



Ministerio  
**de Educación  
y Cultura**



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

# **Regulación glial y tamaño cerebral: el papel de Pretaporter en *Drosophila***

Trabajo final de carrera

Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UdelaR

Departamento de Neurofarmacología Experimental (DNFE)  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Bachiller Agustín Franco  
Orientadora: Dra. María José Ferreiro

Montevideo, Uruguay  
2025

## **Agradecimientos**

A los miembros del tribunal por el esfuerzo de leer y corregir la tesina en tiempo record.

A mi orientadora Maria José por tenerme mucha paciencia durante todo el proceso.

A la UdelaR por brindarme formación de calidad

A todos los miembros del DNFE que de alguna forma contribuyeron.

A Federico de la Plataforma de Citometría de Flujo del IIBCE.

A mis amigos que siempre me dieron para adelante

Y especialmente a mi familia que sin ellos nada hubiera sido posible.

# Índice:

<b>Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>4</b>
La glía y su rol conservado en el Sistema nervioso.....	4
Drosophila melanogaster como modelo para el estudio de la glía.....	7
El gen pretaporter de Drosophila y su eventual relevancia en la glía.....	10
<b>Hipótesis.....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>14</b>
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	14
<b>Metodología.....</b>	<b>15</b>
Diseño y generación de moscas transgénicas.....	15
Evaluación de expresión de Prtp en células gliales mediante inmunohistoquímica.....	17
Análisis por citometría de flujo del efecto de la expresión vs la falta de expresión del gen prtp sobre la población glial.....	19
<b>Resultados.....</b>	<b>21</b>
Pretaporter se expresa en células gliales.....	21
La falta de Prtp impacta en el tamaño del cerebro central.....	23
La falta de Prtp aumenta el número de glía.....	25
<b>Discusión.....</b>	<b>28</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>31</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>32</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>41</b>

## Resumen

La glía desempeña múltiples funciones esenciales para el sistema nervioso, incluyendo el soporte estructural, la modulación sináptica, la regulación homeostática, la defensa inmunitaria y la fagocitosis de sinapsis y detritos celulares, entre otras. En *Drosophila melanogaster*, el gen *pretaporter* (*prtp*), homólogo del gen humano TXNDC5, codifica una proteína homónima la cual reside en el retículo endoplasmático. Bajo condiciones de apoptosis celular, esta proteína se trasloca hacia la membrana plasmática, donde actúa como ligando fagocítico al interactuar con el receptor Draper. Sin embargo, su función en células gliales aún no ha sido explorada.

En este trabajo evaluamos la expresión de *prtp* en células gliales del cerebro adulto de *Drosophila melanogaster* y cómo la pérdida de función de este gen impacta sobre la morfología cerebral y la población glial. Para ello, generamos líneas de moscas transgénicas que expresan GFP en glía utilizando el sistema GAL4-UAS, tanto en individuos con expresión normal de *prtp* como en mutantes nulos para dicho gen. Mediante inmunohistoquímica y microscopía confocal, observamos que *prtp* se expresa en células gliales y que su ausencia determina un aumento significativo del tamaño cerebral.

Adicionalmente, desarrollamos un protocolo de disociación de cerebros de individuos adultos para analizar por citometría de flujo el contenido glial relativo a cada condición. Mediante esta técnica, evidenciamos un incremento en el porcentaje de células GFP+ en los individuos mutantes nulos para *prtp*, sugiriendo un aumento en el número de células gliales en estos individuos respecto a los que expresan normalmente este gen.

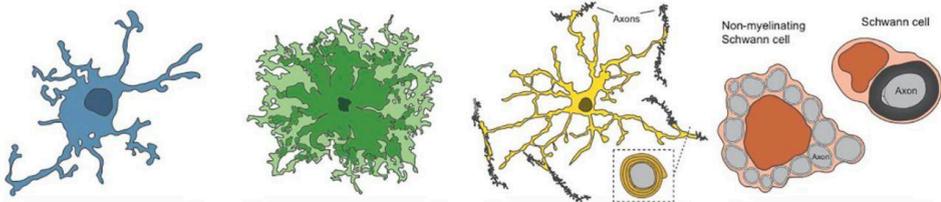
Nuestros resultados demuestran por primera vez la expresión de *prtp* en células gliales y sugieren que su función está relacionada con la regulación del número de glías. Estudios futuros serán necesarios para profundizar en este aspecto y evaluar si esta función se encuentra conservada en sus homólogos de otras especies.

# Introducción

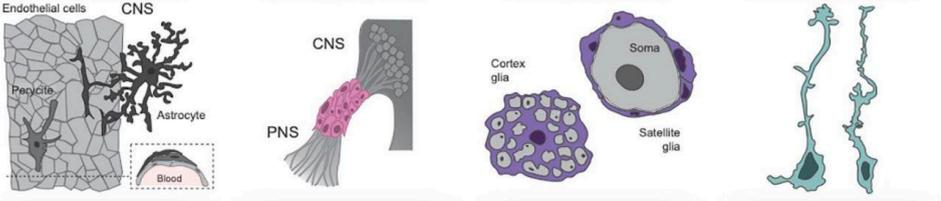
## La glía y su rol conservado en el Sistema nervioso

La glía es el conjunto de células no neuronales del sistema nervioso (SN), presentes a lo largo de la escala evolutiva, tanto en vertebrados como en invertebrados. Estas células desempeñan una amplia variedad de funciones, incluyendo el soporte estructural, el mantenimiento del ambiente extracelular, funciones tróficas, entre otras (Jäkel & Dimou, 2017). A diferencia de las neuronas, las glías no son células excitables, es decir, no tienen capacidad de responder eléctricamente cuando son estimuladas (Kandel et al., 2022), pero sí son células que responden a cambios del ambiente sistémico, como por ejemplo señales metabólicas, de estrés (Schipke & Kettenmann, 2004; Chowen et al., 2016). El número de células gliales varía según la especie evaluada. Mientras que en humanos la relación glía-neurona es de 1:1 (von Bartheld et al., 2016), en invertebrados como *Drosophila melanogaster* es de 1:10 (Freeman, 2015).

Inicialmente se creía que la glía cumplía únicamente funciones estructurales, actuando como un “pegamento” que mantenía unidas a las neuronas (Somjen, 1988). Actualmente se reconoce que, además de estas funciones, las células gliales desempeñan una amplia variedad de roles esenciales para el correcto funcionamiento del SN. Estas funciones incluyen la provisión de un microambiente estable para las neuronas, el suministro de factores tróficos, la participación activa en las sinapsis, la regulación de la homeostasis de neurotransmisores como el glutamato y el GABA, la formación de una barrera entre el sistema nervioso y el resto del medio interno, la participación en la inmunidad del sistema nervioso, la formación de vainas de mielina en vertebrados, entre muchas otras (Khakh & Sofroniew, 2015; Allen & Lyons, 2018). Por otro lado, la glía desempeña funciones claves durante el desarrollo del SN al determinar el número de células que se generan, la identidad neuronal, guiar el proceso axonal y regular el conexionado entre células (Freeman, 2015; Lago-Baldaia et al., 2020) (Figura 1).



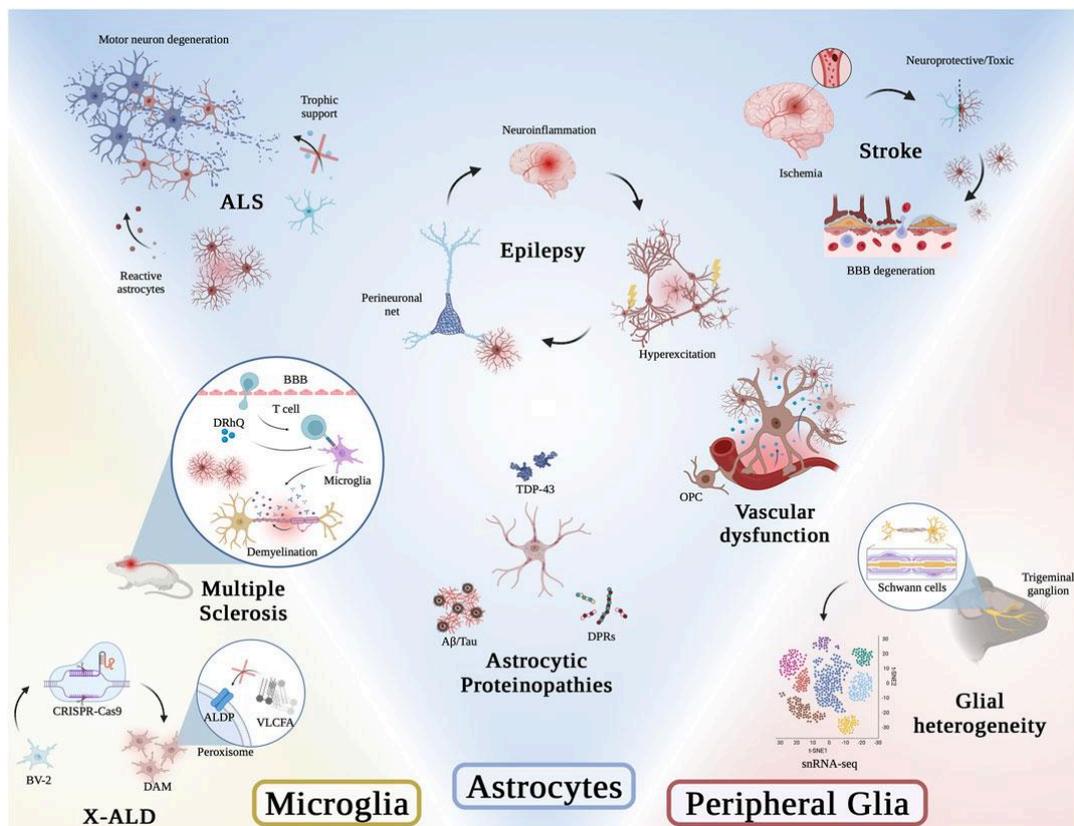
	<b>Microglia</b>	<b>Astrocytes</b>	<b>Oligodendrocytes</b>	<b>Schwann cells</b>
<b>General functions</b>	Immune surveillance; Cellular and axonal debris clearance; Extracellular matrix remodeling	Neurovascular coupling; Ion homeostasis; Neurotransmitter turnover; Synaptogenesis; Neuronal remodeling; Synapse and circuit function	Axon support; Central brain nerve myelination; Neuronal conductance; Metabolic support of neurons	Axon support; Peripheral nerve myelination or non-myelinated enwrapping; Neuronal conductance; Axonal debris clearance
<b><i>C. elegans</i></b>	Mesoderm-derived GLR glia	Cephalic Sheath glia	Cephalic Sheath glia (non-myelinating)	All sheath glia (non-myelinating)
<b><i>Drosophila</i></b>	Astrocytes; Ensheathing glia; Cortex glia	Astrocytes	Neuropil ensheathing glia; Embryonic longitudinal glia (both non-myelinating)	Peripheral ensheathing glia; Wrapping glia (both non-myelinating)
<b>Zebrafish</b>	Microglia	Astrocytes; Radial astrocytes; Bergmann glia, Müller glia	Oligodendrocytes	Remak (non-myelinating) and myelinating Schwann cells
<b>Rodents</b>	Microglia	Astrocytes; Bergmann glia, Müller glia	Oligodendrocytes	Remak (non-myelinating) and myelinating Schwann cells
<b>Human</b>	Microglia	Astrocytes; Bergmann glia; Müller glia	Oligodendrocytes	Remak (non-myelinating) and myelinating Schwann cells

	<b>Blood brain/nerve barrier</b>	<b>Transition zone glia</b>	<b>Soma-associated glia</b>	<b>Radial glia</b>
<b>General functions</b>	Regulated/selective interface between plasma circulation and nervous system	Delimitation of CNS-PNS boundary;	Metabolic/Trophic support; Cellular debris clearance; Axon regeneration	Neuronal and glial progenitor cells; Radial neuronal migration
<b><i>C. elegans</i></b>	Cephalic Sheath glia	Not determined	Not determined	Cephalic and Inner labial sheath glia (embryo); Amphid socket glia (larva)
<b><i>Drosophila</i></b>	Perineurial glia; Subperineurial glia	Peripheral ensheathing glia; Wrapping glia	Cortex glia	Not present (Neuroblasts)
<b>Zebrafish</b>	Percytes (CNS); Perineurial glia (PNS)	Motor exit point glia; Olfactory ensheathing glia	Satellite glia	Radial glia
<b>Rodents</b>	Percytes and Astrocytes (CNS); Perineurial glia (PNS)	Boundary cap cells; Olfactory ensheathing glia	Satellite glia	Radial glia
<b>Human</b>	Percytes and Astrocytes (CNS); Perineurial glia (PNS)	Boundary cap cells; Olfactory ensheathing glia	Satellite glia	Radial glia

**Figura 1. Subtipos gliales en el sistema nervioso central y periférico a lo largo de distintos modelos animales.** Se ilustran 8 subtipos principales de glia: microglía (azul), astrocitos (verde), oligodendrocitos (amarillo), células de Schwann (naranja), glía de barrera hematoencefálica o hematoneural (gris), glía de la zona de transición entre SNP y SNC (rosado), glía asociada a somas neuronales (violeta), y glía radial (celeste). En la parte inferior se detallan las funciones generales de cada subtipo así como las poblaciones gliales ortólogas identificadas en *C. elegans*, *Drosophila*, Zebrafish, roedores y humanos. Modificado de Kremer et al., 2021.

Adicionalmente, se reconoce que la glía tiene un importante rol en las enfermedades neurodegenerativas (EN), tales como el Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson (EP), Esclerosis lateral amiotrófica, etc (Kwon & Koh, 2020; Stoklund Dittlau & Freude, 2024) , enfermedades que afectan la estructura y función del SN de manera progresiva e irreversible. Gran cantidad de evidencia demuestra que estas células se encuentran alteradas en diversas EN, aunque resta aún determinar si los cambios morfológicos del SN presentes en estas enfermedades son causa o consecuencias de las alteraciones gliales (Sheeler et al., 2020; Bennett & Viaene, 2021). Alteraciones estructurales y funcionales en procesos fundamentales tales como el mantenimiento de las sinapsis, la integridad de la barrera hematoencefálica, el soporte metabólico, entre otros, características de algunas EN, pueden estar asociadas a alteraciones de la glía (Sadick et al., 2022; López-Muguruza & Matute, 2023). Aunque el desencadenante de esta disfunción glial es desconocido, se la ha establecido como uno de los factores que contribuyen a la muerte neuronal y a la progresión de las EN. (Barbeito et al., 2004; Dulamea, 2017; Kam et al., 2020; Pasinelli et al., 2024) (Figura 2)



**Figura 2. Participación de las células gliales en diversas patologías del sistema nervioso.** Se ilustra el rol que desempeñan la microglía, astrocitos y glía periférica en algunas enfermedades del sistema nervioso. Adaptado de Pasinelli et al. (2024)

La glía como componente fundamental del SN, sus principales características estructurales y funcionales se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución, tanto en vertebrados e invertebrados (DeSalvo et al., 2014; Sheloukhova & Watanabe, 2024). Esta conservación permite el uso de modelos invertebrados como *Drosophila melanogaster* para su estudio, lo cual representa una ventaja significativa debido, entre otros factores, al menor

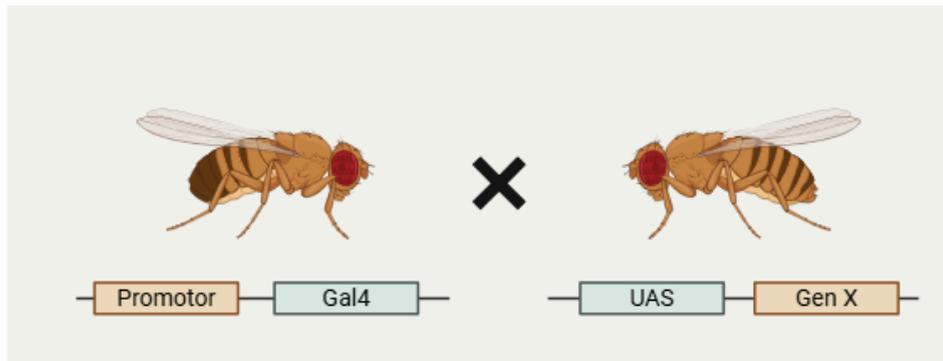
número de células neuronales y no neuronales de su SN, la relativa menor complejidad de sus conexiones sinápticas, la gran disponibilidad de herramientas genéticas y de manipulación que permiten sobre-expresar o silenciar genes específicos de manera célula, tejido o tiempo dependiente de forma más sencilla y las consideraciones éticas que facilitan su uso frente a modelos vertebrados (Pentreath, 1989; Coutinho-Budd & Freeman, 2013).

## ***Drosophila melanogaster* como modelo para el estudio de la glía**

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es un díptero de pequeño tamaño, con distribución mundial, y constituye un modelo ampliamente utilizado en experimentación debido a las múltiples ventajas que ofrece (Budelli et al., 2025). Posee un ciclo de vida corto, de aproximadamente 12 días a 25°C, durante el cual atraviesa por 4 estadios: embrión, larva, pupa y adulto (Ashburner & Thompson, 1978) . Su mantenimiento en el laboratorio es sencillo, ya que se requiere de poco espacio para desarrollar una gran cantidad de distintas cepas en simultáneo.

La genética de *Drosophila* es relativamente simple. Posee únicamente 4 pares de cromosomas, incluido un sistema de cromosomas sexuales XY similar al de mamíferos (Morgan, 1910). Además, su genoma se encuentra totalmente secuenciado y consta de aproximadamente 15.000 genes, muchos de los cuales presentan homólogos en humanos y otros animales (Adams et al., 2000). Actualmente se sabe que aproximadamente el 75% de los genes responsables de enfermedades en humanos encuentran un ortólogo en la mosca de la fruta (Reiter et al., 2001). Adicionalmente existen diversas bases de datos de acceso libre que recopilan valiosa información acerca de este organismo modelo, siendo la más destacada FlyBase (<https://flybase.org/>), que recopila datos de genes, líneas disponibles, herramientas de manipulación, recursos experimentales, protocolos, entre otros.

En la investigación con *Drosophila* se dispone de poderosas herramientas genéticas, entre las cuales se destaca el sistema transgénico GAL4-UAS de expresión ectópica (Brand & Perrimon, 1993), que fue utilizado en esta tesina (Fig. 3). Este sistema permite controlar la expresión de genes en células o tejidos específicos. Para ello, se emplea la secuencia GAL4, proveniente de levadura que codifica la proteína homónima, colocada bajo el control de un promotor específico endógeno del tejido (ej. promotor glial, es decir que se expresa únicamente en glía). Por otro lado, la secuencia de reconocimiento de la proteína GAL4, denominada UAS, se encuentra asociada al gen o secuencia de interés (por ejemplo, GFP, correspondiente a proteína verde fluorescente por su sigla en inglés). Al cruzar ambas líneas transgénicas GAL4 x UAS, la expresión del gen o secuencia de interés se activará únicamente en aquellas células donde se expresa el promotor específico acoplado a GAL4, a través de la producción de la proteína GAL4 y su unión a su secuencia de reconocimiento UAS (Brand & Perrimon, 1993). En el ejemplo particular antes mencionado, se expresará fluorescencia verde GFP únicamente en las glias a través de un promotor endógeno específico glial.



**Figura 3. Representación esquemática del sistema transgénico de expresión ectópica de *Drosophila* GAL4-UAS (Brand & Perrimon, 1993).** Se visualiza el macho transgénico portador de la secuencia GAL4 la cual se encuentra asociada a un promotor endógeno de *Drosophila* célula o tejido específico y a la hembra transgénica expresando el segundo componente del sistema, UAS, asociado a un gen X de interés. Imagen generada en <https://www.biorender.com/>.

El SNC de *Drosophila melanogaster* consta de un cerebro central (CB) y una cuerda nerviosa ventral (CNV) y se encuentra organizado en dos regiones bien diferenciadas: la corteza neuronal y el neuropilo (*Atlas of Drosophila Development by Volker Hartenstein*, s. f.; Contreras & Klämbt, 2023) (Figura 4). La corteza neuronal es la región externa en la cual se encuentran los somas neuronales así como prolongaciones gliales recubriendo dichos somas. En el interior de la corteza se encuentra el neuropilo, región caracterizada por la presencia de axones y dendritas, gran cantidad de sinapsis, y prolongaciones gliales que regulan el entorno sináptico (Freeman, 2015).

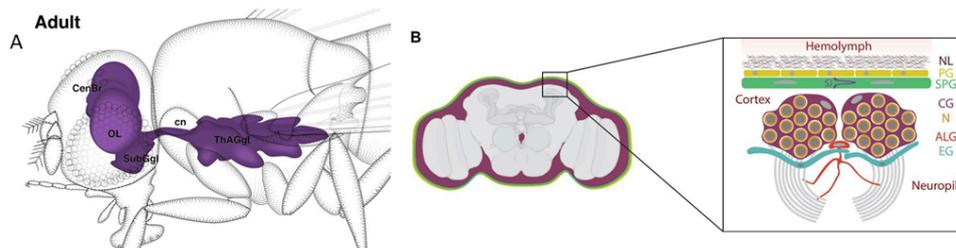
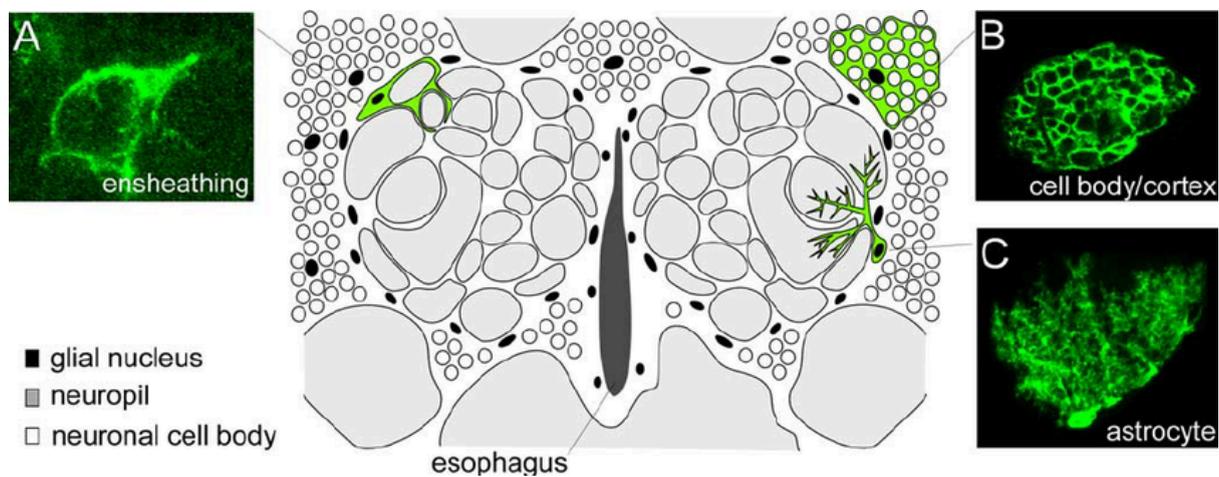


Figura 4. En A organización del sistema nervioso del adulto de *Drosophila melanogaster*. Se visualiza el cerebro central (CenBr), uno de los lóbulos ópticos (OL), ganglio subesofágico (SubGgl), el conectivo cervical (cn) y el ganglio torácico abdominal (ThAGgl) Adaptado de FlyBrain Atlas – Glia. En B organización microscópica del cerebro adulto de *Drosophila melanogaster*. En amarillo y verde se muestra la barrera hematoencefálica formada por la glía perineuronal (PG) y la glía subperineuronal (SPG). En violeta la corteza donde se encuentran los somas de neuronas (N) rodeados por glía cortical (CG) y asociados a la glía similar a astrocitos (ALG) y la glía de recubrimiento (EG). Modificado de Contreras et. al. 2023.

La glía en *Drosophila* comparte las principales características estructurales y funcionales con la glía de otros invertebrados y la de vertebrados. (Freeman & Doherty, 2006). Participa

activamente en la sinapsis, en la recaptación de neurotransmisores, brinda soporte estructural y metabólico, participa en la inmunidad, entre otras funciones (Yildirim et al., 2019). Se subdivide en diferentes subtipos, cada uno con funciones particulares (Figura 5). Estos incluyen la glía perineuronal (PG), la glía subperineuronal (SPG), glía cortical (CG), glía astrocítica (similar a astrocitos, ALG) y la glía de recubrimiento (Awasaki et al., 2008; Edwards & Meinertzhagen, 2010; Yildirim et al., 2019). La identidad de estos subtipos de glía se encuentra determinado por la expresión del factor de transcripción Reverse Polarity (Repo), cuya expresión queda limitada únicamente a la mayor parte de la glía por lo que se utiliza ampliamente como marcador específico panglial (Yuasa et al., 2003; Stork et al., 2012). La excepción es la glía medial la cual no expresa repo debido a que tiene un origen embrionario diferente al resto de los subtipos gliales antes mencionados (Howard et al., 2019). Además de estas diferencias morfológicas y funcionales, cada subtipo presenta un perfil particular de expresión de marcadores moleculares, lo cual constituye una herramienta valiosa para su caracterización (Kremer et al., 2017)



**Figura 5. Representación esquemática y por microscopía de fluorescencia de los tres subtipos principales de glía en *Drosophila* en un corte de cerebro adulto.** Notar la organización del cerebro, la localización del neuropilo y de los cuerpos neuronales. Se esquematiza la disposición de los núcleos gliales y de sus prolongaciones. En A, B y C se muestran a la glía de recubrimiento (ensheathing, EG), la glía cortical (CG) y la glía similar a astrocitos (ALG), respectivamente, marcadas mediante técnica de inmunofluorescencia verde. Figura obtenida de Doherty et. al. (2009).

La glía de superficie, que incluye a la glía PG y SPG, está compuesta por dos capas de células que recubren la superficie del SN y lo separan de la hemolinfa (Awasaki et al., 2008 y figura 4B). La formación de esta barrera hematoencefálica es fundamental para el aislamiento del SN del resto del medio interno (Abbott et al., 2006). La capa más externa se encuentra constituida por la glía perineuronal y consta de células pequeñas que permanecen mitóticamente activas en la adultez, actuando como nichos de generación de nueva glía. Bajo ciertas condiciones esta glía puede proliferar y originar distintos subtipos gliales, actuando como progenitores gliales multipotentes (Bauke et al., 2015; Omoto et al., 2016). Por debajo de la glía perineuronal se encuentra la glía SPG, formada por células grandes y aplanadas unidas entre sí mediante uniones estrechas, lo cual restringe el pasaje de moléculas por vía paracelular desde la hemolinfa hacia el SN (Banerjee et al., 2008; von Hilchen et al., 2008). Adicionalmente, bajo determinadas condiciones, en respuesta a

estímulos nutritivos por ejemplo, la glía SPG puede secretar factores que activan a neuroblastos (células progenitoras del SN) que se encuentran quiescentes, estimulando su diferenciación (Sousa-Nunes et al., 2011).

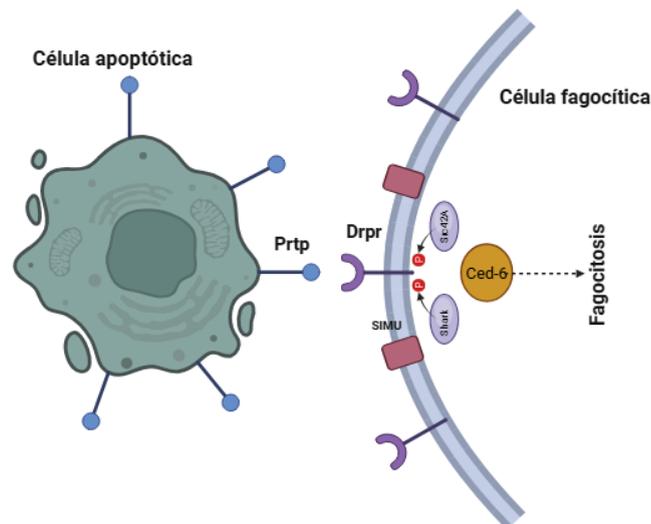
La glía CG se localiza en la corteza, debajo de la glía de superficie. Presenta una morfología compleja, ya que extiende procesos a lo largo de toda la corteza formando una red que envuelve los cuerpos neuronales (Pereanu et al., 2005). Esta glía también tiene la capacidad de activar neuroblastos y contribuir a la neurogénesis (Morante et al., 2013). Además, se cree que durante el desarrollo podría modular el comportamiento neuronal a través de su interacción con la glía ALG (Yildirim et al., 2019).

La glía del neuropilo comprende a la glía ALG y la glía EG. Los somas de estas células se encuentran en la interfase entre la corteza y el neuropilo, sitio caracterizado por la presencia de las prolongaciones neuronales que se interconectan y por la ausencia de cuerpos neuronales (Omoto et al., 2015; Vargas-Barroso & Larriva-Sahd, 2013). La ALG extiende prolongaciones hacia el neuropilo, donde se asocia estrechamente con las prolongaciones neuronales, especialmente en los sitios sinápticos. Estas células expresan transportadores para neurotransmisores clave, como el glutamato y el GABA, participando así en el metabolismo de estos mediante su recaptación, al igual de lo que ocurre en las sinapsis de mamíferos (Omoto et al., 2015; Stacey et al., 2010). Adicionalmente, poseen capacidad fagocítica, ya que expresan el receptor fagocítico Draper (Drpr), que reconoce y se une a diversos receptores de superficie expresados, por ejemplo, en células apoptóticas, como el receptor Pretaporter (Prtp), promoviendo su fagocitosis a través de las glías (Kuraishi et al., 2009). Esto permite no solo la fagocitosis de células apoptóticas sino también llevar a cabo el proceso de poda sináptica, un mecanismo esencial durante la metamorfosis de *Drosophila* (Tasdemir-Yilmaz & Freeman, 2014). La glía EG extiende procesos que envuelven el neuropilo, aislándolo de la corteza. A diferencia de la glía ALG, sus prolongaciones no penetran en el neuropilo, sino que lo rodean completamente (Doherty et al., 2009). Esta glía también expresa Drpr y el receptor dCed-6, lo que le permite fagocitar detritos axonales producto de eventuales daños en las neuronas (Doherty et al., 2009).

## **El gen *pretaporter* de *Drosophila* y su eventual relevancia en la glía**

*Pretaporter* (*prtp*, CG1837) es un gen ubicado en el cromosoma sexual X de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (<https://flybase.org/reports/FBgn0030329.htm>), cuyo ortólogo en humanos es el gen TXNDC5 ([https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc\\_id/21073](https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/21073)). Codifica la proteína Pretaporter (Prtp), que pertenece a la familia de proteínas disulfuro isomerasas, y consta de 416 aminoácidos. La proteína presenta un motivo de retención en el retículo endoplasmático (RE), 3 dominios tipo tiorredoxinas y una secuencia péptido señal en el extremo N-terminal (Kuraishi et al., 2009). Reside normalmente en el RE y en el sistema de endomembranas; además nuestro grupo de investigación reportó su presencia dentro del núcleo celular (Silvera & Ferreira, 2024).

Las funciones de Prtp no han sido exploradas en detalle. Sin embargo, se le predicen posibles funciones basadas en sus dominios estructurales (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR005788/>) y en la relación del gen *prtp* con genes ancestrales que desempeñaban funciones similares (Tesis de Maestría de [Silvera C, 2023](#)). Gracias a sus dominios disulfuro isomerasas (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9VYV3>) Prtp catalizaría el rearreglo de puentes disulfuro de proteínas, contribuyendo así en su correcto plegado. Los dominios tiorredoxinas le conferirían capacidad oxidorreductasa, capacidad que contribuye a la homeostasis redox de las células, un proceso esencial para su supervivencia (Okumura et al., 2015; Tretter et al., 2021). Estos dominios tiorredoxina, también mediarían la unión de Prtp al receptor fagocítico Drpr antes mencionado, presente en la superficie de células con capacidad fagocítica como la glía ALG y la EG (<http://flybase.org/reports/FBgn0027594.htm>)(Figura 6), durante el proceso de apoptosis celular, que ocurre tanto en el desarrollo como en respuesta a estresores celulares. Durante este proceso, Prtp juega un rol fundamental, siendo hasta el momento su única acción demostrada (Doherty et al., 2009; Fujita, 2012; Kuraishi et al., 2009). Se trasloca desde el lumen del RE hacia la superficie celular de la célula apoptótica y se une con Drpr, presente en la membrana celular de la célula fagocítica, induciendo así la fagocitosis de la célula apoptótica (Kuraishi et al., 2009) (Figura 6).

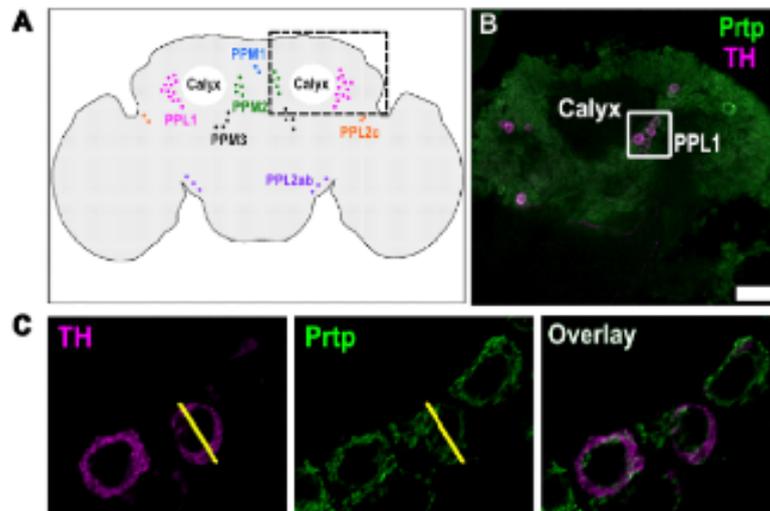


**Figura 6. Representación esquemática de la interacción entre Prtp y Drp en el proceso de fagocitosis de células apoptóticas.**

SIMU: six-microns-under. Ced-6. Imagen generada en <https://www.biorender.com/>.

Adicionalmente, trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación liderado por la orientadora de mi tesina, la Dra Ferreiro, sugirieron la potencial asociación de *prtp* con procesos neurodegenerativos (Silvera C, 2023; (Silvera et al., 2025), revisado en (Budelli et al., 2025)). Esta relación fue explorada mediante estudios de transcriptómica comparativa de embriones de *Drosophila melanogaster* de un estadio de desarrollo que presentaba características histológicas de neurodegeneración respecto a un estadio de reversión histológica de este proceso o estadio de neuroprotección (Ferreiro et al., 2012) en un modelo de neurodegeneración reversible (Cantera et al., 2002). Se identificaron diversos genes expresados diferencialmente como potenciales genes candidatos a neuroprotectores o a ser asociados a procesos de neurodegeneración conservados, observándose una reducción significativa en la expresión de *prtp* en la etapa de neuroprotección respecto a la

etapa previa de neurodegeneración (Ferreiro et al., 2012). Posteriormente, se evaluó el efecto de la ausencia de expresión de *prtp* en adultos de *Drosophila melanogaster*, en un contexto de neurodegeneración dado por la mutación del gen *parkina* (*park*), homólogo al gen humano PARK2, asociado a EP (Silvera, C. 2023; (Silvera et al., 2025)). En este trabajo se demostró por primera vez la expresión normal de *prtp* en neuronas dopaminérgicas de moscas WT (usualmente afectadas en EP) y que la falta de expresión del gen en un contexto mutante *park* protege de la pérdida de estas neuronas mejorando tanto la supervivencia como la movilidad de los individuos mutantes (Figura 7).



**Figura 7. Expresión de Pretaporter en neuronas dopaminérgicas del cerebro de machos de *Drosophila* de 5 días de edad.** En A representación de los grupos de neuronas dopaminérgicas. En B imagen confocal de una región correspondiente al recuadro punteado de A. Se muestra la tinción para Prtp (verde) y para tiroxina hidroxilasa (TH)(magenta), enzima expresada en neuronas dopaminérgicas. Imagen obtenida con el objetivo 40x, barra de escala = 20um. En C ampliación de recuadro en B. Se observa la colocalización de la señal TH y Prtp, indicando la expresión de *prtp* en las neuronas dopaminérgicas. Imagen obtenida con el objetivo 63x. Figura extraída de Silvera et. al. 2025.

Durante el transcurso de estos últimos experimentos de caracterización de la expresión de *prtp* en neuronas dopaminérgicas, nuestro grupo de investigación realizó una nueva observación original, que sugería una aparente diferencia en el tamaño cerebral de individuos con y sin expresión del gen *prtp*. Esto resultaba interesante de explorar a futuro y podía sugerir, dado el patrón de distribución "pan-cerebral" del anticuerpo anti-Prtp más allá de las neuronas dopaminérgicas analizadas, una eventual expresión y rol de Prtp también en las glías de *Drosophila*.

Dado estos antecedentes asociados a *prtp*, y teniendo en cuenta el papel preponderante que tiene la glía a lo largo de la escala evolutiva en el mantenimiento del SN en condiciones

normales y patológicas, como en el caso de las EN como la EP, nos propusimos en este trabajo de tesina de grado para la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas de la FCien-UdelaR, evaluar la expresión Prtp en células gliales de cerebros adultos de *Drosophila melanogaster* y si su deficiencia impacta o altera a la glía.

## Hipótesis

La hipótesis de este trabajo plantea que *pretaporter* se expresa en células gliales de *Drosophila melanogaster* y que su ausencia altera la homeostasis glial afectando el número de glías.

## Objetivos

### Objetivo general

Determinar la expresión de Pretaporter en células gliales de cerebros adultos de *Drosophila melanogaster* y si su ausencia afecta a dichas células, incidiendo en el tamaño cerebral.

### Objetivos específicos

1. Diseñar y realizar cruces de moscas *Drosophila melanogaster* para obtener moscas transgénicas que expresen la proteína fluorescente verde (GFP) exclusivamente en la glía, tanto en un contexto de expresión normal del gen *pretaporter* como en el mutante nulo para este gen (*prtpΔ1*).
2. Determinar la expresión de Pretaporter en células gliales de cerebros de adultos de *Drosophila melanogaster* normales.
3. Determinar si la falta de expresión de *pretaporter* genera cambios en el número de glías y si esto incide en el tamaño del cerebro central de adultos de *Drosophila melanogaster*.

# Metodología

## Diseño y generación de moscas transgénicas

En este trabajo utilicé moscas machos y hembras vírgenes de las siguientes cepas: wild-type Oregon R (*WT*), como control normal, cepa R14, la cual es portadora del driver específico pan-glial *repo-gal4*, cepa R22, la cual contiene *UAS-CD8GFP* como el segundo componente del sistema bipartito transgénico Gal4-UAS, y la cepa R44 la cual contiene el alelo de pérdida de función del gen *prtpΔ1* (abreviado más adelante a lo largo de la tesina como “*prtp-*”). Los genotipos específicos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Genotipos de moscas parentales utilizadas.**

Wild-type (WT)	
R14	<i>X; +/+; repo-gal4/TM3</i>
R22	<i>X; UAS-CD8GFP/UAS-CD8GFP; UAS-CD8GFP/UAS-CD8GFP</i>
R44	<i>X<sup>w1118prtpΔ1</sup>/X<sup>w1118prtpΔ1</sup> ; if/+; TM2/+</i>

Los punto y coma separan el cromosoma sexual, el cromosoma II y el III. CD8GFP expresa GFP en la membrana celular de las células acopladas al GAL4, luego de generar el cruce específico de parentales. TM2 y TM3: balanceadores del cromosoma III que impiden la recombinación y permiten rastrear la segregación de la marca de interés presente en su cromosoma homólogo (ej. *repoGAL4*).

Las moscas fueron mantenidas bajo condiciones estándar: en estufa húmeda a temperatura cercana a los 25°C, con ciclo luz-oscuridad de 12/12 horas y en medio de cultivo estándar compuesto de agua, levadura, agar, glucosa, harina de maíz, Nipagin y ácido propiónico (Silvera C., 2023).

Para la colecta y el sexado de pupas y moscas adultas, la selección de fenotipos y la identificación de hembras vírgenes utilicé lupa estereoscópica (WESO SM-300 SERIES), empleando trietilamina como anestésico.

Para la generación de las moscas transgénicas de interés, a partir de las cepas anteriormente descritas en la Tabla 1, utilicé una herramienta genética fundamental en *Drosophila*: los cromosomas balanceadores. Los balanceadores son cromosomas que contienen múltiples inversiones y reordenamientos, lo cual restringe la recombinación génica, permitiendo la segregación de genes en el mismo orden que se encuentran en el cromosoma, independientemente de su distancia y permitiendo el seguimiento dentro de la

progenie de marcas genotípicas no visibles a simple vista. Se utilizan fundamentalmente para mantener alelos deletéreos, mutaciones, transgenes los cuales se encuentran en heterocigosis en su cromosoma homólogo. Una característica clave de los balanceadores es que los mismos son letales en homocigosis, lo cual asegura que cuando sus marcas dominantes asociadas características son observables en la mosca adulta, es únicamente debido a su presencia en heterocigosis (Miller et al., 2019).

Además de utilizar las marcas fenotípicas asociados a los cromosomas balanceadores para la identificación de los genotipos de interés, recurrí a su clasificación por emisión de fluorescencia verde en aquellas moscas las cuales combinan *repo-gal4* x *UAS-CD8GFP*. Esto fue visualizado bajo la lupa de epifluorescencia con filtro para visualizar la emisión de GFP en verde, respecto a moscas normales y control parental que no emiten fluorescencia..

La generación de las moscas transgénicas de interés involucró los siguientes cruces:

#### Cruce 1

♂ *repo-gal4/TM3*, x ♀ *UAS-CD8GFP/UAS-CD8GFP; UAS-CD8GFP/UAS-CD8GFP*

Seleccioné los individuos F1 con el siguiente genotipo

♂ *X/Y; +/UAS-CD8GFP; repo-gal4/UAS-CD8GFP*

Fenotípicamente esta F1 tiene su glía fluorescente ya que expresa la GFP en la mayoría de las células gliales.

Adicionalmente, con el objetivo de combinar la mutación de la glía fluorescente con la falta de función de *prtp*, realicé los siguientes cruces:

#### Cruce 2

♀ *w<sup>1118</sup>prtpΔ1; if/+; TM2/+* x ♂ *UAS-CD8GFP/UAS-CD8GFP; UAS-CD8GFP/UAS-CD8GFP*

Seleccionando la F1<sub>A</sub> con el genotipo:

♂ *w<sup>1118</sup>prtpΔ1/Y; TM2/ UAS-CD8GFP; +/UAS-CD8GFP*

#### Cruce 3

♀ *w<sup>1118</sup>prtpΔ1; if/+; TM2/+* x ♂ *repo-gal4/TM3*

Seleccioné la F1<sub>B</sub> con el genotipo:

♂ *w<sup>1118</sup>prtpΔ1/Y; +/+; TM2/repo-gal4*

#### Cruce 4

En este cruzamiento crucé a los individuos seleccionados en la F1<sub>A</sub> del cruce 2 con hembras del stock R44.

♀ *w<sup>1118</sup>prtpΔ1/w<sup>1118</sup>prtpΔ1; if/+; TM2/+* x ♂ *w<sup>1118</sup>prtpΔ1; TM2/ UAS-CD8GFP; +/UAS-CD8GFP*

Seleccioné los individuos:

♀ *w<sup>1118</sup>prtpΔ1/w<sup>1118</sup>prtpΔ1; +/UAS-CD8GFP; +/UAS-CD8GFP*

### Cruce 5

♀ *w<sup>1118</sup>prtpΔ1; +/UAS-CD8GFP; +/UAS-CD8GFP* x ♂ *w<sup>1118</sup>prtpΔ1/Y; +/+; TM2/repo-gal4*

De este cruce seleccioné los individuos:

♂ *w<sup>1118</sup>prtpΔ1; +/UAS-CD8GFP; repo-gal4/UAS-CD8GFP*

Estos últimos son experimentales *prtp*-; *repoGFP*.

## **Evaluación de expresión de Prtp en células gliales mediante inmunohistoquímica**

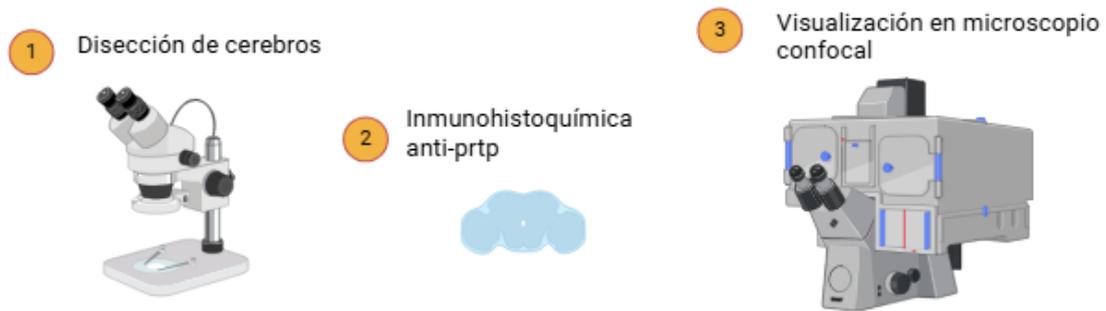
Con el fin de determinar si Prtp se expresa en células gliales utilicé moscas machos de 5 días de edad provenientes de las cepas *WT*, *prtp;repoGFP* y *prtp-; repoGFP*. Disequé cerebros completos (whole mount) de cada cepa utilizando pinzas de precisión DUMONT 5 bajo lupa estereoscópica en PBS 1X frío (n = 6-8 por genotipo) Figura 8.

Me basé fundamentalmente en el protocolo previamente puesto a punto en nuestro grupo (Silvera C., 2023; (Silvera et al., 2025). Fijé los cerebros en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente lavé los mismos dos veces en PBS 1X y una vez en PBS-Triton X-100 0,5% (PBS-T) durante 15 minutos en hielo con agitación suave. Luego incubé las muestras en PBS-Triton X-100 0,5% y albúmina de suero bovino (BSA) 0,1% (PBSTA) durante 1 hora sobre hielo en agitación. Incube las muestras en solución con anticuerpo primario anti-Prtp de rata (gentilmente cedido por el Dr. Nakanishi, Kanazawa University, Japan; (Kuraishi et al., 2009) (dilución 1:300 en PBSTA) por 60 horas a 4°C. Pasado este tiempo, retiré la solución con el anticuerpo primario y lavé cuatro veces con PBS-T por 15 minutos en hielo con agitación suave. Posteriormente incubé las muestras con anticuerpo secundario anti-rata-Cy3 (dilución 1:1000 en PBSTA con suero normal de cabra 2%) por 2 horas en hielo con agitación suave en oscuridad. Lavé tres veces en PBS-T 0,1% y dos veces en PBS 1X por 5 minutos de duración de cada lavado, en frío, con agitación y en oscuridad. Finalmente almacené las muestras a 4°C en glicerol al 80% en Tris pH = 8.

Para el montaje y observación de las muestras, generé cámaras con cinta aisladora negra en cada lámina portaobjetos o cubreobjetos, y deposité cada cerebro en una cámara

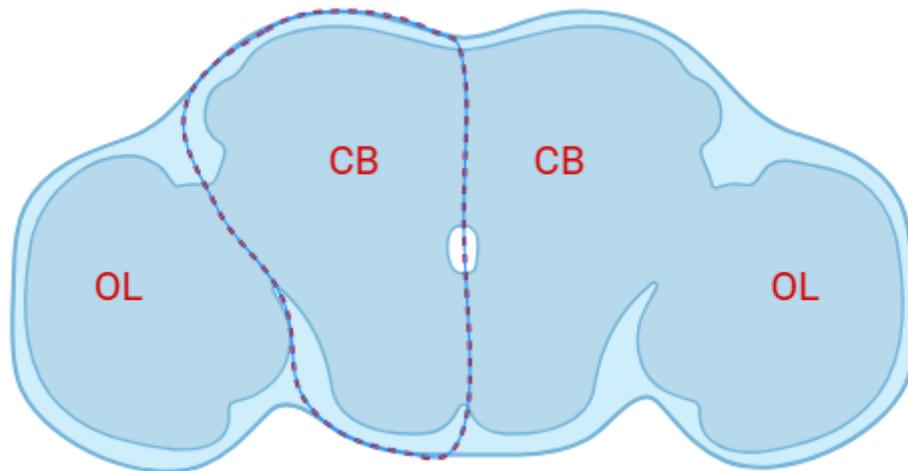
utilizando glicerol 80% en Tris pH = 8. Cubrí los preparados con un cubreobjetos y lo sellé utilizando esmalte de uñas transparente (Silvera, C. 2023).

Visualicé las muestras utilizando microscopía láser confocal, en el microscopio institucional del IIBCE modelo LSM ZEISS 800 AiryScan. Empleé los láseres 488 nm para visualizar el GFP (en verde) y el 561 nm para visualizar el fluoróforo Cy3 (en rojo). Tomé las imágenes utilizando el objetivo 20X (AN = 0,5) y el objetivo de inmersión 63X (AN = 1,40).



**Figura 8. Determinación de la expresión de Prtp en células gliales GFP+ de cerebros adultos por microscopía confocal (Plataforma IIBCE).** Se resumen los diferentes pasos en la evaluación de la expresión de Prtp en células gliales. En 1 la lupa estereoscópica bajo la cual se realizó la disección de los cerebros. Posteriormente, en 2, seguí el protocolo de inmunohistoquímica anti-Prtp puesto a punto por Silvera, C., 2023. En 3 la visualización de las muestras utilizando el microscopio confocal institucional del IIBCE modelo LSM ZEISS 800 AiryScan. Imagen generada en <https://www.biorender.com/>.

Puse a punto un protocolo reproducible de medición comparativa de áreas cerebrales de cerebros adultos (Figura 9). Medí las áreas del hemisferio central de cada genotipo utilizando el software ZEN 3.11 (ZEN lite) de Zeiss y las comparé utilizando el programa estadístico GraphPad Prism. Seleccioné esta región porque estudios previos han documentado cambios en el número de células gliales durante la vida adulta (Awasaki et al., 2008; Foo et al., 2017). Para el análisis estadístico, utilicé el test de normalidad de Shapiro-Wilk y, en función de los resultados, realicé un ANOVA de una vía. Establecí como valor de significancia un valor de  $p = 0.05$ . Los gráficos fueron generados en el mismo programa.



**Figura 9. Medición de cerebros centrales mediante el software ZEN 3.11 (ZEN lite).** Imagen generada en <https://www.biorender.com/>. OL: lóbulos ópticos. CB: cerebro central

### **Análisis por citometría de flujo del efecto de la expresión vs la falta de expresión del gen *prtp* sobre la población glial**

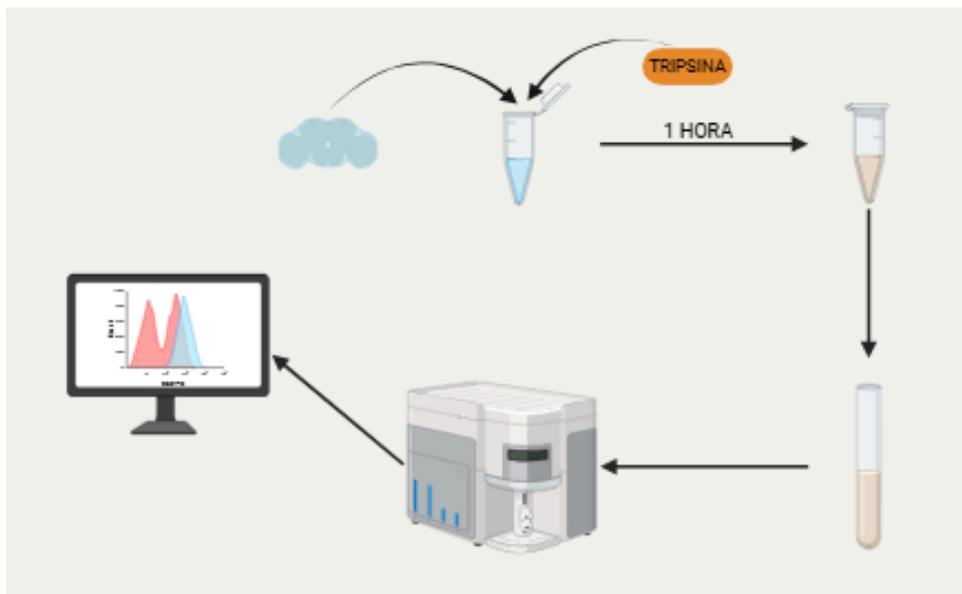
Para determinar un eventual efecto de la falta de expresión de *prtp* sobre la población glial puse a punto un protocolo de citometría de flujo de cerebros de moscas adultas de *Drosophila melanogaster*, basándome en el protocolo de Nandakumar et al., 2020 (Figura 10). Utilicé moscas machos de 5 días de edad de las cepas *TM2/+; repoGal4/+*, los individuos de genotipo *prtp-; +/UAS-CD8GFP; +/UAS-CD8GFP* producto del cruce 4, *prtp+;repoGFP* y *prtp-; repoGFP*.

Disequé cerebros completos de cada cepa utilizando pinzas de precisión DUMONT 5 bajo lupa estereoscópica en PBS 1X frío (n = 15 por genotipo). Para disgregar las muestras y obtener un aislado de células cerebrales con marca GFP+ exclusivamente glial, transferí los cerebros a tubos de Eppendorf de 1,5mL los cuales contenían 300  $\mu$ L de solución 9:1 de Tripsina- EDTA en PBS X10, gentilmente cedida por la Dra. Eugenia Isasi. Incubé por 20 minutos en estufa a 37°C. Trituré utilizando “mortero” por 2 minutos. Posteriormente agregué 200 $\mu$ L de solución 9:1 de Tripsina- EDTA e incubé por 45 minutos en estufa a 37°C. Diluí las muestras con 400  $\mu$ L de PBS 1X y las centrifugué 5 minutos a 300g.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo y clasificador celular MOFLO Astrios EQ (Beckman Coulter, USA) por personal técnico de la Plataforma de Citometría de Flujo y Clasificación Celular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Se utilizó un láser 488nm de 200mW de potencia y se detectaron los siguientes

parámetros: Forward Scatter, Side Scatter e Intensidad de fluorescencia en detector fotomultiplicador con filtro de banda 513/26. La exclusión de dobletes se realizó mediante procesamiento de pulso en Side Scatter (SSC-A vs SSC-W). Se colocó una máscara P1 delante del fotomultiplicador del detector de Forward Scatter 1. Para cada muestra, se adquirieron eventos durante un tiempo de 7 minutos y 30 segundos. El análisis de los datos se realizó con el programa Summit (Beckman Coulter, USA).

Se analizaron regiones idénticas para cada muestra. Estas regiones incluyen una sección de células pequeñas y otra de células grandes. En estas regiones se cuantificó el porcentaje de células GFP + y la intensidad media de fluorescencia.



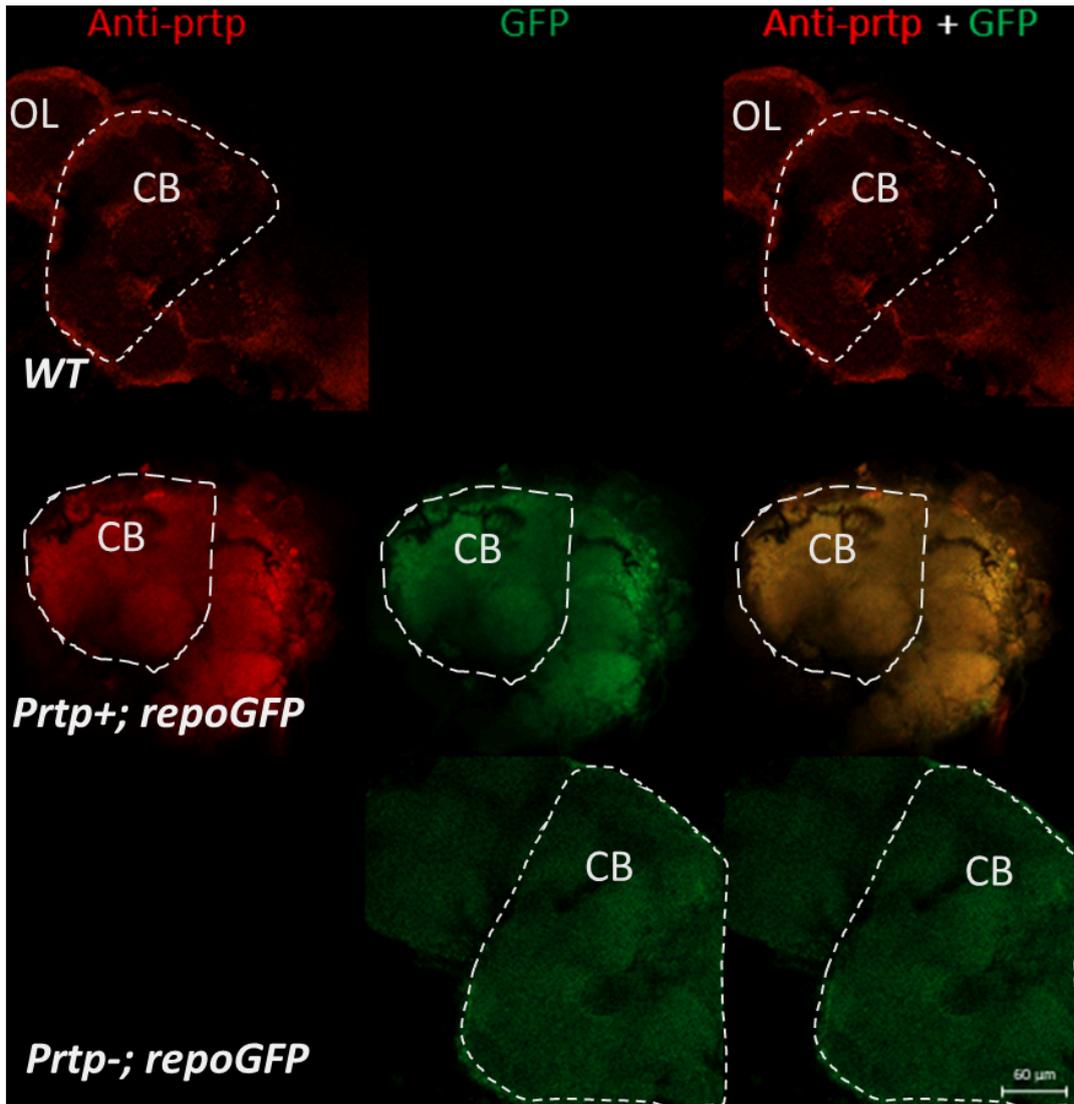
**Figura 10. Cuantificación de glía GFP+ mediante citometría de flujo.** Se esquematiza el proceso para la cuantificación por citometría. Se comienza por la disección de los cerebros, posteriormente se incuban con tripsina durante una hora, se trituran con mortero y se centrifuga previo a la lectura por el citómetro de flujo y clasificador celular MOFLO Astrios EQ (Beckman Coulter, USA). Finalmente se analizaron los datos con el programa Summit (Beckman Coulter, USA) con la ayuda del personal técnico de la Plataforma de Citometría de Flujo y Clasificación Celular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Imagen generada en <https://www.biorender.com/>.

## Resultados

### Pretaporter se expresa en células gliales

Para analizar la potencial expresión normal de Prtp en células gliales de adultos de *Drosophila melanogaster*, realicé inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-Prtp previamente testeado y puesto a punto en nuestro laboratorio, en cerebros de machos adultos de 5 días de edad (señal en rojo). Los genotipos analizados fueron: WT, como control positivo de expresión de *prtp*+; *repoGFP*, que combinaba la expresión de *prtp* y de GFP exclusivamente en células gliales (verde fluorescente); y *prtp*-; *repoGFP*, mutantes de falta de expresión de *prtp* (nulo), como control negativo de expresión de Prtp (Figura 11).

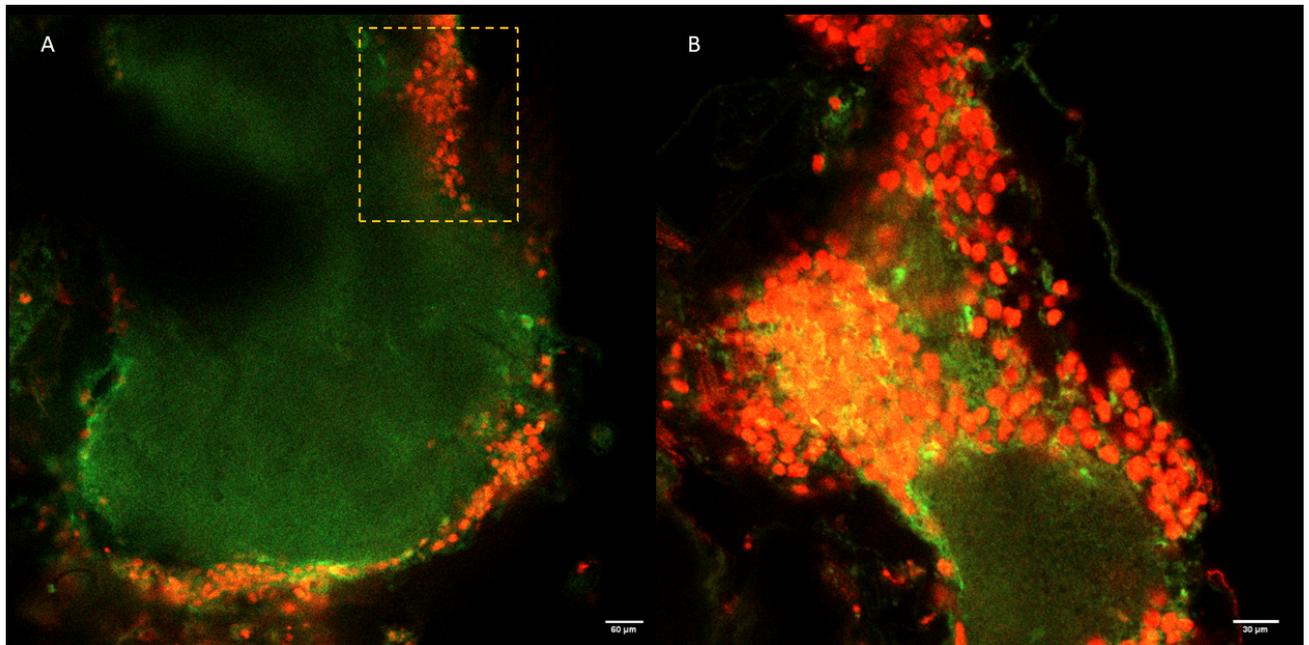
Nuestros resultados muestran primeramente que la tinción contra Prtp fue exitosa, detectándose fluorescencia correspondiente al anticuerpo anti-Prtp en los genotipos WT y *prtp*+;*repoGFP*, pero no en *prtp*-; *repoGFP*, como era esperable. Por otro lado, la fluorescencia correspondiente a GFP (verde) se presenta únicamente en la glía de los individuos GAL4/UAS, portadores de la secuencia UAS-CD8GFP, por lo cual consideramos que la técnica fue exitosa (Fig. 11).



**Figura 11. Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Prtp en cerebros completos de machos adultos de *Drosophila melanogaster* con y sin expresión de Prtp.** Imágenes representativas de cerebros de los siguientes genotipos: *WT*, *prtp+;repoGFP* y *prtp-;repoGFP*, sometidos a inmuno-tinción con anticuerpo anti-Prtp, donde se marca el contorno correspondiente a las regiones de un OL y un hemicerebro CB. En *WT* se observa exclusivamente fluorescencia específica roja correspondiente a la señal del anticuerpo anti-Prtp empleado. En las moscas transgénicas *prtp+; repoGFP* se detecta fluorescencia tanto del anticuerpo anti-Prtp (roja) como de GFP (verde), marcando la membrana de células gliales a través del promotor endógeno específico panglial *repo*. En los mutantes nulos para *prtp* de genotipo *prtp-;repoGFP* se observa exclusivamente señal verde de GFP. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal utilizando el objetivo 20X. La barra de escala corresponde a 60μm.

Posteriormente procedimos al análisis de la expresión de *prtp* el cual se realizó a partir de imágenes de stacks obtenidas con un objetivo de 63X en cerebros del genotipo *prtp+; repoGFP*. Estos stacks corresponden a las secciones más superficiales del cerebro y presentan una separación de 1 μm entre planos. Las imágenes fueron procesadas utilizando los softwares ZEN 3.11 (ZEN lite) de ZEISS y FIJI/ImageJ (Figura 12).

Como ha sido establecido previamente, visualizamos que Prtp (rojo) se expresa en células neuronales (GFP negativas). Adicionalmente, observamos colocalización (amarillo) de la señal del anticuerpo anti-Prtp con la señal GFP+ (verde), lo que indica que también hay expresión de Prtp en células gliales. Estas células gliales que expresan Prtp, por su localización y morfología, parecen corresponder principalmente a la glía CG (ver Figura 5B), y en menor medida, a la glía de recubrimiento EG (ensheating, ver Figura 5A).

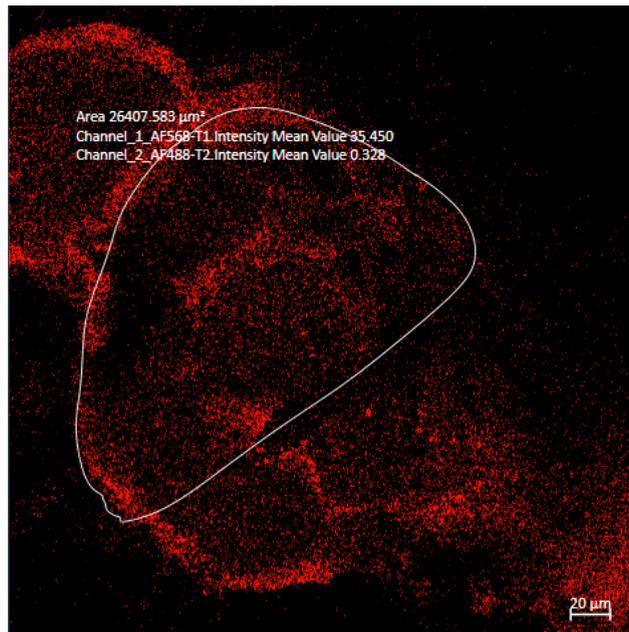


**Figura 12.** A) Cerebro ejemplo de macho adulto de *Drosophila melanogaster* del genotipo *prtp+; repoGFP*. Se observa la señal anti-Prtp (rojo) y la señal de GFP+ (verde), expresada únicamente en células gliales. A su vez, se evidencian áreas de colocalización de ambas señales (amarillo). Imagen obtenida mediante microscopía confocal utilizando un objetivo 40X. La barra de escala corresponde a 60μm. B) Ampliación de área de la corteza recuadrada en A. Se aprecia con mayor resolución la señal del anticuerpo anti-Prtp, la señal GFP+ en glía y la colocalización de ambas señales. Imagen obtenida de proyección en el eje z con el objetivo 63X (Figura suplementaria 1). La barra de escala corresponde a 30 μm.

### La falta de Prtp impacta en el tamaño del cerebro central

Para evaluar si la falta de expresión de *prtp* tiene un impacto en el cerebro de *Drosophila* adultas de 5 días de edad, medí las áreas del cerebro central (CB) en tres grupos: *WT* como control sin transgénesis ( $n = 5$ ), *prtp+; repoGFP* como control transgénico ( $n = 4$ ) y *prtp-; repoGFP*, el transgénico con pérdida de función de *prtp* ( $n = 5$ ).

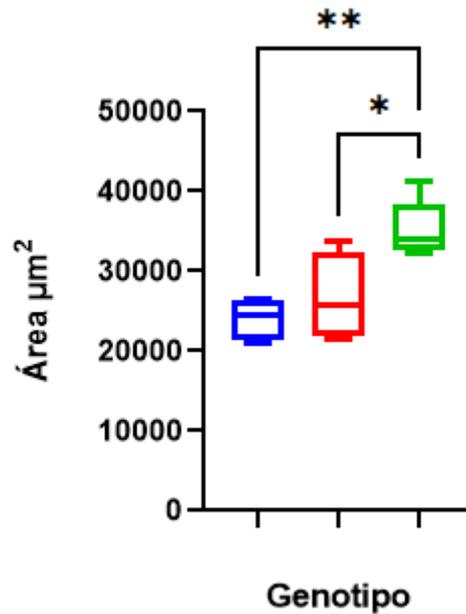
La figura 13 muestra un ejemplo de las mediciones realizadas utilizando el software ZEN 3.11, las cuales fueron graficadas (Figura 14) y comparadas estadísticamente (valores netos y resultados de la estadística, ver ANEXO) mediante el programa estadístico GraphPad Prism.



**Figura 13. Imagen representativa de un cerebro adulto de macho de *Drosophila melanogaster* de 5 días de edad de genotipo WT marcado con anticuerpo anti-Prtp. La región del hemicerebro central, en la cual se midió el área, se encuentra delimitada por una línea blanca de referencia. Imagen obtenida por microscopía confocal utilizando objetivo 20X.**

Los resultados muestran que el área del hemicerebro central en el grupo *prtp-; repoGFP* es significativamente mayor en comparación con los grupos *WT* y *prtp+; repoGFP* (ANOVA de una vía,  $p < 0,01$  \*\* y  $p < 0,05$  \* respectivamente) (Figura 14). No se observaron diferencias significativas entre *WT* y *prtp+; repoGFP* (Figura 14).

Este resultado indica, tal como sugerían nuestras observaciones no cuantificadas previas que dieron origen al planteo de esta tesina, que la pérdida de función de *prtp* incrementa el tamaño del cerebro central en *Drosophila melanogaster*, posiblemente mediante un mecanismo relacionado con la glía, ya sea a través de cambios morfológicos de aumento de tamaño de ciertas células gliales o promoviendo la proliferación glial, es decir aumentando el número total de glías. Esta última posibilidad, también fue explorada y cuantificada mediante las mediciones realizadas por citometría de flujo, cuyos resultados mencionaré a continuación.



**Figura 14. Medición comparativa del área de hemisferios cerebrales centrales de machos adultos de *Drosophila melanogaster* de 5 días de edad según los distintos genotipos.** El gráfico muestra el área (eje Y) en función del genotipo (eje X). Las medias de área se expresan en  $\mu\text{m}^2$ . En azul, *WT* con una media de  $24.039 \mu\text{m}^2$ ; en rojo, *prtp*<sup>+</sup>; *repoGFP* con una media de  $26.765 \mu\text{m}^2$ ; y en verde, los mutantes nulos para el gen *prtp*, *prtp*<sup>-</sup>; *repoGFP* con una media de  $35.180 \mu\text{m}^2$ . Con el test ANOVA una vía, se observan diferencias significativas en los mutantes nulos *prtp*<sup>-</sup>; *repoGFP* respecto a los *prtp*<sup>+</sup>; *repoGFP* (test de Tukey,  $p < 0,05$  \*) y respecto a *WT* (test de Tukey,  $p < 0,01$  \*\*).

### La falta de Prtp aumenta el número de glía

Para evaluar si la pérdida de función de *prtp* podría estar promoviendo la proliferación glial, realicé un análisis por citometría de flujo en cerebros de moscas adultas (Tabla 2 y ANEXO).

En primer lugar, diseñé y optimicé un protocolo de disgregación de cerebros adultos de *Drosophila* seguido de ensayos de citometría en la plataforma del IIBCE. La disgregación del tejido fue exitosa, resultando en una suspensión de células aisladas y viables, lo que permitió realizar el análisis planteado.

Se evaluaron los genotipos *prtp*<sup>+</sup>; *repoGFP*, de expresión normal de *prtp*, y mutantes nulos para *prtp* (*prtp*<sup>-</sup>; *repoGFP*), ambos con expresión positiva de la proteína GFP dirigida a las células gliales mediante el promotor *repogal4*. También se analizaron los genotipos *TM2/+; repogal4/repogal4* y *w1118prtpΔ1/w1118prtpΔ1; +/UAS-CD8GFP; +/UAS-CD8GFP* (provenientes del cruce 4), que fueron utilizados como controles negativos no verde fluorescentes, ya que no presentan expresión de GFP. En todos los casos se realizó una única medición con un  $n = 15$  cerebros para cada condición.

Para todos los genotipos se estableció una ventana de adquisición de 7 minutos y 30 segundos. El análisis se realizó en regiones idénticas entre los distintos grupos experimentales, que incluyeron una región de células GFP+ pequeñas y otra de células GFP+ grandes.

Los porcentajes de células GFP+ de cada genotipo y condición evaluada se resumen en la Tabla 2. Los mutantes nulos de *prtp* (*prtp-;repoGFP*) presentaron un mayor porcentaje de células GFP+ en ambas regiones, de células pequeñas y grandes, en relación con los individuos *prtp+; repoGFP*. En la región de células GFP+ pequeñas, *prtp+; repoGFP* mostró un 87,11 % de células GFP+ frente a un 92,97 % en los mutantes *prtp-;repoGFP*, mientras que en la región de células GFP+ grandes, la proporción fue de 87,81 % en *prtp+; repoGFP* contra 96,64 % en los mutantes *prtp-;repoGFP*.

Se observaron también diferencias en la intensidad de fluorescencia verde GFP+, entre las células de individuos *prtp+; repoGFP* que expresan normalmente *prtp* y aquellas GFP+ de los mutantes nulos de *prtp* (*prtp-;repoGFP*). La media de intensidad de fluorescencia GFP+ en estos mutantes fue mayor en comparación con la de los *prtp+; repoGFP*, con un leve aumento de la intensidad en la región de células GFP+ pequeñas y un incremento más marcado en la región correspondiente a células GFP+ grandes (Tabla 2).

Estos resultados indican que la población de células gliales (células GFP+) es mayor en individuos adultos de 5 días de edad con la mutación de pérdida de función en *prtp*, en comparación con individuos que expresan normalmente el gen *prtp*. Esto respalda la hipótesis de que la proteína Prtp cumple un rol en la modulación de la población glial en cerebros adultos de *Drosophila melanogaster*. Probablemente esto implique más de un subtipo glial, dado el incremento de número e intensidad de células GFP+ de dos rangos de tamaño diferentes (Tabla 2) y dada la morfología variable sugerida en las imágenes de co-localización por inmunohistoquímica (Figura 12).

**Tabla 2. Resultados del análisis de citometría de flujo de cerebros de adultos de *Drosophila melanogaster* de 5 días de edad de los diferentes genotipos.**

Genotipo	repogal4	prtp-; UAS-GFP	repogal4/UAS-GFP	prtp-; repogal4/UAS-GFP
% células pequeñas GFP+	1.15%	2.0%	87.11%	92.97%

<b>% células grandes GFP+</b>	5.24%	5.6%	87.81%	96.64%
<b>Media de fluorescencia células pequeñas</b>	26.97	30.38	2465	2721
<b>Media de fluorescencia células grandes</b>	57.15	58.26	3861	4710

## Discusión

En esta tesina nos propusimos evaluar la hipótesis de que Prtp se expresa en células gliales de cerebros adultos de *Drosophila melanogaster* y que su falta impacta en el número de dichas células y, por consiguiente, en la morfología cerebral. Los resultados obtenidos avalan fuertemente estas hipótesis, demostrando por primera vez, tanto la expresión normal de Prtp en glía así como que su falta determina un aumento en el número de células gliales y en el tamaño cerebral.

Encontramos colocalización entre la señal GFP y la del anti-Prtp, lo que indica que las células gliales expresan el gen *prtp*, hallazgo que coincide con los datos de transcriptómica del *Fly Cell Atlas Project* (H. Li et al., 2022) donde se reportan niveles bajos de expresión de *prtp* en células gliales.

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de Prtp en células gliales de individuos machos de 5 días de edad (Figuras 11-13) se realizó utilizando cerebros completos y las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal con proyecciones en el eje Z. Para contar con una mejor referencia del área visualizada, capturamos los planos más superficiales del cerebro (entre 20 y 30 imágenes), con una separación de 1  $\mu\text{m}$  entre planos. Debemos tener en cuenta que un cerebro completo de adulto de *Drosophila* presenta una profundidad aproximada de 80 a 100  $\mu\text{m}$  (Ou et al., 2016), lo cual implica que no se analizó un importante porcentaje del cerebro más profundo. Sería interesante a futuro, analizar si existe también colocalización con las glías a ese nivel.

Debemos considerar que el GFP visualizado se encuentra bajo el control del promotor endógeno *repo*, acoplado al Gal4, un marcador panglial. Por lo tanto, no podemos determinar si Prtp se expresa en todos los subtipos gliales o solo en algunos. Por la profundidad a la que se obtuvieron las imágenes y por la morfología observada (Figura 12), podemos suponer que Prtp se expresa al menos en la glía CG y en la glía EG más superficial. Sería interesante profundizar en la caracterización de su expresión en los distintos subtipos gliales, lo cual podría abordarse utilizando líneas de *Drosophila* que expresen *GAL4* bajo promotores específicos de cada subtipo de glía (Kremer et al., 2017).

Como previamente fue establecido en la introducción, la función comprobada de Prtp es la de actuar como receptor fagocítico de Drp en condiciones de muerte celular (Kuraishi et al., 2009). Sin embargo, también se le han atribuido otras funciones potenciales, como su participación en el plegado de proteínas y su probable capacidad oxidorreductasa lo cual contribuiría a la homeostasis redox de las células (discutido en Silvera C., 2023). Esto plantea la interrogante sobre cuál podría ser la función principal de Prtp en las células gliales.

Observaciones preliminares de nuestro grupo de investigación documentaron un aumento en el tamaño cerebral en machos de *Drosophila melanogaster* mutantes con pérdida de función de *prtp*, aunque este fenómeno no había sido cuantificado hasta mi tesina. En este trabajo demostramos, por primera vez, que la falta de Prtp determina un aumento significativo del área cerebral del CB de moscas macho adultas de 5 días de edad.

Cabe mencionar que nuestra cuantificación comparativa de las áreas cerebrales (Figuras 13-14) fue realizada en la región del cerebro central (CB), excluyendo los lóbulos ópticos (OL), ya que estas estructuras fueron las más susceptibles al daño durante el proceso de disección y más variables durante el montaje, pudiendo llevar a mediciones erróneas de sub o sobreestimación de áreas, si hubieran sido incluidas. Es por ello que, más precisamente, además de no considerar los OL de cada individuo utilizamos sólo un hemisferio central, seleccionando el que presentara mejor conservación estructural. Esta aproximación puede considerarse como un primer paso para la caracterización morfológica. Para una mayor precisión en la medición del área total cerebral y una posterior estimación del volumen completo, se podrían hacer proyecciones en el eje Z del cerebro entero y mediante un software de análisis como FIJI/ImageJ, cuantificar estos parámetros.

El cerebro de la *Drosophila melanogaster* es extremadamente plástico, presentando cambios en el tamaño de diversas regiones cerebrales (OL, cálices, CB) en respuesta a diferentes estímulos visuales, olfatorios, sociales, entre otros (Barth et al., 1997; Barth & Heisenberg, 1997). Si bien esta plasticidad puede ocurrir en cualquier etapa de la vida adulta, tiene su periodo crítico durante la primera semana post-eclosión (Heisenberg et al., 1995). La mayoría de trabajos que investigaron este fenómeno se centraron en el papel de las neuronas en este proceso, explorando como procesos como la neurogénesis, el aumento de las prolongaciones neuronales y la remodelación de las conexiones sinápticas contribuyen a los cambios en el tamaño cerebral. Sin embargo, son pocos los estudios que han evaluado el papel de la glía en este proceso.

En este contexto, si la glía participa en el aumento del tamaño cerebral observado en los mutantes *prtp-*, podrían plantearse tres escenarios posibles:

1. Las células gliales aumentan de tamaño, lo que contribuye al agrandamiento cerebral.
2. Las células gliales aumentan en número, lo cual expande la masa cerebral total.
3. Ambos procesos ocurren simultáneamente.

Nuestros ensayos de citometría de flujo aportaron información sobre esta pregunta. Cabe destacar que, como parte de este trabajo, logramos poner a punto un protocolo de disgregación de cerebros de moscas *Drosophila melanogaster* para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Este proceso representó uno de los desafíos más significativos de la tesis, demandando una considerable inversión de tiempo y esfuerzo. La optimización de esta metodología no solo permitió alcanzar los objetivos del presente estudio, sino que también permitirá su aplicación en investigaciones futuras que requieran el análisis celular cuantitativo en el SN de *Drosophila*.

Nuestros resultados de citometría de flujo muestran un aumento en la intensidad de fluorescencia de GFP+ en la población glial de los mutantes *prtp-* (Tabla 2 y ANEXO). Esta observación puede interpretarse como un incremento en el número de células GFP+, es decir, un aumento en la cantidad de células gliales. En consecuencia, es razonable atribuir el mayor tamaño cerebral observado en los mutantes *prtp-* al incremento en la población glial.

Cabe señalar que no fue posible realizar un análisis estadístico formal de estos datos, ya que se obtuvo una única medición por muestra de cada genotipo. Para validar

estadísticamente estos resultados en el futuro, sería necesario realizar réplicas para calcular la variabilidad intra-grupo y aplicar pruebas estadísticas apropiadas.

Clásicamente se consideraba que la neurogénesis y la gliogénesis adulta en *Drosophila* eran muy reducidas o incluso inexistentes. Esta idea se sustentaba en el hecho de que las células progenitoras de neuronas y glía, los neuroblastos, se diferencian completamente o sufren apoptosis antes de la eclosión de la larva 1 (Siegrist et al., 2010; Sood et al., 2023). Sin embargo, nuevos estudios comprueban que tanto la neurogénesis como la gliogénesis puede ocurrir en el cerebro adulto, fundamentalmente en respuesta a daño cerebral, estrés o manipulaciones genéticas (Crocker et al., 2021; Foo et al., 2017; Li & Hidalgo, 2020).

Pero, ¿cómo la expresión de *prtp* regularía la población glial? Dada su función comprobada como receptor fagocítico de Drpr, Prtp podría participar en el mantenimiento de la población glial al mediar la eliminación de glía apoptótica. Su ausencia podría impedir la eliminación de células gliales apoptóticas, desencadenando la acumulación de glía disfuncional. Esto podría desencadenar o contribuir con procesos presentes en EN, tal como fue mencionado en la introducción. Una estrategia para explorar esto sería utilizar marcadores de apoptosis, como anticuerpos contra caspasas activadas, y evaluarlos mediante microscopía o citometría de flujo para determinar si las glías acumuladas son apoptóticas (Fan & Bergmann, 2010).

Por otro lado, Prtp podría estar regulando la proliferación glial, limitando su proliferación excesiva mientras que su ausencia desinhibiría uno o varios de los mecanismos que normalmente restringen la expansión glial. En este sentido podría actuar de forma paralela o en conexión con vías reguladoras de la expansión glial conocidas como la vía Hippo, la cual restringe la actividad del coactivador Yorkie. La activación de Yorkie promueve la expresión de genes como *bantam* y *Myc*, que favorecen la proliferación glial (Reddy & Irvine, 2011).

Por último, numerosa evidencia vincula la homeostasis redox con la regulación del ciclo celular y la proliferación celular (Mackova et al., 2024; Sarsour et al., 2009). Una de las funciones de los radicales libres del oxígeno (ROS) es la de actuar como segundos mensajeros en diversas vías de señalización (Sies, 2015; Wu et al., 2022). En este contexto, los niveles de ROS pueden modular el progreso a través de las distintas fases del ciclo celular, actuando sobre múltiples blancos moleculares. Entre estos se incluyen las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), diversos factores de transcripción así como proteínas reguladoras del ciclo como p53 o p21 (Mackova et al., 2024). Según su concentración, los ROS pueden promover la progresión celular o, en niveles más altos, activar mecanismos de senescencia o apoptosis (Tan et al., 2017).

Por sus dominios tiorredoxina, la proteína Prtp tendría una potencial actividad oxidorreductasa, contribuyendo a la homeostasis redox celular (Silvera C., 2023; (Silvera et al., 2025). En este sentido, su ausencia podría desencadenar un desbalance redox que actuase como señal de proliferación glial, favoreciendo la activación del ciclo celular en las glías, aumentando la mitosis y, por ende, el número de células gliales. totales dentro del cerebro de los mutantes *prtp*<sup>-</sup>. Para profundizar en esta posibilidad, podríamos evaluar a futuro los niveles de ROS presentes en estos mutantes respecto a moscas normales al igual que evaluar diversos marcadores del ciclo celular como los niveles de ciclinas y cdk, entre otros.

## Conclusión

En esta tesina de grado realizada para la obtención de mi título de Licenciado en Ciencias Biológicas de la FCien-UdelaR evalué si el gen *pretaporter* se expresa en células gliales de cerebros de adultos de *Drosophila melanogaster* y si su ausencia tiene algún impacto en el número de glías y la morfología cerebral.

Contrasté nuestras hipótesis mediante la planificación y realización de cruces genéticos, empleo de técnicas de inmunohistoquímica y microscopía confocal, programas de análisis de imágenes y estadística, y mediante la puesta a punto y análisis por citometría de flujo.

Nuestros resultados muestran por primera vez que Prtp se expresa en las glías de cerebros adultos de *Drosophila melanogaster*, siendo el único reporte de su expresión en glías hasta el momento (ya que no ha sido reportado aún para sus homólogos). También muestran por primera vez que la falta de expresión de *prtp* se asocia con un aumento del número de células gliales, lo que repercute en la morfología cerebral determinando un aumento de su tamaño.

A partir de estos resultados, propusimos diversos mecanismos mediante los cuales la ausencia de Prtp podría favorecer el aumento de la población glial: disminución en la eliminación (clearance) de glías apoptóticas, desregulación de vías que regulan la proliferación glial o alteraciones en la homeostasis redox intracelular que impacten sobre el control del ciclo celular. Futuros estudios permitirán profundizar en estos mecanismos o sugerir otros alternativos y determinar con mayor precisión el papel de la proteína Prtp en la regulación glial y en su eventual incidencia en el desarrollo cerebral normal y en la generación o mantenimiento de procesos asociados a patologías del SN como las EN mencionadas en la introducción.

## Bibliografía

- Abbott, N. J., Rönnebeck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41-53.  
<https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Venter, J. C. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.  
<https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- Allen, N. J., & Lyons, D. A. (2018). Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*, 362(6411), 181-185. <https://doi.org/10.1126/science.aat0473>
- Atlas of Drosophila Development by Volker Hartenstein*. (s. f.). Recuperado 30 de julio de 2025, de <https://www.sdbonline.org/sites/fly/atlas/1011.htm>
- Awasaki, T., Lai, S.-L., Ito, K., & Lee, T. (2008). Organization and Postembryonic Development of Glial Cells in the Adult Central Brain of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 28(51), 13742-13753.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4844-08.2008>
- Banerjee, S., Bainton, R. J., Mayer, N., Beckstead, R., & Bhat, M. A. (2008). Septate junctions are required for ommatidial integrity and blood-eye barrier function in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 317(2), 585-599.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.03.007>
- Barbeito, L. H., Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Peluffo, H., Viera, L., Estévez, A. G., & Beckman, J. S. (2004). A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research Reviews*, 47(1-3), 263-274.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.05.003>

- Barth, M., & Heisenberg, M. (1997). Vision affects mushroom bodies and central complex in *Drosophila melanogaster*. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 4(2), 219-229. <https://doi.org/10.1101/lm.4.2.219>
- Barth, M., Hirsch, H. V. B., Meinertzhagen, I. A., & Heisenberg, M. (1997). Experience-Dependent Developmental Plasticity in the Optic Lobe of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Neuroscience*, 17(4), 1493-1504. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-04-01493.1997>
- Bauke, A.-C., Sasse, S., Matzat, T., & Klämbt, C. (2015). A transcriptional network controlling glial development in the *Drosophila* visual system. *Development (Cambridge, England)*, 142(12), 2184-2193. <https://doi.org/10.1242/dev.119750>
- Bennett, M. L., & Viaene, A. N. (2021). What are activated and reactive glia and what is their role in neurodegeneration? *Neurobiology of Disease*, 148, 105172. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105172>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401-415. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>
- Budelli, G., Ferreiro, M. J., & Bolatto, C. (2025). Taking flight, the use of *Drosophila melanogaster* for neuroscience research in Uruguay. *Neuroscience*, 573, 104-119. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2025.03.006>
- Cantera, R., Lüer, K., Rusten, T. E., Barrio, R., Kafatos, F. C., & Technau, G. M. (2002). Mutations in spalt cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development (Cambridge, England)*, 129(24), 5577-5586. <https://doi.org/10.1242/dev.00158>
- Chowen, J. A., Argente-Arizón, P., Freire-Regatillo, A., Frago, L. M., Horvath, T. L., & Argente, J. (2016). The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals. *Progress in Neurobiology*, 144, 68-87. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.03.001>
- Contreras, E. G., & Klämbt, C. (2023). The *Drosophila* blood-brain barrier emerges as a

- model for understanding human brain diseases. *Neurobiology of Disease*, 180, 106071. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106071>
- Coutinho-Budd, J., & Freeman, M. R. (2013). Probing the enigma: Unraveling glial cell biology in invertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(6), 1073-1079. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.07.002>
- Crocker, K. L., Marischuk, K., Rimkus, S. A., Zhou, H., Yin, J. C. P., & Boekhoff-Falk, G. (2021). Neurogenesis in the adult *Drosophila* brain. *Genetics*, 219(2), iyab092. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab092>
- DeSalvo, M. K., Hindle, S. J., Rusan, Z. M., Orng, S., Eddison, M., Halliwill, K., & Bainton, R. J. (2014). The *Drosophila* surface glia transcriptome: Evolutionary conserved blood-brain barrier processes. *Frontiers in Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00346>
- Doherty, J., Logan, M. A., Taşdemir, O. E., & Freeman, M. R. (2009). Ensheathing glia function as phagocytes in the adult *Drosophila* brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(15), 4768-4781. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5951-08.2009>
- Dulamea, A. O. (2017). Role of Oligodendrocyte Dysfunction in Demyelination, Remyelination and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. En A. A. A. Asea, F. Geraci, & P. Kaur (Eds.), *Multiple Sclerosis: Bench to Bedside* (Vol. 958, pp. 91-127). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47861-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47861-6_7)
- Edwards, T. N., & Meinertzhagen, I. A. (2010). The functional organisation of glia in the adult brain of *Drosophila* and other insects. *Progress in Neurobiology*, 90(4), 471-497. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.001>
- Fan, Y., & Bergmann, A. (2010). The cleaved-Caspase-3 antibody is a marker of Caspase-9-like DRONC activity in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, 17(3), 534-539. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.185>
- Ferreiro, M. J., Rodríguez-Ezpeleta, N., Pérez, C., Hackenberg, M., Aransay, A. M., Barrio, R., & Cantera, R. (2012). Whole transcriptome analysis of a reversible

- neurodegenerative process in *Drosophila* reveals potential neuroprotective genes. *BMC Genomics*, 13(1), 483. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-483>
- Foo, L. C., Song, S., & Cohen, S. M. (2017). miR-31 mutants reveal continuous glial homeostasis in the adult *Drosophila* brain. *The EMBO Journal*, 36(9), 1215-1226. <https://doi.org/10.15252/emj.201695861>
- Freeman, M. R. (2015). *Drosophila* Central Nervous System Glia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(11), a020552. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020552>
- Freeman, M. R., & Doherty, J. (2006). Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. *Trends in Neurosciences*, 29(2), 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.12.002>
- Fujita. (2012). Role of NPxY motif in Draper-mediated apoptotic cell clearance in *Drosophila*. *Drug Discoveries & Therapeutics*. <https://doi.org/10.5582/ddt.2012.v6.6.291>
- Heisenberg, M., Heusipp, M., & Wanke, C. (1995). Structural plasticity in the *Drosophila* brain. *The Journal of Neuroscience*, 15(3), 1951-1960. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-01951.1995>
- Howard, L. J., Brown, H. E., Wadsworth, B. C., & Evans, T. A. (2019). Midline axon guidance in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 85, 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.029>
- Jäkel, S., & Dimou, L. (2017). Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024>
- Kam, T.-I., Hinkle, J. T., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2020). Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 144, 105028. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105028>
- Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience*, 18(7), 942-952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>
- Kremer, M. C., Jung, C., Batelli, S., Rubin, G. M., & Gaul, U. (2017). The glia of the adult *Drosophila* nervous system. *Glia*, 65(4), 606-638. <https://doi.org/10.1002/glia.23115>

- Kuraishi, T., Nakagawa, Y., Nagaosa, K., Hashimoto, Y., Ishimoto, T., Moki, T., Fujita, Y., Nakayama, H., Dohmae, N., Shiratsuchi, A., Yamamoto, N., Ueda, K., Yamaguchi, M., Awasaki, T., & Nakanishi, Y. (2009). Pretaporter, a *Drosophila* protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. *The EMBO Journal*, *28*(24), 3868-3878. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.343>
- Kwon, H. S., & Koh, S.-H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, *9*(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
- Lago-Baldaia, I., Fernandes, V. M., & Ackerman, S. D. (2020). More Than Mortar: Glia as Architects of Nervous System Development and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 611269. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.611269>
- Li, G., & Hidalgo, A. (2020). Adult Neurogenesis in the *Drosophila* Brain: The Evidence and the Void. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijms21186653>
- López-Muguruza, E., & Matute, C. (2023). Alterations of Oligodendrocyte and Myelin Energy Metabolism in Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(16), 12912. <https://doi.org/10.3390/ijms241612912>
- Mackova, V., Raudenska, M., Polanska, H. H., Jakubek, M., & Masarik, M. (2024). Navigating the redox landscape: Reactive oxygen species in regulation of cell cycle. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, *29*(1), 2371173. <https://doi.org/10.1080/13510002.2024.2371173>
- 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>
- Morante, J., Vallejo, D. M., Desplan, C., & Dominguez, M. (2013). Conserved miR-8/miR-200 defines a glial niche that controls neuroepithelial expansion and neuroblast transition. *Developmental Cell*, *27*(2), 174-187. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.018>
- Morgan, T. H. (1910). SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA. *Science (New York, N. Y.)*, *32*(812), 120-122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>

- Nandakumar, S., Grushko, O., & Buttitta, L. A. (s. f.). Polyploidy in the adult *Drosophila* brain. *eLife*, 9, e54385. <https://doi.org/10.7554/eLife.54385>
- Okumura, M., Kadokura, H., & Inaba, K. (2015). Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. *Free Radical Biology & Medicine*, 83, 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.010>
- Omoto, J. J., Lovick, J. K., & Hartenstein, V. (2016). Origins of glial cell populations in the insect nervous system. *Current Opinion in Insect Science*, 18, 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.09.003>
- Omoto, J. J., Yogi, P., & Hartenstein, V. (2015). Origin and development of neuropil glia of the *Drosophila* larval and adult brain: Two distinct glial populations derived from separate progenitors. *Developmental Biology*, 404(2), 2-20. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.03.004>
- Ou, J., Gao, Z., Song, L., & Ho, M. S. (2016). Analysis of Glial Distribution in *Drosophila* Adult Brains. *Neuroscience Bulletin*, 32(2), 162-170. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0014-0>
- Pasinelli, P., Meyer, K., Ferraiuolo, L., Culibrk, R. A., & Sattler, R. (2024). Editorial: The role of glial cells in neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Medicine*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmmed.2023.1337286>
- Pentreath, V. W. (1989). Invertebrate glial cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 93(1), 77-83. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(89\)90194-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90194-1)
- Pereanu, W., Shy, D., & Hartenstein, V. (2005). Morphogenesis and proliferation of the larval brain glia in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 283(1), 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.04.024>
- Reddy, B. V. V. G., & Irvine, K. D. (2011). Regulation of *Drosophila* glial cell proliferation by Merlin-Hippo signaling. *Development (Cambridge, England)*, 138(23), 5201-5212. <https://doi.org/10.1242/dev.069385>
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A systematic analysis of

- human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 11(6), 1114-1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>
- Sadick, J. S., O'Dea, M. R., Hasel, P., Dykstra, T., Faustin, A., & Liddelow, S. A. (2022). Astrocytes and oligodendrocytes undergo subtype-specific transcriptional changes in Alzheimer's disease. *Neuron*, 110(11), 1788-1805.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.03.008>
- Sarsour, E. H., Kumar, M. G., Chaudhuri, L., Kalen, A. L., & Goswami, P. C. (2009). Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(12), 2985-3011. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2513>
- Schipke, C. G., & Kettenmann, H. (2004). Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia*, 47(3), 226-232. <https://doi.org/10.1002/glia.20029>
- Sheeler, C., Rosa, J.-G., Ferro, A., McAdams, B., Borgenheimer, E., & Cvetanovic, M. (2020). Glia in Neurodegeneration: The Housekeeper, the Defender and the Perpetrator. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms21239188>
- Sheloukhova, L., & Watanabe, H. (2024). Evolution of glial cells: A non-bilaterian perspective. *Neural Development*, 19(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13064-024-00184-4>
- Siegrist, S. E., Haque, N. S., Chen, C.-H., Hay, B. A., & Hariharan, I. K. (2010). Inactivation of both foxo and reaper promotes long-term adult neurogenesis in *Drosophila*. *Current biology: CB*, 20(7), 643-648. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.01.060>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Silvera, M. C., Cantera, R., & Ferreiro, M. J. (2025). Absence of pretapporter restrains features of the parkin phenotype in *Drosophila*. *Experimental Neurology*, 383, 114997. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.114997>
- Silvera, M. C., & Ferreiro, M. J. (2024). Nuclear localization of Pretapporter in *Drosophila melanogaster* third-instar larvae salivary gland and its deficiency-associated nuclear

- phenotype. *microPublication Biology*.  
<https://doi.org/10.17912/micropub.biology.001246>
- Somjen, G. G. (1988). Nervenkitz: Notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia*, 1(1), 2-9. <https://doi.org/10.1002/glia.440010103>
- Sood, C., Nahid, M. A., Branham, K. R., Pahl, M. C., Doyle, S. E., & Siegrist, S. E. (2023). Delta-dependent Notch activation closes the early neuroblast temporal program to promote lineage progression and neurogenesis termination in *Drosophila*. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.88565.1>
- Sousa-Nunes, R., Yee, L. L., & Gould, A. P. (2011). Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in *Drosophila*. *Nature*, 471(7339), 508-512. <https://doi.org/10.1038/nature09867>
- Stacey, S. M., Muraro, N. I., Peco, E., Labbé, A., Thomas, G. B., Baines, R. A., & van Meyel, D. J. (2010). *Drosophila* glial glutamate transporter Eaat1 is regulated by fringe-mediated notch signaling and is essential for larval locomotion. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(43), 14446-14457. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1021-10.2010>
- Stoklund Dittlau, K., & Freude, K. (2024). Astrocytes: The Stars in Neurodegeneration? *Biomolecules*, 14(3), 289. <https://doi.org/10.3390/biom14030289>
- Stork, T., Bernardos, R., & Freeman, M. R. (2012). Analysis of glial cell development and function in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012(1), 1-17. <https://doi.org/10.1101/pdb.top067587>
- Tan, S. W. S., Lee, Q. Y., Wong, B. S. E., Cai, Y., & Baeg, G. H. (2017). Redox Homeostasis Plays Important Roles in the Maintenance of the *Drosophila* Testis Germline Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 9(1), 342-354. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.034>
- Tasdemir-Yilmaz, O. E., & Freeman, M. R. (2014). Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons. *Genes & Development*, 28(1), 20-33. <https://doi.org/10.1101/gad.229518.113>
- Tretter, V., Hochreiter, B., Zach, M. L., Krenn, K., & Klein, K. U. (2021). Understanding

- Cellular Redox Homeostasis: A Challenge for Precision Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 106. <https://doi.org/10.3390/ijms23010106>
- Vargas-Barroso, V., & Larriva-Sahd, J. (2013). A Cytological and Experimental Study of the Neuropil and Primary Olfactory Afferences to the Piriform Cortex. *The Anatomical Record*, 296(9), 1297-1316. <https://doi.org/10.1002/ar.22753>
- von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *The Journal of Comparative Neurology*, 524(18), 3865-3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- von Hilchen, C. M., Beckervordersandforth, R. M., Rickert, C., Technau, G. M., & Altenhein, B. (2008). Identity, origin, and migration of peripheral glial cells in the Drosophila embryo. *Mechanisms of Development*, 125(3-4), 337-352. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.10.010>
- Wu, R., Li, S., Hudlikar, R., Wang, L., Shannar, A., Peter, R., Chou, P. J., Kuo, H.-C. D., Liu, Z., & Kong, A.-N. (2022). Redox signaling, mitochondrial metabolism, epigenetics and redox active phytochemicals. *Free Radical Biology & Medicine*, 179, 328-336. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.007>
- Yildirim, K., Petri, J., Kottmeier, R., & Klämbt, C. (2019). Drosophila glia: Few cell types and many conserved functions. *Glia*, 67(1), 5-26. <https://doi.org/10.1002/glia.23459>
- Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong, W.-C., Hiromi, Y., & Okano, H. (2003). Drosophila homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development (Cambridge, England)*, 130(11), 2419-2428. <https://doi.org/10.1242/dev.00468>

## Anexos

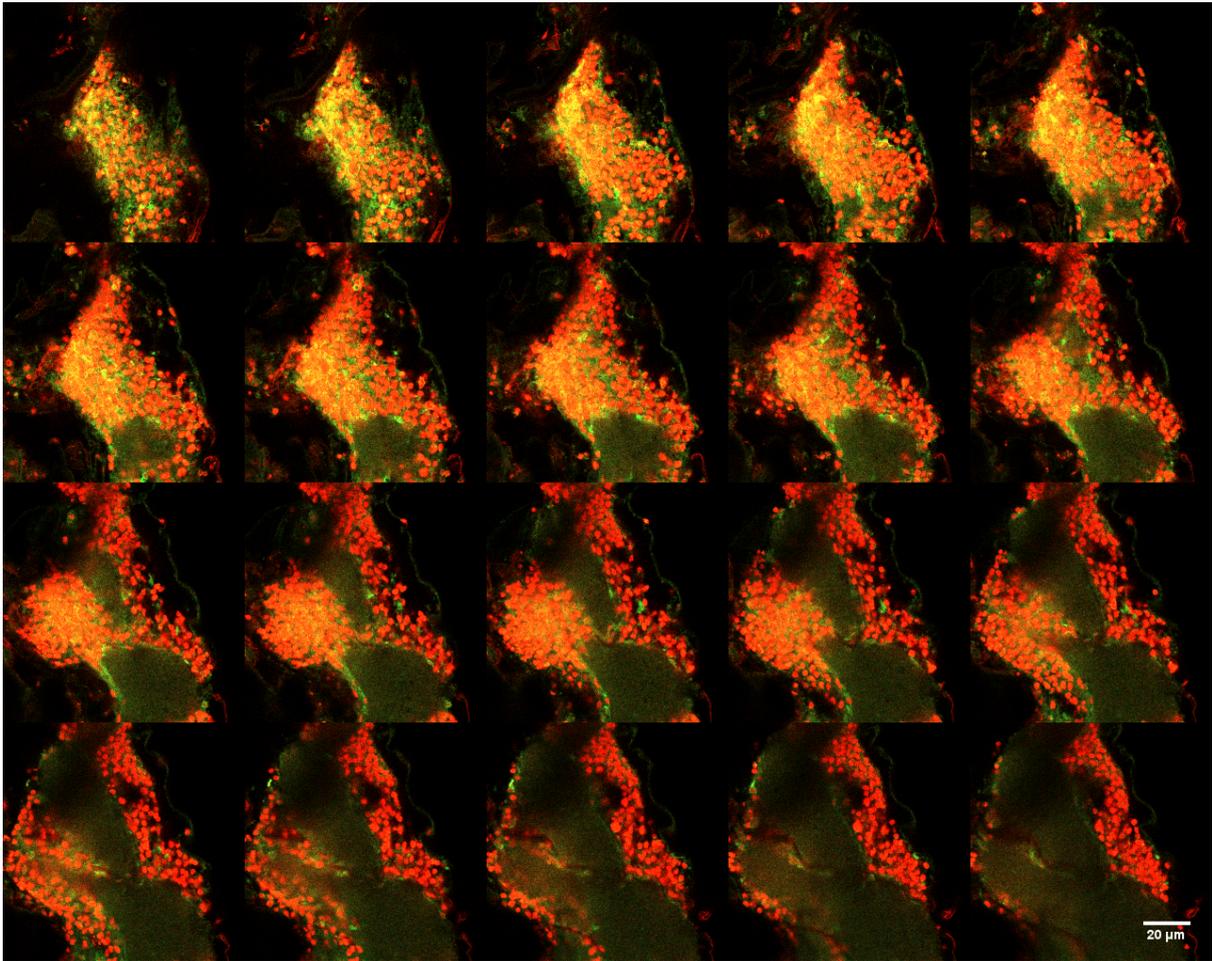


Figura Suplementaria 1. Proyección en el eje Z de cerebro de genotipo *prtp+*; *repoGFP*. Se observa colocalización entre la señal del anticuerpo anti-Prtp (rojo) y la señal de GFP. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal utilizando un objetivo de 63X.

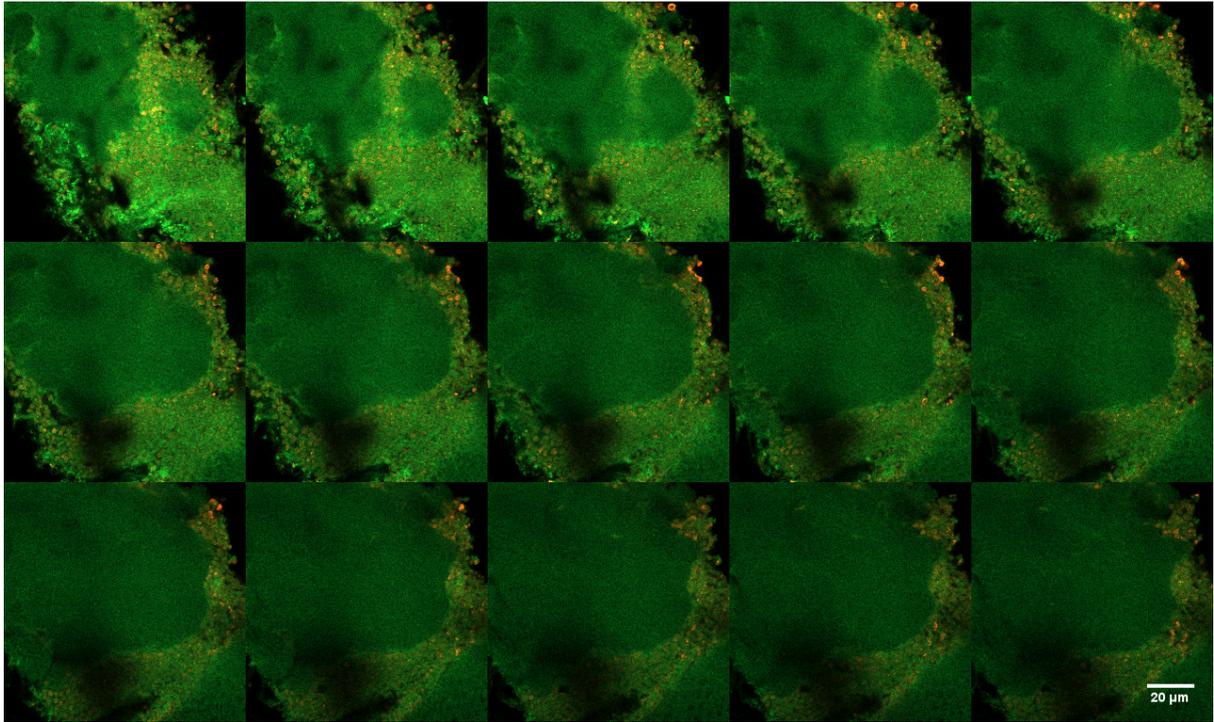


Figura Suplementaria 2. Proyección en el eje Z de cerebro de genotipo *prtp+*; *repoGFP*. Se observa colocalización entre la señal del anticuerpo anti-Prtp (rojo) y la señal de GFP. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal utilizando un objetivo de 63X.

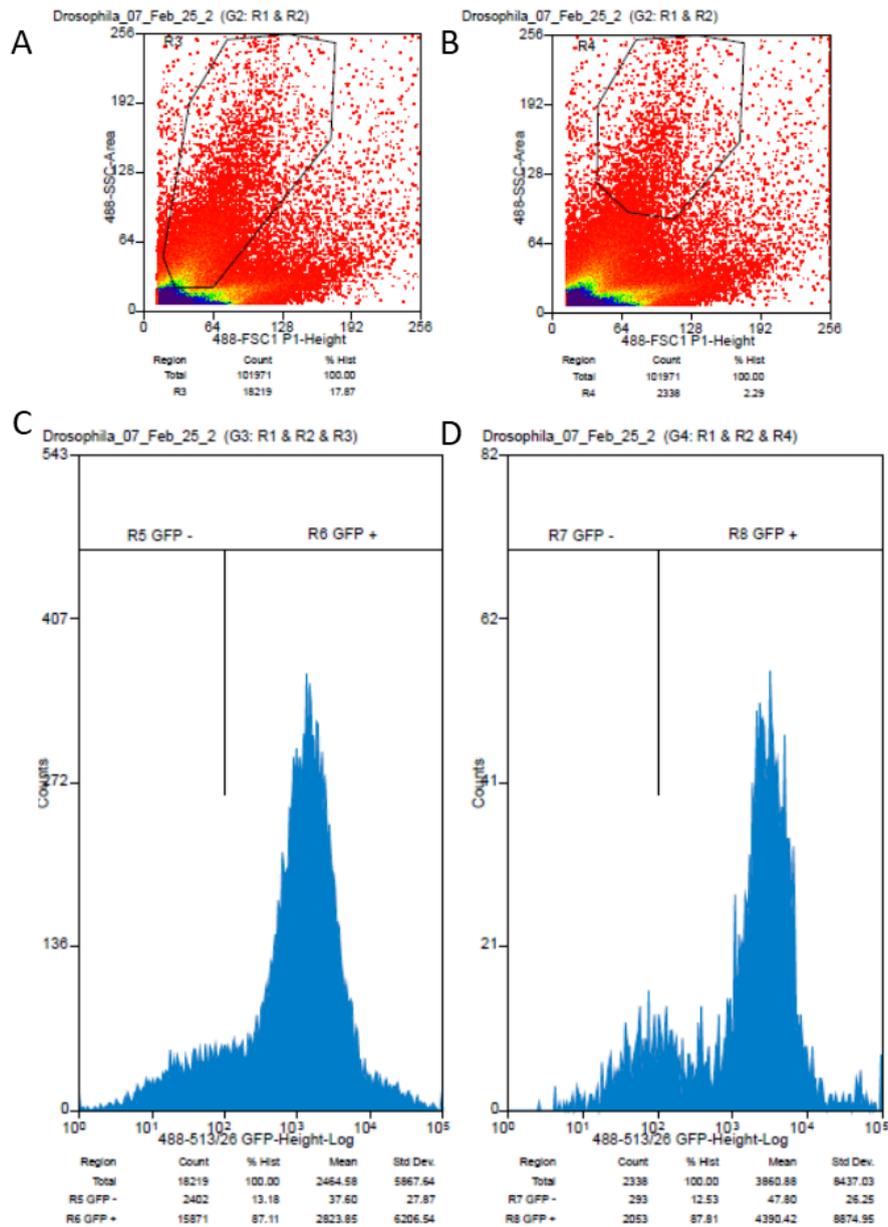


Figura suplementaria 2. Citometría de cerebros de genotipo *prtp+*; *repoGFP*. En A se muestra la región de células pequeñas, y en B la región de células grandes. En C y D se presentan histogramas de fluorescencia para células pequeñas (C) y para células grandes (D), indicando el área correspondiente a las células GFP+.

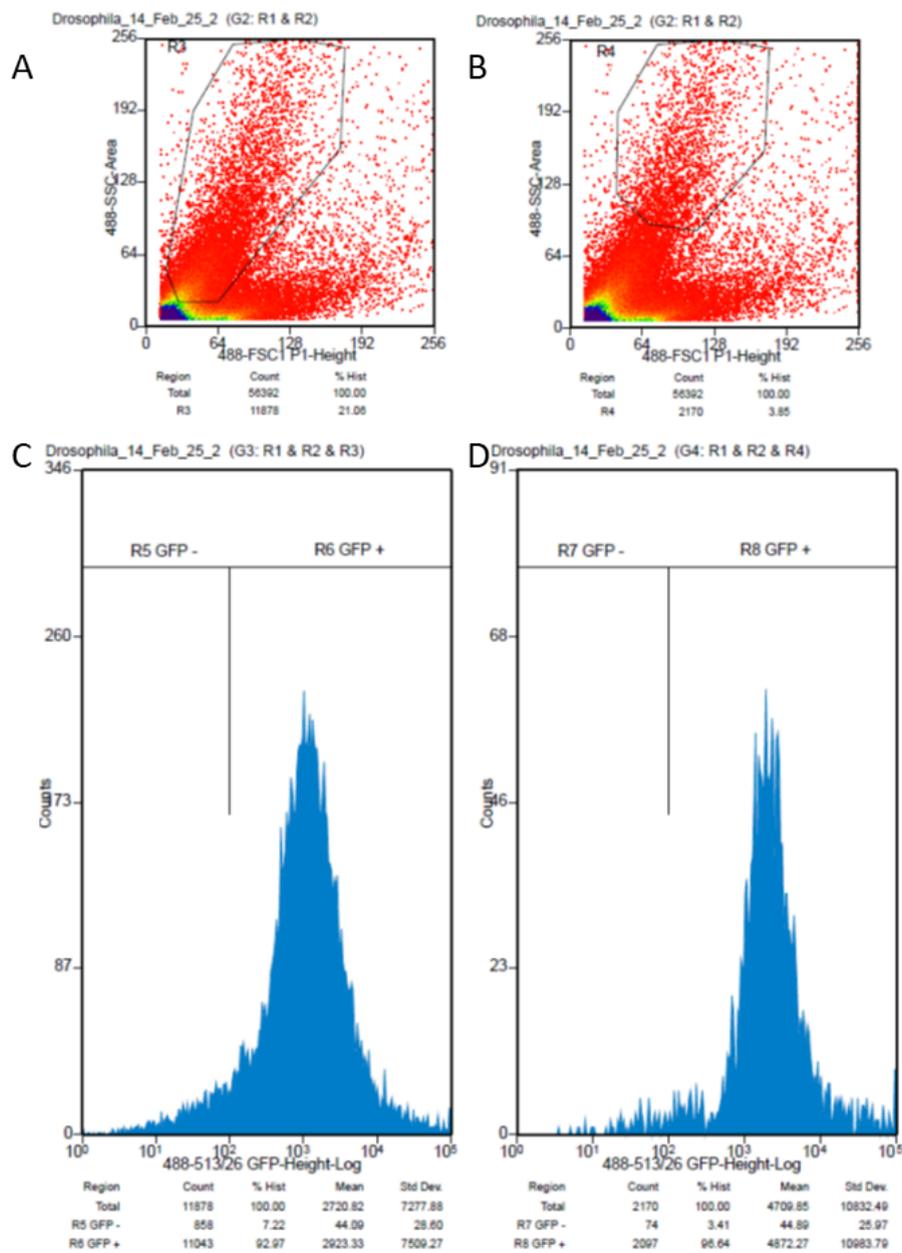


Figura suplementaria 3. Citometría de cerebros de genotipo *prtp-;repoGFP*. En A se muestra la región de células pequeñas, y en B la región de células grandes. En C y D se presentan histogramas de fluorescencia para células pequeñas (C) y para células grandes (D), indicando el área correspondiente a las células GFP+.

Tabla complementaria 1. Medida de los cerebros centrales de los diferentes genotipos analizados. Realizado por el programa ZEN 3.11 (ZEISS lite).

WT	repogal4/UAS-GFP	<i>prtp-; repogal4/UAS-GFP</i>
21119	23193	33891
26520	21519	33132

26407	33819	35447
24475	28527	32213
21675		41217

Tabla complementaria 2. Análisis de normalidad de las medidas de los cerebros centrales mediante el test de Shapiro-Wilk. Realizado en el programa estadístico GraphPad Prism.

<b>Shapiro-Wilk test</b>			
W	0.8589	0.9367	0.8366
P value	0.2244	0.6343	0.1557
Passed normality test (alpha=0.05)	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns
<b>Number of values</b>	5	4	5

Tabla complementaria 3. Análisis mediante ANOVA de una vía de las medidas de los cerebros centrales. Realizado en el programa estadístico GraphPad Prism.

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0.05							
<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95.00% CI of diff.</b>	<b>Below threshold?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>			
Column A vs. Column B	-2725	-9856 to 4405	No	ns	0.5730	A-B		
Column A vs. Column C	-11141	-17864 to -4418	Yes	**	0.0025	A-C		
Column B vs. Column C	-8416	-15546 to -1285	Yes	*	0.0217	B-C		
<b>Test details</b>	<b>Mean 1</b>	<b>Mean 2</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>SE of diff.</b>	<b>n1</b>	<b>n2</b>	<b>q</b>	<b>DF</b>
Column A vs. Column B	24039	26765	-2725	2640	5	4	1.460	11
Column A vs. Column C	24039	35180	-11141	2489	5	5	6.330	11
Column B vs. Column C	26765	35180	-8416	2640	4	5	4.508	11