a punto.

4.3 Microscopía de fluorescencia confocal, mediciones de parámetros musculares y análisis estadísticos

Para analizar la estructura del músculo, se tomaron imágenes de uno o ambos hemitórax de 4-5 individuos machos adultos de 25 días de edad, por cada genotipo: *wt*, *park*, *RNAiCG10932* y *RNAiCG10932-park*. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio láser confocal LSM ZEISS 800 AiryScan, del IIBCE. Se empleó el láser 488 nm para visualizar las mitocondrias marcadas con el MitoTracker Green y el láser 561 nm para visualizar el músculo marcado con Faloidina Rodamina. Con propósitos comparativos se mantuvieron los parámetros generales de adquisición para ser reutilizados con los distintos genotipos. A la vez, en cada sesión de adquisición se tomaron imágenes de los 4 genotipos. Se utilizó tanto el objetivo 10x (aire; NA = 0.3) como el 20x (aire; AN=0.5) para localizar las fibras musculares y ver la estructura general de los músculos de vuelo. Luego se adquirieron las imágenes con el objetivo 40x (aire; NA 0.95), generando series de aproximadamente 4 planos confocales en el eje Z, a intervalos de 1 μ m. Las imágenes se analizaron utilizando el software de acceso libre FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012),

seleccionando para el análisis de varios parámetros musculares, el canal de Faloidina y una sección óptica por imagen donde las miofibrillas estuvieran claramente definidas. En cada imagen de músculo orientado longitudinalmente, se eligieron 2 regiones de interés (ROI) de 31.2 x 31.2 μms en diferentes zonas, en las cuales se analizó el número de miofibrillas, el diámetro de las miofibrillas, la longitud de los sarcómeros y la distancia entre miofibrillas. Para analizar las mitocondrias, se seleccionó el canal de Mitotracker y generó una proyección (Z-project) de 2 secciones ópticas con promedio de intensidad. Posteriormente, se seleccionaron 2 ROI de 46.79 x 46.79 μms en diferentes zonas de cada imagen. Se midió la densidad óptica (mean grey value) del ruido de fondo y se restó (12 unidades de densidad óptica) a la intensidad de los píxeles.

Para medir el diámetro de las miofibrillas, se seleccionaron 6 miofibrillas/ROI respecto al centro de la imagen, midiendo su grosor en tres puntos de cada miofibrilla: al principio, en el medio y al final. Para la distancia entre miofibrillas, se seleccionaron 4 miofibrillas centrales por ROI y se midió nuevamente tres veces en los mismos puntos anteriormente mencionados. Se descartaron aquellas mediciones que parecían estar entre fibras y no entre miofibrillas. Para comparar la longitud de los sarcómeros, se midieron 10 sarcómeros por ROI, siguiendo el criterio establecido por otros autores (Avellaneda et al., 2021; Al-Sabri et al., 2024). Finalmente, la cuantificación del área mitocondrial por ROI se realizó siguiendo el protocolo descrito por Avellaneda et al., 2021 mediante la aplicación del umbral de Otsu.

El análisis estadístico se realizó en todos los casos con el software libre RStudio (<http://www.rstudio.com>). Se evaluó la normalidad con el test de Shapiro-Wilk (Shapiro et al., 1968) y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene (Brown & Forsythe, 1974) para determinar si se debían aplicar pruebas paramétricas o no paramétricas. En los casos en que se cumplían los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianza, se aplicó test paramétrico de ANOVA de una vía (Girden, 1992) y el test de Tukey para comparaciones post hoc pareadas (Keselman & Rogan, 1977) y se generaron gráficos de barras de la media más el error estándar de la media (s.e.m.), utilizando GraphPad (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA), incorporando la significancia estadística para cada comparación. Cuando no se cumplían las condiciones, se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) y Test de Dunn para comparaciones post hoc pareadas (Dunn, 1964) y se generaron gráficos de barras representando la mediana (95% CI).

5. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

5.1 Ensayo de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno

Se estudió la tolerancia al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 en machos de todos los genotipos de 25 días de edad, mantenidos en medio de cultivo fresco. Se analizaron $n=28-46$ machos por genotipo, distribuidos en tubos de 7 a 10 individuos por condición. Las moscas fueron sometidas a un ayuno nocturno de 8 horas, luego se colocaron en tubos con un filtro de papel con una solución acuosa de sacarosa al 2% con H_2O_2 al 2% durante 6 horas. Finalmente, fueron transferidas a un tubo con medio de cultivo y el mismo filtro de papel por 10 horas. Este protocolo fue basado en protocolos publicados (Harrison et al. 2020 y Adedara et al., 2022), pero modificado y puesto a punto por nosotros para evitar efectos de la concentración de sacarosa y del ayuno en la interpretación de los resultados, constituyendo otro gran aporte metodológico de esta tesina.

5.2 Análisis estadístico de la supervivencia

Se realizó un análisis de supervivencia básico utilizando la plataforma OASIS 2 (online application for survival analysis, Yang et al., 2011) para evaluar las diferencias en la supervivencia entre los grupos estudiados. Este análisis incluyó curvas de supervivencia utilizando el estimador de Kaplan-Meier para visualizar la probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo para cada grupo, cálculo de esperanzas de vida media y mediana para cada grupo, proporcionando una medida central de la supervivencia y para evaluar la significancia estadística de las diferencias en la supervivencia entre los grupos, se realizó una prueba de Log-Rank ponderada (Peto-Peto test, Peto & Peto, 1972).

RESULTADOS:

El primer resultado a destacar de esta tesina, crucial para la realización del resto de los experimentos, fue la planificación y concreción exitosa de una serie de cruces (ver punto 2 de la sección de Materiales y Métodos), para obtener moscas que presentaban un genotipo de silenciamiento específico colinérgico de *CG10932* en un contexto genético mutante *park(RNAiCG10932-park)*, combinación genotípica que postulamos como potencial neuroprotectora a comparar principalmente con moscas mutantes *park*, controles de neurodegeneración.

1. EL NÚMERO DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS PPL1 DE LOS DOBLE MUTANTES *RNAiCG10932-PARKINA* ES SIGNIFICATIVAMENTE MAYOR AL DE LOS MUTANTES *PARKINA* Y SIMILAR AL DE MOSCAS NORMALES DE LA MISMA EDAD

En la Figura 9, se ve un ejemplo de imágenes de cerebro de machos adultos de *Drosophila melanogaster* de 25 días de edad de los cuatro genotipos comparados, marcados con anti-TH para visualizar las neuronas dopaminérgicas PPL1. La cuantificación de estas neuronas mostró que los doble mutantes *RNAiCG10932-park* tienen significativamente más neuronas PPL1 que los mutantes *park* (Kruskal Wallis, Test de Dunn, $p < 0,01$) y no se diferencian con moscas normales de la misma edad (Kruskal Wallis test, Test de Dunn, NS), Figura 10. Por lo tanto, se puede concluir que el silenciamiento específico colinérgico del gen *CG10932* en un contexto genético de neurodegeneración mutante *park* logra evitar o postergar la muerte de neuronas dopaminérgicas PPL1 que se da normalmente en los mutantes *park* de esa misma edad.

Por otro lado, para el control parental *RNAiCG10932* solo se logró obtener una imagen de calidad suficiente para cuantificar las neuronas PPL1 (Figura 9C), por lo que este genotipo no se incluyó en el análisis estadístico de la comparación del número de estas neuronas entre genotipos. Se requiere la repetición de estos experimentos para obtener más imágenes y datos de cuantificación neuronal de este genotipo en el futuro.

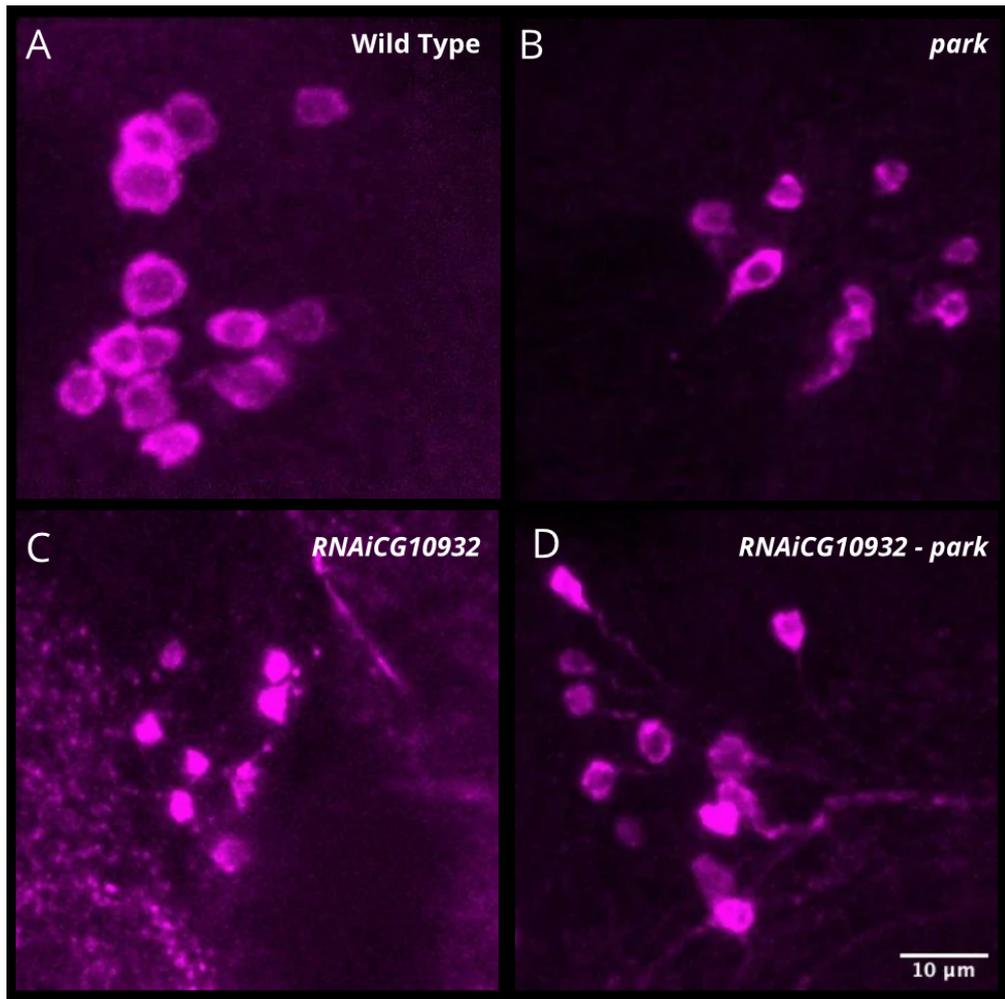


Figura 9. Clústers de neuronas dopaminérgicas PPL1 de cerebros de *Drosophila melanogaster* de cada genotipo Planos confocales proyectados en Z de cerebros de machos adultos de 25 días de edad, marcados con anti-tirosina-hidroxilasa (anti-TH) (magenta). A-D. Imágenes representativas del grupo de neuronas dopaminérgicas PPL1 en moscas de los cuatro genotipos comparados. A. *wt* (Silvera C, 2023), B. *RNAiCG1032-park*, C. *park* (Silvera, 2023); D. *RNAiCG1032*. Barra de calibración: 10 µm

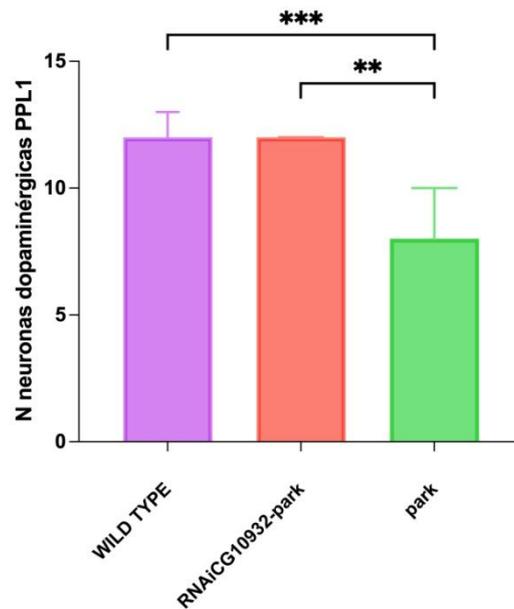


Figura 10. Comparaciones intergenotípicas del número de neuronas dopaminérgicas del protocerebro posterior lateral 1 (PPL1) de machos de 25 días de edad. El eje Y muestra el número de neuronas dopaminérgicas PPL1 totales mientras que en el eje X se muestran los diferentes genotipos: *park*, *RNAiCG10932-park* y *wt*. hemisferios cerebrales analizados por genotipo: *CG10932-park*, N=9; *park*, N=11; *wt*, N=7. Kruskal Wallis y Test de Dunn, ** p< 0,01; *** p< 0,001. Se muestra mediana (95% CI). La cuantificación de las neuronas de moscas *RNAiCG10932* no se incluyó en el análisis estadístico, ya que deben adquirirse más imágenes.

2- LOS MUTANTES *PARKINA* PRESENTAN UNA DEFICIENCIA LOCOMOTORA Y ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN LOS MÚSCULOS DE VUELO, MIENTRAS QUE LOS DOBLE MUTANTES *RNAiCG10932-PARKINA* TIENEN UNA MOVILIDAD Y ESTRUCTURA MUSCULAR MÁS SIMILARES AL DE MOSCAS NORMALES DE LA MISMA EDAD

2.1 RESULTADOS DEL ENSAYO DE LOCOMOCIÓN (CLIMBING)

Como mencioné anteriormente, uno de los aspectos más informados en pacientes que padecen EP, al igual que en los mutantes de *Drosophila melanogaster park* usados como modelo de esta enfermedad, son los defectos locomotores. Para analizar esto, evalué la capacidad de escalada geotáctica (Ali et al., 2011).

Los resultados del análisis de climbing de machos de 25 días de edad de los cuatro genotipos de interés (Figura 11), muestran que la combinación genotípica *RNAiCG10932-park* mejora significativamente la habilidad motora de las moscas en comparación con moscas mutantes *park* (Kruskal-Wallis, Test de Dunn, $p < 0.0001$). Sin embargo, estas moscas presentan una disminución significativa de la locomoción en comparación con las *wt* (Kruskal-Wallis, Test de Dunn, $p < 0.001$).

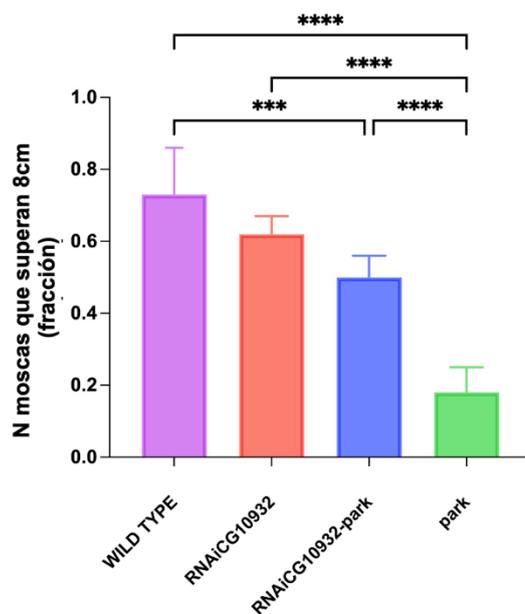


Figura 11. Evaluación de la habilidad motora a través de ensayos de climbing. La figura muestra los resultados de los ensayos de climbing de machos de 25 días de edad. El eje Y muestra el número de moscas (expresado en frecuencia) que sobrepasan la línea trazada a 8cm en menos de 10 segundos, mientras que en el eje X se muestran los diferentes genotipos: *park*, *wt*, *RNAiCG10932-park* y *RNAiCG10932*. Individuos por genotipo: *CG10932-park*, N=30; *park*, N=33; *CG10932*, N=30; *wt*, N=28. Análisis estadístico Kruskal Wallis y Test de Dunn, *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Se muestra mediana (95% CI).

Estos resultados indican que, aunque el silenciamiento colinérgico de *CG10932* mejora la movilidad en comparación con los mutantes *park*, la movilidad no se restaura completamente a niveles normales.

Debido al efecto visto en el estudio de la habilidad locomotora, decidimos ir a analizar el músculo y sus mitocondrias.

2.2 PUESTA A PUNTO DEL DOBLE MARCAJE MÚSCULO-MITOCONDRIAS EN EL MÚSCULO DE VUELO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Destacar primero, como resultado, que en esta tesina logramos poner a punto el doble marcaje músculo-mitocondrias, en el músculo de vuelo de *Drosophila melanogaster*, adecuando el protocolo y balanceando los tiempos al empleo de un marcaje muscular que mejora con la fijación, pero un marcaje mitocondrial con colorante vital que exige poca fijación y tiempo de visualización.

En la Figura 12, se presentan imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal de músculos de vuelo de machos de 25 días de edad de los cuatro genotipos estudiados. Se puede observar cualitativamente que tanto las moscas *wt* (Figura 12A) como las *RNAiCG10932-park* (Figura 12D) muestran fibras musculares ordenadas, alineadas y uniformes en su extensión, sin presencia de "bucles", sugiriendo que ambos genotipos tienen una estructura muscular no dañada para lo esperable a esa edad. En contraste, las moscas *park* muestran áreas con desorganización significativa de las fibras musculares, acompañadas de numerosos "bucles" (Figura 12B). Esta desorganización indica una alteración en la estructura muscular. Las moscas *RNAiCG10932* (Figura 12C) presentan características musculares intermedias respecto a *wt* y *park*. Aunque muestran una mayor organización muscular en comparación con los mutantes *park*, exhiben algunas zonas de desorganización y "enrollamientos". Esto sugiere que el silenciamiento colinérgico de *CG10932* atenúa, pero no restaura completamente la estructura muscular alterada por la mutación en el gen *park*.

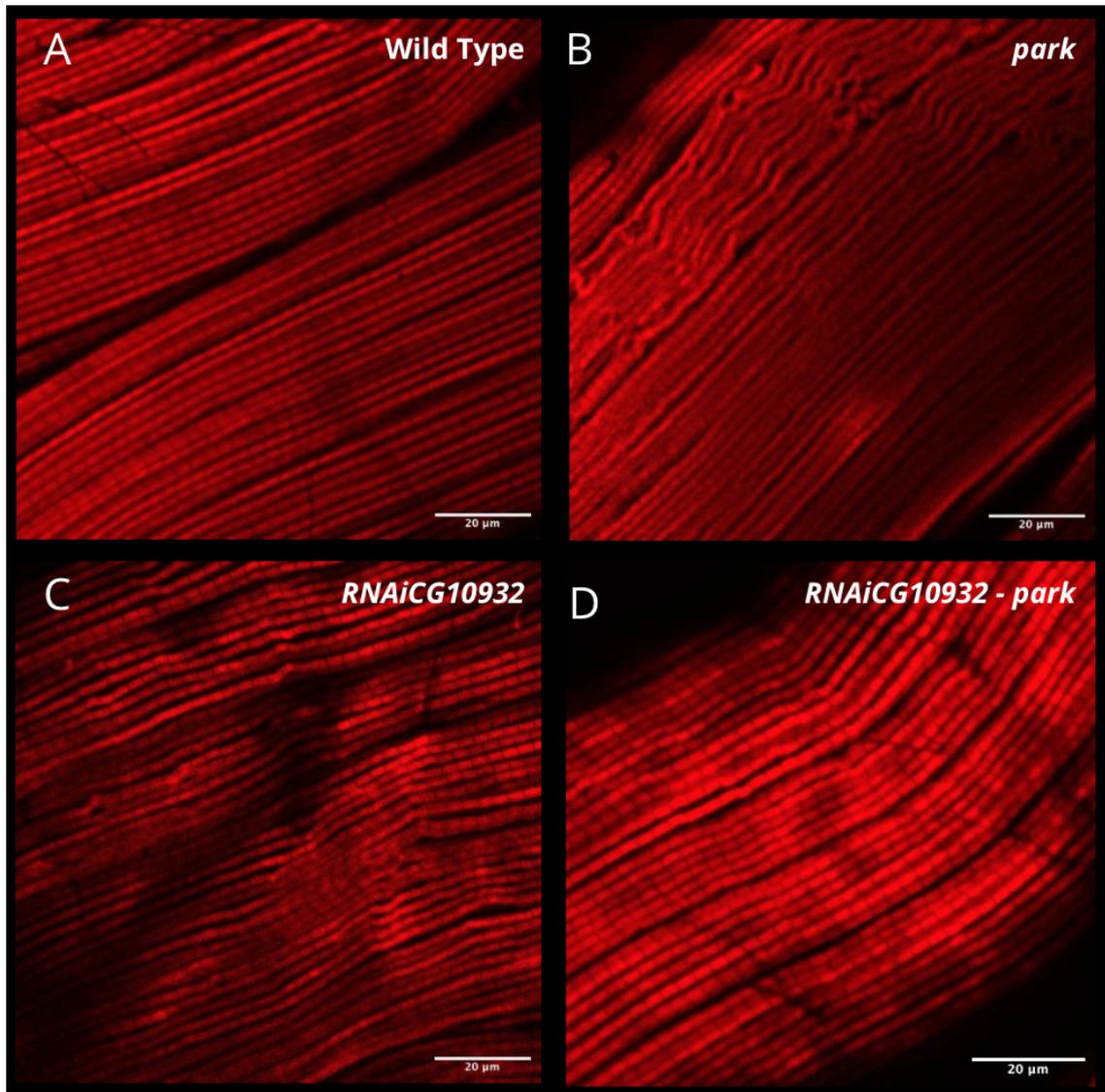


Figura 12. Imágenes confocales del marcaje con Faloidina-Rodamina del músculo de vuelo de machos de *Drosophila melanogaster* de 25 días de edad. Imágenes representativas de los 4 genotipos estudiados: *wt*, *park*, *RNAiCG10932*, *RNAiCG10932-park*. Barra de calibración: 20 µm.

2.3 ANÁLISIS COMPARATIVO DEL NÚMERO DE MIOFIBRILLAS MUSCULARES

Para iniciar el análisis cuantitativo del músculo de vuelo por genotipo, se contó el número de miofibrillas que entran en una región de interés (ROI), de 31.2 x 31.2s µms, 5 imágenes por genotipo, dos ROI por foto. No se observaron diferencias significativas entre las cuatro condiciones estudiadas (ANOVA de una vía, NS). Los resultados de la media del número de miofibrillas + s.e.m. se muestra en la Figura 13.

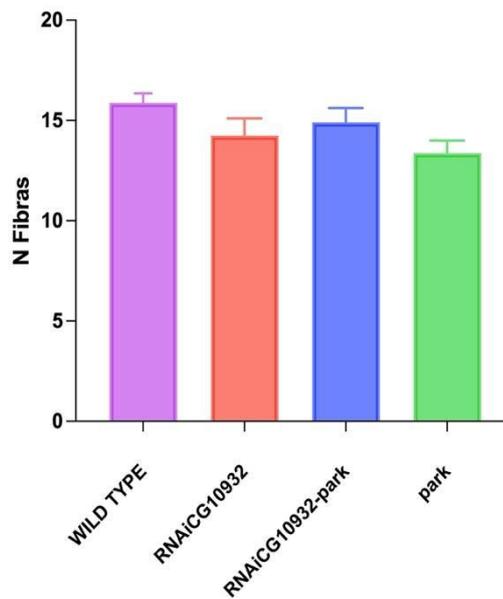


Figura 13. Cuantificación del número de miofibrillas musculares del músculo de vuelo de machos de *Drosophila melanogaster* de 25 días de edad. El eje Y muestra el número de miofibrillas totales mientras que en el eje X se muestran los diferentes genotipos: *park*, *wt*, *RNAiCG10932-park* y *RNAiCG10932*. Imágenes por genotipo: *CG10932-park*, N=10; *park*, N=8; *CG10932*, N=10; *wt*, N=8. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y Prueba de Tukey. Las barras indican la media más el s.e.m.

En resumen, no se observaron diferencias significativas en el número de miofibrillas por ROI entre genotipos, pese a que en la visualización de los hemitórax completos es evidente la falta de fibras musculares en grandes regiones exclusivamente en los mutantes *park*. Estas grandes regiones carentes de músculo no fueron seleccionadas para ubicar los ROI ya que pretendíamos comparar parámetros musculares. Se observa en el gráfico una leve tendencia a que los mutantes *park* presenten menos miofibrillas /ROI, que podrá ser confirmada a futuro aumentando el número de muestras por genotipo o modificando el tamaño y número de ROIs por muestra.

2.4 ANÁLISIS COMPARATIVO DEL DIÁMETRO DE MIOFIBRILLAS Y LA DISTANCIA ENTRE MIOFIBRILLAS

Las mediciones del diámetro de las miofibrillas del músculo de vuelo en los 4 genotipos analizados (Figura 14A) revelaron que las moscas *RNAiCG10932-park* presentan un diámetro de miofibrilla significativamente menor en comparación con el de los mutantes *park*, que son los que presentan el mayor diámetro (Kruskal-Wallis, Test de Dunn, $p < 0,0001$). Además, no se observaron diferencias significativas entre el diámetro de las miofibrillas de moscas *RNAiCG10932-park* y de las *wt*. Por otro lado, se observó un aumento significativo en el diámetro de las miofibrillas de las moscas *RNAiCG10932* en comparación con las *wt* (Kruskal-Wallis, Test de Dunn, $p < 0,0001$, Figura 14A). Esto sugiere que el silenciamiento colinérgico de *CG10932* en contexto mutante *park* atenuaría el efecto de hipertrofia muscular observado en los mutantes *park*, devolviendo a las miofibrillas su diámetro típico, pero el silenciamiento colinérgico solo también generaría un aumento en el diámetro de las miofibrillas respecto a las moscas *wt*.

Los resultados de las mediciones de la distancia entre las miofibrillas (Figura 14B) arrojan que, cuando se silencia el gen *CG10932* a nivel colinérgico en contexto mutante *park*, se evita el aumento de la distancia entre las miofibrillas característico de los mutantes *park* (Kruskal-Wallis, Test de Dunn, $p < 0,0001$). Además, no se observaron diferencias significativas entre la distancia de miofibrillas de moscas *RNAiCG10932-park* y *wt*. Esto sugiere que la combinación genotípica *RNAiCG10932-park* previene el aumento en la distancia entre miofibrillas del músculo de vuelo, que caracteriza a las moscas mutantes *park*.

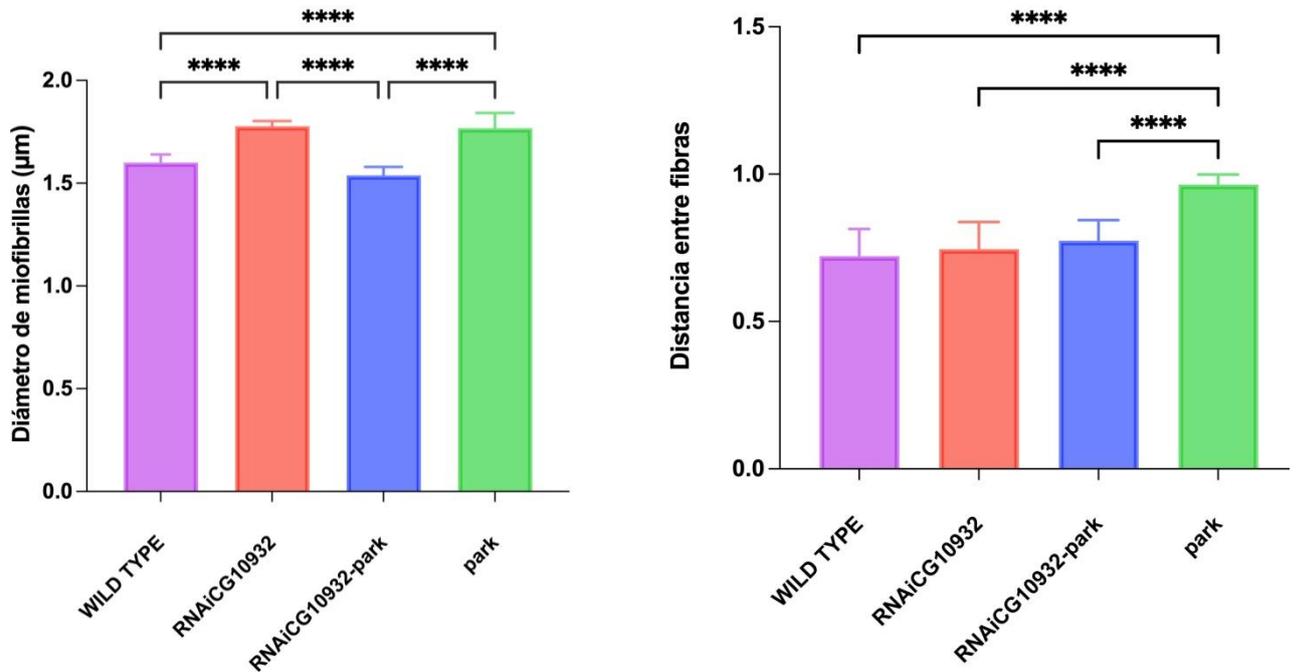


Figura 14. Mediciones del diámetro de las miofibrillas y la distancia entre ellas en el músculo de vuelo de machos de *Drosophila melanogaster* de 25 días de edad en los cuatro genotipos. A. Resultados de la medición del diámetro o grosor de las miofibrillas. El eje Y muestra el diámetro en micrómetros y el eje X se muestran los diferentes genotipos analizados. Mediciones por genotipo; *CG10932-park*, N=180; *park*, N=144; *CG10932*, N=144; *wt*, N=144. B. Resultados de la medición de la distancia entre las miofibrillas. El eje Y muestra la distancia en micrómetros y el eje X se muestran los diferentes genotipos analizados. Mediciones por genotipo: *CG10932-park*, N=120; *park*, N=96; *CG10932*, N=96; *wt*, N=96. Análisis estadístico Kruskal Wallis y Test de Dunn, **** $p < 0.0001$. Se muestra mediana (95% CI).

2.5 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA LONGITUD DE LOS SARCÓMEROS

Los resultados de las mediciones de sarcómeros en el músculo de vuelo de machos de 25 días de edad de los 4 genotipos analizados (Figura 15) indican que no hay una diferencia significativa en la longitud de los sarcómeros entre las moscas *RNAiCG10932-park* y *park* ni entre las moscas *RNAiCG10932-park* y *wt* (Kruskal-Wallis, Test de Dunn, NS en ambos casos).

Por otra parte, se observa un aumento significativo en la longitud de los sarcómeros cuando se silencia el gen *CG10932* sin el contexto mutante *park* en comparación con los

otros tres genotipos (Kruskal-Wallis, Test de Dunn, vs *RNAiCG10932-park* y *wt*, $p < 0.0001$ en ambos casos y vs *park*, $p < 0.001$), Figura 15.

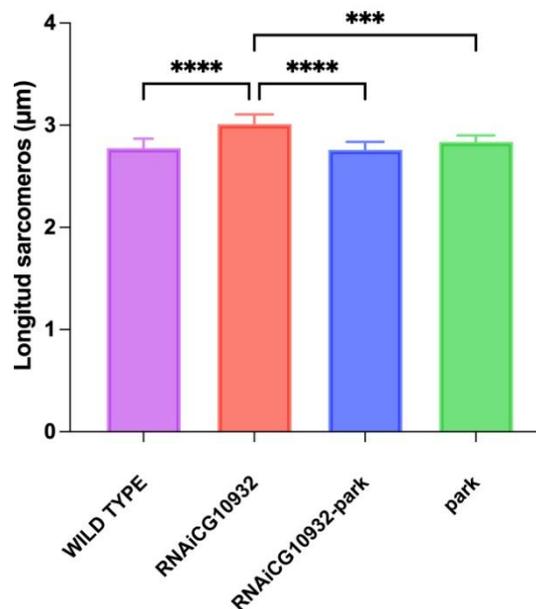


Figura 15. Mediciones de la longitud de los sarcómeros de músculos de vuelo de machos de *Drosophila melanogaster* de 25 días de edad. El eje Y muestra la medida de longitud de los sarcómeros en micrómetros y el eje X se muestran los diferentes genotipos analizados. Mediciones por genotipo: *CG10932-park*, $N=100$; *park*, $N=79$; *CG10932*, $N=80$; *wt*, $N=80$. Análisis estadístico: Kruskal Wallis y Test de Dunn, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$. Se muestra mediana (95% CI).

2.6 ANÁLISIS COMPARATIVO DEL ÁREA MITOCONDRIAL ENTRE LAS MIOFIBRILLAS MUSCULARES

En la Figura 16 se presentan imágenes panorámicas representativas obtenidas mediante microscopía confocal de la tinción de las mitocondrias con MitoTracker Green de los cuatro grupos estudiados. Cualitativamente se observa que tanto en las moscas *RNAiCG10932-park* como en las *wt*, la distribución de las mitocondrias parece más organizada y alineada con la organización de las miofibrillas que corren normalmente ordenadas en paralelo intercalándose con las mitocondrias. En contraste, las moscas *park* y *RNAiCG10932* presentan áreas mitocondriales con una organización menos uniforme.

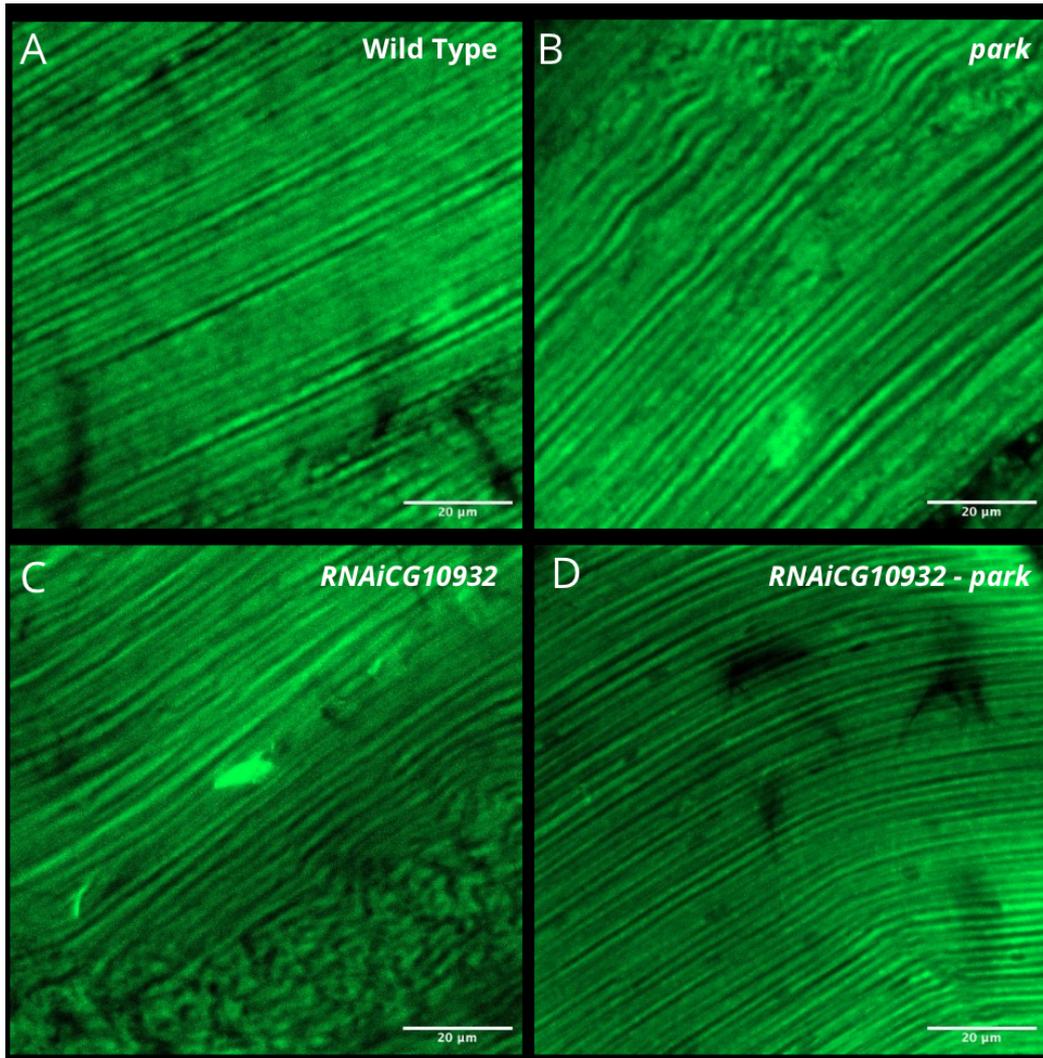


Figura 16. Imágenes panorámicas del marcaje mitocondrial en músculos de vuelo de machos de *Drosophila melanogaster* de 25 días de edad. Proyección en Z de dos planos confocales teñidos con Mitotracker Green (500 nM, Molecular Probes). Se muestran imágenes representativas de los 4 genotipos estudiados. Barra de escala: 20µm.

Se cuantificó el área mitocondrial verde entre las miofibrillas musculares de los músculos de vuelo de los 4 genotipos estudiados (Figura 17). Para ello, se recurrió a un análisis mediante umbralización, midiendo el área verde correspondiente a la región con mitocondrias. Esta magnificación (40x) no permitió análisis adicionales de las mitocondrias (ej. forma y tamaño individual), ya que estos análisis requieren de imágenes tomadas al menos a 63x. Sería interesante a futuro realizar estas comparaciones ya que los mutantes *park* presentan fenotipos de mitocondrias más grandes y fusionadas respecto a las moscas normales y las moscas *RNAiCG10932-park* podrían mejorar también estos fenotipos mitocondriales.

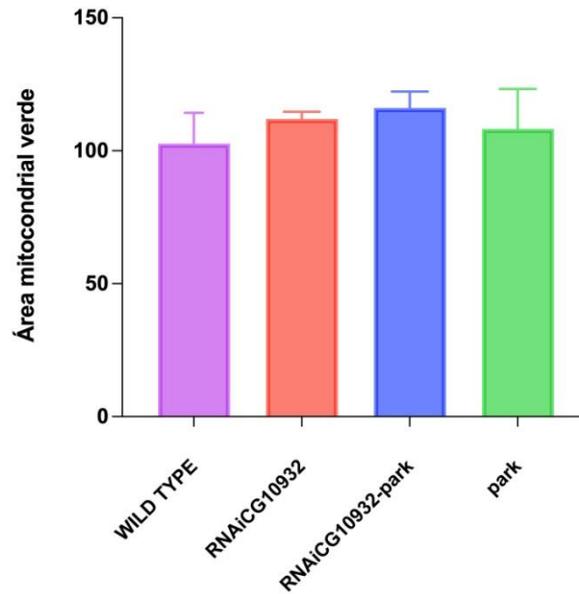


Figura 17. Cuantificación del área mitocondrial entre miofibrillas de músculos de vuelo de machos de *Drosophila melanogaster* de 25 días de edad de los cuatro genotipos. El eje Y muestra el área (μm^2) ocupada por mitocondrias marcadas con Mitotracker fluorescente por ROI y en el eje X se muestran los diferentes genotipos analizados. Imágenes por genotipo; *CG10932-park*, N=14; *park*, N=10; *CG10932*, N=18; *wt*, N=12. Análisis estadístico: Kruskal Wallis y Test de Dunn, NS. Se muestra mediana (95% CI).

El método de cuantificación por umbralización presentó desafíos, ya que la precisión del umbralizado no fue del todo adecuada con mis imágenes, a pesar de ser un método ya descrito y utilizado previamente por Avellaneda et al., 2021 y Al-Sabri et al., 2024. Por esta razón, se plantea la necesidad de mejorar la metodología en futuros análisis y emplear un método de medición alternativo que ofrezca mayor precisión.

Además, se planea obtener imágenes con un objetivo 63x o superior que permitirá alcanzar mayor resolución y facilitará una caracterización más precisa de las mitocondrias individuales. Estas mejoras metodológicas son fundamentales para asegurar la exactitud y la reproducibilidad de los resultados en estudios futuros.

3- LOS DOBLE MUTANTES RNAiCG10932-PARKINA NO MUESTRAN MAYOR TOLERANCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO, RESPECTO A LOS MUTANTES PARKINA

Sometimos a estrés oxidativo a machos de *Drosophila melanogaster* de 25 días de edad de los 4 genotipos analizados, adicionando H₂O₂ en sacarosa a los tubos y medimos la supervivencia de los individuos. Comenzamos haciendo el análisis de las curvas de supervivencia básico con la plataforma OASIS2 (<https://sbi.postech.ac.kr/oasis2/>).

La Figura 18 muestra las curvas de supervivencia correspondientes a las moscas de los genotipos *RNAiCG10932-park*, *park* y *RNAiCG10932*. Las moscas *wt*, contrario a lo esperado en base a toda la bibliografía y datos previos de nuestro laboratorio (Ferreiro et al., 2018), fueron las que presentaron menos tolerancia al estrés oxidativo, por lo que deberemos repetir estos análisis para obtener datos confiables acerca de este genotipo, que presentó diferencias significativas en su supervivencia con las moscas *RNAiCG10932-park* (Peto-Peto test, $p < 0.01$) y *RNAiCG10932* (Peto-Peto test, $p < 0.001$), pero no con las moscas *park* (Peto-Peto, NS).

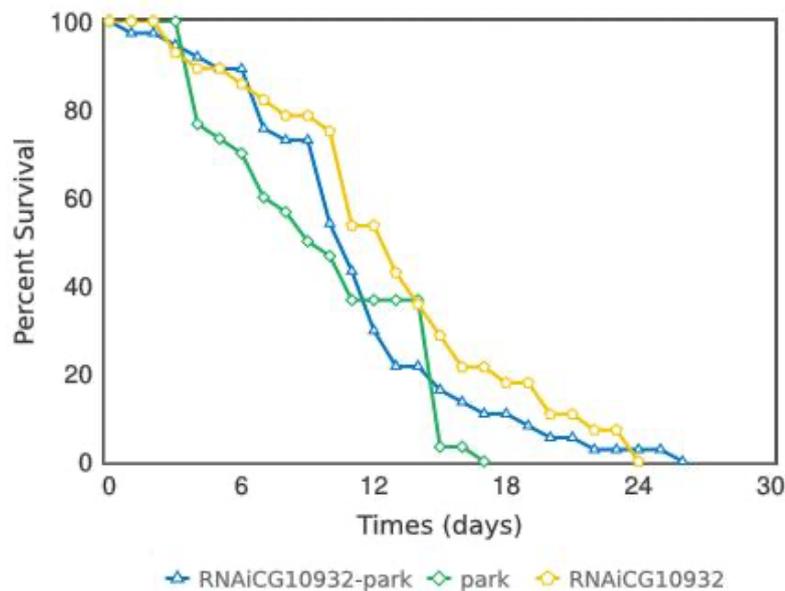


Figura 18. Curvas de sobrevivencia Kaplan-Meier correspondientes al ensayo de tolerancia al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno. El eje X representa el tiempo en días, mientras que el eje Y muestra la sobrevivencia en porcentaje de moscas macho sometidas a condiciones de estrés mediante tratamiento con H₂O₂. Individuos por genotipo; *CG10932-park*, N=37; *park*, N=31; *CG10932*, N=46; *wt*, N=28.. Prueba de Log-Rank ponderada (Peto-Peto test, Peto & Peto, 1972).

Contrario a lo esperado, no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia total de moscas *park* respecto al resto de los genotipos (Test Log rank ponderado, Peto-

Peto, NS). Es importante mencionar que, entre los días 17 y 26, solo uno de los 31 individuos analizados del genotipo *park* sobrevivió, lo cual podría considerarse un valor atípico por ende se repitió el análisis sin considerar este individuo. Excluyendo este individuo, la supervivencia total de las moscas *park* sería de 17 días, en comparación con los 26 días de supervivencia total observados en moscas del genotipo *RNAiCG10932-park*, lo que si bien sigue sin ser significativo, indica una tendencia a un aumento de sobrevida en estas moscas respecto a las *park*, lo que se correspondería con una tendencia a una mayor tolerancia al estrés oxidativo inducido por H₂O₂. También realizamos el análisis comparativo de la vida media de todos los genotipos y vimos que tampoco existen diferencias significativas (Figura 19).

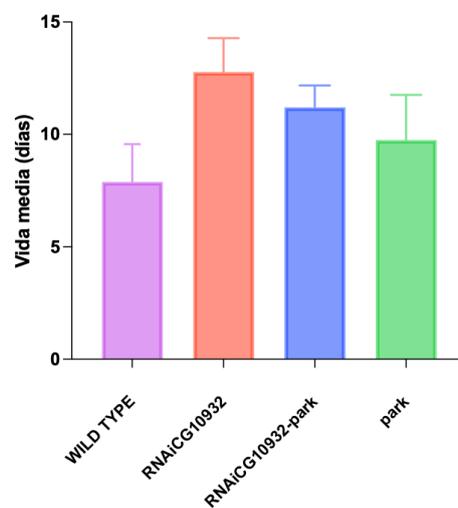


Figura 19. Vida media de machos de *Drosophila melanogaster* bajo condiciones de estrés oxidativo inducido con H₂O₂. El eje Y muestra la vida media en días y el eje X muestra los diferentes genotipos analizados. N=3-5 tubos medidos de 10 individuos cada uno por genotipo. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y Prueba de Tukey. Las barras indican la media más el s.e.m.

Es relevante replicar este experimento bajo condiciones experimentales más controladas de temperatura (25°C), luz y humedad, dado que se llevaron a cabo fuera de la incubadora, que proporciona las condiciones estándar de vida para las moscas.

DISCUSIÓN:

EL SILENCIAMIENTO COLINÉRGICO DE CG10932 EN UN CONTEXTO MUTANTE PARKINA EVITA LA PÉRDIDA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS PPL1 RESPECTO A LOS MUTANTES PARKINA

Nuestros resultados de la cuantificación de neuronas dopaminérgicas PPL1, normalmente significativamente reducidas en número en los mutantes *park* (Greene et al., 2003; Cha et al., 2005; Whitworth et al., 2005; Wang et al., 2007), análogo a lo que ocurre en la sustancia nigra de pacientes con EP, muestran que el silenciamiento colinérgico de *CG10932* en un contexto mutante *park*, logra evitar o quizás postergar la pérdida de estas neuronas dopaminérgicas. Por tanto, a través de la modificación en neuronas productoras del neurotransmisor ACh, uno de los neurotransmisores más abundantes en SNC de los insectos (Gupta, 1987), se evidenció un efecto benéfico en neuronas productoras de DA.

En humanos, el mantenimiento del equilibrio entre la estimulación por acción de la DA y la ACh del cuerpo estriado, es crucial para el funcionamiento motor normal y se ve afectada en trastornos neurológicos como la EP (McGeer&McGeer, 1980, Figura 20). En condiciones normales, la DA facilita el inicio y la coordinación del movimiento, mientras que la ACh modula la actividad neuronal para evitar respuestas motoras exageradas y facilitar la selección de patrones de movimiento apropiados (Rivlin-Etzion et al., 2006; Hoebel et al., 2007).

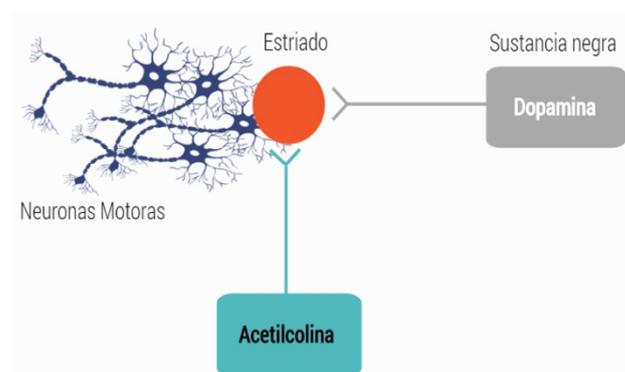


Figura 20. Esquema que muestra la relación entre los neurotransmisores dopamina y acetilcolina en el cerebro humano, para la modulación del sistema motor en el estriado. La DA, proveniente de la sustancia negra y la ACh trabajan en conjunto para regular a las neuronas motoras y el movimiento. Imagen obtenida de http://parkinsongaliciacoruna.org/index.php?V_dir=MSC&V_mod=showart&id=150.

También existe una influencia directa de la ACh en la producción de DA, demostrada tanto en humanos, como en modelos biológicos como la *Drosophila melanogaster* (Shin et al., 2018; Krok et al., 2023) y se explica por la presencia de receptores nicotínicos de ACh (nAChR) en las terminales de las neuronas dopaminérgicas. Hay dos tipos de receptores de ACh: receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR). Los nAChR son canales iónicos activados por la ACh para desencadenar potenciales de acción y permitir la neurotransmisión sináptica rápida (Shin&Venton, 2020). Los agonistas de nAChR regulan la liberación de DA (Pyakurel et al., 2018; Shin&Venton, 2020; Figura 21A) Por otra parte, Sun et al. (2015) demostraron que en miocitos de *Drosophila melanogaster* de genotipo *wt* (células musculares similares a las presentes en los músculos de vuelo que analizamos en esta tesis), la ACh promueve la translocación de PINK1 y Park a las mitocondrias, promoviendo así el correcto reciclado de las mitocondrias defectuosas por mitofagia, mediada por el receptor muscarínico M2(Figura 21B).En cambio, las moscas mutantes *park* heterocigotas, como las que usamos en esta tesina, en principio, no tendrían afectados sus niveles de ACh (Dumitrescu et al., 2023), pero sí presentan una deficiencia de Park, lo que impide una mitofagia eficiente (Ganesan et al., 2021).

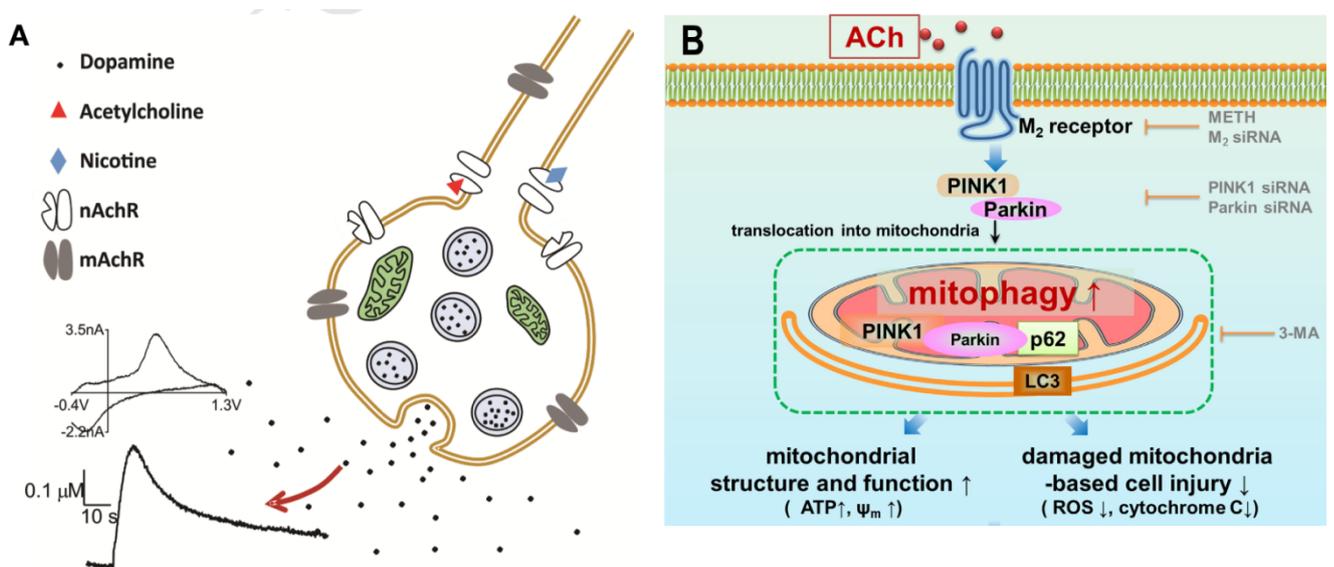


Figura 21. Rol de la acetilcolina en la modulación de la liberación de dopamina y la mitofagia inducida por Park/PINK. A. Esquema que ilustra la interacción entre la DA y la ACh en una terminal sináptica conservada de una neurona dopaminérgica genérica. Se muestran los receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR). Obtenida de Pyakurel et al., 2018. B. Esquema que muestra cómo la ACh, a través del receptor muscarínico M2, promueve la mitofagia en el músculo

de *Drosophila melanogaster* incentivando la translocación mitocondrial de PINK1/Park. Obtenida de Sun et al., 2016.

La mitofagia ineficaz de las moscas mutantes *park* lleva a la acumulación de mitocondrias disfuncionales de mayor tamaño (Ganesan et al., 2021) y con el tiempo a la degeneración neuronal, observada principalmente de manera significativa en moscas adultas de una cierta edad (ej. 25 días) y en grupos neuronales con alta carga oxidativa y gran número de mitocondrias como las neuronas dopaminérgicas, entre las que encontramos al clúster PPL1 analizado.

En nuestro estudio, al silenciar el gen *CG10932* implicado en la producción de acetil-CoA a partir de la β -oxidación de lípidos en la mitocondria (Figura 6), exclusivamente en las neuronas colinérgicas (*RNAiCG10932*), estaríamos reduciendo la disponibilidad de acetil-CoA, precursor necesario para la síntesis de ACh en las neuronas colinérgicas (Figura 22A) y para generar mayores niveles de ATP en sus mitocondrias, adicionales a los obtenidos a partir de la glicólisis (Pietrocola et al., 2015, Figura 22B), algo que podríamos confirmar mediante mediciones de ACh por HPLC o ES-masa en un futuro.

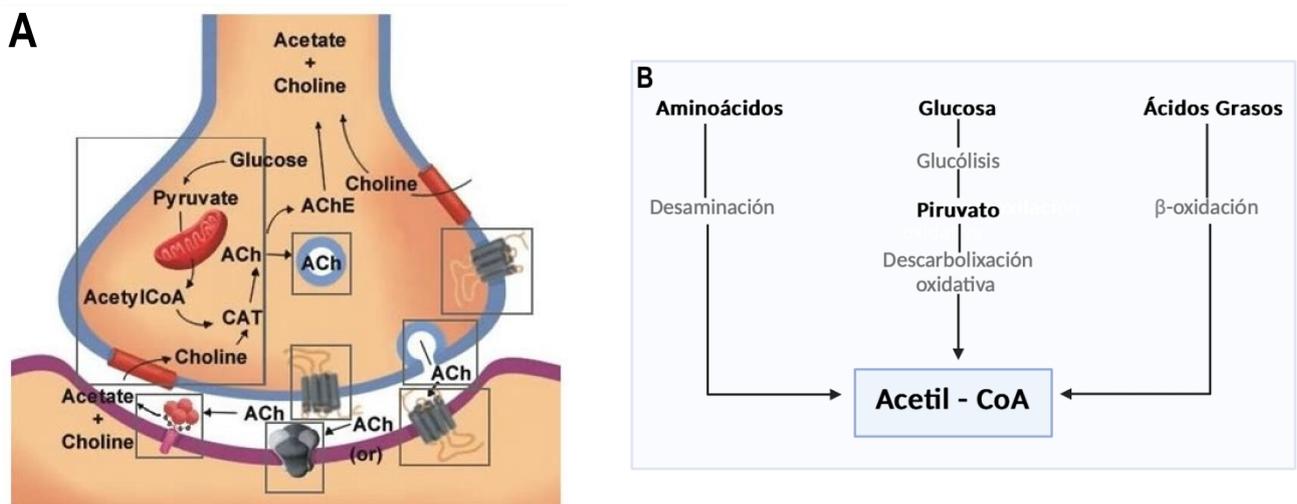


Figura 22. Síntesis de acetilcolina en neuronas colinérgicas y origen del acetil-CoA en las mitocondrias de las células animales. **A.** Esquema que muestra una terminal sináptica de una neurona colinérgica genérica, describiendo la síntesis de ACh a partir de acetil-CoA y colina. **B.** Imagen que ilustra las posibles fuentes de acetil-CoA celular.

Entonces, hipotetizamos que lo que podría estar ocurriendo en las moscas *RNAiCG10932-park*, es una disminución de los niveles de ACh producidos por sus neuronas colinérgicas y de los niveles generales de acetil-coA mitocondriales en estas neuronas, llevando a menores niveles de estrés oxidativo. Esta reducción de ACh, sumada a menores niveles de Park en todas las células, producto de la mutación *park* en heterocigosis, resultarían en una menor translocación de Park a las mitocondrias y por tanto, menores niveles de mitofagia respecto a moscas *wt*. Pero, a la vez, menores niveles de ACh sistémicos también disminuirían los niveles de producción de DA y por ende, todo el metabolismo oxidativo de las neuronas dopaminérgicas, lo que podría retrasar su muerte respecto a las neuronas dopaminérgicas de los mutantes *park*. Esto puede llevar a que, en los mutantes *RNAiCG10932-park*, aunque la mitofagia disminuye debido a la baja translocación de Park en las mitocondrias, el impacto de la reducción en los niveles de mitofagia no resulta tan pronunciado a corto plazo, porque se acumulan mitocondrias dañadas u "oxidadas" más lentamente, debido a que el metabolismo oxidativo de las neuronas dopaminérgicas estaría más lento, debido a la disminución de la tasa de producción de DA. Las neuronas dopaminérgicas son conocidas por tener una alta densidad de mitocondrias debido a su alta demanda energética (Haddad et al., 2015). La ralentización del metabolismo podría permitir que estas neuronas manejen mejor la acumulación de mitocondrias disfuncionales, dándoles más tiempo para adaptarse antes de que ocurra un daño significativo que lleve a la muerte de las neuronas dopaminérgicas.

Sugerimos entonces que el silenciamiento colinérgico de *CG10932* en un contexto mutante *park* ejercería neuroprotección frente a la reducción de los niveles de Park (igual número de neuronas PPL1 respecto a moscas *wt* y mayor número que los mutantes *park*), no a través de la promoción de neurogénesis de nuevas neuronas dopaminérgicas para compensar la pérdida dada por la deficiencia en Park, sino mediante la ralentización de su muerte, proporcionando así más tiempo antes de que se manifiesten los efectos negativos significativos. Se requieren realizar experimentos a edades más avanzadas y mediciones de DA y ACh, entre otros para confirmar nuestra hipótesis.

EL SILENCIAMIENTO COLINÉRGICO DE CG10932 EN UN CONTEXTO MUTANTE PARKINA MEJORA LA MOVILIDAD Y LA ESTRUCTURA DEL MÚSCULO DE VUELO RESPECTO A LOS MUTANTES PARKINA

Los resultados obtenidos en este estudio, que abarcan la habilidad locomotora, el diámetro de las miofibrillas del músculo de vuelo, la distancia entre ellas, la longitud de

los sarcómeros y el análisis del área de mitocondrias entre miofibrillas, pueden interpretarse de múltiples formas debido a que se está afectando procesos celulares fundamentales como el metabolismo del acetil-CoA, la función mitocondrial, entre otros.

Retroalimentación Mecánica entre Mitocondrias y Miofibrillas

El estudio de Avellaneda et al., 2021 sugiere que las mitocondrias y la morfogénesis de las miofibrillas musculares están coordinadas mediante un mecanismo de retroalimentación mecánica en los músculos de vuelo de *Drosophila melanogaster*. Concluyeron que la inducción de la hiperfusión de mitocondrias (ej. lo que ocurre en mutantes *park*) tiene un fuerte impacto en el crecimiento y el espaciamiento de las miofibrillas del músculo de vuelo.

Como mencioné anteriormente, los mutantes con carencia o deficiencia de Park, muestran un aumento en la fusión de las mitocondrias o una disminución en la fisión, debido al importante rol de la proteína Park normal en ese mecanismo (Deng et al., 2008; Wasner et al., 2020; Leduc-Gaudet et al., 2022). El aumento en la fusión mitocondrial en el mutante *park* podría estar directamente relacionado con el aumento del diámetro de las miofibrillas y la mayor distancia entre ellas observados en nuestros resultados (Figura 14). Al silenciar el gen *CG10932* en el contexto mutante *park*, notamos que tanto el diámetro de las miofibrillas de los músculos de vuelo analizados, como la distancia entre ellas, son similares a los de moscas normales, sugiriendo una retroalimentación mecánica adecuada entre mitocondrias y miofibrillas en los dobles mutantes *RNAiCG10932-park* respecto a los mutantes *park*, Figura 23. Este mecanismo de retroalimentación mecánica implica que las mitocondrias no sólo actúan como barreras físicas, sino que también responden y regulan activamente la forma y el crecimiento de las miofibrillas, creando un sistema de comunicación mecánica bidireccional (Avellaneda et al., 2021; Al-Sabri et al., 2024).

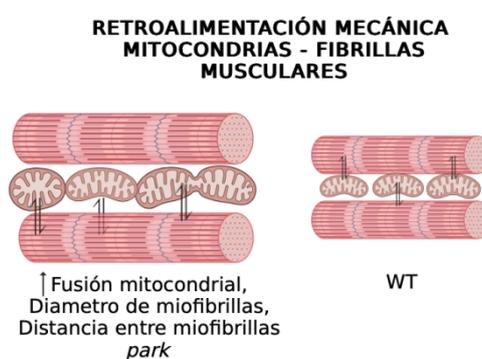


Figura 23. Modelo de comunicación mitocondria-miofibrillas. Representación visual de la bidireccionalidad entre las mitocondrias y las miofibrillas y como esta retroalimentación

mecánica regula el diámetro adecuado de la miofibrilla. Se observan mitocondrias con un equilibrio adecuado entre fusión y fisión, asociadas con miofibrillas normales (*w¹*). En contraste, las mitocondrias hiper fusionadas muestran un aumento en el diámetro y la distancia entre las miofibrillas. (mutantes *park*) Realizada con BioRender, <https://www.biorender.com>

Conexión entre neuronas colinérgicas, glutamatérgicas y dopaminérgicas en *Drosophila melanogaster*

En el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*, la transmisión sináptica excitatoria primaria es colinérgica, como lo describieron Restifo y White (1990). Los músculos de vuelo de *Drosophila melanogaster* están principalmente inervados por neuronas glutamatérgicas que producen glutamato (Glu) (Menon et al., 2013). Existe una interconexión significativa entre diferentes neurotransmisores en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*. Por ejemplo, Cooper y Neckameyer (1999) demostraron que la transmisión glutamatérgica periférica en la unión neuromuscular (correspondiente al músculo de vuelo analizado en esta tesina) es suprimida por la aplicación de DA. Anteriormente ya se mencionó cómo la ACh puede actuar como un estímulo natural para evocar la liberación de DA endógena (Figura 21). Además, Yuan y Lee (2007) encontraron que los receptores D1-like de DA en *Drosophila melanogaster* pueden suprimir la transmisión sináptica colinérgica excitatoria (Friggi- Grelin et al., 2003; Rosenthal et al, 2021)

En condiciones de niveles normales de ACh y DA (ej. moscas *w¹*), existe un equilibrio en la regulación de la liberación de Glu en la unión neuromuscular del músculo de vuelo (Frank et al., 2020). La DA inhibe adecuadamente la excitación glutamatérgica cuando el músculo está en reposo, y la excitación por ACh modula tanto la liberación de Glu como la de DA, manteniendo la excitabilidad neuronal y muscular dentro de un rango normal. En las moscas mutantes *park*, la disfunción de Park reduce la liberación de DA (Dumitrescu et al., 2023) pero no la de ACh, resultando en una menor inhibición de la liberación de Glu a nivel del músculo, volviéndolo "hiperreactivo" respecto a los músculos de vuelo normales. Esto provocaría un aumento en la excitación glutamatérgica, contribuyendo a una mayor excitabilidad neuronal y, consecuentemente, a problemas en la locomoción y otros defectos relacionados con la excitación excesiva.

Hipotetizamos que cuando silenciamos el gen *CG10932* en el contexto de la mutación en *park* a nivel colinérgico (moscas *RNAiCG10932-park*), la disminución de los niveles de ACh reduce la liberación de Glu al disminuir la activación de los nAChR en los terminales glutamatérgicos, lo que a su vez reduciría la excitabilidad muscular del músculo de vuelo. Adicionalmente, la mutación en *park* lleva a una disminución en la liberación de DA, lo que

reduciría la inhibición de la liberación de Glu, promoviendo así la excitabilidad muscular. El efecto combinado de ambos mecanismos actuando en conjunto, podría resultar en un balance parcial entre la excitación y la relajación del músculo de vuelo en las moscas *RNAiCG10932-park* respecto a las moscas *park* (que tienen tendencia a la hiperactivación de estos músculos respecto a moscas normales y por tanto mayor estrés oxidativo), lo que podría explicar una mejora en la locomoción de estas moscas en comparación con los mutantes *park*, aunque aún peor desempeño locomotor respecto a moscas *wt*.

En el contexto del silenciamiento colinérgico del gen *CG10932* sin la mutación *park* (moscas *RNAiCG10932*), se observa una locomoción normal, pero el músculo de vuelo aún presenta un aumento del diámetro de las miofibrillas respecto a moscas *wt*. Si este fenotipo puede correlacionarse con una alteración en la retroalimentación mecánica entre las miofibrillas y las mitocondrias, como mencionamos anteriormente, esto sugiere que las mitocondrias en las fibras musculares de las moscas *RNAiCG10932* no están funcionando de manera óptima. Al extrapolar lo que ocurre en los miocitos de *Drosophila melanogaster*, que se ha mencionado anteriormente (Sun et al., 2016), podemos hipotetizar que la disminución de ACh conduciría a una sub-estimulación de los músculos y a una reducción de la mitofagia debido a la disminución de la translocación de Park y PINK1 en estas moscas respecto a moscas normales. Esto resultaría eventualmente en la acumulación de mitocondrias disfuncionales dentro de las fibras musculares, pero de manera mucho más lenta que en los músculos hiperreactivos de los mutantes *park*, por lo que nuevamente, retrasaría los efectos nocivos sobre los músculos.

Otra posible explicación, alteración de la homeostasis del calcio.

En vertebrados, la unión de ACh a sus receptores en la membrana celular desencadena la apertura de canales de calcio (Ca^{2+}) en el retículo sarcoplásmico (SR) (Rossi & Dirksen, 2006; Rossi et al., 2009; Bennett et al., 2016; Rossi et al., 2022), elevando los niveles de Ca^{2+} intracelular y promoviendo la contracción muscular. Mantener una adecuada homeostasis del Ca^{2+} es crucial para la función celular y la reducción del estrés oxidativo (Giorgio et al., 2018; Favaro et al., 2019; Bevilacqua et al., 2022; Xiao et al., 2022). Se demostró que el Ca^{2+} del SR en el músculo disminuye progresivamente con la edad, y que esta reducción se correlaciona estrechamente con la pérdida de función muscular del envejecimiento (Delrio-Lorenzo et al., 2020). Además, dado que los nAChR son canales iónicos, cualquier alteración en el Ca^{2+} también podría perjudicar este proceso.

Este mecanismo está bien descrito en vertebrados, pero en invertebrados como *Drosophila melanogaster*, si bien la conexión entre mitocondrias, miofibrillas y el SR es conocida, el efecto de ACh sobre la liberación de Ca^{2+} para la contracción muscular aún

no se ha explorado completamente (Hagopian & Spiro, 1967; Delrio-Lorenzo et al., 2020). En los mutantes *park*, se ha observado un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, posiblemente debido a una disfunción en la regulación del Ca^{2+} mediada por la interacción entre el retículo endoplásmico (ER) y las mitocondrias (Ham et al., 2023). Se podría postular que procesos similares a los descritos en vertebrados podrían ocurrir y afectar la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} en los músculos de vuelo analizados. Por tanto, las moscas con silenciamiento colinérgico de *CG10932* podrían tener modificaciones en la homeostasis del Ca^{2+} producto de la modificación en los niveles de ACh, lo que influiría en la morfología y desempeño muscular.

Influencia de los lípidos

Además de las interpretaciones previamente discutidas, la participación de la proteína codificada por *CG10932* en la β -oxidación de lípidos, dentro de las mitocondrias agrega otra dimensión importante a la comprensión de los resultados observados. Recordando, *CG10932* codifica para una acetil-CoA-acetiltransferasa, una enzima crucial en la degradación de lípidos para la obtención de energía a través de la producción de acetil.coA que alimenta al ciclo de Krebs. La regulación adecuada del balance entre la síntesis y degradación de los lípidos dentro de las células, es esencial para, entre muchas cosas, la función de las membranas celulares, incluidas las membranas mitocondriales (Poulaki et al., 2022). Un equilibrio inadecuado en la formación de lípidos puede influir en la integridad y funcionalidad de las mitocondrias, lo que a su vez afecta la producción de energía y la homeostasis celular (Poulaki et al., 2022).

El silenciamiento colinérgico de *CG10932* reduciría la β -oxidación de lípidos en las mitocondrias de estas neuronas, lo que reduciría el aporte de acetil-coA al ciclo de Krebs al provisto por la glicólisis, reduciendo la producción de EROS y la carga de daño oxidativo en estas mitocondrias. Esto, en el contexto de la mutación *park* (moscas *RNAiCG10932-park*), podría reducir el estrés oxidativo en estas neuronas respecto al presente en los mutantes *park* (con niveles de estrés oxidativo y acumulación de mitocondrias defectuosas mayores), lo que lleva a la muerte de neuronas y degeneración muscular (Cackovic et al., 2018; Quinn et al., 2020). Esto aumentaría la supervivencia de las neuronas colinérgicas, indirectamente la de las neuronas dopaminérgicas, como discutimos anteriormente, y promovería la preservación de la estructura muscular y de sus mitocondrias. Pero la inhibición o reducción de la β -oxidación en las neuronas colinérgicas, podría llevar eventualmente a la acumulación de lípidos en tejidos como los músculos, algo que creemos ya se observa como regiones negras exclusivamente en los músculos de vuelo de las moscas *RNAiCG10932-park* y *RNAiCG10932* (Figura 12).

Debemos demostrar en un futuro si se trata o no de gotas de lípidos acumuladas en los músculos por marcadores lipídicos y análisis de las neuronas colinérgicas. De ser así, habría que encontrar o diseñar mecanismos adicionales para contrarrestar una excesiva acumulación de lípidos en el músculo que podría volverse lipotóxica a largo plazo (Birse & Bodmer, 2011; Liu et al., 2013).

Finalmente, en relación con los resultados de la locomoción, el aumento en el diámetro y la distancia entre las miofibrillas del músculo de vuelo de las moscas mutantes *park* podría contribuir a su déficit locomotor respecto a los otros genotipos analizados. La presencia de estos parámetros dentro de rangos normales, al silenciar *CG10932* en el contexto mutante *park* (moscas *RNAiCG10932-park*) mejoraría la locomoción de las moscas, pero no alcanzando niveles de locomoción normales como los observados en las moscas *wt*. Esto podría explicarse por la acción de otros mecanismos o factores contribuyendo a los déficits motores observados en los mutantes *park*, más allá de la regulación de la retroalimentación mecánica entre mitocondrias y miofibrillas, como los otros también discutidos anteriormente.

En resumen, la mejora de los fenotipos del músculo de vuelo y la habilidad locomotora observada en las moscas con silenciamiento colinérgico de *CG10932* en el contexto de la mutación del gen *park* (*RNAiCG10932-park*) respecto a las moscas mutantes *park*, puede estar mediada por una combinación de factores, incluyendo la modificación de las conexiones entre neuronas colinérgicas, glutamatérgicas y dopaminérgicas; la regulación del metabolismo de los lípidos y de la función mitocondrial; la retroalimentación mecánica de las mitocondrias con las miofibrillas musculares y la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} , entre otros. Estos resultados subrayan la complejidad de las interacciones celulares y sugieren que múltiples vías pueden contribuir a la restauración de la función muscular y locomotora en modelos de neurodegeneración, aunque el factor desencadenante de todos estos procesos en este caso particular parece ser la reducción de los niveles generales del neurotransmisor ACh.

EL SILENCIAMIENTO COLINÉRGICO DE CG10932 EN UN CONTEXTO MUTANTE PARKINA NO GENERA CAMBIOS SIGNIFICATIVOS EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO RESPECTO A LOS MUTANTES PARKINA

Comparando los resultados que obtuve de la supervivencia de moscas *wt* y *park* bajo estrés oxidativo inducido por adición de H_2O_2 a la comida, con aquellos de la

supervivencia de moscas *w^t* y *park* no sometidas a estrés oxidativo (extraídos de Silvera, C. 2023 y presentados en el Anexo), se observa una disminución drástica tanto en la vida media como en el tiempo total de supervivencia de las moscas sometidas a estrés respecto a las no tratadas, con una reducción aproximada del 86%.

Dado que estudios previos han demostrado que las mutaciones en el gen *park* resultan en niveles significativamente elevados de EROS endógeno (Adedara et al., 2022; Xiao et al., 2022), era esperable encontrar diferencias significativas en la supervivencia de las moscas mutantes *park* vs el resto de los genotipos analizados, acentuadas por la adición extra de H₂O₂ exógeno. Los niveles elevados de EROS endógeno en las moscas mutantes *park* deberían teóricamente repercutir negativamente en la tolerancia al estrés oxidativo por adición de H₂O₂ extra, disminuyendo así la supervivencia aún más que los otros genotipos. Sin embargo, no logramos diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los mutantes *park* vs el resto teniendo en cuenta todos los valores, pero visualizamos una posible tendencia al excluir el valor atípico observado en el grupo *park*. Esto sugiere que el silenciamiento colinérgico de *CG10932* podría tener un efecto positivo en la prolongación de la supervivencia bajo condiciones de estrés oxidativo. Deberíamos repetir los experimentos y aumentar el número de individuos analizados por genotipo para sacar mejores conclusiones.

Como perspectiva futura, sería valioso realizar mediciones de los niveles endógenos de EROS en los diferentes grupos experimentales. Esta información podría proporcionar una indicación más precisa de si el silenciamiento colinérgico del gen *CG10932* en un contexto de neurodegeneración realmente aumenta la tolerancia al estrés oxidativo en dichas moscas en comparación con las moscas mutantes *park*. Además, evaluar estos niveles podría ayudarnos a comprender mejor los mecanismos subyacentes a la mejora en la supervivencia observada y confirmar si el efecto positivo del silenciamiento colinérgico de *CG10932* en las neuronas dopaminérgicas PPL1, la morfología de los músculos de vuelo y la locomoción, está directamente relacionado con una reducción en la producción de EROS a nivel de las mitocondrias.

CONCLUSIONES

En resumen, esta tesis ha demostrado que el silenciamiento colinérgico de *CG10932* en un contexto de neurodegeneración dado por la mutación en el gen *park* no solo mejora la capacidad locomotora de las moscas y preserva los músculos de vuelo (similares a los *wt* en cuanto al diámetro de las miofibrillas y la distancia entre ellas), sino que también promueve el mantenimiento del número de neuronas dopaminérgicas en el protocerebro posterior lateral de las moscas.

Estos efectos podrían estar relacionados con cambios en los niveles de los neurotransmisores dopamina y la acetilcolina, así como con cambios en la regulación del calcio y el metabolismo de los lípidos, y la reducción del estrés oxidativo en las mitocondrias.

Además, esta tesis logró poner a punto el doble marcaje músculo-mitocondrias combinando el uso de Mitotracker y Faloidina, lo que ha permitido el análisis simultáneo por individuo y ampliado nuestro entendimiento de estos procesos complejos.

Queda pendiente profundizar en la investigación para confirmar el potencial neuroprotector del gen *CG10932* y explorar los mecanismos subyacentes involucrados.

TABLA 1. Resumen de los resultados que tienen diferencias significativas entre las moscas doble mutantes *RNAiCG10932-park* (experimental potencial neuroprotector) y las moscas *wt* y mutantes *park*. (control de neurodegeneración)

	<i>RNAiCG10932-park</i>	
	<i>park</i>	<i>Wild Type</i>
Número de neuronas dopaminérgicas PPL1	>	≈
Diámetro de Miofibrillas	<	≈
Distancia entre Miofibrillas	<	≈
Climbing	>	<

En la tabla, ">" indica que *RNAiCG10932-park* tiene ese parámetro mayor, "<" indica que es menor, y "≈" indica que es similar, con respecto a las moscas *park* y *wt*.

BIBLIOGRAFIA

Adams, M. D., et al., (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>.

Adedara, A.O., et al., (2022). An assessment of the rescue action of resveratrol in parkin loss of function-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Scientific reports*, 12(1), 3922. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07909-7>.

Agarwal, P., et al., (2018). MIND Diet Associated with Reduced Incidence and Delayed Progression of Parkinsonism in Old Age. *The journal of nutrition, health & aging*, 22(10), 1211-1215. <https://doi.org/10.1007/s12603-018-1094-5>.

Al-Sabri, M.H., et al., (2024). Fluvastatin-induced myofibrillar damage is associated with elevated ROS, and impaired fatty acid oxidation, and is preceded by mitochondrial morphological changes. *Scientific reports*, 14(1), 3338. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53446-w>.

Albin, R.L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences*, 12(10), 366-375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-x](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-x).

Ali, Y.O., et al., (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>.

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. (1978). "The laboratory culture of *Drosophila*". In *Ashburner M., Wright T.R.F. The genetics and biology of Drosophila*. 2A. Academic Press. 1-81.

Avellaneda, J., et al., (2021). Myofibril and mitochondria morphogenesis are coordinated by a mechanical feedback mechanism in muscle. *Nature communications*, 12(1), 2091. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22058-7>.

Balestrino, R., & Schapira, A.H.V. (2020). Parkinson disease. *European journal of neurology*, 27(1), 27-42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>.

Bennett PM, Ehler E, Wilson AJ. (2016). Sarcoplasmic reticulum is an intermediary of mitochondrial and myofibrillar growth at the intercalated disc. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 37:55-69. doi: 10.1007/s10974-016-9444-6.

Bertram L, Tanzi RE. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 115(6):1449-57. doi: 10.1172/JCI24761.

Bevilacqua B, et al., (2022). Vías de señalización de calcio y especies reactivas de oxígeno. Artículo de revisión bibliográfica [en línea]. Monografía de Pre Grado. Montevideo: Udelar. FM, 2022. 30 p.

- Birse RT & Bodmer R. (2011). Lipotoxicity and cardiac dysfunction in mammals and *Drosophila*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*.46(5):376-85. doi: 10.3109/10409238.2011.599830.
- Bolus, H., et al., (2020). Modeling Neurodegenerative Disorders in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3055. <https://doi.org/10.3390/ijms21093055>.
- Borowsky, B., et al., (2001). Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), 8966–8971. <https://doi.org/10.1073/pnas.151105198>.
- 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 Equality of Variances. *J of the American Statistical Association*, 69, 364–367.
- Cackovic, J., et al., (2018). Vulnerable Parkin Loss-of-Function *Drosophila* Dopaminergic Neurons Have Advanced Mitochondrial Aging, Mitochondrial Network Loss and Transiently Reduced Autophagosome Recruitment. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 39. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00039>.
- Cantera R, et al., (2002). Mutations in spalt cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development*. 129(24):5577-86. doi: 10.1242/dev.00158. PMID: 12421699.
- Cha, G. H., et al., (2005). Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of *Drosophila*. *PNAS*, 102(29), 10345–10350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500346102>.
- Chambers RP, et al., (2013). Nicotine increases lifespan and rescues olfactory and motor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*.15;253:95-102. doi: 10.1016/j.bbr.2013.07.020.
- Chen, Y., et al., (2018). Silencing the ACAT1 Gene in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Inhibits the Expression of Cyclo-Oxygenase 2 (COX2) and Reduces β -Amyloid-Induced Toxicity Due to Activation of Protein Kinase C (PKC) and ERK. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 9007–9018. <https://doi.org/10.12659/MSM.912862>.
- Chia, S. J., Tan, E. K., & Chao, Y. X. (2020). Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2464. <https://doi.org/10.3390/ijms21072464>.
- Church F. C. (2021). Treatment Options for Motor and Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *Biomolecules*, 11(4), 612. <https://doi.org/10.3390/biom11040612>.
- Connolly B.S., Lang A.E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review. *J. Am. Med. Assoc.* 311:1670–1683. doi: 10.1001/jama.2014.3654.

- Cookson, M. R., & van der Brug, M. (2008). Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein. *Experimental neurology*, 209(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.05.022>.
- Cooper RL, Neckameyer WS. (1999). Dopaminergic modulation of motor neuron activity and neuromuscular function in *Drosophila melanogaster*. *Comp BiochemPhysiol B Biochem Mol Biol*. 122(2):199-210. doi: 10.1016/s0305-0491(98)10160-8.
- Cotzias G.C., Papavasiliou P.S., Gellene R. (1969). Modification of Parkinsonism—Chronic treatment with L-Dopa. *N. Engl. J. Med.* 1969;280:337–345. doi: 10.1056/NEJM196902132800701.
- 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>.
- Delrio-Lorenzo, A., et al., (2020). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ decreases with age and correlates with the decline in muscle function in *Drosophila*. *Journal of cell science*, 133(6), jcs240879. <https://doi.org/10.1242/jcs.240879>.
- Deng, H., et al., (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *PNAS*, 105(38), 14503–14508. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803998105>.
- 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>.
- Deshpande, S. A., et al., (2020). Vesicular neurotransmitter transporters in *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1862(12), 183308. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183308>.
- Duffy J.B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 34(1-2), 1–15. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>.
- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(7), a028035. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>.
- Dumitrescu E, et al., (2023) Parkin Knockdown Modulates Dopamine Release in the Central Complex, but Not the Mushroom Body Heel, of Aging *Drosophila* *ACS Chemical Neuroscience* 14 (2), 198-208. DOI: 10.1021/acscchemneuro.2c00277.
- Dunn, O.J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6:241-252.
- Faust JE, et al., (2012). An inventory of peroxisomal proteins and pathways in *Drosophila melanogaster*. *Traffic*. 13(10):1378-92. doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01393.x.
- Favaro, G., et al., (2019). DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass. *Nature communications*, 10(1), 2576. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10226-9>.

- Ferreiro MJ, et al., (2012). Whole transcriptome analysis of a reversible neurodegenerative process in *Drosophila* reveals potential neuroprotective genes. *BMC Genomics*. 15;13:483. doi: 10.1186/1471-2164-13-483.
- Ferreiro MJ, et al., (2018). *Drosophila melanogaster* White Mutant w1118 Undergo Retinal Degeneration. *Front Neurosci*. 11:732. doi: 10.3389/fnins.2017.00732.
- 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>.
- Frank CA, James TD, Müller M. (2020). Homeostatic control of *Drosophila* neuromuscular junction function. *Synapse*.74(1):e22133. doi: 10.1002/syn.22133.
- Friggi-Grelin F, et al., (2003). Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol*. 54(4):618-27. doi: 10.1002/neu.10185.
- Funayama, M., et al., (2023). Molecular genetics of Parkinson's disease: Contributions and global trends. *J Hum Genet* 68, 125–130. <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01058-5>.
- Ganesan, S., Parvathi, V. (2021). Deconstructing the molecular genetics behind the PINK1/Parkin axis in Parkinson's disease using *Drosophila melanogaster* as a model organism. *Egypt J Med Hum Genet* 22, 86. <https://doi.org/10.1186/s43042-021-00208-2>.
- GBD (2016) Parkinson's Disease Collaborators (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Neurology*, 17(11), 939–953. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3).
- Giorgio, V., et al., (2018). Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell calcium*, 70, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.004>.
- Girden, E.R. (1992). ANOVA: Repeated Measures. Newbury Park, CA: Sage. <https://doi.org/10.4135/9781412983419>.
- Gómez-Chavarín, M., et al., (2014). Desarrollo de la vía dopaminérgica nigroestriatal. *Archivos de Neurociencias*, 19(2), 95-103. <https://doi.org/10.31157/an.v19i2.40>.
- GraphPadPrism 10 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).
- Greene, J.C., et al., (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *PNAS*, 100(7), 4078–4083. <https://doi.org/10.1073/pnas.0737556100>.
- Gupta AP. (1987). Arthropod Brain - Its Evolution, Development, Structure, and Functions. 1. New York: Wiley-Interscience.
- Haddad D, Nakamura K. (2015). Understanding the susceptibility of dopamine neurons to mitochondrial stressors in Parkinson's disease. *FEBS Lett*. 589(24 Pt A):3702-13. doi: 10.1016/j.febslet.2015.10.021.

- Hagopian, M., & Spiro, D. (1967). The sarcoplasmic reticulum and its association with the T system in an insect. *The Journal of cell biology*, 32(3), 535–545. <https://doi.org/10.1083/jcb.32.3.535>.
- Ham, S. J., et al., (2023). PINK1 and Parkin regulate IP₃R-mediated ER calcium release. *Nature communications*, 14(1), 5202. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40929-z>.
- Harrison, B.R., et al., (2020). The metabolome as a link in the genotype-phenotype map for peroxide resistance in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6739-1>.
- Heath, R. J., & Rock, C. O. (2002). The Claisen condensation in biology. *Natural product reports*, 19(5), 581–596. <https://doi.org/10.1039/b110221b>.
- Hoebel, B. G., Avena, N. M., & Rada, P. (2007). Accumbens dopamine-acetylcholine balance in approach and avoidance. *Current opinion in pharmacology*, 7(6), 617–627. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.10.014>.
- Hutter-Paier, B., et al., (2004). The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*, 44(2), 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.043>.
- Huttunen, H. J., et al., (2010). The acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor CI-1011 reverses diffuse brain amyloid pathology in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 69(8), 777–788. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181e77ed9>.
- 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>.
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 386(9996), 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).
- Keselman, H. J., & Rogan, J. C. (1977). The Tukey multiple comparison test: 1953–1976. *Psychological Bulletin*, 84(5), 1050–1056. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.84.5.1050>.
- Kitada, T., et al., (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605–608. <https://doi.org/10.1038/33416>.
- Krok, A.C., et al. (2023). Intrinsic dopamine and acetylcholine dynamics in the striatum of mice. *Nature* 621, 543–549. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05995-9>.
- Kuhl, D. E., et al., (1996). In vivo mapping of cholinergic terminals in normal aging, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 40(3), 399–410. <https://doi.org/10.1002/ana.410400309>.

- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47, 583-621. <http://dx.doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>.
- Leduc-Gaudet, J.-P., Hussain, S.N. and Gouspillou, G. (2022), Parkin: a potential target to promote healthy ageing. *J Physiol*, 600: 3405-3421. <https://doi.org/10.1113/JP282567>.
- Lees A.J., Tolosa E., Olanow C.W. (2015). Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr. *Mov. Disord.* 30:19–36. doi: 10.1002/mds.26120.
- Lemasters J. J. (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research*, 8(1), 3–5. <https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.3>.
- Lionaki, E., et al., (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>.
- Liu Z, Huang X. (2013). Lipid metabolism in Drosophila: development and disease, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Volume 45, Issue 1, Pp 44–50, <https://doi.org/10.1093/abbs/gms105>.
- Manchester Fly Facility. (2015) droso4schools. (s.f.). Droso4schools. <https://droso4schools.wordpress.com/>.
- McGeer, P. L., &McGeer, E. G. (1980). Chemistry of mood and emotion. *Annual review of psychology*, 31, 273–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.31.020180.001421>.
- McLelland, G., et al., (2014). Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO Journal*, n/a. <https://doi.org/10.1002/embj.201385902>.
- Menon, K. P., Carrillo, R. A., & Zinn, K. (2013). Desarrollo y plasticidad de la unión neuromuscular larval de la Drosophila. *Revisiones interdisciplinarias de Wiley. Biología del desarrollo*, 25), 647-670. <https://doi.org/10.1002/wdev.108>.
- 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>.
- Moehlman, A. T., Kanfer, G., & Youle, R. J. (2023). Loss of STING in parkin mutant flies suppresses muscle defects and mitochondria damage. *PLoS Genetics*, 19(7), e1010828. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010828>.
- Morgan, T. H. (1910). Sex Limited Inheritance in Drosophila. *Science*, 32(812), 120122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>.
- Murphy, S. R., et al., (2013). Acat1 knockdown gene therapy decreases amyloid- β in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(8), 1497–1506. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.118>.

- Narendra, D. P., et al., (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoSbiology*, 8(1), e1000298. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2021). *Lehninger principios de bioquímica* (8ª ed.). Omega Editores.
- Nitta, Y., & Sugie, A. (2022). Studies of neurodegenerative diseases using *Drosophila* and the development of novel approaches for their analysis. *Fly*, 16(1), 275–298. <https://doi.org/10.1080/19336934.2022.2087484>.
- Onishi, M., et al., (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *EMBO Journal*, 40(3). <https://doi.org/10.15252/emboj.2020104705>.
- Park, J., Lee, S. B., & Lee, Y. (2009). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*, 441(7097), 1157–1161. <https://doi.org/10.1038/nature04788>.
- Pasquini, J., Brooks, D. J., & Pavese, N. (2021). The Cholinergic Brain in Parkinson's Disease. *Movement disorders clinical practice*, 8(7), 1012–1026. <https://doi.org/10.1002/mdc3.13319>.
- Peto, R, Peto, J., (1972). Asymptotically efficient rank invariant test procedures. *Journal of the Royal Statistical Society*, 135 (2), pp. 185–207. https://www.jstor.org/stable/2344317?seq=1#page_scan_tab_contents.
- Pietrocola, F., et al., (2015). Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell metabolism*, 2(16), 805–821. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.014>.
- Pirrotta V. (1988). Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. *Biotechnology*. 10:437–56.
- Poulaki A & Giannouli S. (2022). Mitochondrial Lipids: From Membrane Organization to Apoptotic Facilitation. *Int J Mol Sci* 23(7):3738. doi: 10.3390/ijms23073738.
- Pyakurel, P., Shin, M., & Venton, B. J. (2018). Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) mediated dopamine release in larval *Drosophila melanogaster*. *Neurochemistry international*, 114, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.12.012>.
- Quinn PMJ, et al., (2020). PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. *Acta NeuropatholCommun*. 8(1):189. doi: 10.1186/s40478-020-01062-w.
- Ramanan VK & Saykin AJ. (2013). Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *Am J Neurodegener Dis*. 2(3):145-75.
- Reiter, L.T., et al., (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>.

- Restifo LL & White K. (1990). Molecular and genetic approaches to neurotransmitter and neuromodulator systems in *Drosophila*. *Adv Insect Phys* 22: 116–219. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60006-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60006-5).
- Rivlin-Etzion, M., et al., (2006). Basal ganglia oscillations and pathophysiology of movement disorders. *Current opinion in neurobiology*, 16(6), 629–637. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.10.002>.
- Rosenthal JS & Yuan Q. (2021). Constructing and Tuning Excitatory Cholinergic Synapses: The Multifaceted Functions of Nicotinic Acetylcholine Receptors in *Drosophila* Neural Development and Physiology. *Front Cell Neurosci*. 15:720560. doi: 10.3389/fncel.2021.720560.
- Rossi, A. E., & Dirksen, R. T. (2006). Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle & nerve*, 33(6), 715–731. <https://doi.org/10.1002/mus.20512>.
- Rossi AE, Boncompagni S, Dirksen RT. (2009). Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial symbiosis: Bidirectional signaling in skeletal muscle. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 37:29–35. doi: 10.1097/JES.0b013e3181911fa4.
- Rossi, D., et al., (2022). The Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle Cells: A Labyrinth of Membrane Contact Sites. *Biomolecules*, 12(4), 488. <https://doi.org/10.3390/biom12040488>.
- 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>.
- Safarpour, D., et al., (2015). Nursing home and end-of-life care in Parkinson disease. *Neurology*, 85(5), 413–419. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001715>.
- Schindelin, J., et al., (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Scott, D. A., et al., (2010). A Pathologic Cascade Leading to Synaptic Dysfunction in α -Synuclein-Induced Neurodegeneration. *The Journal Of Neuroscience* 30(24), 8083–8095. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1091-10.2010>.
- Seirafi, M., Kozlov, G., & Gehring, K. (2015). Parkin structure and function. *The FEBS journal*, 282(11), 2076–2088. <https://doi.org/10.1111/febs.13249>.
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B. and Chen, H.J. (1968). A Comparative Study of Various Tests of Normality. *Journal of the American Statistical Association*, 63, 1343–1372. <https://doi.org/10.1080/01621459.1968.10480932>.
- Shimura, H., et al., (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature genetics*, 25(3), 302–305. <https://doi.org/10.1038/77060>.

- Shin, M., Copeland, J. M., & Venton, B. J. (2018). *Drosophila* as a Model System for Neurotransmitter Measurements. *ACS chemical neuroscience*, 9(8), 1872–1883. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.7b00456>.
- Shin, M., Copeland, J. M., & Venton, B. J. (2020). Real-Time Measurement of Stimulated Dopamine Release in Compartments of the Adult *Drosophila melanogaster* Mushroom Body. *Analytical chemistry*, 92(21), 14398–14407. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02305>.
- Silva, B., et al., (2022). Glia fuel neurons with locally synthesized ketone bodies to sustain memory under starvation. *Nature metabolism*, 4(2), 213–224. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00528-6>.
- Silvera, C. (2023). Investigación de la potencial función neuroprotectora del gen pretaporter en un modelo de enfermedad de Parkinson [en línea] *Tesis de maestría. Montevideo :Udelar. FC – PEDECIBA*.
- Spillantini, M. G., et al., (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>.
- Sun, L., et al., (2015). Acetylcholine Attenuates Hypoxia/Reoxygenation Injury by Inducing Mitophagy Through PINK1/Parkin Signal Pathway in H9c2 Cells. *Journal of cellular physiology*, 231(5), 1171–1181. <https://doi.org/10.1002/jcp.25215>.
- Szrok-Jurga, S., et al., (2023). The Role of Acyl-CoA β -Oxidation in Brain Metabolism and Neurodegenerative Diseases. *International journal of molecular sciences*, 24(18), 13977. <https://doi.org/10.3390/ijms241813977>.
- Tissenbaum H. A. (2015). Using *C. elegans* for aging research. *Invertebrate reproduction & development*, 59(sup1), 59–63. <https://doi.org/10.1080/07924259.2014.940470>.
- Tolosa, E., et al., (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 20(5), 385–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2).
- Torres, A., & Guzmán, M. (2023). Neurotransmisores. Kenhub. <https://www.kenhub.com/es/library/fisiologia/neurotransmisores>.
- van der Kolk, N. M., et al., (2019). Effectiveness of home-based and remotely supervised aerobic exercise in Parkinson's disease: a double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet. Neurology*, 18(11), 998–1008. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30285-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30285-6).
- Venken, K. J., & Bellen, H. J. (2007). Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*. *Development (Cambridge, England)*, 134(20), 3571–3584. <https://doi.org/10.1242/dev.005686>.
- 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>.
- Wang, C., et al., (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>.

Wang, Q., Liu, Y., & Zhou, J. (2015). Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational neurodegeneration*, 4, 19. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0042-0>.

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>.

Whitworth, A. J., et al., (2005). Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a Drosophila model of Parkinson's disease. *PNAS*, 102(22), 8024–8029. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501078102>.

World Health Organization (2006). Neurological disorders : public health challenges. *World Health Organization*. <https://iris.who.int/handle/10665/43605>.

World Health Organization (2022). Parkinson disease: a public health approach. Technical brief. Geneva: Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Xiao, B., Kuruvilla, J., & Tan, E. K. (2022). Mitophagy and reactive oxygen species interplay in Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's disease*, 8(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00402-y>.

Yang, Y., et al., (2006). Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. *PNAS*, 103(28), 10793–10798. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602493103>.

Yang, J. S., et al., (2011). OASIS: online application for the survival analysis of lifespan assays performed in aging research. *PloSone*, 6(8), e23525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023525>.

Yildirim, K., et al., (2019). Drosophila glia: Few cell types and many conserved functions. *Glia*, 67(1), 5–26. <https://doi.org/10.1002/glia.23459>.

Yuan, N., & Lee, D. (2007). Suppression of excitatory cholinergic synaptic transmission by Drosophila dopamine D1-like receptors. *European Journal of Neuroscience*, 26. DOI: [10.1111/j.1460-9568.2007.05870.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05870.x)

Zhu, B., Yin, D., Zhao, H., & Zhang, L. (2022). The immunology of Parkinson's disease. *Seminars in immunopathology*, 44(5), 659–672. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00947-3>.

ANEXO:

TABLA 1. Resumen de todos los resultados de evaluación de parámetros locomotores y musculares, neuronas dopaminérgicas y supervivencia luego del estrés por H₂O₂

VARIABLE		park	RNAiCG10932_park	WT	RNAiCG10932
NEURONAS DOPAMINÉRGICAS PPL1	Shapiro-Wilk normality test W = 0.83957, p-value = 0.001124 Levene's Test for Homogeneity of Variance Df F value Pr(>F) group 2 6.9223 0.004656 *** 22 Kruskal-Wallis rank sum test Kruskal-Wallis chi-squared = 14.84, df = 2, p-value = 0.0005993	x̄: 7909 SD: 1,640 Std.Error of Mean: 0,4946 N: 11, Rango: 4 *** RNAi_park (p.aj: 3.6E-3)	x̄: 11,57 SD: 0,5345 Std.Error of Mean: 0,2020 N: 7, Rango: 1 *** park (p.aj: 3.6E-3)	x̄: 12,00 SD: 0,5774 Std.Error of Mean: 0,2182 N: 7, Rango: 2 **** park (p.aj: 2E-4)	
NUMERO DE FIBRAS	Shapiro-Wilk normality test W = 0.95312, p-value = 0.1522 Levene's Test for Homogeneity of Variance Df F value Pr(>F) group 3 0.6929 0.5636 30 Anova: Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F) GRUPO 3 26.88 8.960 2.183 0.111	x̄: 13.4 SD: 1.77 Std.Error of Mean: 0.625 N: 8, Rango: 5	x̄: 14.9 SD: 2.28 Std.Error of Mean: 0.722 N: 8, Rango: 6	x̄: 15.9 SD: 1.36 Std.Error of Mean: 0.479 N: 8, Rango: 3	x̄: 14.3 SD: 2.43 Std.Error of Mean: 0.861 N: 8, Rango: 7
		significancia: NS	significancia: NS	significancia: NS	significancia: NS
DIAMETRO	Shapiro-Wilk normality test W = 0.9431, p-value = 1.453e-14 Levene's Test for Homogeneity of Variance Df F value Pr(>F) group 3 9.2538 5.428e-06 **** 608 Kruskal-Wallis rank sum test Kruskal-Wallis chi-squared = 66.095, df = 3, p-value = 2.925e-14	x̄: 1.867 SD: 0.4750 Std.Error of Mean: 0.040 N: 144, Rango: 3.037 **** RNAi_park (p.aj: 1.34E-10) **** WT (p.aj: 1.65E-6)	x̄: 1.544 SD: 0.3395 Std.Error of Mean: 0.34 N: 180, Rango: 1.972 **** park (p.aj: 1.34E-10) **** RNAi (p.aj: 9.30E-9)	x̄: 1.6 SD: 0.2615 Std.Error of Mean: 0.022 N: 144, Rango: 1.415 **** RNAi (p.aj: 3.65E-5) **** park (p.aj: 1.65E-6)	x̄: 1.774 SD: 0.305 Std.Error of Mean: 0.025 N: 144, Rango: 1.995 **** WT (p.aj: 3.65E-5) **** RNAi_park (p.aj: 9.30E-9)
DISTANCIA ENTRE FIBRAS	Shapiro-Wilk normality test W = 0.43852, p-value < 2.2e-16 Levene's Test for Homogeneity of Variance Df F value Pr(>F) group 3 0.6101 0.6087 404 Kruskal-Wallis rank sum test Kruskal-Wallis chi-squared = 45.431, df = 3, p-value = 7.492e-10	x̄: 1.07 SD: 0.961 Std.Error of Mean: 0.0981 N: 96, Rango: 9.91 **** RNAi_park (p.aj: 5.29E-5) **** WT (p.aj: 794E-8) **** RNAi (p.aj: 1.55E-8)	x̄: 0.830 SD: 0.258 Std.Error of Mean: 0.0236 N: 120, Rango: 1.30 **** park (p.aj: 5.29E-5)	x̄: 0.812 SD: 0.560 Std.Error of Mean: 0.0571 N: 96, Rango: 5.73 **** park (p.aj: 794E-8)	x̄: 0.728 SD: 0.338 Std.Error of Mean: 0.0345 N: 96, Rango: 1.65 **** park (p.aj: 1.55E-8)
SARCOMERO	Shapiro-Wilk normality test W = 0.98918, p-value = 0.01296 Levene's Test for Homogeneity of Variance Df F value Pr(>F) group 3 1.6717 0.1729 335 Kruskal-Wallis rank sum test Kruskal-Wallis chi-squared = 40.369, df = 3, p-value = 8.9e-09	x̄: 2.87 SD: 0.360 Std.Error of Mean: 0.0405 N: 79, Rango: 1.78 *** RNAi (p.aj: 5.04E-4)	x̄: 2.77 SD: 0.276 Std.Error of Mean: 0.0276 N: 100, Rango: 1.59 **** RNAi (p.aj: 3.93E-8)	x̄: 2.77 SD: 0.330 Std.Error of Mean: 0.0369 N: 80, Rango: 1.67 **** RNAi (p.aj: 9.27E-7)	x̄: 3.05 SD: 0.296 Std.Error of Mean: 0.0331 N: 80, Rango: 1.40 **** WT (p.aj: 9.27E-7) **** RNAi_park (p.aj: 3.93E-8) **** park (p.aj: 5.04E-4)
CLIMBING	Shapiro-Wilk normality test W = 0.9801, p-value = 0.02676 Levene's Test for Homogeneity of Variance Df F value Pr(>F) group 3 2.027 0.1126 Kruskal-Wallis rank sum test Kruskal-Wallis chi-squared = 82.333, df = 3, p-value < 2.2e-16	x̄: 0.177 SD: 0.115 Std.Error of Mean: 0.0210 N: 30, Rango: 0.420 **** RNAi_park (p.aj: 4.78E-7) **** RNAi (p.aj: 9.43E-12) **** WT (p.aj: 2.86E-17)	x̄: 0.535 SD: 0.168 Std.Error of Mean: 0.0259 N: 42, Rango: 0.660 **** park (p.aj: 4.78E-7) *** WT (p.aj: 4.06E-4)	x̄: 0.754 SD: 0.158 Std.Error of Mean: 0.0288 N: 30, Rango: 0.500 **** park (p.aj: 2.86E-17) *** RNAi_park(p.aj: 4.06E-4)	x̄: 0.608 SD: 0.188 Std.Error of Mean: 0.0265 N: 50, Rango: 0.820 **** park (p.aj: 9.43E-12)

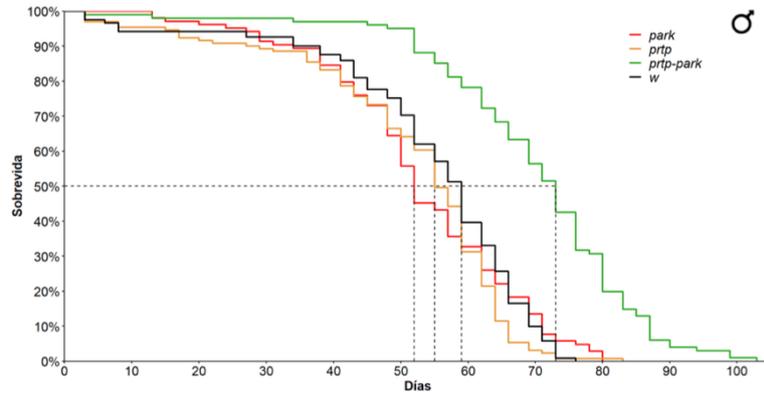


Figura Anexo. Curvas de sobrevivida de machos de *Drosophila melanogaster wt* ymutantes *park* no sometidos a estrés oxidativo. Análisis realizado mediante el método de Kaplan-Meier por Silvera, 2023.