



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO NEURODEGENERATIVO
POR LA EXPRESIÓN DE UNA FORMA MUTANTE DEL RECEPTOR
DE IP₃ EN OJOS MOSAICO DE *Drosophila melanogaster***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

D O C T O R A E N C I E N C I A S

P R E S E N T A

EVA OLIVIA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

Director de Tesis: **Dr. Mauricio Díaz Muñoz**

Querétaro, Qro.

Junio, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio B-11 del Instituto de Neurobiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Mauricio Díaz Muñoz. El estudio fue apoyado por el CONACYT con el número de proyecto Q-40179.

El comité tutorial estuvo formado por:

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. Rolando E. Hernández Muñoz

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Juan R. Riesgo Escovar

Instituto de Neurobiología, UNAM

AGRADECIMIENTOS

1. Agradecimiento especial al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.
2. Agradecimiento al Comité Tutoral por todas sus sugerencias enriquecedoras para este trabajo y su valioso tiempo para la discusión de los resultados: Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Rolando Hernández Muñoz y Dr. Juan R. Riesgo Escovar.
3. Otorgo un gran agradecimiento a las autoridades del Instituto de Neurobiología, UNAM por su confianza y las facilidades otorgadas para la realización de este doctorado.
4. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el donativo No. Q- 40179, cuyos fondos sirvieron para la realización de esta tesis.
5. Agradecimiento especial al Nut. Fernando López Barrera por su apoyo técnico para la realización de las gráficas, imágenes y esquemas de las presentaciones.
6. Agradezco ampliamente a la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Neurobiología de la UNAM, especialmente a Ma. de Lourdes Palma Tirado por su ayuda técnica para el procesamiento de las muestras y la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión.
7. Otorgo un amplio agradecimiento a la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM; en particular al Sr. Jorge Sepúlveda y al Med. Cir. Rodolfo Paredes Díaz por la obtención de algunas imágenes de microscopía electrónica.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

En la parte de INTRODUCCIÓN de la presente Tesis se desarrollaron aspectos de la dinámica intracelular de calcio, de las características moleculares del receptor de IP₃, del proceso de fototransducción en el ojo de *Drosophila melanogaster*, y de la relación entre el calcio y el estrés oxidativo.

La parte central de los resultados experimentales está incluida el artículo “TIME COURSE OF RETINAL DEGENERATION ASSOCIATED WITH THE ABSENCE OF IP₃ RECEPTOR IN *Drosophila melanogaster*” publicado en la revista especializada de circulación internacional *Experimental Biology and Medicine*.

La parte de DISCUSIÓN consta de una integración general de los temas desarrollados en la Tesis, y complementa el análisis de los resultados que se realizó en la publicación antes mencionada.

Se incluyó un Apéndice que contiene un capítulo de libro titulado: “Invertebrates as experimental models to study neurodegenerative diseases” que fue publicado en el libro: *New perspectives on Brain Cell Damage, Neurodegeneration and Neuroprotective Strategies* de la editorial hindú Research Signpost, así como el artículo de difusión “Muerte Apoptótica en *Drosophila melanogaster* y en Vertebrados Superiores, que fue publicado en la Revista de Educación Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM

ÍNDICE

	Página
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
<i>Dinámica Intracelular de Calcio</i>	9
<i>Receptor de IP₃</i>	11
<i>El ojo de <u>Drosophila melanogaster</u> y la fototransducción</i>	13
<i>Calcio y estrés oxidativo</i>	16
<i>Muerte y Calcio Intracelular</i>	18
Planteamiento del problema	21
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
Metodología	22
<i>Glosario</i>	22
<i>Construcción de moscas con ojo mosaico</i>	22
<i>Reproducción y mantenimiento de las moscas</i>	25
<i>Electrorretinogramas</i>	25
<i>Microscopía electrónica</i>	26
<i>Parámetros de estrés oxidativo</i>	27
<i>Muerte celular por apoptosis</i>	29
Resultados	30
<i>Artículo: Time course of retinal degeneration associated with the absence of IP₃ receptor in Drosophila melanogaster</i>	31
<i>Erratum</i>	56
<i>Obtención de moscas mosaico homocigotos mutantes para el IP₃R</i>	59
<i>Microscopía electrónica</i>	59
<i>Electrorretinogramas</i>	67
<i>Inmunohistoquímica</i>	70
Discusión	75
Conclusiones	83
Perspectivas	85

Bibliografía	86
Apéndice	93
<i>Capítulo de Libro:</i>	
<i>Invertebrates as experimental models to study neurodegenerative diseases</i>	93
<i>Artículo de Revisión:</i>	
<i>Muerte apoptótica en <u>Drosophila melanogaster</u> y en vertebrados superiores</i>	113

RESUMEN

La ausencia del receptor a inositol trifosfato (IP_3) está asociada con la degeneración de la retina en *Drosophila melanogaster*. Para caracterizar el curso temporal de este proceso, se construyeron moscas con ojos mosaico llevando un alelo nulo del gen *itpr* y se estudiaron por electroretinogramas y microscopía electrónica. Las alteraciones morfológicas como las ampollas de la membrana plasmática, mitocondrias rotas y pérdida de fotorreceptores, aumentaron gradualmente a partir del día 5 después de la eclosión y fueron más evidentes durante los días 10-15, evidenciando una fuerte desorganización de las estructuras. La comunicación de las células de la retina con su primer relevo sináptico y el potencial de receptor de fueron significativamente afectados, mostrando una reducción en los transientes ON y OFF, y el potencial de receptor desde el día 10 después de la eclosión. Los defectos funcionales fueron más severos progresivamente. Inesperadamente, las alteraciones no solo fueron detectadas en el segmento no pigmentado mutante sino también en el segmento pigmentado correspondiente a las omatidias no mutantes.

Para explorar el mecanismo que subyace a este proceso degenerativo, se caracterizó el patrón de estrés oxidativo y la muerte apoptótica por técnicas de inmunohistoquímica. Las omatidias mutantes mostraron incrementos intermitentes de reacciones pro-oxidantes (detectadas por aductos de 4- hidroxinonenal) a lo largo de la vida de la mosca. La caspasa 3 (un efector apoptótico) mostró un patrón similar. También se observaron episodios de incrementos de lipoperoxidación y apoptosis en las omatidias no mutantes.

Los resultados indican que los fotorreceptores que carecen del IP_3R sufren incrementos de lipoperoxidación concomitantes con la desorganización celular, la alteración de la fototransducción y la viabilidad celular. Los fotorreceptores no mutantes también mostraron un patrón similar de daño, indicando que el proceso degenerativo es no autónomo y es tan intenso que se propaga hasta las células no mutantes de los ojos mosaico. En conclusión, la omatidia con la mutación nula del IP_3R degenera con un proceso asociado con actividad lipoperoxidativa y apoptótica intermitente.

ABSTRACT

The absence of the inositol trisphosphate receptor (IP₃R) in the eye is associated with a gradual retinal degeneration in *Drosophila melanogaster*. To characterize the time course of this process, mosaic flies with homozygous mutant patches in the eye with a null allele of the *itpr* gene in the eye were studied by electroretinograms and transmission electron microscopy. Membrane blebbing, disrupted mitochondria, altered morphology, and loss of photoreceptors were increased progressively starting 5 days after hatching, and were more evident at days 10-15. Highly disorganized structures were observed after. The first communication of retinal cells with the synaptic cells and the receptor potential were also significantly distorted. The electroretinograms (ERGs) showed reduced on and off transients as well as decreased receptor potential starting at day 10 of hatching. The functional defects became progressively more severe. Unexpectedly, these alterations were detected not only in the non-pigmented mutant ommatidia, but also in the pigmented, IP₃R-expressing, wild-type ommatidia.

To explore the mechanism underlying this degenerative process, the progression of pro-oxidant and apoptotic reactions was characterized by immunohistochemical techniques. Mutant ommatidia showed intermittent episodes of increased pro-oxidant reactions (detected as adducts of 4-hydroxy-nonenal) throughout the fly's life. Similarly, several episodes of active caspase 3, an apoptotic effector, were evident with the same time pattern. Episodes of enhanced lipid peroxidation and apoptosis were also observed in wild type ommatidia.

The results indicate that photoreceptors lacking IP₃R suffer episodes of increased lipid peroxidation concomitant with retinal cells subcellular organization and disruption of phototransduction and cell viability. Wild type photoreceptors also showed a similar pattern of damage, indicating that the degenerative process is non-autonomous and is so intense that it propagated to the non-mutant retinal cells in the mosaic eyes. In conclusion, ommatidia harboring a null mutation of the IP₃R degenerate by a process associated with intermittent lipid peroxidation and apoptotic activities.

INTRODUCCIÓN

DINÁMICA DEL CALCIO INTRACELULAR

El calcio es un elemento clave en el control metabólico y en la fisiología celular. Los cambios en los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma resultan de un equilibrio coordinado entre diversos compartimentos en donde el catión transita por medio de canales iónicos, transportadores y ATPasas (Jaiswal, 2001). La concentración basal del Ca^{2+} citosólico se encuentra en el rango nM bajo, y durante eventos de activación se incrementa varias veces llegando en algunas ocasiones hasta niveles μM . El Ca^{2+} ingresa al citosol desde el espacio extracelular o liberándose a partir de los depósitos intracelulares (principalmente retículo endoplásmico y mitocondria). En la membrana plasmática se localizan canales de calcio que se activan ya sea por cambios en el potencial de membrana, o por la acción de ligandos específicos. En esta membrana se encuentra también una ATPasa que moviliza el calcio hacia el medio extracelular.

Los depósitos intracelulares son piezas importantes en la homeostasis del calcio, ya que la función de almacenaje para el catión es vital para la célula.

La mitocondria es un reservorio de calcio y lo capta a través de un uniportador, el cual posiblemente se abre cuando el calcio citoplásmico es alto. Este uniportador se bloquea por rutenio y varios derivados de éste. El calcio se almacena por el gradiente del potencial electroquímico generado por la combinación del potencial de la membrana mitocondrial interna y la baja concentración de calcio en la matriz (Duchen, 1999).

Se ha reportado que el núcleo también almacena importantes concentraciones de calcio. El calcio nuclear tiene un papel importante en la regulación de la expresión de genes en las células, aunque no se sabe con certeza los mecanismos involucrados en el control de la señalización del calcio en este organelo. Se ha reportado la presencia de receptores a inositol trifosfato (IP_3R), a Ryanodina (RyR) y de la ATPasa de calcio sensible a tapsigargina en la membrana nuclear, sin embargo, continúa siendo éste un campo de investigación activa (Kusnier, 2006).

El retículo endoplásmico es posiblemente el reservorio de calcio intracelular más importante, ya que es capaz de almacenar las concentraciones más altas del catión. En el retículo endoplásmico está ampliamente reportada la existencia de dos canales liberadores de calcio, los receptores a Ryanodina y los receptores a IP_3 , así como el de una ATPasa

(SERCA) sensible a tapsigargina que introduce el catión hacia el lumen del organelo (Carafoli et al., 2001).

El calcio es un elemento clave en la fisiología celular, ya que presenta un papel múltiple: 1) como mensajero intracelular y efector de receptores acoplados a proteínas G y receptores con actividad de tirosina cinasa, 2) como ión con actividad despolarizante y disparador de eventos de secreción, y 3) como un elemento estabilizador de la estructura celular, ya que la señalización de calcio controla un vasto rango de funciones, desde respuestas de corto plazo, tales como la contracción del citoesqueleto y la secreción de vesículas, hasta respuestas de tiempos más prolongados, como la diferenciación, la división y la muerte celular (Venkatachalam et al, 2002).

Por todo lo anterior, el calcio citosólico está tan finamente regulado, lo que permite un funcionamiento adecuado del sistema celular; y por la misma razón, se explica que alteraciones en la dinámica intracelular de calcio repercutan negativamente en los eventos de comunicación intra e intercelular, y al mismo tiempo se vuelva frágil la estructura celular.

Dada la importancia fisiológica de la homeostasis intracelular de calcio, entender los mecanismos y las moléculas involucradas en ésta constituyen un tema de investigación muy relevante y de muchos alcances.

Se han utilizado diversos modelos experimentales para el estudio del calcio intracelular tales como células en cultivo, células neoplásicas, organelos aislados, etc. Todos ellos han aportado una amplia información sobre los mecanismos celulares y moleculares responsables de la dinámica del calcio intracelular; sin embargo, no ha sido posible estudiar el papel funcional del manejo de calcio en sistemas más complejos como tejidos, órganos u organismos. En este mismo sentido, el estudio del calcio intracelular siempre ha estado limitado por la dificultad de utilizar técnicas y recursos de genética molecular en vertebrados, que son la mayoría de los animales experimentales de uso común, principalmente por la presencia de múltiples isoformas de los canales y ATPasas involucrados en este evento.

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es un modelo sencillo, barato y muy accesible en condiciones de laboratorio. Este organismo ofrece muchas ventajas prácticas, ya que su ciclo de vida es muy corto y se conoce todo su genoma. Desde hace varias décadas, la mosca de la fruta ha sido utilizada para llevar a cabo diversos estudios genéticos y ha servido de modelo experimental para diversas patologías humanas, que en otros

organismos ha sido muy difíciles de reproducir. También se ha utilizado para entender procesos fisiológicos complejos, en base a la correspondencia entre un gran número de genes del invertebrado con los de mamíferos. Por todas estas razones, *Drosophila melanogaster* está considerada como un modelo de laboratorio muy útil y versátil. Otra de las grandes ventajas del empleo experimental de este insecto, es que muchas veces existe solo una copia del gen de interés, a diferencia de los mamíferos en donde se encuentran muchas veces isoformas múltiples.

En *Drosophila melanogaster* ya se han realizado diversos estudios para entender la dinámica intracelular de calcio, dirigidos a saber si existen las mismas proteínas reguladoras que han sido reportadas en mamíferos, así como a entender su modulación (Vázquez-Martínez, et al, 2003).

En la mosca de la fruta existen la mayoría de las proteínas que tienen que ver con el control del calcio intracelular: por ejemplo, el gen *dry* que codifica para homólogo en *Drosophila* del RyR (Takeshima et al, 1994); el gen *itp-r83A* para el homólogo de la mosca del IP₃R (Sinha y Hasan, 1999), y un homólogo de la ATPasa de Ca²⁺ sensible a tapsigargina (SERCA) (CaP60A). Mientras que en *Drosophila* sólo existe un locus para cada una de estas proteínas, en vertebrados existen 3 genes distintos para cada una de éstas (Magyar et al., 1995).

Se sabe que el calcio es un mensajero intracelular en varios sistemas celulares de *Drosophila*, como en la definición del eje de simetría corporal, la liberación de neurotransmisores y la actividad de los fotorreceptores (Cretón et al., 2000 y Hardie, 2001).

RECEPTOR DE IP₃

Diversos estímulos extracelulares incluyendo factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores generan 1,4,5-inositol trifosfato (IP₃) por la activación de diversos receptores de membrana plasmática y eventualmente por la acción de una fosfolipasa C (PLC). El recambio del IP₃ juega un papel importante en la transducción de señales biológicas en la mayoría de las células eucariontes, particularmente en el sistema nervioso central. Existen dos clases de receptores capaces de responder a los estímulos extracelulares y activar esta vía: los receptores de 7 pases transmembranales acoplados a proteínas G que activan a la fosfolipasa C β (PLCβ) y los receptores a tirosin cinasas que activan a la PLCγ. La activación de estas fosfolipasas promueven la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-

difosfato (PIP₂) generando inositol 1,4,5- trifosfato (IP₃) y 1,2- diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a su receptor en el retículo endoplásmico y activa la liberación de Ca²⁺ de este depósito (Mikoshiba et al, 1994 y Hisatsune, 2005).

Se ha descrito la cristalización de gran parte del NH₂ terminal del IP₃R de cerebelo de rata (tipo 1), siendo los hallazgos más importantes los siguientes: 1) Se reconoce una estructura con 2 dominios, la cual presenta poca simetría. 2) El sitio de unión al IP₃ se encuentra en el surco central entre los 2 dominios. 3) Cada dominio presenta proporciones similares de estructura alfa-hélice y hoja beta-plegada. 4) Se infiere que los lóbulos cambian su conformación al unirse el IP₃, y que este cambio conformacional se comunica a la región del poro para permitir su apertura (Bosanac et al, 2002).

El gen que codifica para el IP₃R en *Drosophila melanogaster* (ltp-r83a) se encuentra en el brazo derecho del 3er. cromosoma. Su ubicación abarca desde la posición cromosómica 83A5 hasta la 83A9. En la mosca, este canal liberador de Ca²⁺ se expresa de manera ubicua y está implicado en múltiples aspectos del desarrollo, pero los procesos fisiológicos asociados a su función todavía no se han aclarado (Venkatesh y Hasan, 1997).

El receptor de IP₃ esta homogéneamente localizado (Figura 1) en todos los tejidos tanto en el embrión como en el adulto (Vázquez-Martínez, 2003).

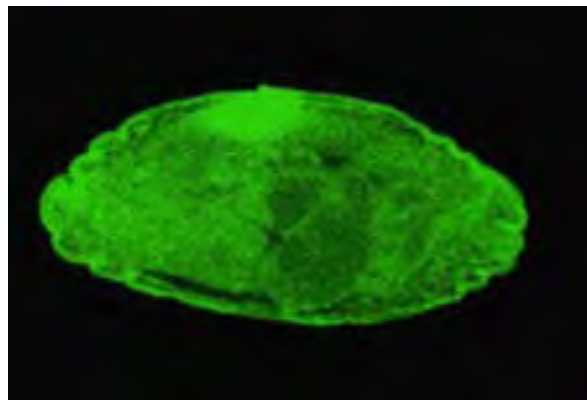


Figura 1. Embrión de mosca en el estadio 16 teñido con 2 μM de FL-Heparina

La localización del mRNA del IP₃R en tejidos de moscas adultas como la retina y la antena, sugiere que este receptor se pudiera requerir durante la transducción visual y olfatoria. Además, es muy abundante en patas y tórax (Yoshikawa et al, 1992). La proteína tiene hasta un 50 % de homología con los IP₃R de vertebrados, y en ciertas porciones del carboxilo terminal se detecta una homología muy importante con los RyRs (Yoshikawa et

al, 1992). En 1997, Venkatesh y Hasan reportaron un alelo mutante para el IP₃R, originado por la inserción de un elemento P {PZ} a 200 pares de bases del extremo 5' del primer exón. Las mutantes (Itp-r83A⁰⁵⁶¹⁶) mueren en el segundo estadio larvario. Se han descrito otros alelos mutantes del IP₃R (Raghu et al, 2000). En nuestro proyecto contamos con dos de ellas: 1) La mutante B0 nula, ya que no se detecta el ARNm del IP₃R en sus tejidos, y 2) la mutante L4 que presenta la inserción de un transposón en una zona cercana al primer exón, sin embargo, en este alelo no se sabe si el receptor es expresado o no, y a que tipo de alelo de falta de función da origen.

El grupo de Hardie generó clones homocigotos mutantes para el IP₃R en el ojo de moscas mosaico. Estos autores reportaron hallazgos inesperados que se resumen más adelante y que sirven de antecedentes directos para el presente proyecto.

EL OJO DE *Drosophila melanogaster* Y LA FOTOTRANSDUCCIÓN

En el adulto, el ojo compuesto de *Drosophila melanogaster* está formado por aproximadamente 800 unidades conocidas como omatidia. Cada omatidia a su vez se compone de 20 células entre las que se incluyen 8 fotorreceptores de naturaleza neuronal (Figura 2).

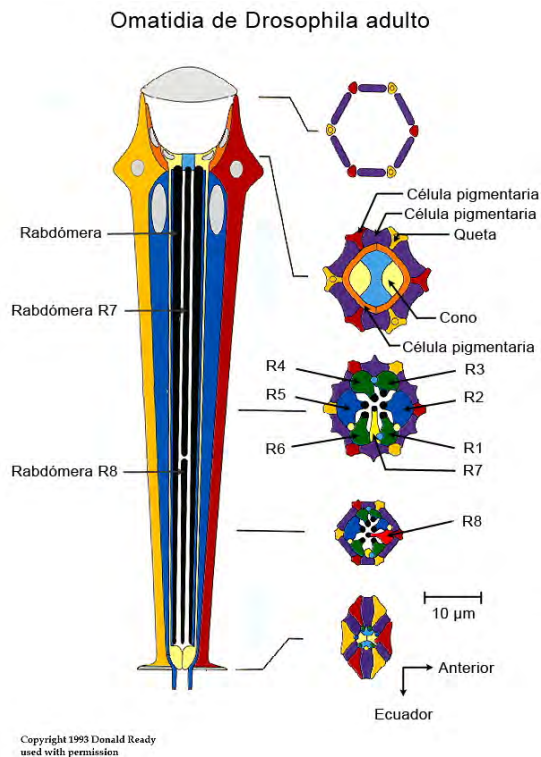


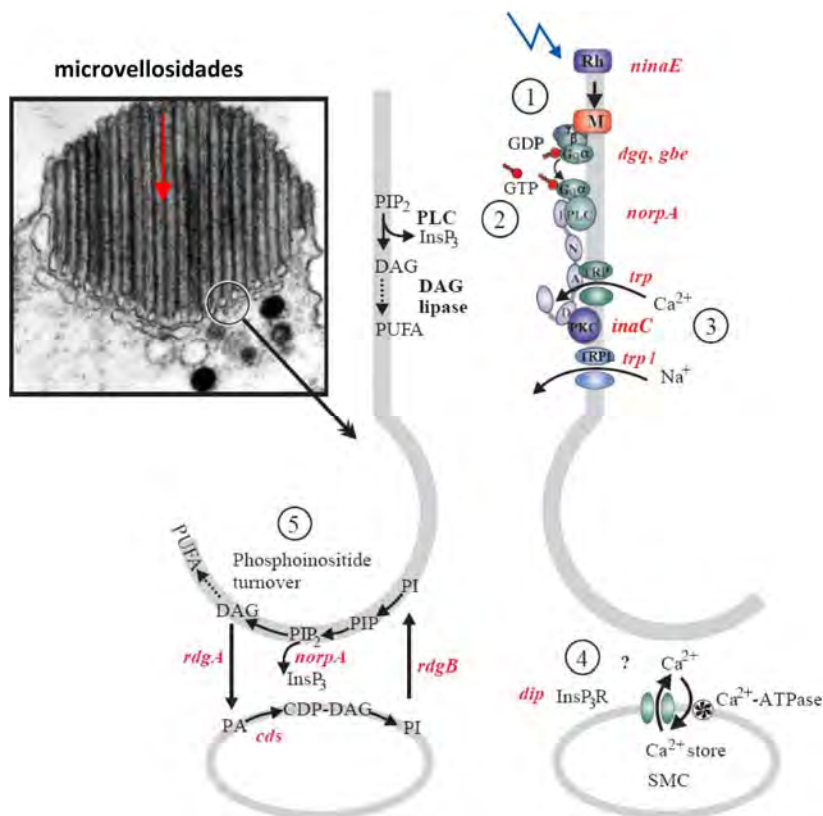
Figura 2. Esquema de una omatidia del ojo de *Drosophila melanogaster*.

En el sistema visual de la mosca adulta se expresan 6 tipos de rodopsinas. La identidad funcional de los fotorreceptores depende de las formas moleculares de rodopsina presentes que varían según su respuesta a la luz visible y ultravioleta. Los fotorreceptores R1- R6 contienen la rodopsina de amplio espectro Rh1, mientras que los ocelos contienen la rodopsina Rh2. De acuerdo al tipo de rodopsina en los fotorreceptores internos, se pueden distinguir 3 clases de omatidias. En el borde del área dorsal, los fotorreceptores R7 y R8 contienen la rodopsina UV- Rh3. Estas omatidias forman un filtro polarizante que detecta la luz UV reflejada por el cielo. Las otras 2 clases de omatidias están distribuidas al azar en el resto de la retina y presentan diferencias en la fluorescencia de los fotorreceptores internos, omatidias yellow (*y*: ~70% de las omatidias) y omatidias pálidas (*p*: el ~30% restante). Las omatidias *y* expresan la rodopsina UV- Rh4 en los fotorreceptores R7 y la rodopsina Rh6 sensible a la luz verde en los fotorreceptores R8; mientras que las omatidias *p* expresan la rodopsina UV- Rh3 en R7 y Rh5 en R8. Se cree que la importancia biológica de estos subtipos de omatidias permite la discriminación de un rango amplio de longitudes de onda ya que con las omatidias *y* se discriminan la mayoría de las longitudes de onda corta y con las omatidias *p* se discriminan colores que van hasta el verde (Tahayato et al, 2003). A lo largo de cada neurona fotorreceptora se presenta una especialización de la membrana plasmática conocida como rabdómera. La rabdómera está formada por cerca de 60 mil microvellosidades; éstas son el equivalente a los segmentos externos de los conos y bastones de mamíferos, ya que contienen la rodopsina y la maquinaria molecular que se encarga de la fototransducción. Más de 100 millones de moléculas de rodopsina se localizan en cada fotorreceptor (Pepe, 1999).

La fototransducción se lleva a cabo en la rabdómera (Figura 3). Las microvellosidades que conforman la rabdómera, tiene una longitud de 1-2 μm y 60 nm de diámetro. En la base de cada microvellosidad se encuentra el aparato molecular de la fototransducción. La fototransducción en *Drosophila melanogaster* depende de Na^+ y Ca^{2+} extracelular y está mediada por dos clases de canales: los canales TRP y TRPL (*transient receptor potential* y *transient receptor potential like*). Los pasos de la fototransducción son los siguientes: 1) El fotón es absorbido por el cromóforo 11-*cis* retinal, y la fotoisomerización resultante al *all-trans* retinal dirige la conversión de la rodopsina a metarodopsina que activa el heterodímero de la proteína Gq por la vía de intercambio GDP-GTP, liberando la subunidad Gq α . 2) Gq α activa la PLC- β que genera IP₃ y DAG, a partir de PIP₂. 3) Después de esto,

se activan las dos clases de canales sensibles a la luz (TRP y TRPL) por un mecanismo aún desconocido. 4) En la base de la microvellosidad se encuentra un sistema de cisternas que tienen depósitos de Ca^{2+} y tienen IP_3R y ATPasas del tipo SERCA en sus membranas. Las cisternas pudieran ser importantes en el ciclo del fosfatidilinositol, para asegurar niveles adecuado de PIP_2 en la membrana plasmática (Hardie, 2001). 5) El DAG generado se convierte en ácido fosfatídico y entra a la vía de la cinasa del DAG para convertirse a fosfatidil inositol (PI), y por la fosfatidil inositol sintetasa el PI es transportado de regreso a la membrana de la microvellosidad. Para completar el ciclo se convierte el PI a PIP_2 por fosforilación secuencial (la cinasa de PI y la cinasa de PIP) (Hardie, 2001).

La fototransducción en *Drosophila melanogaster* requiere necesariamente la actividad de PLC, ya que mutantes nulos de la PLC- β , el gen *norpA*, no tienen respuesta a la luz (Bloomquist et al, 1988). Sin embargo, el mecanismo por el cual la actividad de la PLC- β está ligada a la apertura de los canales TRP y TRPL no ha sido dilucidado.



Hardie, R. 2001. J Exp Biol. 204:3403-3409.

Figura 3. Señalización molecular durante el proceso de fototransducción en *D. melanogaster*. Las claves en letras rojas indican las mutantes que muestran defectos durante el proceso.

CALCIO Y ESTRÉS OXIDATIVO

Los cambios en los niveles de Ca^{2+} citosólico juegan un papel muy importante en la modulación de diversas vías de señalización intracelular. Algunas de estas vías se asocian a reacciones pro-oxidantes que intervienen en procesos de señalización celular, pero que en casos de desregulación, producen alteraciones severas que culminan en el aumento de la fragilidad celular.

El delicado balance entre las ventajas y desventajas de las reacciones pro-oxidantes, es claramente un aspecto importante en la vida celular. Es por esta razón que actualmente se reconoce que la regulación redox del metabolismo celular es un campo amplio de estudio que tiene fuerte impacto en diversas disciplinas como la fisiología, la biología celular y la medicina clínica (Dröge, 2002).

Una consecuencia de las reacciones pro-oxidantes es que las membranas celulares están constantemente expuestas a especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno, cuya acción está íntimamente ligada a un proceso conocido como lipoperoxidación. Muchas condiciones patológicas y enfermedades humanas están relacionadas con un aumento de la peroxidación lipídica.

Durante la lipoperoxidación una molécula reactiva (radical libre), como es el hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), ataca un ácido graso, constituyente de triacilgliceroles o fosfoacilgliceroles. La interacción del radical libre va dirigida al carbono adyacente, a un doble enlace, ocasionando un rompimiento homolítico al sustraer un hidrógeno que forma agua al unirse al radical, mientras que el ácido graso presenta un electrón libre en el carbono afectado por el hidroxilo. Una vez que a un fosfolípido se le quita un electrón, éste busca estabilizar su estructura química y toma el electrón de la molécula próxima, generándose así una reacción en cadena (Figura 4). Los productos de la lipoperoxidación son aldehídos, cetonas, esterres, alcoholes. Este proceso repetitivo conduce a la membrana a perder sus propiedades fisicoquímicas y culmina con la muerte de la célula. La lipoperoxidación se asocia con diversos padecimientos como la rigidez de los vasos sanguíneos (ateroesclerosis), la inflamación de las articulaciones (artritis reumatoide), el cáncer y el proceso de envejecimiento celular (Velázquez-Paniagua, M et al, 2004).

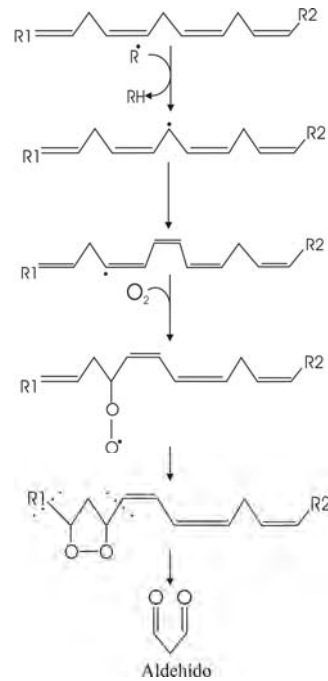


Figura 4. Reacción en cadena de la lipoperoxidación.

El manejo del calcio celular también puede ser un factor que favorezca la actividad lipoperoxidativa, ya que la falta de control en la dinámica del calcio intracelular puede activar y desactivar enzimas en momentos inapropiados. Por ejemplo, existen proteasas, fosfolipasas y endonucleasas dependientes de Ca^{2+} que podrían tener un encendido descontrolado causando a su vez degradación de proteínas, membranas y del DNA. El Ca^{2+} también estimula ciertas formas de la óxido nítrico sintetasa, que en presencia del ión superóxido, promueve la formación del anión reactivo peroxinitrito.

La mitocondria a través de la cadena de transporte de electrones es un sitio para la generación de radicales libres. En condiciones de reposo entre el 2 y 5% del oxígeno molecular que consume la mitocondria es parcialmente reducido a ión superóxido (O_2^-). El O_2^- en H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD) y a su vez, el H_2O_2 es transformada en agua y O_2 por la acción de la catalasa o la glutatión peroxidasa.

La alteración de la actividad mitocondrial por falta de regulación celular en el manejo del calcio, también puede repercutir en un incremento en la actividad lipoperoxidativa. En este caso, el calcio intramitocondrial impide un correcto acoplamiento de la fosforilación oxidativa, por lo que se produce un desacoplamiento de la cadena de transporte de

electrones, una producción insuficiente de ATP y eventualmente un incremento en la formación del ión superóxido.

Otra consecuencia del incremento en el calcio citosólico, es la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). El mPTP es una molecular formada por varias proteínas, una de las cuales es un canal no selectivo dependiente de voltaje modulado por Ca^{2+} . La elevación del calcio citosólico y el estrés oxidativo mantienen el poro en un estado abierto (Wischin- Fuentes y col., 2009)

MUERTE CELULAR Y CALCIO

Una de las paradojas del Ca^{2+} es que funciona como señal de vida y de muerte celular, ya que es necesario que existan elevaciones del catión dentro de la célula para que funcione como señal, pero por otro lado, si los mecanismos que regulan la dinámica intracelular de Ca^{2+} se alteran irreversiblemente y se presentan elevaciones prolongadas de Ca^{2+} , la sobrevivencia de la célula se ve amenazada. Esto desemboca en una muerte apoptótica o necrótica (Martínez-Gómez y Dent, 2002).

Se ha comprobado en diversos tipos celulares que con la adición de taspigargina, un inhibidor de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, se provoca el vaciamiento del catión de los depósitos intracelulares, la acumulación del catión en el citosol y eventualmente se induce el proceso apoptótico (Bian et al, 1997). Sin embargo, también se ha estudiado ampliamente que la muerte celular por apoptosis o muerte celular programada (MCP) no es un proceso que se presente únicamente en casos de daño o cuando la homeostasis de la célula se ve comprometida. Se sabe que la apoptosis es un paso crucial para que se lleve a cabo una organogénesis exitosa durante el desarrollo de los tejidos durante la ontogénesis (Danial y Korsmeyer, 2004).

Siendo la apoptosis esencial para el desarrollo, la embriogénesis y la homeostasis tanto en vertebrados como en invertebrados, se reconoce que es un evento programado en el que participan numerosos genes en forma concertada (Ellis, 1992 y Raff et al, 1993). Este proceso se ha caracterizado en organismos tan variados como plantas, nemátodos, insectos y mamíferos. Las células apoptóticas tienen una morfología característica: hinchamiento de la membrana celular y formación de vesículas (blebbing), reducción del tamaño celular y condensación nuclear.

Una falla en la regulación de la apoptosis puede tener consecuencias perjudiciales incluyendo tumorigénesis, autoinmunidad, enfermedades neurodegenerativas, deficiencias hematopoyéticas e infertilidad (Ranger et al, 2001, Giannetti et al, 2004 y Danial y Korsmeyer, 2004). La apoptosis es un mecanismo de control homeostático/reostático que aunque implica la destrucción de la integridad celular, es necesario para la conformación correcta de tejidos y órganos.

Se reconocen diversos tipos de muerte celular en función de la vía de señalización que se activa durante el proceso. Se había pensado que la muerte celular programada era exclusivamente por apoptosis, mientras que la necrosis era considerada un modo de muerte más circunstancial. Sin embargo se ha visto que la necrosis es también un mecanismo regulado, tanto en su activación como en su mecanismo. El término empleado recientemente para definir la muerte por necrosis es el de Necroptosis (Glick, 2010).

También la autofagia se ha propuesto como un mecanismo de muerte celular. La autofagia es por sí misma un proceso degradativo que es importante para balancear las fuentes de energía en momentos críticos del desarrollo y en respuesta al estrés asociado a la falta de nutrientes.

La autofagia también juega un papel importante en la remoción de agregados de proteínas mal plegadas, eliminación de organelos dañados (mitocondrias, retículo endoplásmico y peroxisomas), así como la eliminación de patógenos intracelulares (Glick, 2010).

La pérdida en la homeostasis de diversos metabolitos intracelulares o la desregulación de vías completas de señalización, pueden dar lugar a la activación del programa de muerte celular que mejor convenga a un sistema celular dado.

La señalización intracelular por Ca^{2+} puede activar señales de muerte, actuando a través de la mitocondria o del retículo endoplásmico (RE). De manera basal, existe un continuo intercambio de calcio entre estos dos organelos. Normalmente, el RE es el principal almacén del Ca^{2+} intracelular; sin embargo, también la mitocondria puede almacenarlo a bajos niveles. Si el RE libera una cantidad exagerada de Ca^{2+} , se pueden activar señales de estrés en el RE y activar genes involucrados en la vía apoptótica. Por otra parte, el Ca^{2+} liberado por el RE es capturado por la mitocondria y cuando existen altos niveles del catión dentro de ésta, activan eventos que dirigen a la célula a la muerte celular, ya sea apoptótica o necrótica (Berridge et al, 1998, Parchen y Doutheil, 1999 y Siesjö y Kristian, 1999).

Otra forma plenamente demostrada en que el calcio ejerce acción tóxica es la excitotoxicidad. En este fenómeno aminoácidos activadores estimulan la entrada de Ca^{2+}

extracelular a través de receptores canal sensibles a glutamato. Independientemente de la ruta de entrada del calcio, la elevación de este catión en el citoplasma usualmente responde a estímulos extra e intracelulares: 1) La entrada de calcio por la membrana plasmática puede activar la liberación de calcio de depósitos intracelulares (liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}); 2) El calcio liberado por el receptor de Ryanodina y de IP_3 puede activar cinasas o fosfatasas que cambien el estado de fosforilación y la forma de apertura de canales de calcio dependientes de voltaje o de ligando, ubicados en la membrana plasmática; 3) En varios sistemas celulares el núcleo puede actuar como organelo movilizador de calcio, ya sea de forma independiente o supeditada a la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular (Morales-Tlalpan, 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Basándonos en los antecedentes antes citados y tomando en cuenta que los mecanismos involucrados en la degeneración de la estructura ocular en *Drosophila melanogaster* mutante para el IP₃R son desconocidos, en el presente proyecto proponemos utilizar un modelo de moscas mosaico para el estudio detallado de los procesos involucrados. Este tipo de eventos tienen una relación cercana con ciertas enfermedades (Alzheimer, Huntington, Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica, Esclerosis Múltipla, etc.) que cursan con degeneración neuronal, y que son un problema de salud cada vez más apremiante en las sociedades modernas.

HIPÓTESIS

La mutación nula de alelos del gen para el IP₃R en el ojo de *Drosophila* generará alteraciones en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular, lo que activará reacciones pro-oxidantes que eventualmente comprometerán la estructura celular de este órgano.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar de manera funcional y estructural el proceso neurodegenerativo asociado a mutaciones del IP₃R en omatidias homocigotas mutantes de moscas mosaico.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construcción de moscas mosaico con clones homocigotos de los alelos mutantes del IP₃R en el ojo.
2. Establecer el curso temporal que tiene la neurodegeneración del ojo de las moscas mosaico utilizando técnicas de microscopía electrónica y analizando la capacidad visual de las moscas mosaico por medio de electroretinogramas.
3. Identificar la posible participación de reacciones pro-oxidantes con pruebas fluorescentes y anticuerpos específicos contra subproductos de la actividad lipoperoxidativa, durante el proceso de degeneración del ojo en las moscas mutantes.
4. Una vez establecido el curso temporal de la neurodegeneración se tratará de definir el mecanismo de muerte celular: Se analizará el desarrollo y la estabilidad de la estructura del ojo por medio de observaciones al microscopio confocal o de epifluorescencia a través de técnicas inmunohistoquímicas, con el fin de definir si la destrucción celular se lleva a cabo por necrosis o apoptosis.

METODOLOGÍA

Glosario:

Sb (Stubble): fenotipo de quetas cortas y gruesas.

Ser (Serrate): fenotipo de alas con los extremos incompletos.

Cyo (Curly of Oster): fenotipo con alas curvadas hacia arriba, cromosoma balanceador. El marcador dominante es Cy, alas curvas.

TM3: balanceador del cromosoma 3, marcado con *Ser* o *Sb*.

TM6: balanceador del cromosoma 3, marcado con *Ubx*.

Tb: fenotipo con el cuerpo acortado y engrosado.

y: mutación *yellow*, cuerpo de color café claro

w: mutación *white*, ojos de color blanco.

hsflp: gen de la flipasa que se activa por calor

M: mutación *minute*, produce un fenotipo de quetas delgadas

Ubx: halterios alterados

Balanceador: son cromosomas que están diseñados para prevenir la recombinación genética entre cromosomas homólogos durante la meiosis.

1. CONSTRUCCIÓN DE MOSCAS CON OJOS MOSAICO

Una mosca mosaico es un organismo en el cual se expresa una mutación de interés de forma homocigota en un solo tipo celular. Esta estrategia es útil sobretodo cuando se trata de mutaciones letales que si se expresan en el organismo completo son letales. Para distinguir las células mutantes dentro del órgano de interés del resto celular, se utiliza algún marcador de tejido y de color, por ejemplo. El marcador de tejido nos va a ayudar a dirigir la mutación y el marcador de color, nos ayuda a diferenciar las células mutantes de las no mutantes. Esto último resulta una gran ventaja en el caso del ojo y en la Figura 1 de los resultados se muestra una mosca mosaico genético de ojo.

Las moscas mosaico se obtuvieron por 2 estrategias:

- 1) Se solicitó al Dr. P. Raghú moscas con alelos mutantes del IP₃R reportados por su grupo (alelos *l(3)itpr^{B4}* y *l(3)itpr^{90B.0}*). Se hicieron cruzas para obtener mosaicos del IP₃R utilizando únicamente el alelo *l(3)itpr^{90B.0}*. Esta cepa se cruzó con moscas que tienen el cDNA de la flipasa bajo el control transcripcional de un intensificador específico de ojo proveniente del gen *eyeless (ey)*, el nombre del stock utilizado en el laboratorio fue:

(yweyeflp;FRT82armlacZ)/ TM6, *Ubx*

Las mutantes obtenidas se llamaron B0 por el stock inicial enviado por el grupo del Dr. Raghú en donde la mutación del receptor de IP₃ es nula, es decir, no se sintetiza el RNA mensajero del gen.

- 2) El segundo grupo de moscas mosaico se obtuvo, a partir de una línea de moscas mutantes para el IP₃R (línea # 11664 del Banco de Bloomington) basándonos también en el sistema FRT/FLP de recombinación mitótica (**F**lipase **R**ecombinación **T**arget, sitios de reconocimiento de la Flipasa que hacen posible la recombinación) (Theodosiou y Xu, 1998). La mutante así obtenida se denominó L4 y es pertinente mencionar que la alteración molecular del IP₃R de este alelo no está aún caracterizada. Al momento de la eclosión es fácil identificar las moscas que muestren clonas de células mutantes en el ojo por la falta de pigmento.

PRIMERA CRUZA

<p>♀ <u>ry-; P{ry+}Itpr83A</u> TM3, Sb¹, Ser¹, ry-</p> <p style="text-align: center; font-size: 2em;">X</p> <p>♂ ywhsflp; <u>FRT82w+M</u> TM6, Tb¹, Sb¹</p>	<p>El objetivo es generar moscas recombinantes que van a tener la mutación en estudio y la FRT82 recombinados en el mismo brazo del cromosoma. En la cruce se rescatan hembras vírgenes que tengan las siguientes características:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- No Toby 2.- Ojos rojos 3.- Pelos largos y delgados (no Sb) 4.- Alas normales (no Ser) <p>Antes de cruzar estas hembras con machos que contienen un cromosoma balanceador, se debe agregar antibiótico (geneticina 25mg/ ml) al alimento del frasco en el que se va a realizar la cruce para que se rescaten en la progenie las que tengan el FRT, ya que las moscas FRT tienen un gen de resistencia a geneticina. Idealmente, así se rescatarán las moscas que contengan el FRT. El genotipo esperado es:</p> <p>R1 = ywhsflp; <u>ry- P{ry+}itpr83A</u> FRT82 w+ M</p>
--	---

SEGUNDA CRUZA

<p>♀ $yw; \underline{ry- P\{ry+\}itpr83A}$ FRT82 w+ M</p> <p style="text-align: center;">X</p> <p>♂ $yw; \underline{D \underline{gl}}$ TM3, Sb¹, Ser¹</p>	<p>Las moscas obtenidas con el genotipo anterior se deben de cruzar con machos que contienen un cromosoma balanceador, para que las recombinaciones que se generaron en sus gametos no se pierdan. De esta cruce se rescatan las hembras vírgenes y los machos que tengan las siguientes características:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- No Toby 2.- Ojos blancos 3.- Alas cortadas (Ser) y hacia atrás 4.- Quetas cortas y gruesas <p>Las hembras vírgenes de la progenie resultante se cruzan nuevamente con machos que contienen el cromosoma balanceador. La cruce se realiza colocando una sola pareja por frasco. El genotipo esperado es:</p> <p style="text-align: center;">$yw; \underline{FRT82itpr83A}$ TM3, Sb¹, Ser¹</p>
--	--

TERCERA CRUZA

<p>♀ $yw; \underline{FRT82itpr83A}$ TM3, Sb¹, Ser¹</p> <p style="text-align: center;">X</p> <p>♂ $yw; \underline{D \underline{gl}}$ TM3, Sb¹, Ser¹</p>	<p>De la progenie obtenida de la cruce anterior se toman las hembras vírgenes y los machos, que tengan las siguientes características:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- No Toby 2.- Ojos blancos 3.- Alas con los extremos incompletos y hacia atrás 4.- Quetas cortas y gruesas (Sb¹) <p>Se realizan cruzan entre sí y la clona resultante es el stock que se conserva y se crece para realizar la cruce final para obtener los mosaicos. Se seleccionan los frascos que son homocigotos letales, ya que sólo esos son los que son los recombinantes de interés. El genotipo esperado es:</p> <p style="text-align: center;">$yw; \underline{FRT82itpr83A}$ TM3, Sb¹, Ser¹</p>
---	---

Una vez obtenida una línea de individuos heterocigotos para un cromosoma FRT82 itpr83A^{L4}, se cruza con otra línea de moscas que tienen el cDNA de la flipasa FRT bajo el control transcripcional de un intensificador específico para ojo proveniente del gen *eyeless* (*ey*) y un promotor basal. De esta forma se obtienen finalmente las moscas con ojos mosaico, es decir, solo una parte del ojo será mutante homocigota para la mutación en estudio.

2. REPRODUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS MOSCAS

Los stocks de *Drosophila melanogaster* se mantuvieron en un cuarto con ciclo luz/oscuridad 12:12 a una temperatura constante de 25° C. El medio de cultivo se preparó de la siguiente manera: 50 g de levadura activa, 50g de azúcar o piloncillo y 15g de agar. Se aforó a 500 ml de agua desionizada y se esterilizó en autoclave. Se permitió enfriar a 55° C aproximadamente y se agregaron 5 ml de ácido propiónico y 7g de grenetina. Se puso el medio en viales esterilizados de 10 x 3cm y se mantuvieron en refrigeración tapados con algodón.

3. ELECTORRETINOGRAMAS

Para los electrorretinogramas, se siguió el método reportado por Ayer y Carlson en 1991, en el cual se toma una mosca y se coloca en una punta de pipeta de 200 µl para inmovilizarla. Se corta la punta y se fija sobre un portaobjetos con un trozo de plastilina o cera dental. Se coloca en un microscopio estereoscópico y se hace contacto eléctrico en la mosca con un electrodo de registro sobre la superficie del ojo, y uno de referencia insertado en el tórax. Los electrodos se preparan con vidrio de borosilicato (O. D.: 1.5mm, I. D.: 0.86mm) y se llenan con Buffer de Ringer para *Drosophila* (182 mM de KCl, 46 mM de NaCl, 3 mM de CaCl₂, 10 mM de Tris-Base a pH 7.2).

A un lado del microscopio se tiene una lámpara de fibra óptica, que en uno de sus brazos tiene adaptado un obturador de cámara fotográfica. Esta lámpara sirve para dar un pulso de luz blanca con una duración de 100 ms. y el registro se realizó a 500 ms. / 20 mV.

Los electrodos están acoplados a un amplificador que amplifica la señal 10 veces, y este a su vez está conectado a un osciloscopio en donde se observa y mide la señal eléctrica generada por el ojo de la mosca cuando recibe el pulso de luz. Se registraron 10 moscas en

cada edad estudiada (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 60 días después de la eclosión), haciendo 5 registros en la zona mutante y 5 en la zona no mutante del ojo.

El electroretinograma (ERG) es el registro de la respuesta de campo de células fotorreceptoras y postsinápticas de la retina de mosca. El ERG consta de 3 principales componentes, 1) una respuesta rápida positiva cuando se enciende la luz conocido como transiente ON, 2) un componente sostenido negativo que se mantiene mientras la luz está encendida que se conoce como potencial de receptor y 3) una respuesta negativa pronunciada conocida como transiente OFF que se presenta cuando se apaga la luz. Los transientes ON y OFF se producen por las neuronas de segundo orden de la lámina en la postsinápsis de los fotorreceptores (Kelly y Suzuki, 1974). El potencial de receptor viene directamente de los fotorreceptores.

Dentro del registro se cuantifican los 4 diferentes parámetros de interés (transientes ON y OFF, potencial de receptor y overshoot; Figura 1). Al final se promediaron y se realizó una *t* de student.

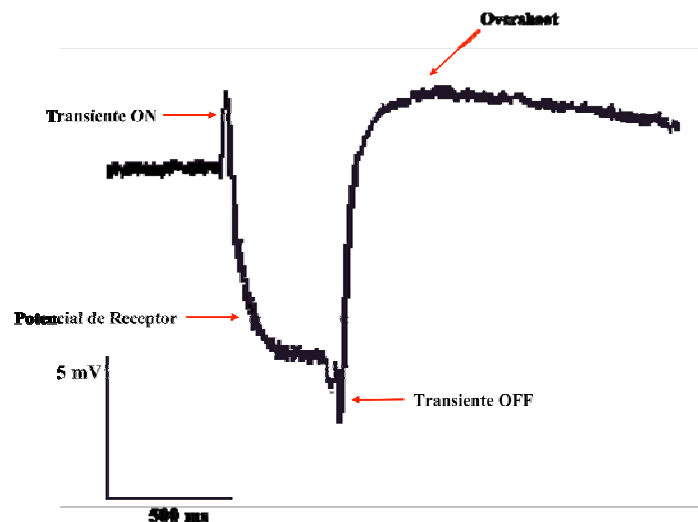


Fig 1 Representación de un electroretinograma donde se muestran los componentes de interés dentro del trazo.

4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El uso del microscopio electrónico de transmisión se utilizó para analizar la estructura fina de la retina de la mosca. En una micrografía electrónica de una muestra es posible distinguir los diferentes componentes de una célula (membrana plasmática y organelos) y

sus características morfológicas, ya que es posible realizar cortes ultrafinos (60-80 nm) y aumentos muy grandes (hasta 1 millón de veces)

Cabezas de moscas de diferentes edades después de la eclosión fueron procesadas utilizando el siguiente método:

- Se cortan las cabezas y se ponen en hielo durante 2 h en glutaraldehído al 2.5 %, buffer de cacodilatos 0.1 M y tetraóxido de osmio al 2 %.
- Se retira el fijador y las cabezas se deshidratan secuencialmente con etanol al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% durante 30 min.
- Se pasan a acetona al 100% durante 30 min., 2 veces.
- Se ponen en acetona al 100% y resina (DURCUPAN) en una solución 1:1.
- Se dejan en rotación suave durante 2 días, se ponen en los moldes, se rellenan con resina fresca y se dejan en el horno a 60° C durante 2 días o hasta que la resina esté completamente dura.
- Una vez polimerizados los bloques, se desmoldan y se cortan en un ultramicrotomo a 60-80 nm de grosor. Los cortes se colectan en rejillas de cobre de 300 mesh y se contrastan con el siguiente protocolo:
 - Acetato de Uranilo al 2 %: 15 min en plancha caliente (60-100° C) y 5 min a temperatura ambiente. Se enjuagan con 100 ml de agua desionizada.
 - Citrato de Plomo al 2 %: 12 min a temperatura ambiente, se enjuagan y se dejan secar.
- Se observan en el microscopio electrónico de transmisión.

5. PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO

La presencia de reacciones pro-oxidantes asociadas a formas reactivas de oxígeno se midió por técnicas inmunohistoquímicas a través de la detección de subproductos de lipoperoxidación utilizando anticuerpos específicos fluorescentes (Thompson et al, 1986; Pou et al, 1993; Mohanty et al, 1997; Ohishi et al, 1985). Los experimentos se evaluaron por microscopía de epifluorescencia y/o confocal. La disección de las retinas de los ojos de *Drosophila melanogaster* se basó en el método reportado por Hiromi (Hiromi, 1990). A continuación se describe a detalle:

- Se seccionan las cabezas por la mitad y se fijan en una solución de paraformaldehído al 3 %, sacarosa al 3.5 % y fosfato de sodio 100 mM a pH 7.4, durante 24 h a 4° C.
- Se enjuaga 1 vez con buffer de fosfato de sodio 100 mM a pH 7.4.
- El tejido se deshidrata secuencialmente por acetonas al 50, 70 y 90 %, durante 30 min cada una.
- Se enjuaga con buffer de fosfato de sodio 2 veces, se extraen las retinas con una aguja de tungsteno y se dejan en buffer de fosfatos (PBS) (Hiromi, 1990).
- Se quita el buffer y se bloquen con leche baja en grasa al 4 % durante 20 min. . La leche se diluye en buffer de fosfatos con tritón X-100 al 0.2 % (PBST) (Carthew, 2000).
- Se quita la solución bloqueadora y se agrega el anticuerpo primario que reconoce conjugados de 4-hidroxi-nonanal (Rabbit Anti-HNE, Alpha Diagnostic International- Cat. #HNE11-S) en una dilución 1:500 diluido en PBST.
- Se deja incubando toda la noche a 4° C.
- Se enjuaga el tejido con PBS durante 10 min. en 3 ocasiones.
- Se agrega nuevamente la solución bloqueadora y se incuba durante 30 min. y se agrega el anticuerpo secundario anti- conejo conjugado con FITC (fluoresceína isotiocianato) (Donkey anti- Rabbit secondary antibody IgG FITC Cat. # 2090, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) en una dilución 1: 5000. Se incuba durante 2 h a 4° C.
- Se enjuaga con PBS durante 10 min. en 3 ocasiones y se montan las retinas con una solución de 1:1 de PBS: glicerol en un “sándwich” entre 2 cubreobjetos sobre un portaobjetos.
- Se observan al microscopio de epifluorescencia, y se cuantifica la señal mediante el software Image ProPLUS 5.5.

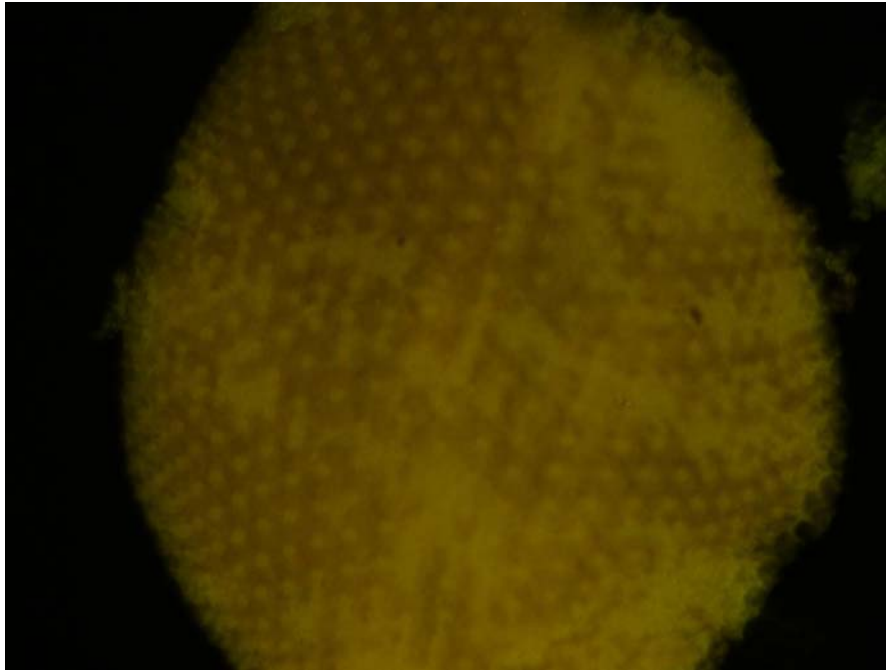


Figura 1: Retina completa de *Drosophila* aislada por el método de Hiromi.

La cuantificación de la densidad promedio de fluorescencia se realizó tomando 3 zonas de un área determinada, tanto en la zona no mutante como en la zona mutante. Esto se calcula en el control negativo y en el positivo; al positivo se resta el negativo en cada zona y el resultado se grafica como actividad lipoperoxidativa en el positivo (zona mutante) y negativo (zona no mutante).

6. MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

Se siguió el mismo método de extracción de retinas descrito por Hiromi y se utilizó la misma técnica de inmunohistoquímica y cuantificación descrita en el párrafo anterior.

Se evaluó el proceso de muerte celular por apoptosis utilizando el anticuerpo anti-caspasa 3 (Cell Signalling Technology Cat. # 9662. Rabbit Caspasa3 Antibody) a una dilución 1:25.

El anticuerpo que utilizamos ya fue evaluado en *Drosophila* a una concentración menor (Ohsawa, 2008). Se utilizó el mismo anticuerpo secundario del estrés oxidativo. Los resultados fueron evaluados por *t* de student y las gráficas se realizaron con el software Sigma Plot 10.0.

RESULTADOS

La descripción de los resultados obtenidos con el alelo B0 se presentan en el artículo anexo a continuación, el cual consta de una *Fe de erratas* con algunas correcciones finales. Inmediatamente después del artículo se describen los resultados obtenidos con el otro alelo mutante estudiado, el alelo L4.

**TIME COURSE OF RETINAL DEGENERATION ASSOCIATED
WITH THE ABSENCE OF IP₃ RECEPTOR IN *Drosophila melanogaster***

Olivia Vázquez-Martínez, Angélica Loranca, Lourdes Palma-Tirado, Sabina Wischín-Fuentes, Mónica Villalobos-Leal, Anaid Antaramián, Juan Riesgo-Escovar, Rolando Hernández-Muñoz¹, and Mauricio Díaz-Muñoz*

Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro and ¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, MÉXICO

Running title: Lack of IP₃R and retinal neurodegeneration

*Author for correspondence:

Mauricio Díaz-Muñoz, Ph D
(mdiaz@inb.unam.mx)
Instituto de Neurobiología
Km 15 Carretera QRO-SLP
Campus UNAM-Juriquilla
Querétaro 76230, QRO
MÉXICO
Tel and Fax: + 52 442 2381035

ABSTRACT

The absence of the inositol trisphosphate receptor is associated with a gradual retinal degeneration in *Drosophila melanogaster*. To characterize the time course profile of this process, mosaic flies expressing a null allele of the *itp* gene in the eye were studied by electroretinograms and electronic microscopy. Membrane contour alterations, disrupted mitochondria, altered morphology, and even loss of photoreceptors were increased progressively starting 5 days after hatching, were more evident during days 10-15, and promoted highly disorganized structures thereafter. The synaptic transmission and membrane potential of retinal cells were also significantly distorted; showing reduced on and off transients as well as membrane potential from day 10 of hatching, and the functional defects became progressively more severe. Unexpectedly, these alterations were detected not only in the non-pigmented mutant ommatidia, but also in the pigmented ommatidia, including heterozygous and twin clones expressing IP₃R.

To explore the mechanism underlying this degenerative process, the progression of pro-oxidant and apoptotic reactions was characterized by immunohistochemical techniques. Mutant ommatidia showed intermittent episodes of increased pro-oxidant reactions (detected as adducts of 4-hydroxy-nonenal) throughout the fly's life. Similarly, several episodes of active caspase 3, an apoptotic effector, were evident with the same time pattern. Episodes of enhanced lipid peroxidation and apoptosis were also observed in the pigmented ommatidia of the mosaic eyes.

The results indicate that photoreceptors lacking IP₃R suffer episodes of increased lipid peroxidation which eventually perturb the retinal subcellular organization and disrupt the phototransduction process and cell viability. Pigmented ommatidia also showed a similar pattern of damage, indicating that the degenerative process is non-autonomous and is so intense that it propagated to the non-mutant retinal cells in the mosaic eyes. In

conclusion, ommatidia with a null mutation of IP₃R degenerate by a process associated with intermittent lipid peroxidation and apoptotic activities.

Key Words: Null mutation, apoptosis, oxidative stress, 4-hydroxy-nonenal, electroretinogram, electron microscopy.

INTRODUCTION

The 1, 4, 5-inositol trisphosphate receptor (IP₃R) is a high molecular weight, tetrameric protein that participates in calcium dynamics in non-excitabile and excitable cells. The IP₃R functions as an intracellular calcium-release channel in response to signal transduction processes. This receptor is an allosteric protein whose activity is modulated by a number of metabolic factors such as calcium levels, adenine nucleotides, redox state, phosphorylation-dephosphorylation, and the presence of regulatory proteins, among others (1, 2). In particular, the IP₃R is involved in the control of gene expression, neuronal signaling, exocytosis, intracellular pH, and apoptosis. Indeed, experiments in tissues with enhanced or abolished expression of IP₃R have indicated a direct role of this calcium-release channel in cellular duplication and survival (3). It has been demonstrated that the carboxy-terminal region of the IP₃R binds the pro-apoptotic mitochondrial factor cytochrome C (3) as well as the mutant protein huntingtin, which is directly responsible for the neurodegenerative progression linked to Huntington's disease (4). The association both of these proteins with IP₃R enhances its response and promotes abnormal calcium signaling prior to the onset of apoptotic activity (3, 4).

The genome of *Drosophila melanogaster* shows only one gene, DroIP₃R that codes for IP₃R, and it is localized in the right arm of the third chromosome at the position 83A5-83A9. DroIP₃R is expressed ubiquitously and is implicated at several stages of fly development, but the precise role played in specific cellular systems, tissues, and organs is still undetermined (5); DroIP₃R shows 50% homology with IP₃Rs in vertebrates (6). We reported coincidence between ligand binding parameters such as [³H]-IP₃ affinity and sensitivity to antagonists (heparin, 2-APB (aceto-methoxy 2-aminoethoxydiphenyl borate), and Xestospongin C) between DroIP₃R and IP₃Rs from vertebrate organisms (7). In addition, a fluorescent probe specific for DroIP₃R showed positive signal in the cytoplasm

of almost every tissue of embryos and adult flies (7). In 1997, Venkatesh and Hasan (5) reported a DroIP₃R mutant allele constructed by the insertion of a P element, and the homozygotic animals with this mutation (Itp-r83A⁰⁵⁶¹⁶) died at the second larva instar stage.

The *Drosophila* adult eye has ~800 visual units known as ommatidia. Each ommatidium is formed by 20 different cell types, 8 photoreceptor and 12 accessory cells. Each photoreceptor shows a microvillar structure called rhabdomere, which is the functional part of the system during the phototransduction process. This event is highly dependent on extracellular Ca²⁺ and is mediated by two principal types of plasma membrane calcium channels: TRP and TRPL (Transient Receptor Potential and Transient Receptor Potential-Like, respectively) (8).

Since phototransduction is impaired in flies expressing mutant alleles of phospholipase C in the eye (*norpA*), it was hypothesized that the DroIP₃R might be playing a role in the molecular events underlying the light-driven activation of *Drosophila* photoreceptors (8). However, this suggestion was excluded based on studies of null mutants for DroIP₃R in retina, in which the phototransduction process was completely normal (9, 10). Strikingly, after a few days, the mutant flies showed a progressive retinal degeneration that severely affected the photoreceptor structure even when the flies were kept in darkness (9).

Given the close relation between disruption of intracellular calcium dynamics and generation of reactive oxygen species (ROS) (11), this project was based on the hypothesis that the failure to express DroIP₃R in the retina would cause an onset of pro-oxidant reactions. Eventually, the concomitant oxidative stress would interfere with the organization and alter the function of the photoreceptors, leading to cell death.

Indeed, using flies with mosaic eyes, we demonstrated that prior to the structural and functional modifications elicited by the lack of IP₃R, the affected photoreceptors showed episodes of increasing lipid peroxidative activity as well as apoptosis. The extent of the damage was non-autonomous since it was not confined to the mutant ommatidia but extended to the pigmented ommatidia, in accord with previous reports of some mutations that are so aggressive that their deleterious effects spread to adjacent cells (12).

MATERIALS AND METHODS

Materials

For immunohistochemical experiments, the antibody anti-caspase 3 was obtained from Cell Signaling Company, MA, USA and anti-4-Hydroxy-nonenal from Alpha Diagnostic International, TX, USA. The resin for electron microscopy was from Electron Microscopy Sciences, PA. Secondary antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Ca, USA. All the other chemical substances were purchased from Sigma-Aldrich Company, St. Louis MO, USA

Mutant flies

Mutant flies lacking IP₃R were kindly donated by Dr. Padinjat Raghu (Cambridge University, England) (allele 1 (3) *itr*^{90B.0}). A complete molecular characterization of this mutation was previously reported by Venkatesh and Hasan (5).

Experimental and control groups

Mosaics were generated by the expression of the gene *eyeflp* (*yweyflp*; *FRT82armlacZ/ TM6, Ubx*) in the mutant flies donated by Dr. Raghu.

Flies stocks were maintained on a 12 h light/ 12 h dark cycle (lights on at 07:00 h) at constant temperature (≈28 °C). We express the mosaic using the *FRT90IP₃R^{B0}* stock obtained from Dr. Raghu mating with an *yweyflp*; *FRT82armlacZ/ TM6, Ubx* stock (13,

14). Flies are mosaic of pigmented (heterozygous or homozygous for the w⁺ marker) and unpigmented (lacking the marker) tissue.

Non-mosaic, heterozygous flies were used as additional controls. They were born in the same cohort from which mosaics were obtained, and they were selected by their lack of eye pigmentation.

Electroretinograms

Flies were attached to a cover slip with dental wax; the ground electrode was introduced into the thorax whereas the recording electrode was placed in contact with the eye surface. The electroretinogram was initiated by a light beam of 100 ms, and the recorded activity was collected by an amplifier at 500 ms/20 mV (15).

Recording was done in non-mosaic and mosaic flies. In the mosaic flies, 5 recordings were made in the pigmented ommatidia section of the eye and another 5 in the mutant zone (without pigmentation) of each fly. The experiment was performed from 10:00 to 12:00 h in 8-10 flies at each time point studied.

Electron microscopy

Fly heads were dissected and fixed in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4 containing 2% OsO₄ and 2.5% glutaraldehyde for 2 h. Dehydration was achieved with ethanol in increasing concentrations: 30%, 50%, 70%, 90%, and 100%. After dehydration, the heads were put into 100 % acetone for 30 min and impregnated in a mixture of acetone and DURCUPAN resin (1:1) with gentle rotation overnight. The resin was polymerized by placing the samples in a 60°C oven for 30 min. The heads were sectioned into 60-80 nm slices in an ultramicrotome, and prepared for electron microscopy (16). Subcellular structures were examined in mosaic and non-mosaic flies, comparing the alterations in

mutant with non-mutant ommatidia (17), and photoreceptor disappearance was also evaluated.

Estimation of lipid peroxidation and apoptosis

An immunohistochemical approach was used to evaluate the onset and progression of lipid peroxidative and apoptotic activities. Peroxidation of lipids was estimated using an antibody against protein adducts with 4-hydroxynonenal (4-HNE), whereas apoptosis was assessed with an antibody against active caspase 3. Sampling of retinas was done every 2- 3 days extending 41 (caspase 3) and 50 days (4-HNE) after hatching. The eyes were fixed in a solution of 4% paraformaldehyde, 20% sucrose, and sodium phosphate pH 7.4 for 24 h. Dehydration was made with increasing concentrations of acetone: 30%, 50%, and 70%. Retinas were carefully separated from corneas by manipulating a pair of tungsten needles under a stereoscopic microscope (18). Retinas were blocked with 2% bovine fetal serum, 2% albumin, and phosphate buffer containing 0.25% Triton X-100. Incubation with the first antibody (at 1:500 for 4-HNE and 1:25 for caspase 3) was over night at 4° C. The second FITC-conjugated antibody was added at a 1:5000 dilution (for both antibodies) and was incubated for 2 h. After each incubation, the samples were washed 3 times for 3 min to decrease the non-specific signals. The images were obtained in an epifluorescence microscope and analyzed with Image Pro plus 5.1. The quantitative expression of the lipid peroxidative and apoptotic activities in the pigmented ommatidia and mutant ommatidia of the mosaic eyes involved three steps: 1) Calculation of the fluorescent signal detected in absence of the first antibody; 2) Quantification of the signal in presence of both antibodies; 3) Estimation of the difference between step 2 and 1 to get the net fluorescent signal. Results were compared with the signal detected in control, non-mosaic flies without pigment.

Even though the caspase 3 antibody was raised from a human epitope, several tests indicated adequate recognition of the *Drosophila* protein (19) (data not shown).

Data analysis

Values are expressed as mean \pm SEM. Significance was tested by ANOVA and the Student's t-test. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Time Course of Electretinogram Disruption. To gain insight into the process of retinal degeneration associated with the absence of IP₃R, electroretinograms were recorded periodically in mosaic flies from day 1 to \approx day 45 after hatching. Representative recordings of pigmented and mutant ommatidia of mosaic flies (5 and 45 days-old) are displayed in Figure 1, panel D. Non-mosaic flies showed normal electroretinograms with well-defined ON and OFF transients and a clear receptor potential (arrows in panels A-C but recording not shown). The recordings in mosaic flies depicted alterations in both pigmented and mutant ommatidia, with shorter ON and OFF transients (panels A and C) and briefer receptor potential (panel B).

The time course of the electroretinogram disruption in pigmented and mutant ommatidia of mosaic flies showed similar patterns during the first 10 days after hatching. However, a significant shortening in the ON and OFF transients was detected after day 10. In the following days, the OFF transient and the receptor potential became even smaller, resulting in a much distorted electroretinogram by day 30 and thereafter (panels A-D). Electroretinograms performed in pigmented ommatidia of mosaic flies showed smaller, but consistent alterations in the ON and OFF transients and the receptor potential. In contrast, the electroretinograms obtained in control flies expressing IP₃R but without pigment did not show any significant changes from day 1 to 45 after hatching (arrows in panels A-C). Taken together, the electrophysiological results indicate that the lack of IP₃R is

compensated during the first 10 days by an unknown adaptive mechanism; however, after \approx day 15 the function of the photoreceptors and their synaptic contacts deteriorate progressively, culminating in a much altered electroretinogram after day 30. The significant alterations in the recordings of the pigmented ommatidia section of the mosaic eye strongly suggest that damage spread from the mutant ommatidia (12).

Time Course of Structural Modifications of the Photoreceptors. The onset and progression of the damage in structural features of pigmented ommatidia and IP₃R-null ommatidia are depicted in Figure 2 and summarized in Table 1. In mosaic eyes, the onset of modified cellular components was detected by day 5, first with subtle alterations even in pigmented ommatidia; in subsequent days the damage in mutant ommatidia became more severe, especially in photoreceptors and endomembranes. Incipient membrane contour alterations was observed in plasma membranes by day 5 (panel B), increasing at day 15 (panel C, white arrows). At this time, sections of some photoreceptors lacking the IP₃R looked deformed and contracted in the rhabdomeric membranes (asterisk in panel C). By day 40, when the degenerative process is more advanced, loss of photoreceptors, broken mitochondria, and distorted morphology of the ommatidia were clearly observed. Some changes were also observed in pigmented ommatidia of the mosaic flies, such as contour alterations in membranes and minor damage in nuclei and mitochondria at days 5 and became more apparent at day 15, probably because of damage spreading from the cells without IP₃R. Some of the alterations observed (membrane contour alterations and broken organelles) are characteristics of apoptotic death. In contrast, morphological and ultrastructural characteristics were normal in the non-mosaic control flies (panel A).

Time Course of Pro-oxidant Reactions. Peroxidation of lipids, as an indicator of pro-oxidant reactions, was quantified in *Drosophila* retina *in situ* by an antibody that recognized proteins conjugated with 4-hydroxy-nonenal (Figure 3, panel B). Several

episodes of enhanced lipid peroxidation were observed beginning in the first days after hatching in the pigmented and mutant ommatidia of mosaic flies, indicating that a burst in oxidant episodes was taking place in ommatidia with and without expression of the IP₃R (Figure 3, panel A). Five coincident peaks of lipoperoxidative activity were detected in both zones during the course of the experiment (approximately one per week), but the peroxidative bursts expressed by the pigmented ommatidia in the mosaic flies were ≈20% smaller. The signal associated with 4-hydroxy-nonenal adducts was barely detectable in non-mosaic control flies (Figure 3, panel A).

Time Course of Apoptotic Activity. Figure 4, panel A shows the sequential bursts of activity of the pro-apoptotic enzyme caspase 3. The activated caspase 3 was detected by immunochemical techniques in the retinas of mosaic flies (Figure 4, panel B). As with the lipid peroxidation results, the pigmented and mutant ommatidia in the mosaic eyes showed coincident increases in apoptotic activity throughout the 40 days of experimental observations. Concurrent increases in caspase 3 signals were detected in 5 peaks over the course of the 45 days of experimental observations (approximately one per week). Again, fluorescent signal associated with active caspase 3 was barely detectable in the retinas of non-mosaic control flies (Figure 4, panel A).

DISCUSSION

The observation made by Rhagu et al. (9) regarding the damage and cellular death in *Drosophila* retinal cells without IP₃R provided an opportunity to examine the relationship between this calcium-release channel and the integrity of specialized cells such as photoreceptors after hatching. *Drosophila* is an accepted experimental model to study degenerative processes since it is possible to study the effects of loss-of-function mutations in mosaic tissues (12). The use of non-mosaic flies without eye pigment born in the same cohort of mosaics flies demonstrated that the degenerative process observed in mosaic flies

was due to the lack of IP₃R and not to the non-pigmented condition that accompanied construction of the mosaic eyes. In addition, the damage observed in the pigmented ommatidia of the mosaic flies clearly indicated that the degenerative process was not autonomous, but instead it propagated from the mutant photoreceptors to the rest of the eye cells (13, 12). The exact propagating mechanism for the cellular alterations is not known. Given the plausible pro-oxidant damage in the cells containing the mutant IP₃R, some possibilities might be: 1) the release of ROS/RNS associated to pro-oxidant bursts, 2) the onset of inflammatory reactions promoted by dying cells, 3) transit of diffusible disability molecules and factors from the affected cells by gap junctions.

Models of Retinal Degeneration

Numerous mutations expressed in *Drosophila* eye involve some type of retinal degeneration. Alterations in genes of the phototransduction pathway result in morphological abnormalities whose expression is dependent on light stimulation. In contrast, the cellular disruption associated with the absence of IP₃R is light-independent (9). Some other mutations that are also independent of photonic stimulus are: *ninaE* (Rhodopsin 1), *ninaA* (Cyclophilin-related protein), *rdgA* (Diacylglycerol kinase), *arr1* (Arrestin 1), and *trp* (Transient receptor potential channel) (13). Another aspect that is distinctive about the retinal degeneration in the IP₃R mutant flies is the long time interval before it is established (days to weeks). Retinal degeneration associated with other mutated genes usually exhibit functional or morphological abnormalities within only 1 or 2 days (*rdgA*, *rdgB*, *arr2*) (8, 20).

IP₃R and Calcium Mobilization in Fly Retina

The biophysical properties of the *Drosophila* IP₃R are similar to those reported for its vertebrate counterparts, and more precisely to the IP₃R type 1 (21). The distinctive characteristics of IP₃R type 1 are: medium IP₃-affinity, a high ATP affinity, and a low Ca²⁺

affinity (22). In addition, IP₃R type 1 has been recognized as a critical factor in apoptosis (1); however, this role has not been studied for the *Drosophila* IP₃R.

As to the role played by the IP₃R in retinal cells, especially in the physiology of photoreceptors, it is accepted that in the same way that occurs in other cellular systems, the IP₃R is localized in endomembranes such as the endoplasmic reticulum and nucleus. Nonetheless, in photoreceptors, the IP₃R fulfills complementary roles, releasing calcium in photon-responsive (submicrovillar cisternae) and in non-responsive zones (perinuclear and cytoplasmic cisternae). It has been suggested that in open-rhabdom eyes such as *Drosophila*'s, the more important calcium reservoir for phototransduction is not the one associated with the submicrovillar cisternae but the extracellular distended lacunae at the bases of the rhabdomeric structures. On the other hand, the rest of the endoplasmic reticulum seems to play a much more important role in the intracellular calcium dynamics by participating in cell signaling, communication with the mitochondrial network, control of pro-oxidant and apoptotic reactions, and regulation of protein folding (23).

In addition to the IP₃R, another calcium-release channel, the RyR, is also present in the *Drosophila* retina (7). This raises the possibility of a more complex intracellular calcium regulation since it is well documented that when these 2 receptor channels coexist in the same cell, they usually act in coordination to fine tune the mobilization of cytoplasmic and nuclear calcium (24). RyR is localized in the perinuclear endoplasmic reticulum and in the submicrovillar cisternae, but at much higher concentration in the former set of endomembranes (25). Further experiments are needed to find out if the presence and/or properties of the RyR change in the mutant retinal cells lacking the IP₃R.

IP₃R, Oxidative Stress, and Cell Death

It is well accepted that IP₃R is a modulator of the apoptotic process (1). Both pro- and antiapoptotic factors are recognized with high affinity by the IP₃R. Knock out of IP₃R

genes usually results in prevention of apoptosis (26, 27). Hence, the degenerative process observed in *Drosophila*'s mosaic eyes in the ommatidia without IP₃R is unexpected.

To suggest a mechanism to explain the cellular events involved in the retinal damage, it is convenient to consider the tight relation between oxidative reactions and intracellular calcium dynamics. Even though the phototransduction process, which depends on extracellular calcium, is not affected by the lack of IP₃R, it is necessary to characterize the cellular events within the photoreceptors that are regulated by the calcium released from intracellular deposits.

Temporal Integration

Our study detected 2 phases in the degenerative process associated with the lack of IP₃R in the retina: The first encompasses the first 10 -15 days after eclosion, when the structural and functional damage are mild. In contrast, the second phase, from day 15 and on, involves severe abnormalities that compromise the integrity of the photoreceptor.

Phase 1. The mutant flies lacking retinal IP₃R showed distorted electroretinograms 10 days after hatching, indicating an altered membrane potential and synaptic activity (Figure 1). The first defects, the loss of the ON and OFF transients, are usually associated with the impaired electrical communication in the first synapse of the visual pathway between the photoreceptor and the neurons at the lamina layer. On the other hand, structural abnormalities in the mutant retinas started at day 5, with incipient membrane contour alterations in the photoreceptor membrane that became more evident by days 10 – 15 (Figure 2). Remarkably, increased episodes of lipoperoxidative and caspase 3 activities were detected during the first week after eclosion, suggesting that functional and structural defects were preceded by enhanced pro-oxidant reactions as well as an activated program of cell death (Figures 3 and 4).

Phase 2. Electroretinograms and membrane structures were seriously modified: The electrical response to photonic stimulation is almost lost, and the photoreceptor morphology is highly disorganized, even showing loss of rhabdomeric structures. The increased lipid peroxidation and the caspase 3 activity continue throughout the entire second phase (Figures 3 and 4). One interpretation of these data is that, in the absence of IP₃R, the system reaches a point at which it is no longer able to sustain equilibrium between pro-oxidant reactions and antioxidant defenses. Beyond that point (\approx day 15 after hatching), the degenerative process becomes irreversible.

In summary, our results indicate that the absence of IP₃R in the retina promotes continuous and propagating episodes of oxidative stress and apoptotic activity during the entire post-hatching period. These intermittent episodes of pro-oxidant and apoptotic reactions have been observed in other experimental systems such as liver regeneration and it has been explained as events of cellular damage promoted by alteration in redox balance (28). During the first 10 days the system can compensate, although not completely, for the increase in pro-oxidant reactions and the enhanced apoptotic activity. The compensatory mechanisms might involve antioxidant defenses and increased cellular exchange. However, after 15 days the system loses its capacity to compensate for or repair the oxidative damage, and a cascade of deleterious effects make the retinal cells unable to survive. It would be opportune to explore if necrotic events also take place along with apoptosis during the degenerative process promoted by the null IP₃R mutation in *Drosophila*.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

OV-M performed all the experiments and participated in drafting the manuscript

AL-C participated in generating the mosaics and implemented the technique to obtain the retinas and the immunohistochemical experiments

LP-T helped with the electron microscopy

SW-F helped with the quantification of fluorescent signals

MV-L helped in obtaining the mosaic flies, isolating retinas, and with the oxidative stress experiments

AA helped in the mating of flies to get the mosaic stocks

JR-E contributed the fly stock, helped with the genetic experiments, and participated in drafting the manuscript

RH-M participated in drafting the manuscript

MD-M conceived the study, participated in designing the project and drafting the manuscript

ACKNOWLEDGMENTS

We are in debt with the **Ph.D. Program in Biological Sciences, UNAM since this manuscript is part of the O.V.-M. Doctoral thesis**. We thank Drs. Mario Zurita and Enrique Reynaud (Instituto de Biotecnología, UNAM) for their suggestions to improve the manuscript. We also thank the Electron Microscopy Unit of the Institute of Cellular Physiology, especially Mr. Rodolfo Paredes and Mr. Jorge Sepulveda for their collaboration in electronic microscopy techniques, Nutriologist Fernando López-Barrera for assistance with preparing the Figures, and Dr. Dorothy Pless for correcting the English version of manuscript. The project was supported by CONACyT grant 40179- Q to MD-M.

REFERENCES

1. Choe CU and Ehrlich BE. The inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor (IP₃R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci. STKE* 363: re15, 2006
2. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 131: 1047-1058, 2007
3. Verkhatsky A. Calcium and cell death. *Subcell Biochem* 45: 465-480, 2007
4. Bezprozvanny I. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, calcium signaling and Huntington's disease. *Subcell Biochem* 45: 323-335, 2007
5. Venkatesh K. and Hasan G. Disruption of the IP₃ receptor gene of *Drosophila* affects larval metamorphosis and ecdysone release. *Current Biology* 7: 500-509, 1997
6. Yoshikawa S, Tanimura T, Miyawaki A, Makoto N, Yusaki M, Furuichi T and Mokoshiba K. Molecular cloning and characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 267: 16613-16619, 1992
7. Vázquez- Martínez O, Cañedo- Merino R, Díaz- Muñoz M and Riesgo- Escovar JR. Biochemical characterization, distribution and phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster* ryanodine and IP₃ receptors, and thapsigargin-sensitive Ca²⁺ ATPase et al. *J Cell Sci* 116: 2483- 94, 2003
8. Hardie RC. Phototransduction in Microvillar Photoreceptors of *Drosophila* and other invertebrates. In: Basbaum AI, Kaneko A, Shepherd GM and Westheimer G. *The Senses: A comprehensive reference, Vision 1*. San Diego: Academic Press, Vol 1: p77, 2008.
9. Raghu P, Colley NJ, Webel R, James T, Hasan G, Danin M, Selinger Z and Hardie RC. Normal phototransduction in *Drosophila* photoreceptors lacking an InsP₃ receptor gene. *Mol Cell Neurosci* 15: 429-445, 2000
10. Acharya JK, Jalink K, Hardy RW, Hartenstein V and Zuker CS. InsP₃ receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in *Drosophila*. *Neuron* 18:881-887, 1997
11. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002
12. Resino J and García-Bellido A. *Drosophila* genetic variants that change cell size and rate of proliferation affect cell communication and hence patterning. *Mech Develop* 121: 351- 364, 2004

13. Theodosiou NA and Xu T. Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 14: 355-365, 1998
14. Perrimon N. Creating mosaics in *Drosophila*. *Int. J Dev Biol* 42: 243-247, 1998
15. Alawi A A and Pak W L. On-Transient of insect electroretinogram: Its cellular origin. *Science* 172: 1055-1057, 1971
16. Cárabez-Trejo A, Sandoval F and Palma-Tirado L. Ultrastructural changes of tissues produced by inhalation of thinner in rats. *Microscopy Res Tec* 40: 56-62, 1998
17. Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Fröhwein U, Schulte-Hermann R. Programmed Cell Death (PCD) Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci* 926: 1-12, 2000.
18. Hiromi Y. Whole mount staining of *Drosophila* retina for β - Galactosidase activity. In: *Rubin Lab Methods*. Berkeley, California. p 78. 1990
19. Ohsawa S, Hamada S, Yoshida H and Miura M. Caspase-mediated changes in histone H1 in early apoptosis: prolonged caspase activation in developing olfactory sensory neurons. *Cell Death and Differentiation* 15:1429- 1439, 2008
20. Acharya U, Patel S, Koundakjian E, Nagashima K, Han X, Acharya JK. Modulating sphingolipid biosynthetic pathway rescues photoreceptor degeneration. *Science* 14: 1740- 1743, 2003
21. Srikanth S, Wang Z, Tu H, Nair S, Mathew MK, Hasan G and Bezprozvanny I. Functional properties of the *Drosophila melanogaster* inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mutants. *Biophys J* 86: 3634-3646, 2004
22. Tu H, Wang Z, Nosyreva E, De Smedt H, Bezprozvanny I. Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. *Biophys J* 88: 1046-1055, 2005
23. Polyanovsky AD. Calcium stores in *Drosophila* retina revisited: An electron-cytochemical localization of calcium. *J Evol Biochem Physiol* 36: 78-84, 2000
24. Morales-Tlalpan V, Arellano RO and Díaz-Muñoz M. Interplay between ryanodine and IP₃ receptors in ATP- stimulated mouse luteinized-granulosa cells. *Cell Calcium* 37: 203- 213, 2005
25. Baumann O. Distribution of ryanodine receptor Ca²⁺ channels in insect photoreceptors cells. *J Comp Neurol* 421: 347-361, 2000

26. Hirota J, Baba M, Matsumoto M, Furuichi T, Takatsu K and Mikoshiba K. T-cell-receptor signaling in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) type-1-deficient mice: is IP₃R type 1 essential for T-cell-receptor signaling? *Biochem J* 333: 615-619, 1998.
27. Jayaraman T and Marks A. T Cells Deficient in inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. *Mol and Cell Biol* 17: 3005-3012, 1997.
28. Aguilar-Delfín I, López-Barrera F and Hernández-Muñoz R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CC14 administration. *Hepatology* 24: 657-662, 1996.

Figure legends

Figure 1. Time course of electroretinogram-related parameters in mosaic flies expressing pigmented and mutant ommatidia. Panel A, B, and C show the time variations of the ON transient, receptor potential, and OFF transient, respectively. Pigmented ommatidia (gray circles and dash lines) and mutant ommatidia (black squares and straight lines). Arrows in panels A-C show the values obtained in recordings of non-mosaic and non-pigmented flies. Panel D depicts representative electroretinograms from mosaic flies from the pigmented ommatidia and mutant zones at 5 and 45 days after eclosion. The values are expressed as mean \pm SEM of at least 25 independent observations. *Indicates statistically significant differences, $p < 0.05$.

Figure 2. Time course of ultrastructural characteristics in mosaic flies expressing pigmented and mutant ommatidia. Panel A: Non-mosaic fly expressing IP₃R showing ommatidia with normal cellular structures (left image: low magnification, scale bar = 2 μ m; right image: high magnification, scale bar = 1 μ m). Panels B-D correspond to mosaic flies: Left images show pigmented ommatidia of mosaic flies and right images show mutant ommatidia (scale bar = 1 μ m, excepting panel D mutant retina, scale bar = 2 μ m). Structural alterations are marked by white arrows in panels B and C; in panel D altered ommatidia are marked with asterisks whereas normal ommatidia are marked with arrows. Panel D right also contain an inset showing a disorganized rhabdomere. Representative images of at least 5 independent observations.

Figure 3. Panel A. Time course of pro-oxidant reactions detected by fluorescent immunochemical label associated with 4-hydroxy-nonanal conjugates in mosaic flies lacking IP₃R. Gray circles and dash lines show the signal of pigmented ommatidia, and black squares and straight lines correspond to mutant ommatidia. The thick-black line at

the bottom of the graphic shows the lipoperoxidative signal measured in retinas of non-mosaic flies. Panel B. Representative image showing the fluorescent signal associated to the presence of 4-HNE conjugates from a 18 days old mosaic fly (the mutant area is non-pigmented). The values are expressed as mean \pm SEM of at least 20 independent observations. *Indicates statistically significant differences, $p < 0.05$.

Figure 4. Panel A. Time course of fluorescent signal associated with active caspase 3 in mosaic flies lacking IP₃R. Gray circles and dash lines show the signal of pigmented ommatidia, and black squares and straight lines correspond to mutant ommatidia. The thick-black line at the bottom of the graphic shows the signal of active caspase 3 measured in retinas of non-mosaic flies. Panel B. Representative image showing the fluorescent signal associated to the presence of caspase 3 activated from a 21 days old mosaic fly (the mutant area is non-pigmented). The values are expressed as mean \pm SEM of at least 20 independent observations. *Indicates statistically significant differences, $p < 0.05$.

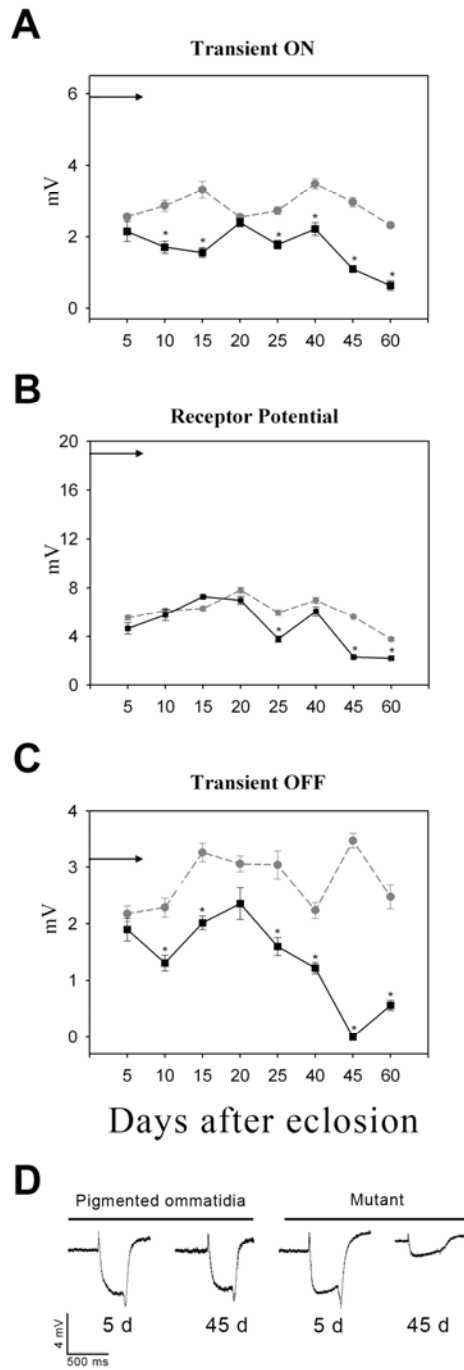
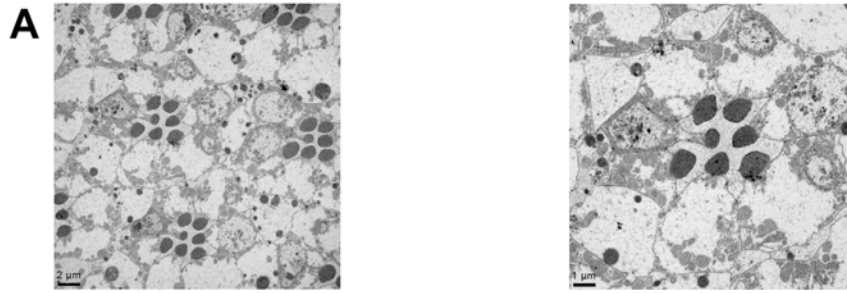


Figure 1

Non-mosaic



Mosaic

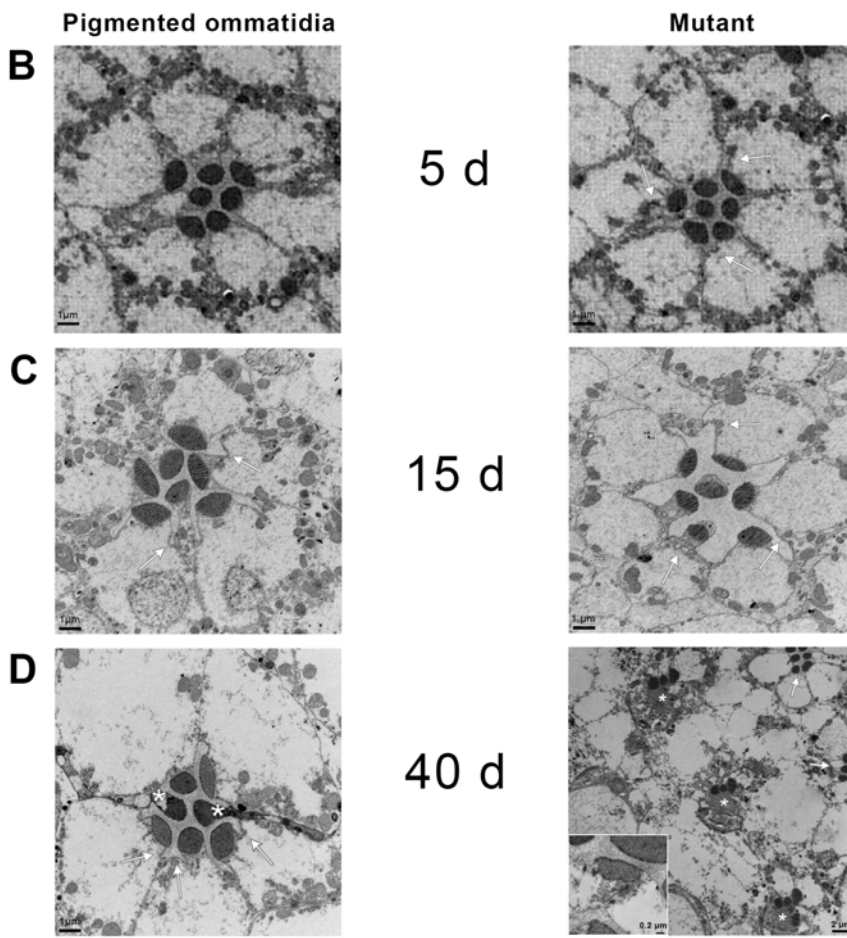
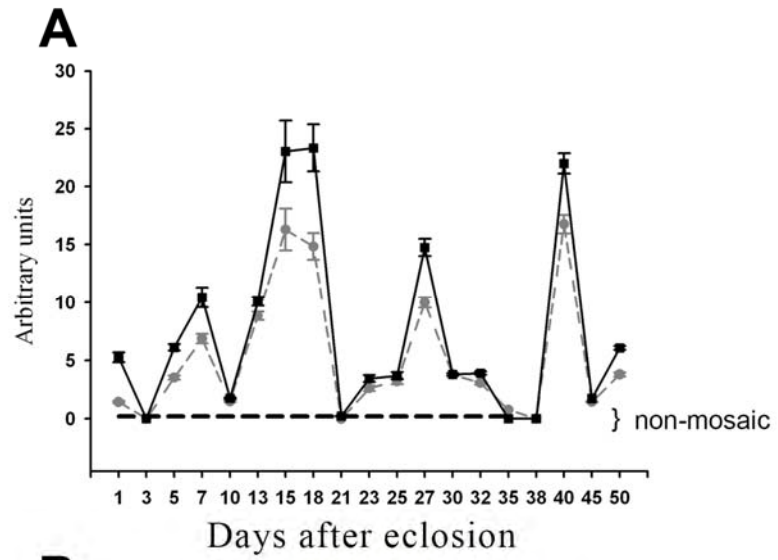
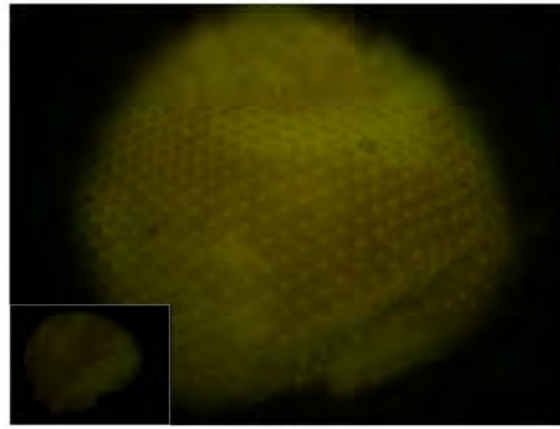


Figure 2

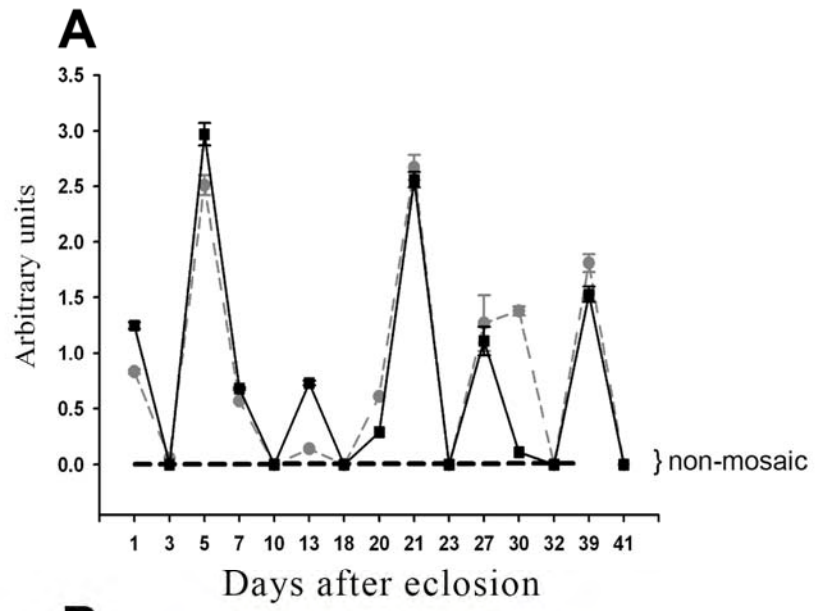


B



18 Days

Figure 3



B

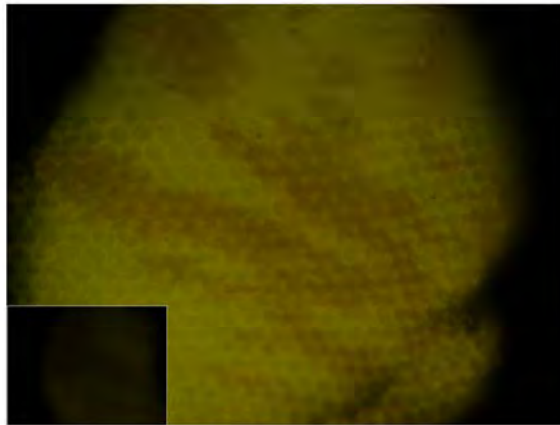


Figure 4

Nota: El presente *Erratum* se realizó siguiendo el número de páginas y líneas de la prueba de impresión del artículo que envió la revista, en paréntesis se incluye la página correspondiente a las páginas del artículo en la versión extendida dentro de esta tesis.

Erratum

Time course of retinal degeneration associated with the absence of IP₃ receptor in *Drosophila melanogaster* (PDF of the final version)

- Through out the manuscript the term “DroIP₃R” should be changed for “*itpr*”.

ABSTRACT

Page 1, end of line 5 (**página 32**)

Original

“The synaptic transmission and membrane potential of retinal cells were also significantly distorted; showing reduced on and off transients as well as membrane potential from day 10 of hatching...”

New

“Comparison between electroretinograms recorded in wild type and mutant tissues showed progressive differences in the on and off transients as well as in the magnitude of the summed receptor potentials of photoreceptor cells from day 5 of hatching...”

MATERIALS AND METHODS

Page 2, Experimental and control groups, line 1 (**página 36**)

Original

“Mosaics were generated by the expression of the gene *eyeflp* (*yweyflp*; FRT82 *armlacZ/TM6*, *Ubx*) in the mutant flies donated by Dr. Raghu.”

New

“For mosaic analysis, the allele *l(3)itpr^{90B.0}* was placed on a homologous chromosome bearing FRT sites (9).”

Page 2, Experimental and control groups, line 6 (**página 36**)

Original

“We expressed the mosaic using FRT90IP₃RB0 stock obtained from Dr. Raghu mating with a *yweyflp*; FRT82 *armlacZ/TM6*, *Ubx* stock (13, 14).”

New

“Homozygous mutant ommatidia were detected by absence of a red-eye marker (w+) in a w- background following the strategy already reported (13, 14).”

RESULTS

Page 3, Time course of electroretinogram disruption, 2nd paragraph (**página 39**)

Add at the beginning of the paragraph:

«Nevertheless the direct comparison between the pigmented and non-pigmented ommatidia in the mosaic flies is not straightforward, some of the differences detected in the wild type and the *itpr*-deficient ommatidia are worth to point out.”

Page 3, Time course of electroretinogram disruption, 2nd. paragraph, line 11 (**página 39**)

Original

“In contrast, the electroretinograms obtained in control flies expressing IP₃R but without pigment did not show any significant changes from day 1 to 45 after hatching (arrows in panels A-C). Taken together, the electrophysiological results indicate that the lack of IP₃R is compensated during the first 10 days by an unknown adaptive mechanism; however, after ~day 15 the function of the photoreceptors and their synaptic contacts deteriorate progressively, culminating in a much altered electroretinogram after day 30.”

New

“In contrast, the electroretinograms obtained in control flies expressing IP₃R but without pigment showed higher values in these parameters, especially in the ON transient and the magnitude of the summed receptor potentials of photoreceptor cells. Hence, these data indicate that mosaic flies showed altered electroretinograms since hatching in both, wild type and mutant tissues, supporting the hypothesis of a propagated damage from the cells lacking the IP₃R.”

DISCUSSION

Page 7, Temporal integration, Phase 1, line 2 (**página 44**)

Original:

“..indicating an altered membrane potential and synaptic activity..”

New

“...indicating a more accentuated degenerative process in the cells lacking the IP₃R..”

Page 7, Temporal integration, Phase 1, line 12 (**página 44**)

Original

“Remarkably, increased episodes of lipoperoxidative and caspase 3 activities were detected during the first week of eclosion, suggesting that functional and structural defects were preceded by enhanced pro-oxidant reactions as well as an activated program of cell death”

New

“Increased episodes of lipoperoxidative and caspase 3 activities were detected in the wild type and mutant tissues since the first week of eclosion, suggesting that the onset of the biochemical alteration associated to the lack of IP₃R started very early and that was also rapidly propagated to the wild type cells.”

OBTENCIÓN DE MOSCAS MOSAICO HOMOCIGOTOS MUTANTES PARA EL IP₃R

Los mosaicos en el ojo de la mosca presentan células sin pigmento que son homocigotas para la mutación y células pigmentadas son heterocigotas u homocigotas silvestres. El tamaño del clon es variable, puesto que la recombinación de los cromosomas por la flipasa ocurre de manera azarosa en el ojo.



Figura 1: Cabeza de *Drosophila* con ojos mosaico. La flecha roja señala las células homocigotas mutantes para el IP₃R.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El objetivo principal del proyecto fue establecer el curso temporal del proceso neurodegenerativo, por lo que fue necesario estudiar la morfología y la fisiología de la retina mosaico para la mutación del receptor de IP₃. Para analizar la ultraestructura se realizaron cortes ultrafinos y se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión.

Las imágenes de microscopía electrónica presentadas a continuación son representativas de moscas mosaico a diferentes días de eclosión (n=4) del alelo L4 y su comparación con fotografías del segmento no mutante.

OMATIDIA NORMAL EN SEGMENTO DE FENOTIPO NO MUTANTE DE MOSCA L4

En esta micrografía se observa la disposición normal de los fotorreceptores y de la omatidia completa en una sección no mutante del ojo mosaico al día 20 después de la eclosión. A un

mayor acercamiento se aprecia la estructura normal de la rabdómera. En la imagen de la izquierda, la flecha negra señala un fotorreceptor.

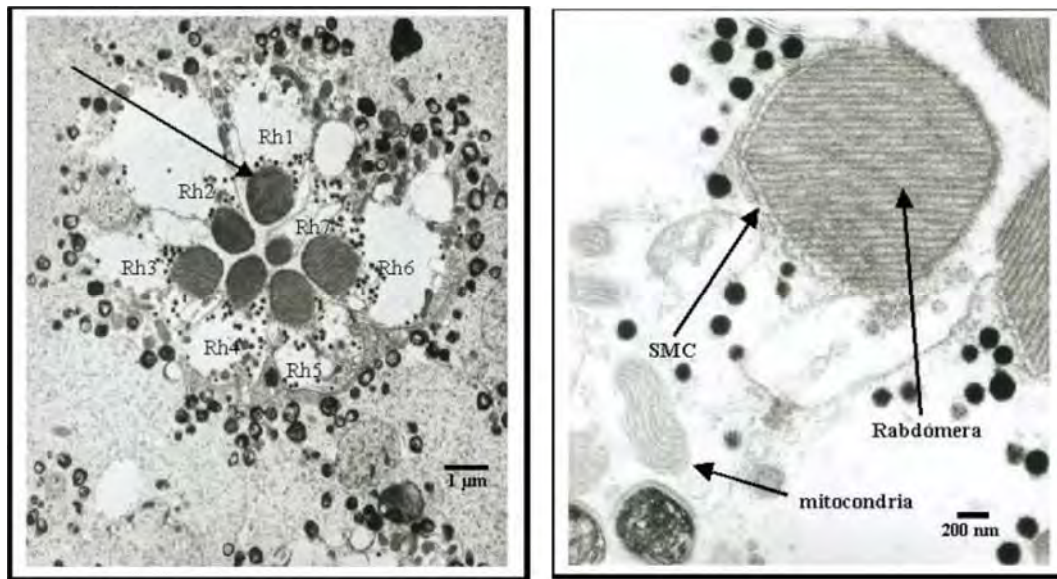
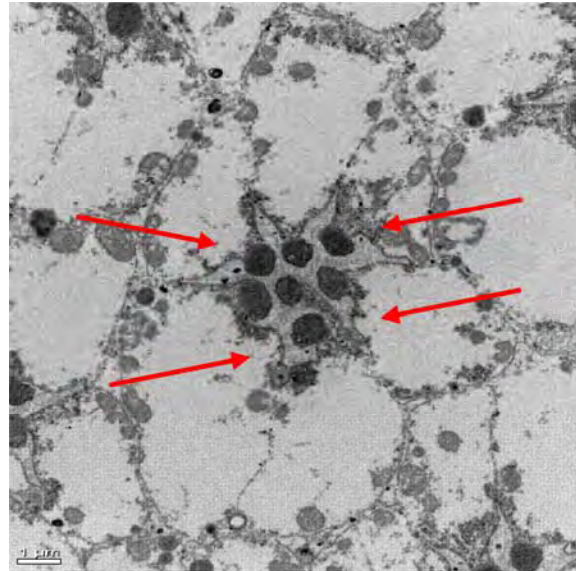


Figura 2: Corte de retina de *Drosophila* a 80 nm de grosor. Los fotorreceptores (Rh1-Rh6) se numeran en sentido contrario a las manecillas del reloj. SMC: Vesículas submicrovillares.

OMATIDIA EN SEGMENTO DE FENOTIPO HOMOCIGOTO L4 (5 DÍAS DE ECLOSIÓN)

Desde esta edad ya se observa formación de ampollas o blebbing en la membrana plasmática de las células fotorreceptoras. El blebbing es una característica distintiva en células que están conteniendo con un problema de sobrevida, y es un término comúnmente utilizado cuando se describe el proceso apoptótico (Kerr y col, 1972). Sin embargo, es difícil afirmar sólo con esta evidencia si a esta edad las células están muriendo por apoptosis, ya que no se observaron otras alteraciones.

En la figura 3 se marcan con flechas rojas las zonas de la membrana celular donde se presentan las ampollas; también observamos que los fotorreceptores se encogieron, ya que en la zona de la rabdómera se ven más pequeños que el control.

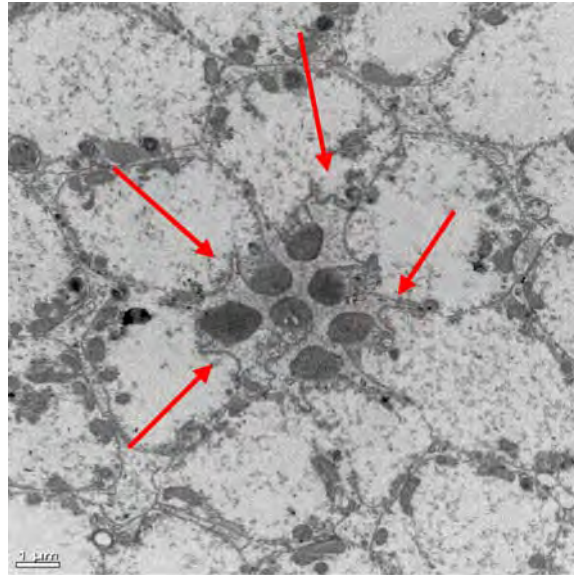


L4 5d 10000x

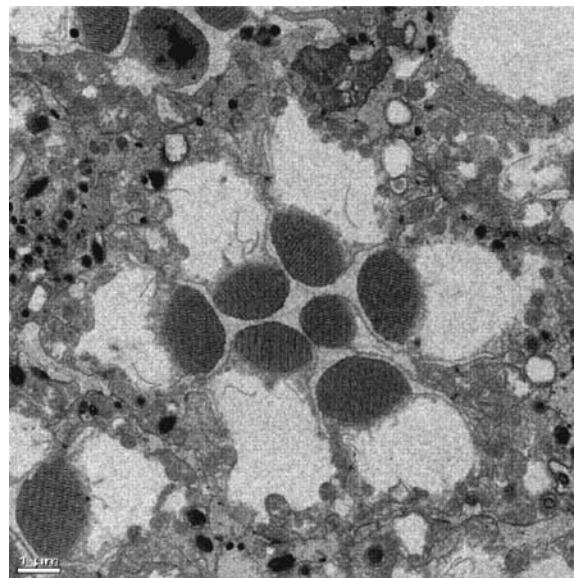
Figura 3: Micrografía de omatidia de 5 días después de la eclosión del alelo L4.

OMATIDIA EN SEGMENTO DE FENOTIPO HOMOCIGOTO L4 (10 DÍAS DE ECLOSIÓN)

A esta edad se observan las alteraciones de la membrana plasmática más evidentes y la disposición hexagonal que normalmente presentan las omatidias se encuentra desarreglada. En la figura 4 superior se señalan las ampollas más evidentes a diferencia de la fotografía inferior que corresponde al segmento de células no mutantes donde se observa la estructura normal de la omatidia y la membrana no presenta las ampollas.



L4 10d 10000x



L4 10d 10000x

Figura 4: Omatidia de mosca del alelo L4 de 10 días después de la eclosión.

OMATIDIA EN SEGMENTO DE FENOTIPO HOMOCIGOTO L4 (15 DÍAS DE ECLOSIÓN)

A los 15 días, las células fotorreceptoras se hacen pequeñas, el blebbing se acentúa y la disposición hexagonal de la ommatidia se pierde. En la figura 5 superior se marcan las alteraciones observadas: ampollas membranales (flecha amarilla), fotorreceptores dañados (flecha roja) y una mitocondria rota (flecha verde). La figura 5 inferior muestra las células en el segmento no mutante y se observa que aún a esta edad las alteraciones en la

membrana plasmática (flecha roja) son mínimas, y la arquitectura de los fotorreceptores permanece prácticamente sin cambios.

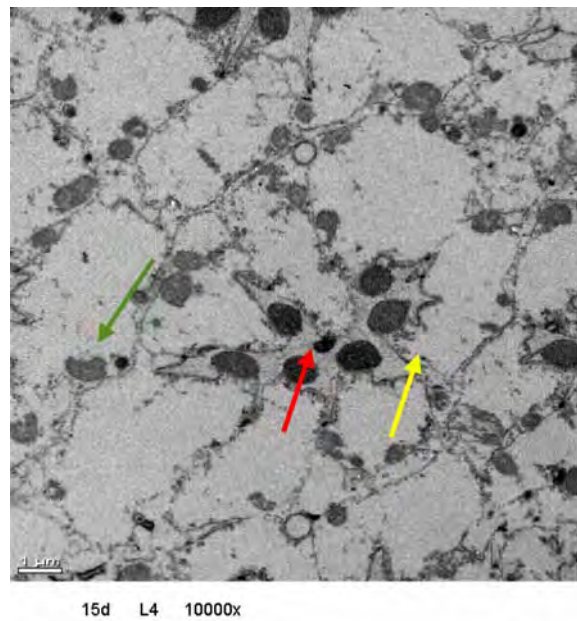
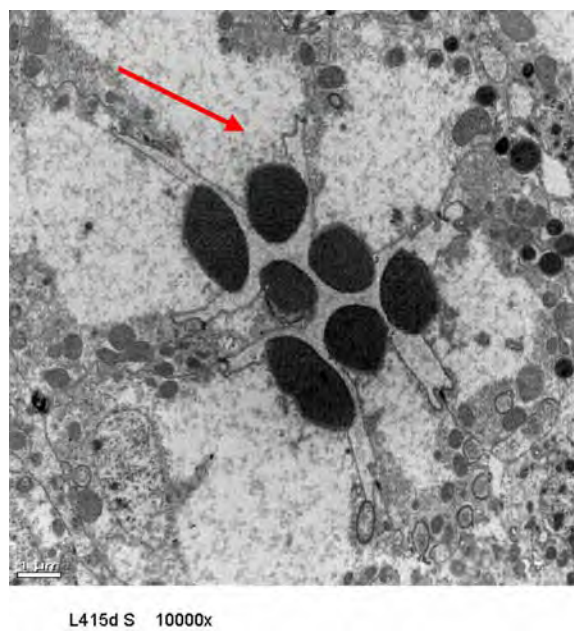
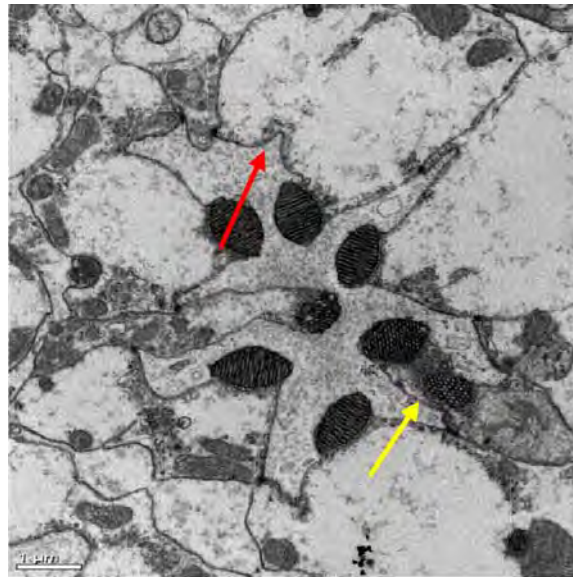


Figura 5: Omatidia de 15 días después de la eclosión del alelo L4. La imagen superior corresponde al segmento mutante con alteraciones de la membrana plasmática más severas y la imagen inferior muestra el segmento no mutante con alteraciones mínimas.



OMATIDIA EN SEGMENTO DE FENOTIPO HOMOCIGOTO L4 (20 DÍAS DE ECLOSIÓN)

A los 20 días, la arquitectura de la membrana de las células fotorreceptoras se observa con ondulaciones (figura 6, flecha roja); la célula también se observa más pequeña y se mantiene la separación de los fotorreceptores al centro de la omatidia. La flecha amarilla señala una rabdómera que se desprendió de algún fotorreceptor y se depósito sobre otro (no fue posible distinguir si estaba internalizado o solo sobrepuesto).



20d L4 B 15000x

Figura 6: Omatidia del alelo L4 de 20 días después de la eclosión.

OMATIDIA EN SEGMENTO DE FENOTIPO HOMOCIGOTO L4 (30 DÍAS DE ECLOSIÓN)

A esta edad (figura 7) las alteraciones observadas en días tempranos se volvieron más evidentes y severas. Se observa falta de fotorreceptores (se ven sólo 4 en lugar de 7), mitocondrias rotas y falta de estructura en la membrana plasmática con ampollas (flechas rojas). Se pierde por completo la disposición hexagonal de la omatidia, algunos de los fotorreceptores se ven hinchados.

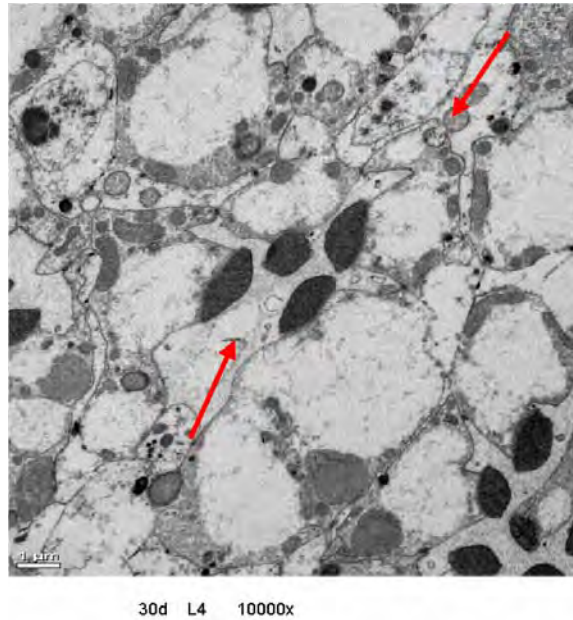
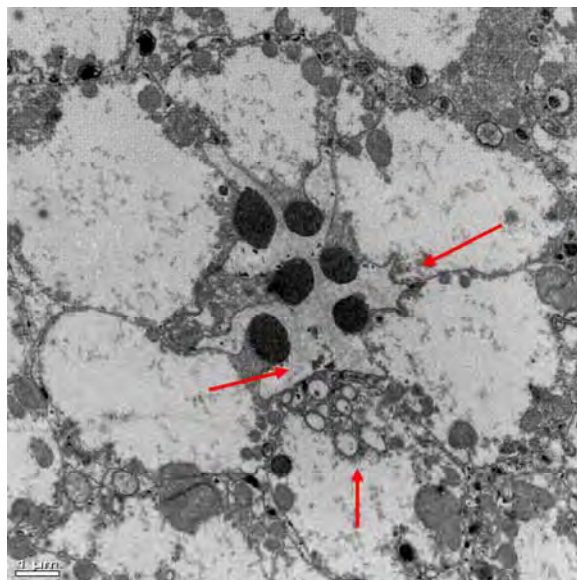


Figura 7: Omatidia de 30 días después de la eclosión, alelo L4.

OMATIDIA EN SEGMENTO DE FENOTIPO HOMOCIGOTO L4 (35 DÍAS DE ECLOSIÓN)

A los 35 días después de la eclosión, se continúa observando la falta de fotorreceptores, la acumulación de vesículas, mitocondrias rotas, fotorreceptores que perdieron la rabdómera, alteraciones en la estructura de las membranas plasmática y nuclear. Todas las alteraciones observadas, son típicas de las células que se encuentran en proceso de muerte. Probablemente este proceso sea muerte por apoptosis, ya que en este tipo de muerte se observan las ampollas y se conserva el límite celular; sin embargo, no es posible asegurarlo únicamente por las fotos. En la muerte por necrosis los daños son diferentes; en este tipo de muerte se presenta hinchamiento de la célula, rompimiento de membranas y esparcimiento del contenido celular; en ningún caso se observaron estas características.



L4 35d 10000x

Figura 7: Omatidia de 35 días de eclosión con pérdida de fotorreceptores y vesículas, alelo L4.

En la tabla 1 se presenta un resumen de los resultados antes mostrados. Se calificó la morfología de las células tanto en la zona no mutante como en la zona mutante.

	5 d		10 d		15 d		20 d		30 y 35 d	
	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
Membrana plasmática	*	*	**	***	**	***	**	***	***	****
Núcleo	*	*	**	**	**	**	**	**	***	****
Mitocondria	*	*	*	**	**	**	**	**	**	***
Pérdida de Fotorreceptores	ND	*	ND	ND	ND	**	ND	**	**	****
Rhabdomera	*	*	*	*	*	**	*	**	***	****

Tabla 1: Calificación morfológica de los daños observados en la retina de *Drosophila* homocigota mutante L4 para el IP₃R.

En la tabla se muestra S como la zona silvestre y M como la zona mutante. El nivel de daño en las fotografías se calificó con el siguiente criterio:

- * daño ligero
- ** daño intermedio
- *** daño severo
- **** daño muy severo
- ND no detectado

ELECTRORRETINOGRAMAS

Se realizaron estudios electrofisiológicos (retinogramas) de los fotorreceptores de las moscas mosaico con la mutación nula del IP₃R por registro de la actividad eléctrica de las retinas. Se muestran los datos indicativos de cada parámetro que forman parte de los electrorretinogramas (ver metodología).

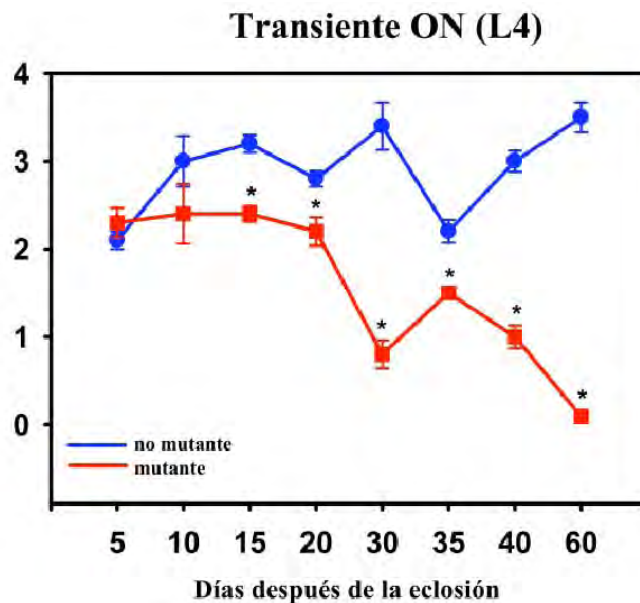


Figura 8: Gráfica del Transiente ON del alelo L4. Promedios de una serie de 40 registros. *
p < 0.001

La figura 8 ilustra que alrededor del día 15 después de la eclosión el transiente ON claramente empieza a verse afectado por la ausencia del IP₃R. Esto coincide con los resultados encontrados con la microscopía electrónica de transmisión. Los asteriscos

indican diferencias significativas respecto al valor control. Promedios de una serie de 40 registros. * $p < 0.001$

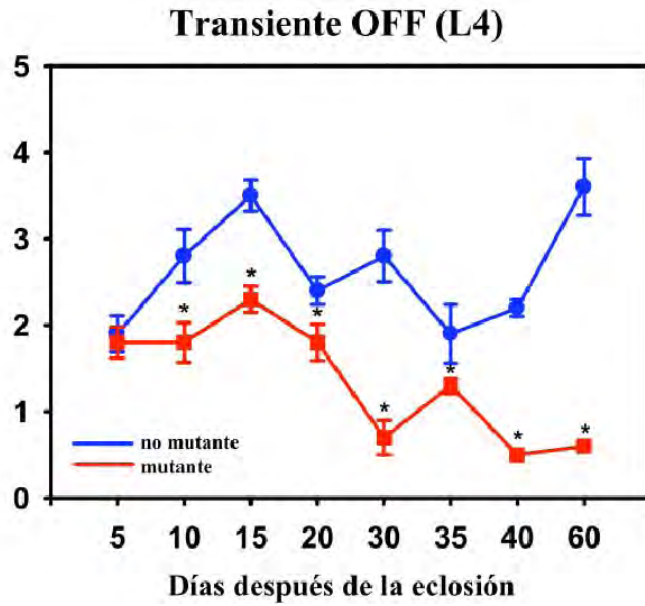


Figura 9: Figura 8: Gráfica del Transiente OFF del alelo L4.

La figura 9 muestra los cambios encontrados en el transiente OFF que fueron similares a los mostrados con el transiente ON a partir del día 15. Promedios de una serie de 40 registros. * $p < 0.001$

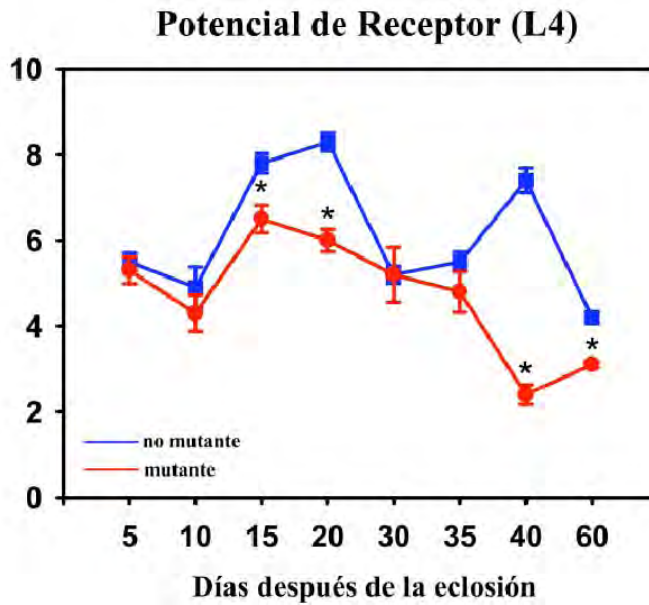


Figura 10: Gráfica del Potencial de Receptor del alelo L4.

Los cambios encontrados en el potencial de receptor que muestra la gráfica 10 no fueron tan marcados como en los transientes ON y OFF, aunque también se observa una disminución en la respuesta de la retina en las células mutantes de la mosca mosaico.

Promedios de una serie de 40 registros. * $p < 0.001$

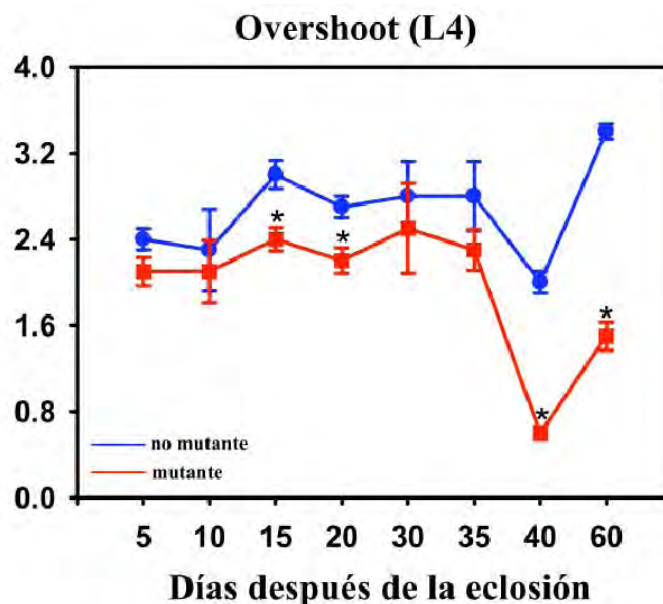


Figura 11: Gráfica del overshoot correspondiente al alelo L4.

La figura 11 muestra los datos obtenidos en el overshoot donde los cambios se observaron a partir del día 15; sin embargo, los cambios más severos se observaron en las edades avanzadas sugiriendo una tendencia disminuir la fototransducción a lo largo de la vida de la mosca. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al valor control.

La figura 12 muestra los trazos representativos de las alteraciones observadas en la respuesta visual de las moscas con tejido ocular mutante para el IP_3R L4. Promedios de una serie de 40 registros en cada una de las zonas (silvestre y mutante). * $p < 0.001$

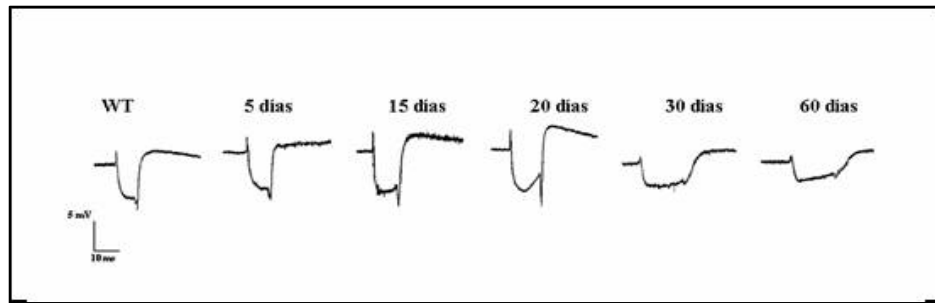


Figura 12: Registros representativos de los electroretinogramas realizados en el segmento mutante de un mosaico del alelo L4 a lo largo de la vida de la mosca adulta.

INMUNOHISTOQUÍMICA

- Estrés Oxidativo

Con el fin de explorar un posible mecanismo asociado al proceso neurodegenerativo por la ausencia del IP₃R, se implementaron experimentos para valorar la presencia de estrés oxidativo en el sistema experimental. Ya que no es factible realizar determinaciones bioquímicas en un sistema como los ojos mosaico, se optó por el uso de anticuerpos como una alternativa para detectar actividad pro-oxidante. Para realizar esta clase de experimentos que implican la obtención de la retina completa separada de la córnea y del tejido cerebral, se implementó en primera instancia una técnica de disección según el método Hiromi (descrito en la sección de Métodos).

Se utilizó un anticuerpo que detecta la presencia de aductos de 4- hidroxinonenal (4- HNE), el cual es un aldehído α , β insaturado que se usa comúnmente como marcador de lipoperoxidación debido a que se produce en el metabolismo peroxidativo del ácido araquidónico o linoleico. Se ha reportado ausencia de ácido araquidónico en *Drosophila* pero el ácido linoleico si está presente (Chyb, 1999)). El 4- HNE a su vez, forma aductos de vida media larga con proteínas, las cuales se ven modificadas en su función (Noiri et al, 2001 y Toyokuni et al, 1994).

Las fotografías 13 y 14 muestran retinas de una mosca mosaico del alelo L4 teñidas para detectar la presencia del metabolito secundario a la actividad lipoperoxidativa, el 4-HNE y detectado con anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína. Las imágenes corresponden a retinas mosaico con el anticuerpo anti-4-HNE a los 21 días después de la eclosión, que fue la edad en donde se observó el pico más alto de lipoperoxidación.

Los resultados obtenidos nos corroboraron que el anticuerpo utilizado para detectar la presencia de 4- hidroxinonenal fue útil para distinguir la actividad lipoperoxidativa de retinas de moscas mosaico.



Figura 13: Retina de *Drosophila* mosaico incubada con el anticuerpo secundario como control negativo

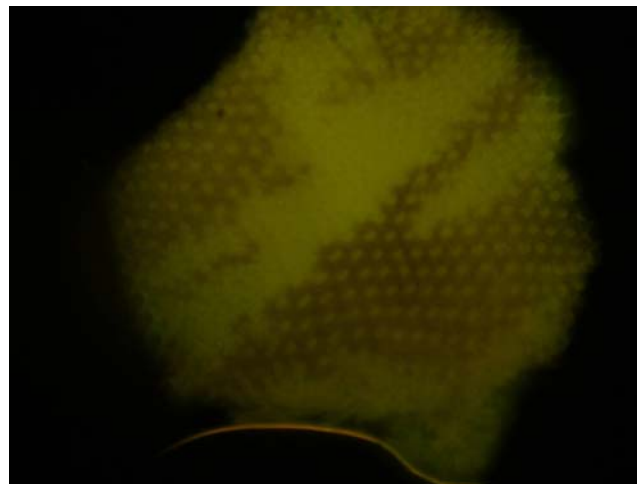


Figura 14: Retina mosaico incubada con el anticuerpo primario anti- HNE y el secundario.

La cuantificación de estos resultados se muestra en la Figura 15, y corrobora que la ausencia del IP₃R promueve episodios de estrés oxidativo recurrentes, los cuales podrían estar relacionados con el proceso degenerativo de la retina.

La gráfica muestra los episodios de lipoperoxidación en la mosca mosaico para el alelo L4 con incrementos a los 3, 15, 21, 25, 30, 40, 45 y 50 días después de la eclosión en la zona mutante. Los picos mayores se presentaron a los 21 y 30 días de edad. En la zona no mutante también observamos episodios de lipoperoxidación intermitentes. Esto muy posiblemente se debe a la vecindad que mantienen las células no mutantes con las células mutantes (Resino y García-Bellido, 2004). Los asteriscos marcan los datos significativos para una $p < 0.001$.

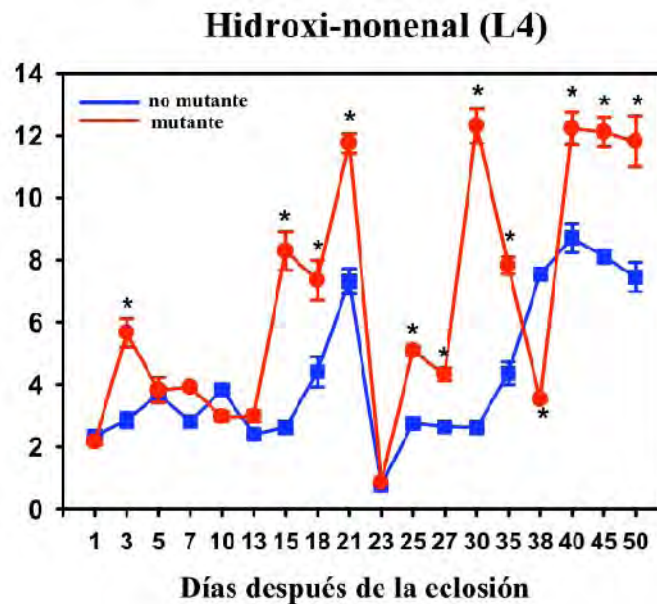


Figura 15: Patrón lipoperoxidativo de retinas de *Drosophila*

Muerte Celular

Se realizaron experimentos con un anticuerpo anti-caspasa 3 activa, el cual es un marcador de actividad apoptótica. Esta cisteín proteasa sirve de sustrato de la caspasa 9 y a su vez hidroliza ICAD (inhibitor caspase-activated DNase), el cual es un inhibidor de la nucleasa CAD (caspase-activated DNase) que actúa en el núcleo celular. El gen que codifica para el homólogo de la caspasa 3 de mamífero en *Drosophila melanogaster* (*decay*), tiene una identidad del 37% y una similitud del 56% comparado con el gen de vertebrados (Dorstyn et al, 1999). El anticuerpo aquí utilizado ya ha sido probado con anterioridad en la mosca (Ohsawa, 2008); sin embargo, nosotros decidimos usar una concentración más alta para nuestros experimentos.

Las Figuras 16 y 17 son representativas del pico de caspasa observado a los 18 días después de la eclosión en las moscas mosaico para el alelo L4. Los asteriscos marcan los datos significativos para una $p < 0.001$.

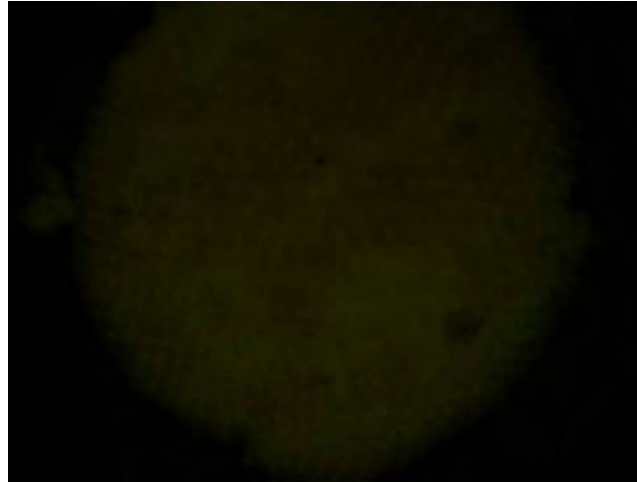


Figura 16: Control negativo para el anticuerpo de caspasa 3 en una retina mosaico.

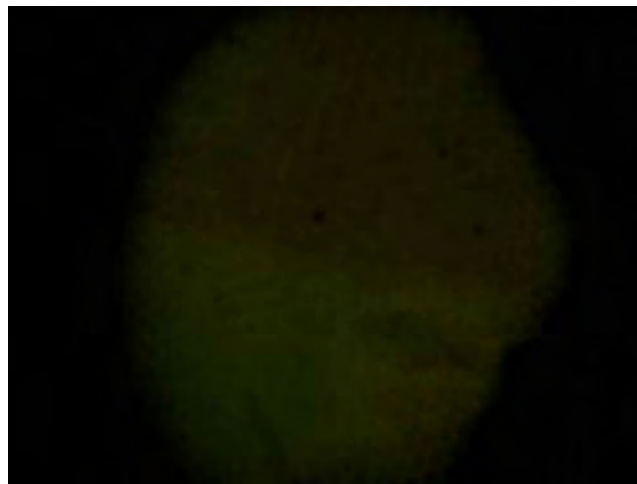


Figura 17: Retina mosaico incubada con el anticuerpo primario anti- caspasa3 y el anticuerpo secundario.

Los resultados obtenidos fueron cuantificados y graficados como se muestra en la Figura 18. Se observaron incrementos discretos pero significativos a los 18 y 25 días después de la eclosión. Este parámetro indicativo de apoptosis hace correspondencia temporal con la

presencia de protuberancias en las membranas de los fotorreceptores observadas en las micrografías electrónicas (15, 20 y 35), así como con los incrementos de reacciones pro-oxidantes. También se observó que hay una coincidencia con las alteraciones encontradas en todos los parámetros de los electroretinogramas a partir de los 15 días después de la eclosión.

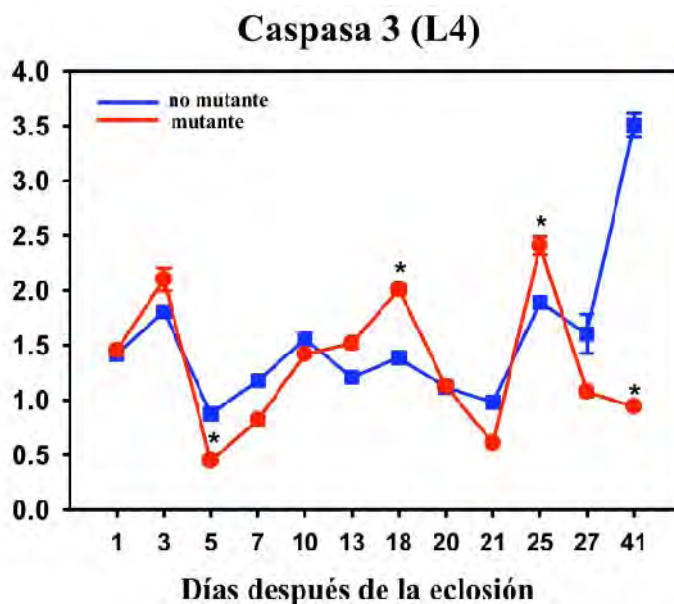


Figura 18: Niveles de caspasa3 de retinas mosaico de *Drosophila*

Tanto los resultados del 4-HNE como los de caspasa 3, no fueron comparados con un control de ojo blanco sin mutación, esos experimentos no se realizaron; sin embargo, en base a las similitudes que muestra este alelo con el reportado en el artículo, es muy probable que el control de ojo blanco se pudiera comportar en una forma similar.

DISCUSIÓN

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es un sistema experimental ampliamente usado desde hace décadas. Su tamaño y fácil reproducción han favorecido llevar a cabo experimentos de gran relevancia en todos los campos de la ciencia básica, pero principalmente en la genética molecular. La construcción de mosaicos genéticos como modelo experimental tiene la ventaja de permitir la observación de los efectos de mutaciones letales de manera local, sin afectar al organismo completo. Se han implementado mosaicos genéticos en diversas partes anatómicas de la *Drosophila*, pero los reportados en el ojo son de los más empleados. Sin embargo, el sistema presenta algunas desventajas, siendo una de ellas el tamaño del ojo, ya que al ser tan pequeño es complicado realizar mediciones bioquímicas clásicas. Otra desventaja es que la expresión de la mutación se lleva a cabo en todas las células que componen el órgano ocular, lo que a veces dificulta saber la secuencia de eventos y las interacciones celulares que culminan con las alteraciones estructurales y funcionales del ojo.

Los resultados experimentales de este trabajo han mostrado que las modificaciones producidas en los 2 alelos considerados en este estudio, B0 y L4, son en términos prácticos semejantes, y repercuten de igual forma en la ultraestructura y en el funcionamiento de la retina. Este hecho sugiere fuertemente que la proteína del IP₃R codificada en el alelo L4 carece de actividad, por lo que es equivalente a la ausencia del receptor que caracteriza al alelo B0.

Los sistemas biológicos son ejemplos de un equilibrio dinámico y plástico entre los componentes estructurales que los forman y las funciones diversas que en un momento dado pueden realizar. En este proyecto estudiamos de manera específica el órgano visual de la mosca, el cual está estructurado por varios tipos celulares dispuestos en un arreglo arquitectónico complejo (Figura 2 de la Introducción). El ojo de *Drosophila* está especializado en la transducción de estímulos luminosos en señales eléctricas para hacer posible la función visual del organismo. Aunque están íntimamente ligados estos 2 aspectos, no siempre es clara la forma fina en que ciertas funciones dependen de las estructuras celulares. En este contexto, fue importante en este estudio que intenta definir el curso temporal de la neurodegeneración de la retina por ausencia del IP₃R, la caracterización precisa de las propiedades estructurales de los fotorreceptores y sus membranas asociadas en moscas a diferentes edades después de la eclosión. Al mismo

tiempo, fue clave caracterizar la respuesta del ojo a estímulos fóticos para de esa manera hacer una correlación temporal entre la estructura y función de los fotorreceptores de la retina de la mosca cuando éstos degeneran al faltar el IP₃R.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

De acuerdo a los resultados obtenidos con la microscopía electrónica se observan alteraciones en la organización celular de la omatidia y de los fotorreceptores desde edades tempranas estudiadas, 5, 10 y 15 días, por lo que la neurodegeneración de los fotorreceptores debe iniciarse de manera rápida.

Ya se ha reportado que en ciertas ocasiones las células aledañas a una mutación sufren alteraciones menores o similares a las causadas por la mutación de estudio. A este efecto o daño difundido hacia la vecindad de las células mutantes se le conoce como respuesta no autónoma y se le ha llamado específicamente acomodación positiva (Resino y García-Bellido, 2004).

En nuestro estudio detectamos que las células vecinas aunque no se observan rotas o con algún signo de muerte, si presentan organelos alterados y la membrana plasmática con ampollas.

RECEPTOR DE IP3

La calificación otorgada a los cambios o daños observados en los fotorreceptores se basa en la observación de las estructuras celulares y subcelulares de ambas poblaciones celulares y se resume en la Tabla 1 corroborando la hipótesis de esta investigación.

Además, se observaron estructuras subcelulares rotas (mitocondrias) y/o alteradas en la estructura (membranas) desde las edades antes mencionadas, así como también la pérdida de los fotorreceptores en la zona de la rabdómera al rededor de los 20 días después de la eclosión. Todas las alteraciones celulares observadas en nuestro sistema experimental sugieren fuertemente que el tejido está sufriendo un programa de muerte celular bien definido. Las ampollas observadas en la membrana plasmática y nuclear, son típicas de las células que entran en un programa apoptótico (Bursch, 2000).

Desde hace varios años se han hecho diversos esfuerzos para conocer la dinámica intracelular de calcio en el fotorreceptor de la mosca tanto en condiciones de reposo como en condiciones de estimulación fótica.

Las concentraciones de calcio intracelular oscilan entre los 30 y los 70 nM en condiciones de reposo, y en condiciones de excitación alcanzan niveles hasta de 250 nM (Hardie, 1996), aunque existen otros reportes donde se han observado concentraciones hasta de 600 nM en los fotorreceptores después de dejarlos en adaptación a la oscuridad (Oberwinkler y Stavenga, 2000). Estos datos indican que en los fotorreceptores de *Drosophila* el calcio intracelular fluctúa en límites reportados para otros tipos celulares.

Aunque está bien reconocido que la muerte celular veces está asociada con alteraciones en la homeostasis de calcio, en nuestro sistema no sabemos si este parámetro se vio alterado por la falta del IP₃R ya que no se han realizado observaciones ni mediciones al respecto. En nuestro modelo de estudio, no sabemos si las oscilaciones de calcio se incrementan o disminuyen tanto en el citoplasma como en el interior del retículo endoplásmico u otros organelos, forzando al sistema a hacer uso de otros canales liberadores de calcio como el receptor a Ryanodina para eliminar el exceso de calcio, o a una regulación anormal de la ATPasa de calcio (SERCA) para captar más del catión en el retículo endoplásmico.

Desde hace varios años se han realizado experimentos para conocer más a fondo el proceso de fototransducción en la mosca de la fruta. Una de las hipótesis más fuertes postulaba que la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares, era la responsable de que se desencadenara toda la cascada; sin embargo al realizar estudios electrofisiológicos de la movilización de calcio, se vio que no era así. Para hacer esto posible era necesario añadir altas concentraciones de calcio de manera artificial ya que el calcio que se estaba liberando desde los depósitos intracelulares, no era suficiente para el proceso. La conclusión fue que este efecto se debía a que las cisternas submicrovillares (SMC), que son las estructuras intracelulares en donde se localiza el receptor de IP₃ en el fotorreceptor de *Drosophila*, tienen una capacidad muy baja para secuestrar calcio y por lo tanto, sólo es capaz de contener una concentración muy baja del catión (Hardie, 1993).

Sería muy interesante hacer este tipo de mediciones en fotorreceptores que no expresan el receptor de IP₃ y conocer más a detalle algunos de los aspectos del manejo de calcio intracelular que pudieran estar alterados y sus consecuencias más directas en la activación de reacciones pro-oxidantes (peroxidación de lípidos) o de los programas de muerte celular por apoptosis (actividad de caspasa 3).

A diferencia de lo que vemos en nuestro estudio y lo citado en el artículo de Banerjee y Hasan del 2005, existe un número muy extenso de aproximaciones experimentales en donde el IP₃R se ha propuesto como regulador negativo del proceso apoptótico. Por ejemplo, diversos reportes se han publicado en donde la delección de las 3 isoformas del IP₃R en una línea celular de linfocitos DT-40 de pollo, o la expresión disminuida tanto de la isoforma I y III en líneas celulares T Junktat, hace a estas células más resistentes a los estímulos apoptóticos asociados al tratamiento con estaurospatina (Khan, 1996; Sugawara, 1997; Jayaraman y Marks, 1997 y Assefa, 2004).

En contraste, existen también ejemplos en donde la alteración o la falta del IP₃R se asocia a otro tipo diferentes de modificaciones: Ratones mutantes del receptor de IP₃ (aminoácidos 1732-1839) presentan crisis epilépticas recurrentes (Street y col., 1997). En otro trabajo reportan que ratones que carecen del receptor de IP₃ tipo 1 presentan ataxia severa, la masa corporal disminuida en un 50% y el tamaño de los cerebros disminuidos en un 40%. Estos animales parecen normales al nacimiento pero alrededor del día 9 presentan la ataxia y falta de equilibrio para mantenerse caminando; hacia el día 15 presentan torsión del tronco y hacia los días 20-23 ataques tónicos. La conclusión de estos trabajos es que el receptor de IP₃ en estos ratones es esencial para el crecimiento y funcionamiento adecuado del cerebro (Matsumoto y col., 1996).

En la mosca de la fruta, en ausencia del receptor de IP₃, los organismos no son viables desde el estado larvario y si se realizan diferentes combinaciones de la mutación, los adultos viables tienen defectos en la postura de las alas con reducida habilidad para el vuelo (Joshi y col., 2004 y Banerjee y col. 2004). En otro reporte del grupo de Hasan, encontraron que las mutantes del receptor de IP₃ en el estado larvario no son viables debido a que pierden la habilidad de alimentarse al estar impedida la señalización asociada a insulina (Agrawal y col., 2009).

Todos los reportes antes citados complementan y dan perspectiva a los hallazgos reportados en el presente estudio. Es evidente el papel tan complejo que el calcio intracelular juega en diversos sistemas celulares, y que es inadecuado asignar a la función del IP₃R consecuencias únicas en lo referente a la muerte o sobrevivencia celular. Es necesaria la realización de diversos acercamientos experimentales para generar una idea más cabal de los procesos finos e íntimos implicados en la neurodegeneración de los fotorreceptores cuando está ausente el IP₃R. En resumen, se hace patente que cada sistema experimental o

cada célula en particular, maneja de manera propia su maquinaria molecular dependiendo de las demandas que reciba del medio externo.

ELECTRORRETINOGRAMAS

Por otro lado, los resultados observados en los electroretinogramas en donde las alteraciones medibles se presentan desde los 15 - 20 días después de la eclosión, indican que están desfasadas con las alteraciones estructurales que se detectaron desde los primeros días después de la eclosión. Los cambios en los electroretinogramas (disminución de los transientes ON y OFF) son indicativos de que la comunicación entre los fotorreceptores y las células con las que hacen contacto sináptico localizadas en la lámina, se altera varios días después de que se detectan alteraciones estructurales en los fotorreceptores, sugiriendo que la transmisión sináptica es refractaria, al menos en un inicio, a estos cambios estructurales.

La posibilidad de que sobrevengan carencias en la comunicación sináptica ante la ausencia del IP₃R ya ha sido estudiada en la caracterización de los patrones de vuelo de moscas mutantes para este receptor-canal. En este trabajo se reportó que el transcrito de la enzima Glutamina sintetasa 2 (Gs2) está reducida de forma significativa en ejemplares mutantes del IP₃R. Esto va acompañado de niveles bajos de glutamato y los niveles del transcrito de la subunidad del GluRIIA que forma parte del receptor iónotrópico a glutamato sensible a AMPA-kainato, así como un incremento de las ramificaciones axonales y del número de sinapsis en la unión neuromuscular que controla el vuelo (Nair, 2007).

Se sabe que la fototransducción de *Drosophila*, se lleva a cabo a través de la liberación de histamina (Hardie, 1987), y aunque no ha sido estudiado si ve afectada en mutantes del IP₃R, esta posibilidad no puede ser descartada en nuestro sistema de estudio dado que se ven afectados los transientes ON y OFF de los electroretinogramas de las moscas mosaico. Aunque es evidente el daño celular y las alteraciones funcionales de los fotorreceptores en nuestro sistema experimental, es difícil precisar la serie de los eventos intracelulares asociados a estos cambios.

Existen reportes en donde al aplicar un tratamiento farmacológico (ratas inyectadas con Pentobarbital) se altera la cantidad, disposición y la estructura del retículo endoplásmico liso de los hepatocitos (Chedid y Nair, 1972). En nuestro modelo de estudio donde se está trabajando con una mutación nula del IP₃R, carecemos de la información para asegurar que

la estructura de las cisternas asociadas al retículo, los espacios submicroviliares, y la comunicación que establece el retículo dentro de la célula con otros organelos, se encuentre intacta en ausencia del receptor de IP_3 . Sería muy probable que siendo el receptor de IP_3 una proteína tan importante para la homeostasis de calcio intracelular y encontrándose en la mosca expresado por un solo gen, en su ausencia se presentarían diversos cambios en el arreglo de las endomembranas, así como en eventos de señalización.

Como se mencionaba anteriormente, ante la ausencia del IP_3R , no se sabe las adaptaciones que se pudieran presentar en los otros canales y proteínas que manejan calcio presentes en las células del ojo de *Drosophila*, incluyendo los canales de membrana plasmática (los dependientes de ligando y los sensibles a voltaje), así como del otro canal liberador del retículo endoplásmico, el receptor de Ryanodina (RyR) y la ATPasa de calcio (SERCA). En este sentido se ha reportado en varios sistemas celulares que la expresión fina de los eventos de la dinámica de calcio intracelular es altamente dependiente de la localización subcelular y del funcionamiento coordinado del IP_3R y del RyR (Morales-Tlalpan, 2005). A la fecha se carece de información precisa sobre estos parámetros en la retina de la mosca de la fruta silvestre, circunstancia que podría hacerse más patente en moscas con modificaciones genéticas.

ESTRÉS OXIDATIVO, APOTOSIS y CALCIO

Dado que el sistema de estudio es de dimensiones muy pequeñas, no es posible realizar experimentos de estrés oxidativo por las técnicas bioquímicas clásicas (p.e., la actividad lipoperoxidativa), como son el método del ácido tiobarbitúrico y la detección de dienos conjugados. Por esta razón fue necesario que la detección de estrés oxidativo se realizara por medio de anticuerpos específicos que reconocieran productos de reacciones pro-oxidantes. Los resultados inmuno-histoquímicos obtenidos con el uso del anticuerpo para detectar conjugados de 4-HNE, muestran que la aplicación de esta estrategia metodológica fue adecuada para cumplir dicha meta.

Resultó muy importante caracterizar el nivel de estrés oxidativo en nuestro sistema experimental ya que este fenómeno se ha relacionado a la alteración de la dinámica del calcio intracelular como un evento desencadenante de procesos degenerativos. Está ampliamente documentado que las alteraciones en el manejo del calcio intracelular, como las que se presentarían ante la ausencia o la acción defectuosa del IP_3R , favorecen la

generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), así como la activación de procesos apoptóticos y/o necróticos (Nam, 2002).

Se ha reportado en diversos sistemas la relevancia de la interacción entre el Ca^{2+} intracelular, las especies reactivas de oxígeno y la muerte celular. Por ejemplo, en cultivos neuronales sometidos a condiciones de hipoxia intermitente, el calcio intracelular y las EROs se incrementan de manera secuencial, lo que eventualmente culmina con una liberación masiva de neurotransmisores (Kim, 2004). Se demostró que la transferencia de Ca^{2+} del retículo endoplásmico hacia la mitocondria se requiere para la iniciación de la muerte celular programada por algunas de las señales apoptóticas (Scorrano, 2003). Los canales TRP expresados heterológamente en células HEK, promueven el desbalance en el manejo de calcio intracelular y una sensibilidad aumentada hacia el H_2O_2 (Hara, 2002).

En nuestro modelo experimental todavía no podemos comentar sobre estos u otros eventos que relacionan calcio y estrés oxidativo, ya que todavía está pendiente la caracterización del manejo de calcio intracelular a corto, mediano y largo plazo en las células presentes en la retina de la mosca cuando el IP_3R no se expresa.

Los experimentos para determinar el tipo de muerte celular (necrosis y/o apoptosis) que se asocia a la neurodegeneración correlacionan de manera muy interesante con las alteraciones observadas en la microscopia electrónica, ya que la presencia del blebbing o ampollas en la membrana plasmática es una característica reportada de la muerte apoptótica (Bursch, 2000). Estas alteraciones deben repercutir de manera importante en la fisiología de la célula y se asocian temporalmente con la disminución en la respuesta sináptica observada en los electroretinogramas.

Por la asociación antes mencionada del estrés oxidativo y la muerte celular, justamente en nuestros resultados se observó que la muerte celular por apoptosis se presenta desde los primeros días y encontramos incrementos en la presencia de caspasa 3 después de que se presentó un pico de estrés oxidativo.

Un aspecto que todavía no está bien definido y que debe ser objeto de una caracterización más completa es la posibilidad de que en nuestro modelo de estudio se presenten otras formas de muerte celular como la necrosis o la autofagia. Está reportado que la alteración en la dinámica del calcio intracelular puede estar relacionada con ambos procesos, y aunque todavía no sabemos con precisión cómo está modificado el manejo de calcio en el interior de los fotorreceptores y otros tipos celulares que forman la omatidia de la mosca,

consideramos muy probable que ante la ausencia del IP₃R este parámetro esté alterado de manera significativa.

Alteraciones en la actividad del receptor de IP₃ se han implicado recientemente en aquellas enfermedades en donde la desregulación de la homeostasis del calcio intracelular se ha relacionado en la patogénesis temprana de condiciones neurodegenerativas específicas (Huntington, Alzheimer, Ataxia Espinocerebelar tipo 1) indicando un papel causal (Banerjee y Hasan, 2005). También se estudiado la liberación de calcio mediada por IP₃R en ratones que tienen un defecto genético espontáneo en el IP₃R y en animales knockout del mismo, y se ha observado que los ratones homocigotos tienen una tasa muy baja de nacimientos debido a que mueren *in utero* (Matsumoto, 1996 y Street, 1997).

Otro hallazgo interesante en nuestros resultados fue que también se detectaron alteraciones en la zona no mutante del mosaico. Resulta muy llamativo que el hecho de **que al** estar en vecindad con células que expresan una mutación, las células “sanas” también muestren un compromiso morfológico y fisiológico. En algunos aspectos, las alteraciones fueron muy discretas (electrorretinogramas); sin embargo, en la estructura, el estrés oxidativo y la apoptosis, se observaron alteraciones muy similares a las células que carecían de la expresión del IP₃R.

Analizando los resultados obtenidos en este trabajo, consideramos que se logró una descripción del curso temporal de la neurodegeneración retiniana. El artículo comprende la información sobre la secuencia de las alteraciones estructurales y funcionales de la retina, correlacionando dichos cambios con las reacciones pro-oxidantes presentes en el sistema experimental con el alelo B0. En conjunto con los resultados logrados, se considera que el proyecto ha cumplido los objetivos planteados y la contestación de la hipótesis de trabajo.

CONCLUSIONES

La obtención de organismos mosaico homocigotos para la mutación del receptor de IP_3 , resultó una herramienta experimental muy útil. Antes de nuestro estudio, no se había realizado una caracterización temporal de los cambios morfológicos en la omatidia de la mosca cuando se expresa la mutación del receptor de IP_3 . El uso de la microscopía electrónica nos permitió conocer en que momento después de la eclosión de la moscas comienzan las alteraciones estructurales de las diversas células oculares, además de haber sido posible un seguimiento de la progresión del daño hacia los 30 o 35 días siguientes.

Sin duda alguna, la mosca de la fruta permite el uso de herramientas experimentales muy amplias para este tipo de estudios y una de ellas es el estudio electrofisiológico de las células de interés. El uso de los electrorretinogramas fue muy útil e indicativo de la pérdida de la fototransducción en los organismos mosaico, demostrándonos que la transmisión sináptica de los fotorreceptores con su primer relevo, está alterada y que esta alteración está ligada a los cambios estructurales observados pero de manera desfasada.

A pesar de las limitantes experimentales que conlleva trabajar con un modelo tan pequeño, como lo es la retina de la mosca, fue posible llevar a cabo experimentos de estrés oxidativo y muerte celular; con el fin de conocer si los cambios estructurales y fisiológicos estaban sustentados con componentes moleculares. Los resultados nos demostraron que existen cambios lipoperoxidativos intermitentes en la retina mosaico de la mosca seguido de un patrón de muerte celular apoptótica que correlacionan con las alteraciones morfológicas y estructurales antes mencionadas. Ya se ha reportado este tipo de patrón lipoperoxidativo en diferentes fracciones de hígado cuando el órgano atraviesa por el proceso de regeneración (Aguilar y col., 1996).

La aportación de este trabajo permitió el conocimiento del patrón temporal de lo que sucede en la célula fotorreceptora del ojo de la mosca cuando el receptor de IP_3 está ausente y que es diferente a lo reportado en otros sistemas.

En resumen:

- 1) Se obtuvieron organismos con segmentos homocigotos mutantes para el IP_3R en ojos mosaico de manera exitosa.
- 2) Los datos de microscopía electrónica muestran que la morfología de la omatidia se altera ya desde los 5 días después de la eclosión en el segmento mutante y desde los 15 días en el

segmento no mutante. Estas alteraciones son progresivas, haciéndose más severas a los 30 y 35 días.

3) Los resultados de los electroretinogramas indican que los transientes ON y OFF se alteran desde el día 10-15, en ambos alelos. El segmento no mutante no mostró alteraciones fuertes en estos parámetros. Los otros parámetros (potencial de receptor y overshoot) se modifican de manera significativa después de la tercera semana de eclosión. Las alteraciones observadas en los electroretinogramas son posteriores a las observadas en la estructura de las omatidias por microscopía electrónica.

4) Se detectaron varios episodios de estrés oxidativo en ambos alelos estudiados y en ambos segmentos. Con el anticuerpo anti-HNE, se observaron cambios desde los primeros días, haciéndose más claros a los 18, 27 y 40 días en el alelo B0 y a los 3, 18, 21 y 30 días en el alelo L4. También se observaron episodios de estrés oxidativo en el segmento de células no mutantes debido a la vecindad con las células mutantes. La señal del anticuerpo anti-HNE correlaciona con el patrón de alteraciones estructurales observados por microscopía electrónica.

5) Los resultados de la caspasa 3 activa mostraron un incremento importante en la presencia de apoptosis desde el primer día de la eclosión en el alelo B0. Estos resultados sugieren una correlación estrecha con las alteraciones estructurales observadas en la microscopía electrónica y los cambios en los electroretinogramas. Los cambios estructurales en las membranas celulares son típicos de muerte celular apoptótica. Se observó una correlación con el patrón de estrés oxidativo, sugiriendo que la muerte apoptótica es el resultado de los eventos lipoperoxidativos. En el alelo L4, los picos de caspasa 3 fueron más discretos y en ambos segmentos; sin embargo, correlacionan con los cambios estructurales, los electroretinogramas y los incrementos del estrés oxidativo.

PERSPECTIVAS

1. Sobre-expresar proteínas antioxidantes (SOD, catalasa) y observar si se contrarrestan los efectos de la mutación.
2. Expresar factores anti-apoptóticos (p35, DIAP1) en fondos genéticos mutantes para el receptor de IP₃ para ver si se rescata el fenotipo.
3. Expresar la mutación en el ojo completo para eliminar todo el pigmento y mejorar las mediciones de fluorescencia.
4. Profundizar el estudio de microscopía electrónica y de fluorescencia para analizar si existen efectos necróticos adicionales.
5. Caracterizar los niveles, localización subcelular y la actividad de otros canales iónicos y bombas metabólicas encargadas del manejo del calcio intracelular.
6. Implementar un sistema experimental que nos permita medir de manera directa la concentración de calcio intracelular en la retina de *D. melanogaster* en presencia y ausencia del IP₃R.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Delfín, I. López-Barrera, F. and Hernández-Muñoz, R. (1996) Selective Enhancement of Lipid Peroxidation in Plasma Membrane in Two Experimental Models of Liver Regeneration: Partial Hepatectomy and Acute CCl₄ Administration. *Hepatology* 24: 657-662.
- Agrawal, N., Padmanabhan, N. and Hasan, G. (2009) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function in *Drosophila* insulin producing cells. *PLoS One* 4: 1-10.
- Assefa, Z., Bultynck, G., Szlufcik, K., Nadif, K. N., Vermassen, E., Goris, J., Missiaen, L., Callewaert, G., Parys, J. B., and De Smedt, H. (2004) Caspase-3-induced truncation of type 1 inositol trisphosphate receptor accelerates apoptotic cell death and induces inositol trisphosphate-independent calcium release during apoptosis *J. Biol.Chem.* 279, 43227–43236
- Ayer, R. K., and Carlson, J. (1991) acj6: a gene affecting olfactory physiology and behavior in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5467-5471.
- Banerjee, S., Lee, J., Venkatesh, K., Wu, C. F. and Hasan, G. (2004) Loss of flight and associated neuronal rhythmicity in inositol 1, 4, 5- trisphosphate receptor mutants of *Drosophila*. *J Neurosci* 24: 7869- 7878.
- Banerjee, S and Hasan, G. The InsP3 receptor: its role in neuronal physiology and neurodegeneration. (2005) *BioEssays* 27: 1035-1047.
- Berridge, M., Bootman, M. D. and Lipp, P. (1998) Calcium a life and death signal. *Nature* 395: 645-648.
- Bian, X., Hughes, F. M., Huang, Y., Cidlowski, J. A. and Putney, J. W. jr. (1997) Roles of cytoplasmic Ca²⁺ and intracellular Ca²⁺ stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *Am electroretinogramas Physiol* 272: C1241-1249.
- Bloomquist, B. T., Shortridge, R.D., Schneuwly, S., Perdew, M. Montell, C., Steller, H., Rubin, G. and Pak, W.L. (1988) Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, norpA, and its role in phototransduction. *Cell* 54: 723-733.
- Bosanac, I., Alattia, J.R., Mal, T.K., Chan, J., Talarico, S., Tong, F.K., Tong, K.I., Yoshikawa, F., Furuichi, T., Iwai, M., Michikawa, T., Mikoshiba, K. and Ikura, M. (2002) Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature* 420: 696-700.

- Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, CH., Fröhwein, U. and Schulte-Hermann, R. Programmed Cell death (PCD) Apoptosis, Autophagic PCD, or Others? (2000) *Ann N Y Acad Sci.* 926:1-12.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D. and Brini, M. (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signal. *Biochem Biol Mol* 36: 107-160.
- Chedid, A. and Nair, V. (1972) Diurnal rhythm in endoplasmic reticulum of rat liver: Electron microscopic study. *Science* 175: 176-179.
- Cretón, R., Kreiling, J.A. and Jaffe, L.F. (2000) Presence and roles of calcium gradients along the dorsal-ventral axis in *Drosophila* embryos. *Dev Biol.* 217: 375-385.
- Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004) Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 116: 205-219.
- Dorstyn, L., Read, S. H., Quinn, L. M., Richardson, H. and Kumar, S. (1999) *J Biol Chem* 274: 30778-30783.
- Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Duchen, M. R. (1999) Contribution of mitochondria to animal physiology: from homeostasis sensor to calcium signaling and cell death. *J Physiol* 516: 1-17.
- Ellis, R. E. (1992) Negative regulators of programmed cell death. *Curr Opin Genet Dev* 2: 635-641.
- Feiler, R., Bjornson, R., Kirschfeld, K., Mismer, D., Rubin, G.M., Smith, D.P., Socolich, M. and Zuker, C.S. (1992) Ectopic expression of ultraviolet-rhodopsins in the blue photoreceptor cells of *Drosophila*: visual physiology and photochemistry of transgenic animals. *J Neurosci* 12: 3862-3868.
- Giannetti, L., Consolo, U., Magnoni, C. and Muzio, L. (2004) Apoptosis: Escaping strategies in human skin cancer. *Oncol Rep Feb* 11: 401-5.
- Glick, D., Barth, S. and Macleod, K. F. (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanism. *J Pathol* 221: 3- 12.
- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K. and Mori, Y. (2002) LTRPC2Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 9: 163-173.

- Hardie, R. C. (1987) Is histamine a neurotransmitter in insect photoreceptors? *J Com Physiol* 161: 201- 213.
- Hardie, R. C., Peretz, A., Pollock, J. A. and Minke, B. (1993) Ca^{2+} limits the development of the light response in *Drosophila* photoreceptors. *Proc R Soc Lond B* 252: 223-229.
- Hardie, R. C. (1996) INDO-1 measurements of absolute resting and light-induced Ca^{2+} concentration in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci* 16: 2924-2933.
- Hardie, R.C. (2001) Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 204: 3403–3409.
- Hiromi Y. (1990) Whole mount staining of *Drosophila* retina for β - Galactosidase activity. In: Rubin Lab Methods. Berkeley, California. p 78.
- Jaiswal, J. K. (2001) Calcium – how and why?. *J Biosci* 26: 357-363.
- Jayaraman, T., and Marks, A. R. (1997) T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis *Mol.Cell. Biol.* 17, 3005–3012.
- Joshi, R., Venkatesh, K., Srinivas, R., Nair, S. and Hasan, G. (2004) Genetic dissection of *itpr* gene function reveals a vital requirement in aminergic cells of *Drosophila* larvae. *Genetics* 166: 225- 236.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Kelly, L. E. and Suzuki, D. T. (1974) The effects of increased temperature on electroretinograms of temperature-sensitive paralysis mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Nat Acad Sci* 71: 4906- 4909.
- Khan, A. A., Soloski, M. J., Sharp, A. H., Schilling, G., Sabatini, D. M., Li, S., Ross, C. A., and Snyder, S. H. (1996) Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Science* 273, 503–506
- Kim, D., Natarajan, N., Prabhakar, N.R. and Kumar, G.K. (2004) Facilitation of dopamine and acetylcholine release by intermittent hypoxia in PC12 cells: involvement of calcium and reactive oxygen species. *J Appl Physiol* 96: 1206-1215.
- Kusnier, C., Cardenas, C., Hidalgo, J. and Jaimovich, E. (2006) Single-channel recording of inositol trisphosphate in the isolated nucleus of a muscle cell line. *Biol Res* 39: 541-553.

- Magyar, A., Bakos, E. and Varadi, A. (1995) Structure and tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* organellar-type Ca(2+)-ATPase gene. *Biochem J* 310: 757-763.
- Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, Nagata E, Tanaka K, Takano H, Minowa O, Kuno J, Sakakibara S, Yamada M, Yoneshima H, Miyawaki A, Fukuuchi Y, Furuichi T, Okano H, Mikoshiba K, Noda T. (1996) Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5- trisphosphate receptor. *Nature* 379:168–171.
- Martínez-Gómez A. y Dent, M. A. R. (2002) La controversia de la muerte celular mediada por calcio, ¿es disparada por la mitocondria o el retículo endoplásmico? *Ciencia Ergo Sum* 9: 62-72.
- McConkey, D. J. and Orrenius, S. (1994) Signal transduction pathways to apoptosis. *Trends Cell Biol.* 4: 370-5.
- Mikoshiba, K., Furuichi, T. and Miyawaki, A. (1994) Structure and function of IP₃ receptors. *Cell Biol.* 5: 273-281.
- Mohanty, J.G., Jaffe, J.S., Schulman, E.S. and Raible, D.G. (1997) A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immunol Methods* 202: 133-141.
- Morales-Tlalpan, V., Arellano, R.O. and Díaz-Muñoz, M. (2005) Interplay between ryanodine and IP₃ receptors in ATP-stimulated mouse luteinized-granulosa cells. *Cell Calcium* 37: 203-213.
- Nair, S., Agrawal, N. and Hasan, G. (2007) Homeostasis of glutamate neurotransmission is altered in *Drosophila* Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mutants. *Invert Neurosci* 7: 137- 147.
- Nam, S.H., Jung, S.Y., You, C., Ahn, E.H. and Suh, C.K. (2002) H₂O₂ enhances Ca²⁺ release from osteoblast internal stores. *Yosei Med J.* 43: 229-235.
- Noiri, E., Nakao, A., Uchida, K., Tsukahara, H., Ohno, M., Fujita, T., Brodsky, S. and Goligorsky, M. S. (2001) Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281: F948- F957.
- Oberwinkler, J. and Stavenga, D. G. (2000) Calcium transients in the rhabdomeres of Dark- and Light- adapted fly photoreceptors cells. *J Neurosci* 20: 107- 1709.

- Ohishi, N., Ohkawa, H., Miike, A. Tatano, T. and Yagi, K. (1985) A new assay methods for lipid peroxides using a methylene blue derivative. *Biochem Int* 10:205-211.
- Ohsawa S, Hamada S, Yoshida H and Miura M. (2008) Caspase-mediated changes in histone H1 in early apoptosis: prolonged caspase activation in developing olfactory sensory neurons. *Cell Death and Differentiation* 15:1429- 1439.
- Osborne, B. A. and Schwartz, L. M. (1994) Essential genes that regulate apoptosis. *Trend Cell Biol.* Nov, 4: 394-9.
- Paschen, W. and Doutheil, J. (1999) Disturbances of the functioning of endoplasmatic reticulum: A key mechanism underlying neuronal cell injury. *J. Cereb Blood Flow Metab* 19:1-18.
- Pepe, I.M. (1999) Rhodopsin and phototransduction. *J Photochem. Photobiol.* 48: 1-10.
- Pou, S., Huang, Y., Bhan, A., Bhadti, V.S., Hosmane, R.S., Wu, S.Y. Cao, G. and Rosen, G.M. (1993) A fluorophore-containing nitroxide as a probe to detect superoxide and hydroxyl radical generated by stimulated neutrophils. *Anal Biochem* 212: 85-90.
- Raff, M. C., Bares, B. A., Burne, J. F., Coles, H. F., Ishizaki, Y. and Jacobson, M. D. (1993) Programmed cell death and the control of cell survival. *Science* 262: 695-700.
- Raghu, P., Colley, N.J, Webel, R., James, T., Hasan, G., Danin, M., Selinger, Z. and Hardie, R.C. (2000) Normal phototransduction in *Drosophila* photoreceptors lacking an InsP₃ receptor gene. *Mol Cell Neurosci* 15: 429-445.
- Ranger, A. M., Malynn, B. A. and Korsmeyer, Stanley J. (2001) Mouse models of cell death. *Nature Genetics* 28: 113-118.
- Resino, J., García-Bellido A. (2004) *Drosophila* genetic variants that change cell size and rate of proliferation affect cell communication and hence patterning. *Mechanism of Development* 121, 351-364
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T. and Korsmeyer, S.J. (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300:135-139.

- Siesjö, K. B., Hu, B. and Kristian, T. (1999) Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? *J.Cereb Blood Flow Metab* 19: 19-26.
- Sinha, M. and Hasan, G. (1999) Sequencing and exon mapping of the *inositol 1,4,5-trisphosphate receptor* cDNA from *Drosophila* embryos suggests the presence of differentially regulated forms of RNA and protein. *Gene* 233: 271-276.
- Street VA, Bosma MM, Demas VP, Regan MR, Lin DD, Robinson LC, Agnew WS, Tempel BL. (1997) The type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene is altered in the opisthotonos mouse. *J Neurosci* 17:635–645.
- Sugawara, H., Kurosaki, M., Takata, M., and Kurosaki, T. (1997) Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J.* 16, 3078–3088.
- Tahayato, A., Sonnevile, R., Pichaud, f., Wernet, M. F., Papatsenko, D., Beafils, P., Cook, T. and Deplan, C. (2003) Otd/Crx, a dual regulator for the specification of ommatidia subtypes in the *Drosophila* retina. *Dev Cell* 5: 391- 402.
- Takeshima, H., Nishi, M. Iwabe, N. Miyata, T., Hosoya, T. Masai, I. and Hotta, Y. (1994) Isolation and characterization of gene for a ryanodine receptor/calcium release channel in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 337: 81-87.
- Theodosiou, N.A. and Xu, T. (1998) Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods: A companion to methods in enzymology* 14: 355-365.
- Thompson, A., Seliger, H.H. and Posner, G.H. (1986) Chemiluminescent probes for singlet oxygen in biological reactions. *Methods Enzymol* 133: 569-584.
- Toyokuni, S., Uchida, K., Hattori-Nakakuki, Y., Hiai, H. and Stadtman, E. R. (1994) Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal caicinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2616-2620.
- Vázquez- Martínez, O., Cañedo-Merino, R., Díaz-Muñoz, M. and Riesgo-Escovar, JR (2003) Biochemical characterization, distribution and phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster* ryanodine and IP₃ receptors, and thapsigargin sensitive Ca²⁺ ATPase. *Journal of Cell Science* 116, 2483-2494.
- Velázquez-Paniagua, M., Prieto-Gómez, B. y Contréras-Pérez, R. (2004) El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencia* 75: 36-43.

- Venkatachalam, K., van Rossum, D.B., Petterson, R.L., Ma, H, and Gill, D.L. (2002) The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell Biology* 4: E263-272.
- Venkatesh, K. and Hasan, G. (1997) Disruption of the IP₃ receptor gene of *Drosophila* affects larval metamorphosis and ecdysone release. *Current Biology* 7: 500-509.
- Wischin-Fuentes, S., Morales-Tlalpan, V., Acosta-Santoyo, G. and Díaz-Muñoz, M. (2009) Pro-Oxidant Reactions: Physiological and Pathological Implications. En *Oxidative stress and intracellular calcium dynamics*. Research Signpost. Editors: Mauricio Díaz-Muñoz and Abel Santamaría del Ángel. pp: 201-223.
- Yoshikawa, S., Tanimura, T., Miyawaki, A., Makoto, N., Yusaki, M., Furuichi, T. and Mokoshiba, K. (1992) Molecular cloning and characterization of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 267: 16613-16619.
- Yoshioka, T., Inoue, H., Kasama, T., Seyama, Y., Nakashima, S., Nozawa, Y. and Hotta, Y. (1985) Evidence that arachidonic acid is deficient in phosphatidylinositol of *Drosophila* heads. *J Biochem* 98, 657- 662.
- Zong, W. and Thompson, C. B. (2006) Necrotic death as a cell fate. *Genes & Dev* 20: 1-15.

APÉNDICE

En ésta sección se incluyen 2 escritos que fueron publicados durante la realización del doctorado. El capítulo de libro: “*Invertebrates as experimental models to study neurodegenerative diseases*” y una revisión en español titulada: “*Muerte apoptótica en Drosophila melanogaster y en vertebrados superiores*”.

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



New Perspectives on Brain Cell Damage, Neurodegeneration and Neuroprotective Strategies, 2007: 1-19 ISBN: 81-308-0164-7
Editors: Abel Santamaría and María Esther Jiménez-Capdeville

Invertebrates as experimental models to study neurodegenerative diseases

**Olivia Vázquez-Martínez, Verónica Morales-Tlalpan
Sabina Wischin-Fuentes and Mauricio Díaz-Muñoz**
Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, QRO, México

Abstract

Neurodegenerative diseases are hereditary and

times: Alzheimer, Parkinson, Huntington and Kennedy diseases, amyotrophic lateral sclerosis, retinosis pigmentosa, etc. These disorders markedly impact the lives of millions and represent one of the critical goals of medical research today.

*In order to prevent and propose treatments for neurodegenerative diseases is imperative to learn and understand the molecular and cellular mechanisms of these pathologies. A successful strategy in recent years has been to reproduce some aspects of the degenerative disorders in laboratory organisms that are simpler and more suitable for experimental manipulation. In this review, we present some of the biomedical highlights to gain more understanding about genetic, physiological and biochemical disturbances of the main neurodegenerative diseases using the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, and the nematode *Caenorhabditis elegans*, as experimental models.*

Introduction

Last century has witnessed a remarkable increase in life expectancy for most of the human beings (from ≈40 to more than 70 years). Thanks to significant improvements in sanitation and in the combat against infectious diseases, the adoption of more effective hygiene habits and higher familiar incomes, the proportion of elderly people is every year growing throughout almost all countries of the world. From a biological perspective, this circumstance has brought a previously unknown situation: the appearance in the human population of a new set of pathological entities afflicting to the more mature members of our society. Among these maladies, neurodegenerative disorders highlight, because of the economical and social distress they produce in the individuals and the families who suffer those conditions. Indeed, neurodegenerative diseases are especially insidious since make people incapable to act independently in a progressive manner, and therefore they usually involve a number of years of suffering and uncertainty for the victims themselves and their relatives. As a consequence, enormous financial investments need to be done to take care of the patients and for support of their families.

Given this alarming situation, a priority for researchers in biomedicine is to investigate and understand the cellular and molecular mechanisms involved in the onset and development of the neurodegenerative diseases. One of the first steps toward the aim of preventing these sicknesses and/or overcoming the clinical problems related with a decreased capacity in the physiology of the brain, is to comprehend the interplay among the genes, the proteins, the organelles and the cells of the nervous system whose altered functions are responsible for the pathogenesis of these disorders.

As part of the multiple strategies to cope the degenerative diseases of the brain, many biomedical research groups have chosen simpler organisms than mammals and vertebrates to account for a more precise information about the molecular mechanisms involved in the principal neurodegenerative disorders that affect humans such as Parkinson, Huntington and Alzheimer diseases. Therefore, they have as experimental models in their laboratories dipters such as *Drosophila melanogaster* (the fruit fly) and nematodes such as *Caenorhabditis elegans* (the 1 mm roundworm). The underlying principles are easy to understand: 1) These invertebrates present a nervous system with molecular and cellular events similar to the ones disrupted during the degenerative processes in the brain of mammals; 2) The genes recognized as responsible for the pathogenesis are also present in *D. melanogaster* and *C. elegans* with the advantage that in many cases there is only one isoform of these genes in invertebrates; 3) It exists an extensive methodological support to manipulate molecularly the genetic properties of these organisms, and hence, it is common to get organisms with knock out, knock in, overexpression and mosaic of diverse genes.

In this review we summarize the main molecular and cellular advances in the understanding of the principal human neurodegenerative diseases having *D. melanogaster* and *C. elegans* as experimental models.

Huntington disease

This inherited disorder with autosomic dominant transmission, affects up to 8 people per 100,000, with no distinction between men and women. The symptoms become conspicuous during the fourth decade of life, but a juvenile form of Huntington disease (HD) has also been reported. Formally, it was first described by George S. Huntington in 1872, but chronicles about the havoc associated to its symptoms had been known much earlier. Some of the initial designations of HD were "St Vito dance" and "chorea maior". At present HD is one of the first genetic ailments for which an accurate test can be performed.

The patients show a progressive decline in their physical and cognitive abilities, and some of them even present psychiatric problems. The more characteristic symptom is random, uncontrollable and rapid movements in their extremities and lack of coordination. As HD progresses, problems to sit, stand, speech, chewing and swallowing are also present. Eventually a full-time care is required for every patient.

HD is caused by a trinucleotide repeat expansion in the huntingtin gene (Htt), and is one of the 8 polyglutamine (or polyQ) diseases so far reported (other are spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, 7 and 17, spinobulbar muscular atrophy and dentatorubropallidoluysian atrophy). Cerebral cortex, but particularly the caudate nucleus and the putamen, are severely affected with loss of neurons and gliosis. Great number of striatal medium spiny

neurons, which are GABAergic, are lost. It is assumed, based in a number of experimental evidences, that abnormal huntingtin produces aggregates which are toxic by enhancing oxidative stress and affecting mitochondrial function.

Drosophila. *Drosophila* transgenic models of HD have proven to be excellent models of the human disease by replicating most of the features of its pathological characteristics, such as the late onset, the reduced longevity, the neurodegeneration, and the impaired motor function (1).

The expression of mutant human huntingtin protein cause widespread degeneration in the *Drosophila* central nervous system that correlates with degeneration of photoreceptor neurons.

Drosophila models of degenerative processes have been used to find and prove pharmacological treatments for their human counterparts. Transgenic flies engineered to express mutant human genes have been used to test the effectiveness of various chemical compounds in vivo. Cystamine was selected based on its ability to inhibit transglutaminase activity and thereby inhibit aggregate formation possibly by blocking glutamine crosslinking. It has proven efficacious in prolonging survival and improving motor neuron function in HD mice (2) and reducing photoreceptor neuron degeneration in flies (3).

Other protective actions in photoreceptor degeneration include inhibition of the pro-apoptotic enzyme caspase-3, improvement of mitochondrial respiration and function, and reduction of oxidative stress through the enhanced production of glutathione (4)

Histone deacetylase inhibitors have proven effective at arresting progressive neuronal degeneration in a fly model of HD even after onset of symptoms (5). Drug at threshold concentrations in *Drosophila* produce no apparent lethality and can suppress polyglutamine-induced pathology at levels comparable to or better than single compound feedings at higher effective concentrations.

Alzheimer disease

Neurodegenerative disorder characterized by gradual deterioration in cognitive abilities accompanied by behavioral alterations and neuropsychiatric symptoms. Alzheimer disease (AD) is the most frequent type of dementia in the elderly. By the age 85, one out of two persons will have symptoms of AD and even a larger proportion will have some of the pathological features typical of the disease in their brains. This neurological illness was described by Alois Alzheimer at the beginning of the past century in Germany.

The clinical characteristics start with an incipient short term memory loss which progresses to a more persistent and pervasive forms. Eventually, aphasia, disorientation and disinhibition are also installed. AD may also include behavioral changes, and in the last stages, it involves alteration in mobility, feeding inability and incontinence. According to the seriousness of

symptoms and the assistance needed by the patients, AD is classified as mild, moderate and severe.

Forensic findings show that AD implies neuronal loss or atrophy, chiefly in the temporal, parietal and frontal cortex, associated also to inflammatory responses caused by deposition of amyloid plaques and neurofibrillary tangles. Amyloid beta is a short peptide produced by an anomalous proteolytic rupture of a transmembrane protein known as amyloid precursor protein. Aggregation of amyloid beta forms the neuritic plaques which have been considered as responsible for neuronal loss. The function of this protein is unclear, but has been related to neuronal development. Amyloid beta is generated by the sequential action of two enzymes known as β and γ secretases. A mutant variant of presenilin 1 and 2, a component of the γ secretase, has been related to the onset of AD. In addition of amyloid beta, tau which is an microtubule-associated proteins, is also abnormally accumulated as paired helical filaments. It has been proposed that tau aggregation is generated by its hyperphosphorylation, leading to the formation of neurofibrillary tangles inside neuronal somas.

Most of AD cases are "sporadic" with environmental factors such as head injury, repeated trauma and exposure to chemicals, acting as triggers. However, mutations of presenilins as well as inheritance of the $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E are regarded as responsible or as risk features for some of Alzheimer cases that run in families. This neurodegenerative disorder has been linked in humans to the 1st, 14th and 21st chromosomes, but identification of the altered genes in each chromosome awaits confirmation. Alternative reports associate the onset and develop of AD to genes related to insulin-degrading enzymes, inflammatory 5-lipoxygenase gene and endothelin-converting enzymes.

Drosophila. Multiple mutants have been reported in *Drosophila* showing different aspects of the degenerative process observed during AD. In mammals, the ADAR2 protein which edits the primary structure in glutamate and serotonin receptors, can rescue the degenerative defects when is expressed in the *Drosophila* dADAR mutant (6). A *Drosophila* screen searching for mutations hypersensitive to hypoxia, identified three mutant loci (7), and interestingly one of them turned out to encode ADAR (8). ADAR as editing factor could be relevant for the recovery from oxygen deprivation. Thioredoxin, a multifunctional antioxidative and antiapoptotic protein (9) might play a role because this gene is up-regulated in ADAR mutants (10).

The *drop-dead* (*drd*) neurodegenerative mutant most likely affects a structural component for oxygen supply. The *drd* mutant was later found to cause late-onset neuronal degeneration. The *drd* gene encodes a structural component of tracheal tubes in *Drosophila* (6).

The expression of mammalian tau in *Drosophila* induces cell death and can lead to the formation of neurofibrillary tangles (11). *Drosophila* also

possesses an endogenous *tau* gene and mutations have been isolated but no phenotype has been described (12).

The *Drosophila futsch* gene, which encodes a protein homologous to vertebrate MAP1, when is mutated produce progressive neurodegeneration in the olfactory system with important disruption in the microtubule network (13).

The breakdown of phosphatidyl choline has been observed in many acute and chronic neurodegenerative disorders (14). Elevated levels of phosphatidyl choline have been connected with AD, since amyloid beta can increase phosphatidyl choline synthesis (15). *Drosophila swiss cheese (sws)* mutant shows and increase in phosphatidyl choline levels, widespread degeneration and neuronal apoptosis (16). The fly *sws* mutant and the subsequent creation of a mouse mutant for this gene are one of the first examples where *Drosophila* provides the basis to identify a vertebrate gene that also causes progressive neurodegeneration.

Interestingly, cholesterol and cholesterol ester have been implicated in the production of the amyloid beta fragment. Amyloid precursor protein in *Drosophila* is encoded by the *Appl* (*amyloid precursor protein-like*) gene and genetic interaction test have shown that a deletion of the *Appl* gene enhances the neurodegenerative phenotype in the *loe* gene (fatty acid metabolism), although the *Appl* mutant by itself does not reveal any neurodegeneration (17).

C. elegans. Use of the worm *C. elegans* to model AD is recent. The worms genetically modified to express the human gene for A β ₄₂, show amyloid aggregates of different sizes, just as seen in Alzheimer's brain. The symptoms of transgenic worms include paralysis and a life span of only 20 days. Thus, the transgenic *C. elegans* expressing A β ₄₂ has been used widely for mechanistic studies regarding amyloid being evident the formation of intracellular A β deposits (18). The relationship between amyloid formation and oxidative damage was documented using this model. In the *C. elegans* a methionine (Met³⁵) is essential for free radical production by A β ₁₋₄₂, and its critical for β -sheet formation in the transgenic organism (19). A correlation between a progressed paralysis phenotype with an increased levels of protein carbonyls supports the amyloid hypothesis," which states that A β -induced oxidative stress leads to neuronal cell death seen in AD (20). DNA microarray assay of the transgenic strain indicates that several stress-related genes were up-regulated, principally two genes homologous to human α B-crystalline and tumor-necrosis-factor-induced protein, which were also found up-regulated in the postmortem human AD brain (21). Even though this is an invertebrate system and thus may not have significance to AD pathology, it is a well-suited model for correlating A β expression and its associated toxicity in an *in vivo* model organism.

To understand the events in development of AD and to develop therapeutic strategies, it is important to establish the temporal sequence of events leading to neurodegeneration. *C. elegans* is a suitable tool for mechanistic examination of the transgene products as well as for pharmacological analysis of time course and kinetics of drug effect (22).

Parkinson disease

This degenerative disorder of the brain is characterized by an impediment in the patients' motor skills and speech ability. The prevalence of this malady is estimated around 180 cases per 100,000, whereas the incidence varies according to gender (men are affected more than women), ethnical condition (elevated values among Hispanics) and age (elderly are more affected). The condition had been known since ancient times, but the disease was formally documented in 1817 by the British physician James Parkinson. Parkinson disease was one of first illness to be linked to the deficiency of a particular neurotransmitter. In this case, it was shown that the disease result from the loss of pigmented dopamine-secreting cells in the pars compacta region of the substantia nigra. The dopaminergic neurons project toward the basal ganglia to regulate mobility. Other dopaminergic pathways are also decreased or absent which explains the psychiatric pathology associated to Parkinson disease: altered volition and emotional responsiveness, reduced desire and initiative, as well as problems in sensory processes and maternal behavior.

Two hypothesis have been postulated to explain the loss of dopaminergic neurons in Parkinson disease: 1) Accumulation of the protein α -synuclein in cytoplasmic inclusions called Lewy bodies which can not be eliminated by ubiquitination; 2) High levels of iron that promotes generation of reactive oxygen species (ROS) and enhancement of pro-oxidative reactions.

The causes of Parkinson disease are diverse, being most of the cases idiopathic. In less proportion Parkinson disease has been related to genetic and toxic factors, as well as head traumas. Mutations in the genes of the next proteins have been associated to some forms of Parkinson disease: α -synuclein, parkin, ubiquitin hydrolase and dardarin. One of the most effective toxin to create Parkinson disease-like symptoms is MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) which destroys dopaminergic neurons when it is transformed to MPP⁺ by oxidation of monoamine oxidase.

Drosophila. The model of Parkinson's disease in *Drosophila* is based on expression of normal and mutant forms of human α -synuclein. α -Synuclein (SNCA)-transgenic flies show selective loss of dopaminergic neurons, formation of filamentous α -synuclein rich inclusions similar to Lewy bodies and progressive locomotor dysfunction.

The phosphorylation at Ser129 in α -synuclein, is a key mechanism controlling α -synuclein toxicity. Alteration of Ser129 to the phosphorylation-incompetent residue alanine completely attenuates α -synuclein toxicity. Mutation of Ser129 to aspartate to mimic phosphorylation significantly enhances α -synuclein toxicity in dopaminergic neurons and in the retina. Overexpression of *Drosophila* G protein-coupled receptor kinase increases phosphorylation of α -synuclein at Ser129 and enhances α -synuclein neurotoxicity.

Mutation of Ser129 to alanine not only abrogates α -synuclein toxicity, but also markedly increases inclusion-body formation in Kenyon cells. Non-phosphorylated α -synuclein is readily recruited into inclusion, whereas phosphorylation of α -synuclein favors the maintenance of α -synuclein in a soluble, toxic form (23).

Phosphorylation seems to be a common mechanism underlying neurotoxicity. *tau* deposited in the characteristic protein aggregates of Alzheimer disease and related disorders –neurofibrillary tangles– is hyperphosphorylated. Two recently cloned familial Parkinson disease loci encoded protein kinases and increasing phosphorylation by manipulating kinases and phosphatases alters *tau* solubility and neurotoxicity (24).

The *Drosophila* mutants of the pigmentation gene PINK1 have males sterile and most of females too. Male sterility was due to spermatid mitochondria abnormalities. The flies exhibited a shorter life, age-dependent movement disability, age-dependent increase or aberrant wing phenotype, and disorganized muscle fibers resulting in poor flight performance, enlarged and abnormal mitochondrial phenotype, and reduction in ATP levels (25). These mutants are sensitive to the free radical inducer, paraquat, and the complex 1 inhibitor, rotenone, suggesting that the absence of PINK1 leads to decreased resistance to reactive oxygen species, and they are more sensitive a variety of stressors, illustrating the potential importance of environmental and genetic interactions in the pathogenesis of PD (26).

Mutations in *Drosophila parkin* result in profound mitochondrial defects in multiple tissue types. Fly *parkin* mutants also display progressive degeneration of a subset of dopaminergic neurons and that this degeneration can be rescued by the overexpression of a glutathione S-transferase, a factor that has been implicated in the cellular response to oxidative stress (27, 28).

C. elegans. Transgenic worms that over express wild-type or familial Parkinson mutant human α -synuclein was constructed. Dopamine neurons exhibited accumulation of α -synuclein in the cell bodies and neuritis, and the worms showed failure in the locomotive rate in response to food (29).

In *C. elegans* homolog of human *parkin* was found and called *pdr-1* (Parkinson's disease-related gene-1). Parkin in *C. elegans* interacts with

enzymes of the complex ubiquitin/ proteasome. Mutants of *pdr-1* loss-of-function, showed altered solubility and their intracellular localization properties is hypersensitive to different proteotoxic stress conditions (30).

Amyotrophic lateral sclerosis

Neurodegenerative disease characterized by the loss of upper and lower motor neurons that prevent the initiation and control of voluntary movement. One difference with other degenerative affections is that patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) maintain a proper mental functioning. This disorder involves destruction of areas of the spinal cord (lateral) where the nerve cells that signal and control the muscles are located (amyotrophic). Eventually these sections get scarred or harden because of gliosis and proliferation of extracellular matrix (sclerosis). ALS affects all races and ethnic groups, being men more prone to present the malady than women. Usually, the first symptoms appear between 40 and 60 years of age.

The symptoms are very subtle at the beginning, starting with progressive weakness in legs or arms, but in some patients also with difficulty in speaking and eating. At some point, patients are not able to stand or walk, and present serious impediments to swallow and chew. Usually they die because of respiratory failure.

The molecular mechanism underlying ALS is still obscure. A familiar form of this disease has been associated to a mutant version of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD1). Therefore, a hypothesis regarding the pathogenesis of this disorder postulates pro-oxidant reactions and an increase in reactive oxygen species as the factors responsible for the neuronal loss. An alternative interpretation suggests that mutant SOD1 might act as an amyloid protein, and hence promote the formation of agglomerates capable to block cellular transport and other vital functions. Additionally, it was found that patients with ALS had significant higher levels of the excitatory neurotransmitter glutamate in serum and spinal fluid. The increased presence of glutamate could lead to excitotoxicity episodes as an explanation for the death of spinal neurons. Supporting an active role of glutamate in the pathogenesis of this disease is the improvement in the health condition of patients under Riluzole administration, which is a compound that decreases the release of glutamate.

Drosophila Immunocytochemistry on brain tissues from ALS patients showed that there a selective loss of immunoreactivity for EAAT-2, a glutamic acid transporter expressed uniquely in glia cells (31). EAAT function is remove glutamate from synaptic cleft, preventing the excessive excitation of postsynaptic neurons. *Drosophila* has a single high-affinity glutamate transporter, dEAAT1. The inactivation of this transporter leads to widespread degeneration in the neuropil with the formation of small vacuoles, electro-dense material in

neuritis and swollen mitochondria. These knock-down flies also suffer from oxidative stress and show a 50% reduction in life span. Interestingly treatment with the antioxidant melatonin or the anti-excitotoxic drug riluzole improved this condition significantly (32).

Null mutations in *Drosophila* SOD reduce the adult life span, cause hypersensitivity to oxidative stress, and lead to extensive necrotic death in the retina as well as a degeneration in the lamina (33).

C. elegans. Strains of *C. elegans* were genetically manipulated to express wild type and mutant human of SOD1. The transgenic worms expressing mutant SOD1 showed discrete aggregates in the muscle tissues and a greater vulnerability to oxidative stress. In the absence of oxidative stress, mutant human SOD1 proteins were degraded more rapidly than the wild-type human SOD1 protein (34).

Kennedy disease

This neuromuscular disorder is associated with mutation of the androgen receptor (AR) and it is also known as X-linked spinal-bulbar muscular atrophy. The disease was named after W.R. Kennedy who described the clinical condition in 1968. In humans, Kennedy disease (KD) is expressed exclusively in males since is a sex-linked illness, whereas females are carriers. It is believed that KD could be one of the most common forms of motor neuron diseases, since many patients have been misdiagnosed to have amyotrophic lateral sclerosis.

KD involves multiple CAG repeats (that codifies for the amino acid glutamine) in the gene for the androgen receptor. For that reason is classified as a polyQ disorder, in the same category as Huntington disease. At the beginning patients with the disease report muscular fatigue in proximal limbs that progress to affect the tongue and mouth muscles. Neurological symptoms include dysphagia and problems for swallowing and talking.

It is unknown the molecular and cellular mechanisms by which mutations in androgen receptor cause the deficiency in the neuromuscular system.

Drosophila. An early *Drosophila* model of KD was achieved by expressing a truncated version of the androgen receptor (AR). The flies presented neuronal degeneration that was coupled to aggregation of mutant protein. These studies illuminated a role, not only for molecular chaperones and proteasomal degradation, but also for the small ubiquitin-like modifier (SUMO) in the pathogenesis of polyglutamine diseases, suggesting that trafficking and/or the metabolism of AR controlled by SUMO modification of other proteins impacts KD pathogenesis.

A more recent *Drosophila* model, engineered to express the full-length expanded AR, not only revealed the critical role for hormone binding in the

pathogenesis of KD, but also showed important details about specific aspects of mutant AR metabolism in this disease.

The finding that hormonal activation is a required element of the pathogenicity of expanded AR, suggests that pharmacologic antagonists of the AR might serve a useful therapeutic purpose. However, treatment of flies expressing the full-length expanded AR with either hydroxyflutamide or bicalutamide failed to protect them from the neurodegenerative process and indeed exacerbated the disease (35).

Hereditary spastic paraplegia

This disease is also known as Familial Spastic Paraparesis, and formally is a group of inherited disorders characterized by a progressive weakness and stiffness of the legs. It is classified as uncomplicated, if only muscular problems are present, or complicated if the condition is also accompanied by neurological disturbances such as retinopathy, ataxia, ichthyosis, optic and peripheral neuropathies, deafness and dementia.

Genes that are associated for several forms of hereditary spastic paraplegia (HSP) have been identified. So far, approximately 20 genetic loci, which can be autosomal dominant or autosomal recessive, have been related to the onset of HSP. These genes are known as SPG (spastic gait). More studies are necessary to achieve a better perspective about the molecular mechanisms underlying the mutations of these genes to produce this type of disease.

Drosophila. *Drosophila* has been shown to contain a highly conserved spastin homolog, *Drosophila spastin* (*Dspastin*) (36).

Mammalian spastin has a nuclear localization; *Dspastin* was demonstrated to be a cytoplasmic protein enriched in neuronal axons and synaptic connections. At the neuromuscular junction (NMJ) synapse, loss of *Dspastin* causes morphological undergrowth and loss of synaptic area. *Dspastin* overexpression decreases microtubule stability, whereas loss of *Dspastin* enhances microtubule stability (37).

Drosophila neuronal knockdown of *Dspastin* and, conversely, neuronal overexpression of *Dspastin* containing a conserved pathogenic mutation both recapitulate some phenotypic aspects of the human disease.

Drosophila lacking phenotypes exclusively within the nervous systems displayed mutant phenotypes that resembled observations made in HSP patients. First, there was no lethality associated with neuronal loss of *Dspastin* activity, and flies eclosed into apparently normal young adults. Indeed, HSP is not a lethal condition, and patients present variable ages of onset, indicating that there are no obvious developmental defects linked to spastin mutations or, if present, these defects become manifest only after birth.

Flies progressively developed severe movement defects and within around 15-20 days of birth stopped moving altogether. Progressive locomotor

dysfunction and impaired gait are the hallmark of HSP pathology. Nervous system-specific reduction of *Dspastin* function resulted in progressive neurodegeneration of the fly brain with obvious presence of neurons undergoing apoptosis (38).

Adrenoleukodystrophy

Disorder that affect the growth and development of myelin. Adrenoleukodystrophy (ADL) is inherited in a sex-linked manner on the chromosome X. The prevalence is approximately 1 in 20,000 individuals. There are two modalities of ADL, the more severe impinges on children boys at ages 5 – 10 and it is characterized by seizures, ataxia, adrenal insufficiency, as well as degeneration of visual and auditory functions. A milder form of ADL affects young adults that present spinal cord dysfunction with weakness and numbness of the limbs and urination and defecation problems.

The defective gene in ADL codifies for a fatty acids transporter protein localized in peroxisomes. One of the most important functions of these organelles is the oxidation of fatty acids. When this transporter fails, an excessive accumulation of very long chain fatty acids (more than 24 carbons) is detected in the serum of patients. These fatty acids are present in high amounts in all cells, but are specially insidious by avoiding the formation of myelin by oligodendrocytes in the nervous system, and altering the cellular physiology of the adrenal glands.

Drosophila. In *Drosophila*, a transporter for very long chain fatty acids is encoded by the *bubblegum* (*bgm*) gene (39) and *bgm* flies mutant show retinal degeneration and strong degeneration in the first optic ganglion, the lamina.

Another *Drosophila* mutant connected with fatty acid metabolism is the *loechring* (*loe*) mutant. The *loe* mutation affects the γ -subunit of the AMP-activated protein kinase (AMPK) complex, a heterotrimer consisting of the catalytic α -subunit and the regulatory β and γ -subunits (40). *loe* also reveals a severe reduction in cholesterol ester, a storage form of cholesterol in the cells, while free cholesterol levels are unchanged (23).

Retinitis pigmentosa

A genetic condition that produces a progressive blindness in patients that usually are in their 40s or 50s. In the retinitis pigmentosa (RP) the photoreceptors, including rods and cones, as well as the retinal pigment epithelium are altered, causing at first defective dark adaptation (nyctalopia), later constriction of the peripheral visual field and eventually complete blindness.

Nearly 40 different genes have been associated to RP. The first mutation was identified in the gene of rhodopsin in 1989. The mode of inheritance is

particular of each familiar history, and encompasses autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked.

Drosophila. The first degenerative mutants described in *Drosophila* affected the retina causing degeneration of photoreceptors. Despite the differences between phototransduction pathways in *Drosophila* and humans, the function of rhodopsin/opsin pigment are conserved (6).

It has been estimated that more than 25% of all cases of RP are due to dominant mutations in the opsin protein. Interestingly, it has been shown that four of the reported mutations in opsin in humans related to RP, can also be found in dominant retinal degeneration in *Drosophila* (41).

One form of RP called Leber congenital amaurosis (LCA) is caused by loss-of-function mutations in the RP12 gene. The RP12 gene encodes CRB1, one of the three human homologues of the *Drosophila* Crumbs protein (42). Crumbs is a transmembrane protein involved in the assembly of adherens junctions in polarized cells and has a special role in the support of the rhabdomeric structure in adult photoreceptors because loss-of-function mutants show a collapse of rhabdomeres. CRB1 appears to have a similar structural function in the outer segment of vertebrates cone cells (43).

Some *Drosophila* neurodegenerative mutants that are associated with neuronal ion channels. Loss-of-function mutants in TRP (transient receptor potential) channel show only mild and slow degeneration of photoreceptors, and constitutive active mutant form causes rapid and severe retinal degeneration (44). This phenotype can be suppressed by overexpression of Ca_v1X, a Na⁺/Ca²⁺ exchanger, strongly suggesting that Ca²⁺ overload, a well-known consequence of excitotoxicity, is responsible for the photoreceptor degeneration in TRP mutants (45). The role of TRP channels in vertebrates in neurodegenerative diseases remains to be determined.

C. elegans. As part of the genome sequencing project, a gene termed CE δ was identified in *C. elegans*. The gene product was shown to be very similar in sequence to PDE δ , and in part, at the C-terminal domain of the human retinal gene 4 (HRG4). The protein expressed in this nematode has practically an identical biological activity as the protein expressed in mammalian photoreceptors (46).

Tubby and tubby like proteins (TULP) are proteins with unknown functions. TULPs are implicated in the obesity, sensoneuronal degeneration, and development. Mutation of particular TULPs has been shown to be responsible for obesity and retinitis pigmentosa. In the worm, the conserved exon 2 of gene *tub* was localized, their shown a similarity with homolog gene in human, mouse, rat, dog and *Drosophila* (47).

Duchenne and becker muscular dystrophies

Both neurological diseases are allelic forms of progressive myopathies caused by the disruption of the gene dystrophin (48). These diseases affect approximately 1 in 3500 male births (49).

Dystrophin is a protein (3685 amino acid) found in skeletal, cardiac muscles and in the nervous system. Biochemical studies have revealed that dystrophin is a component of the transmembranal complex of proteins called DAPs (dystrophin-associated proteins) (48). Dystrophin is located in the sarcolemma, bound by its amino-terminal to actin filaments, and by its carboxy-terminal to glycoproteins as dystroglycan, sarcoglycan, and others dystrobrevin and syntrophin proteins (50).

Although the *C. elegans* is remotely related to mammals, the striated muscles shown equivalence to vertebrate muscles. The *C. elegans* genome contains a dystrophin homologue (*dys-1*) (49). Mutants of the *dys-1* gene display several locomotor phenotypes (hyperactivity, bending of the head, hypercontraction), but have apparently normal muscles due to the short time lifespan in the worm, in contrast with to mammals that the phenotype take weeks (49). The motility defects are probably the result of increased cholinergic activity (50).

The calcium channel activity is a critical factor in the progression of muscle degeneration related to dystrophin (51). Recently *SLO-1* channel, a protein with a conductance to K⁺ modulated by calcium and voltage was found to be involved in the disytophy disease. In *C. elegans* the absence of *dys-1* results in a down-regulation of *slo-1*. This down-regulation cause a calcium influx and massive contraction (52).

Other invertebrates used as experimental models for neurodegenerative diseases

C. elegans and *Drosophila* are the invertebrates most commonly used as experimental models to study neurodegenerative diseases. Nevertheless, there are other non-vertebrate organisms that are already playing a similar role, with the perspective to become important experimental subjects in the next years. The final goal is and will be to keep us learning the cellular processes that underlie the molecular abnormalities present in this type of pathologies.

Although the cephalopod squid (*Loligo peali*) as an organism is not yet an accepted model for neurodegeneration, its giant axon has been used to reproduce certain circumstances characteristic of degenerative disorders. Under appropriate experimental conditions, the squid axon may be induced to assemble tangles of neurofilaments according to their phosphorylation status. This type of aggregates affecting cytoskeletal proteins have been observed clearly in Alzheimer disease, but also in amyotrophic lateral sclerosis and

Parkinson disease. The necessity to understand better the cellular formation and destruction of these tangles will be important to consider a clinical planning in the future (53).

Another aspect of degenerative diseases that could be studied with good perspectives in the squid axoplasm is the regulation of the fast axonal transport that has been shown to be defective in polyQ disorders such as spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) and Huntington disease (HD) (54-56).

The squid has also been useful to understand regulatory pathways for kinesin-driven motility in axons which are essential for fast anterograde transport for a variety of membrane-bound organelles. During this cellular event, many different proteins are packaged and delivered to specific subdomains along the axons. This activity needs the coordinated enzymatic activities of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), protein phosphatase 1 (PP1) and glycogen synthase kinase-3 (GSK3). Defects in protein transport may play critical roles in many neurodegenerative conditions including Alzheimer disease. The role of GSK3 in regulating kinesin-based motility suggested that axonal transport might be a vulnerable step in Alzheimer's pathogenesis. As CDK5 and GSK activity can be regulated via multiple pathways, different pathogenic mechanism might converge to alter kinesin-based transport of organelles (57).

Aplysia, a gasteropod, has been used to study neurodegeneration caused by the formation of inclusions of cofilin-actin rod which are part of the Hirano bodies seen in brains of patients with Alzheimer disease. *Aplysia* may become a useful experimental model because it is easily manipulated and its nervous system is very well known. In addition, the synaptic contact between neurons are very well suited for experimental manipulation (58).

Apis mellifera, the honey bee, is an established model for studies of social interaction, sensory processing, learning and memory (59, 60), being all of them altered in diseases such as Alzheimer, Huntington and Parkinson diseases. Recently, studies made with this insect regarding aging regulation by pro-oxidative reactions were reported. Neuronal oxidative damage typically increases with age and is also a hallmark in several neurodegenerative diseases. Bees are good experimental model to study oxidative stress because they exhibit a flexible pattern of longevity and have a stress resistant stage phenotype (*diutinus*, winter bee) that enables them to survive for 8-10 months.

Rotifers are also very good experimental model for aging studies, and although any study directly related with their nervous system has been reported, some experiments with neuroprotective agents have been made. Rotifers can be used in large-scale analysis because their manipulation is not expensive and their reproduction time is short. Since rotifers are aquatic organisms, single-housed organisms can be exposed to exactly the same toxin and drug regime in a controlled environment, a great advantage over animals

in which the substance must be administered in the food or administered by other means (i.e., by injection) (61).

Glial cells constitute the major component of the central nervous system in many invertebrates, and *Planorbium corneus*, *Mytilus edulis* (both molluscs) and *Leucophaea maderae* (insect) are not the exception. These invertebrates possess glial cells closely related to immunoreactive hemocytes, which correspond to the vertebrate microglia (62-64). Some studies in *P. coreus* have been made regarding signalling molecules exchanged between neurons and microglia following neuronal damage (65).

Neurons from the lepidopteran *Lymantria dispar* (a lepidopteran) has served as an experimental system for Parkinson disease since the insect makes use of dopamine and related catecholamines in a variety of processes including cuticular sclerotization and immunological reactions. Because its potential use as an experimental tool, several research groups are interested in understanding how the insect cells metabolize exogenous salutaridinol, an intraneuronal dopamine-derived tetrahydroisoquinoline that induces apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma cells (66).

Concluding remarks

Neurodegenerative diseases are already a public health problem of large proportions, and their incidence will continue growing in the next years. At present, understanding of the molecular mechanisms associated to these illnesses is a top priority in the biomedical research. The use of invertebrate organisms as experimental models are among the more promising strategies to reach that goal.

References

1. Marsh, J.L., and Thompson, L.M. 2004, *BioEssays*, 26, 485.
2. Karpuj, M.V., Becher, M.W., Springer, J.E., Chabas, D., Youssef, S., Pedotti, R., Mitchell, D., and Steinman, L. 2002, *Nat. Med.*, 8, 143.
3. Dedeoglu, A., Kubilus, J.K., Jeitner, T.M., Matson, S.A., Bogdanov, M., Kowall, N.W., Matson, W.R., Cooper, A.J., Ratan, R.R., and Beal, M.F. 2002, *J. Neurosci.*, 22, 8942.
4. Lesort, M., Lee, M., Tucholski, J. and Johnson, G.V. 2002, *J. Biol. Chem.*, 278, 3825.
5. Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Polman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., Kurokawa, R., Housman, D.E., Jackson, G.R., Marsh, J.L., and Thompson, L.M. 2001, *Nature*, 413, 739.
6. Krestschmar, D. 2005, *Invert. Neurosci.*, 5, 97.
7. Haddad, G.G., Sun, Y., Wyman, R.J., and Xu, T. 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10809.
8. Palladino, M.J., Bower, J.E., Kreber, R., and Ganetzky, B. 2003, *J. Neurosci.*, 23, 1276.

9. Chiueh, P.C., Salt, I.P., Davies, S.P., Hardie, D.G., and Carling, D. 2003, *Biochem. J.*, 346, 659.
10. Chen, L., Rio, D.C., Haddad, G.G., and Ma, E. 2004, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 131, 93.
11. Jackson, G.R., Wiedau-Pazos, M., Sang, T.K., Wagle, N., Brown, C.A., Massachi, S., and Geschwind, D.H. 2002, *Neuron*, 34, 509.
12. Doerflinger, H., Benton, R., Shulman, J.M., and St Johnston, D. 2003, *Development*, 130, 3965.
13. Bettencourt da Cruz, A., Schwarzel, M., Schulze, S., Niyiyati, M., Heisenberg, M., and Kretschmar, D. 2005, *Mol. Biol. Cell.*, 16, 2433.
14. Klein, J. 2000, *J. Neural. Transm.*, 107, 1027.
15. Koudinova, N.V., Koudinov, A.R., and Yavin, E. 2000, *Neurochem. Res.*, 25, 653.
16. Muhlig-Versen, M., da Cruz, A. B., Tschape, J.A., Moser, M., Buttner, R., Athenstaedt, K., Glynn, P., and Kretschmar, D. 2005, *J. Neurosci.*, 25, 2865.
17. Torroja, L., Packard, M., Gorczyca, M., White, K., and Budnik, V. 1999, *J. Neurosci.*, 19, 7793.
18. Link, C. D. 2001. *Mech. Ageing Dev.*, 122, 1639-49.
19. Fay, D. S., Fluet, A., Johnson, C. J., and Link, C. D. 1998. *J. Neurochem.*, 71, 1616-25.
20. Butterfield, D. A. 1997. *Chem. Res. Toxicol.*, 10, 495-506.
21. Link, C. D., Taft, A., Kapulkin, V., Duke, K., Kim, S., Fei, Q., Wood, D. E., and Sahagan, B. G. 2003. *Neurobiol. Aging.*, 24, 397-413.
22. Driscoll, M., and Gerstbrein, B. 2003. *Nat. Rev. Genet.*, 4, 181-94.
23. Tschape, J.A., Hammerschmied, C., Muhlig-Versen, M., Athenstaedt, K., Daum, G., and Kretschmar, D. 2002, *EMBO J.*, 21, 6367.
24. Chen, L., and Feany, M. B. 2005, *Nature Neurosci.*, 8, 657.
25. Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.M., and Chung, J. 2006, *Nature*, 441, 1058.
26. Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H. Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A., and Guo, M. 2006, *Nature*, 441, 1162.
27. Whitworth, A., Theodore, D.A., Greene, J.C., Benes, H., Wes, P.D., and Pallanck, L.J. 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 8024.
28. Singh, S.P., Coronella, J.A., Benes, H., Cochrane, B.J., and Zimniak, P. 2001, *Eur. J. Biochem.*, 268, 2912.
29. Kuwahara, T., Koyama, A., Gengyo-Ando, K., Masuda, M., Kowa, H., Tsunoda, M., Mitani, S., and Iwatsubo, T. 2006. *J. Biol. Chem.*, 281, 334-40.
30. Springer, W., Hoppe, T., Schmidt, E., and Baumeister, R. 2005. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 3407-23.
31. Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. 1995, *Ann. Neurol.*, 38, 73.
32. Rival, T., Soustelle, L., Strambi, C., Besson, M.T., Iche, M., and Birman, S. 2004, *Curr. Biol.*, 14, 599.
33. Phillips, J.P., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Boulianne, G.L., Kirby, K., and Hilliker, A.J. 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8574.
34. Oeda, T., Shimohama, S., Kitagawa, N., Kohno, R., Imura, T., Shibasaki, H., and Ishii, N. 2001. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 2013-23.

35. Merry, D.E. 2005, *NeuroRx: J. Amer. Soc. Exp. Neurother.*, 2, 471.
36. Kammermeier, L., Spring, J., Stierwald, M., Burgunder, J.M., and Reichert, H. 2003, *Dev. Genes Evol.* 213, 412.
37. Trotta, N., Orso, G., Rossetto, M.G., Daga, A., and Broadie, K. 2004, *Curr. Biol.*, 14, 1135.
38. Orso, G., Martinuzzi, A., Rossetto, M.G., Sartori, M.F., and Daga, A. 2005, *J. Clin. Invest.*, 115, 3026.
39. Min, K.T., and Benzer, S. 1999, *Curr. Biol.*, 7, 885.
40. Hardie, D.G. 2004, *J. Cell. Sci.*, 117, 5479.
41. Colley, N.J., Cassill, J.A., Baker, E.K., and Zuker, C.S. 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3070.
42. den Hollander, A.I., Heckenlively, J.R., van den Born, L.I., de Kok, Y.J., van der Velde-Visser, S.D., Kellner, U., Jurklies, B., van Schooneveld, M.J., Blankenagel, A., Rohrschneider, K., Wissinger, B., Cruysber, J.R., Deutman, A.F., Brunner, H.G., Apfelstedt-Stylla, E., Hoyng, C.B., and Cremers, F.P. 2001, *Am. J. Hum. Genet.*, 69, 198.
43. Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C.J., Ready, D.F., and Tepass, U. 2002, *Nature*, 416, 143.
44. Minke, B., and Agam, K. 2003, *Cell Calcium*, 33, 395.
45. Wang, T., Xu, H., Oberwinkler, J., Gu, Y., Hardie, R.C., and Montell, C. 2005, *Neuron*, 45, 367.
46. Li, N., and Baehr, W. 1998. *F. E. B. S. Lett.*, 440, 454-7.
47. He, W., Ikeda, S., Bronson, R. T., Yan, G., Nishina, P. M., North, M. A., and Naggert, J. K. 2000. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 81, 109-17.
48. Gieseler, K., Bessou, C., and Segalat, L. 1999. *Neurogenetics*, 2, 87-90.
49. Bessou, C., Giugia, J. B., Franks, C. J., Holden-Dye, L., and Segalat, L. 1998. *Neurogenetics*, 2, 61-72.
50. Chamberlain, J. S., and Benian, G. M. 2000. *Curr. Biol.*, 10, R795-7.
51. Mariol, M. C., and Segalat, L. 2001. *Curr. Biol.*, 11, 1691-4.
52. Carre-Pierrat, M., Grisoni, K., Gieseler, K., Mariol, M. C., Martin, E., Jospin, M., Allard, B., and Segalat, L. 2006. *J. Mol. Biol.*, 358, 387-95.
53. Grant, P., Zheng, Y., and Pant, H.C. 2006, *Biol. Bull.*, 210, 318.
54. Morfini, G., Pigino, G., Szebenyi, G., You, Y., Pollema, S., and Brady, S.T. 2006, *Nat. Neurosci.* 9, 907.
55. Szebenyi, G., Morfini, G.A., Babcock, A., Gould, M., Selkoe, K., Stenoien, D.L., Young, M., Faber, P.W., MacDonald, M.E., McPhaul, M.J., and Brady S.T. 2003, *Neuron*, 40, 41.
56. Feany, M.B. and La Spada, A.R. 2003, *Neuron*, 40, 1.
57. Morfini, G., Szebenyi, G., Brown, H., Pant, H.C., Pigino, G., DeBoer, S., Beffert, U., and Brady, S.T. 2004, *EMBO J.*, 23, 2235.
58. Jang, D.H., Han, J.H., Lee, S.H., Lee, Y.S., Park, H., Lee, S.H., Kim, H., and Kaang, B.K. 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 102, 16072.
59. Seehuus, S.C., Krekling, T., and Amdam, G.V. 2006, *Exp. Gerontol.*, 41, 1117.
60. Jones, A.K., Raymond-Delpech, V., Thany, S.H., Gauthier, M., and Sattelle, D.B. 2006, *Genome Res.*, 16, 1422.

61. Poeggeler, B., Durand, G., Polidori, A., Pappolla, M.A., Vega-Naredo, I., Coto-Montes, A., Boker, J., Hardeland, R., and Pucci, B. 2005, *J. Neurochem.*, 95, 962.
62. Sonetti, D., Ottaviani, E., Bianchi, F., Rodríguez, M., Stefano, M.L., Scharrer, B., and Stefano, G.B. 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91, 9180.
63. Peruzzi, E., and Sonetti, D. 2004, *Acta Biol. Hung.*, 55, 287.
64. Peruzzi, E., Fontana, G., and Sonetti, D. 2004, *Brain Res.*, 1005, 9.
65. Sonetti, D., and Peruzzi E. 2004, *Acta Biol. Hung.*, 55, 273.
66. Ottaviani, E., Nappi, A.J., and Vass, E. 2002, *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 49, 1.

MUERTE APOPTÓTICA EN *Drosophila melanogaster* Y EN VERTEBRADOS SUPERIORES*

Olivia Vázquez Martínez, Verónica Morales Tlalpan y Mauricio Díaz Muñoz

RESUMEN

La apoptosis o muerte celular genéticamente programada es un mecanismo crucial durante el desarrollo de los organismos, por el cual se eliminan células dañadas, infectadas o sin ningún destino en el organismo adulto. La falta de coordinación en el proceso apoptótico se asocia a la aparición de padecimientos como el cáncer, insuficiencia cardíaca, enfermedades autoinmunes e infertilidad. La apoptosis es un fenómeno evolutivamente conservado a lo largo de la escala filogenética. Estudios experimentales con organismos genéticamente menos complejos que el mamífero, como la *Drosophila*, han ayudado a dilucidar una gran parte de la vía apoptótica. En el presente trabajo se ofrece una panorámica de la importancia biológica de este proceso con base en la experimentación realizada en otros organismos experimentalmente más accesibles.

PALABRAS CLAVE: Muerte celular genéticamente programada, *Drosophila melanogaster*, mamíferos.

ABSTRACT

Programmed cell death or apoptosis is a crucial mechanism to eliminate damaged or infected cells, as well as cells that disappear during the embryonic development. Failure in the coordination of this process results in pathological consequences such as cancer, cardiac insufficiency, autoimmune diseases and infertility. Apoptosis is a phenomenon conserved along the evolutionary progression. The experimental studies in genetically less complex organism than mammals, have given insights into the molecules and events related to apoptotic pathways. We offer an overview about the biological importance of apoptosis, and point out that the most relevant information about this process is based in basic research done in more accessible organisms.

KEY WORDS: Genetically programmed cell death, *Drosophila melanogaster*, mammals.

GENERALIDADES DEL PROCESO APOPTÓTICO

La apoptosis es un fenómeno altamente complejo que se considera como una forma de muerte celular programada y que ocurre durante el desarrollo embrionario, en ejemplos de procesos homeostáticos en el organismo maduro, así como en ciertas patologías.

Apoptosis es un término derivado del griego y está conformado por 2 vocablos: apo - proveniente de y ptosis - que cae, por lo que de ma-

nera genérica hace referencia al evento de caída de hojas y pétalos que presentan plantas y flores. Es un serie de eventos que engloba mecanismos de regulación muy eficientes y genéticamente conservados a lo largo de la escala filogenética. Es crucial durante el desarrollo embrionario eliminando células dañadas, infectadas o destinadas a desaparecer durante la morfogénesis, así como para mantener la homeostasis celular en los tejidos adultos (1). La apoptosis se

considera como un mecanismo de control homeostático/reostático que aunque implica la destrucción de la integridad celular, es necesario para el funcionamiento y conformación correctos de tejidos y órganos. Los cambios homeostáticos se dan alrededor de un punto de equilibrio y amortiguan las variaciones, mientras que los cambios reostáticos implican cambios en el punto de equilibrio y favorecen nuevas formas de control.

Los tejidos durante el desarrollo ontogénico están constantemente

*Recibido: 15 de agosto de 2006 Aceptado: 13 de marzo de 2007

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular. Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México. C. P. 76230. Tel y fax: (442) 238-1035 Correo E: vazquez@inb.unam.mx

proliferando y en recambio, por lo que el tamaño y la forma del órgano es el resultado de un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular (2). Algunas características comunes a la progresión del ciclo celular y al proceso apoptótico son la pérdida de adhesión, la disminución del tamaño celular y la reorganización nuclear.

La muerte celular por apoptosis es un mecanismo conservado evolutivamente y se ha reconocido principalmente en una gran gama de organismos, desde levaduras hasta mamíferos. Incluso entidades como los virus, tienen mecanismos para adaptarse y contender con este fenómeno durante su ciclo de infección en una célula hospedera. Por ejemplo, ante un ataque viral la célula afectada desencadena procesos de defensa, que incluye la activación de la apoptosis, para limitar la replicación y la expansión viral. Sin embargo, los virus cuentan con recursos fascinantes y estrategias efectivas para evadir la respuesta inmune y la iniciación del proceso apoptótico (3).

En humanos, alteraciones en la regulación de la apoptosis se asocia a enfermedades como: cáncer, padecimientos del corazón, inmunodeficiencias, desórdenes que cursan con neurodegeneración, deficiencias hematopoyéticas e infertilidad (4, 5).

ADAPTACIONES CELULARES A LA APOPTOSIS

Después de recibir la señal de inicio de muerte o al perder el estímulo de supervivencia, se activa una maquinaria molecular que desencadena la muerte apoptótica. Durante el proceso se presentan cambios bioquímicos y morfológicos en casi todos los organelos subcelulares. Las células apoptóticas tienen una morfología característica: aparición de protube-

rancias en la membrana, reducción del tamaño celular, condensación nuclear y fragmentación del DNA.

Por ejemplo, en la membrana plasmática se expresan epítopes específicos que se asocian al reconocimiento y la posterior remoción del remanente celular por fagocitos. Uno de estos epítopes es el lípido de membrana fosfatidilserina, que al ser translocado de la monocapa interna a la externa de la membrana plasmática, ha sido empleado como indicador de que la célula se encuentra en apoptosis activa (6). Existen receptores de muerte localizados en la superficie celular, que se caracterizan por tener un dominio extracelular rico en cisteínas y que al unir a su ligando específico promueven la muerte celular programada. Estos receptores pertenecen a la familia de proteínas de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF).

Un evento clave de la apoptosis ocurre en el citoplasma, y es la activación de proteasas especializadas llamadas caspasas, las cuales son iniciadoras y efectoras responsables de desencadenar muchos de los mecanismos bioquímicos y metabólicos que caracterizan el proceso (7). Las caspasas (en inglés "caspases: cysteinyl aspartate-specific proteases") son cistein-proteasas que reconocen y cortan a sus sustratos en sitios contiguos a residuos de ácido aspártico. Normalmente se expresan como zimógenos inactivos (pro-caspasas), y se componen de un pro-dominio de longitud variable, seguido por una región larga y una corta donde se encuentran los sitios de reconocimiento al sustrato y el sitio catalítico. Usualmente las caspasas se han dividido en dos tipos: las caspasas iniciadoras (tipo I) y las caspasas ejecutoras (tipo II), según el papel secuencial que desempeñan en el proceso apoptótico (8, 9).

De manera notable, la mitocondria destaca como un factor determinante durante la apoptosis. Una forma clásica de apoptosis conlleva la liberación desde la mitocondria del citocromo C y otros factores inductores y que eventualmente activan las enzimas caspasas. Otras proteínas mitocondriales que pertenecen a la familia Bcl2 (del inglés "B-cell lymphoma 2"), actúan como sensores importantes de señales extra e intracelulares y regulan positiva y negativamente el proceso apoptótico. Otros factores mitocondriales que influyen en la apoptosis incluyen aspectos de mal funcionamiento del organelo, como alteraciones en la fosforilación oxidativa, el potencial de membrana y la capacidad de amortiguar los niveles del Ca^{2+} citoplásmico. Las alteraciones mitocondriales relacionadas a la apoptosis, usualmente se asocian con alteraciones en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial (7).

La activación de las caspasas requiere de la interacción con el citocromo C liberado de la mitocondria, y se lleva a cabo en un complejo macromolecular conocido como apoptosoma. En un principio fue descrito en el nematodo *C. elegans*, pero ha sido reconocido en todos los metazoarios hasta ahora estudiados. El apoptosoma presenta una estructura tetramérica constituida por proteínas conocidas como CED-4 (del inglés "cell death abnormality") en *C. elegans*, Apaf-1 (del inglés apoptosis activating factor-1) en mamíferos y ARK (del inglés apoptosis related killer) en *Drosophila melanogaster*.

También se presentan cambios distintivos en el núcleo celular durante la apoptosis. Al microscopio electrónico, en la fase temprana hay condensación de la cromatina, para

formar masas uniformemente densas; el nucléolo presenta disposición periférica de la cromatina con formación de gránulos osmiofílicos hacia el centro del núcleo. Eventualmente la cromatina se compacta en grado extremo y el nucléolo termina por desintegrarse.

Además de los elementos ya mencionados, existen otros reguladores del proceso apoptótico entre los que se encuentran: aumentos de Ca^{2+} citosólico, acumulación de cAMP, activación de la proteína cinasa C, activación de cinasas de residuos de tirosina, la producción de ceramidas, la intervención del retículo endoplásmico a través de la actividad de chaperonas conocidas como reticulinas y otros más (7).

Las células apoptóticas son ingeridas y digeridas por células vecinas o macrófagos, sin desencadenar ninguna respuesta inflamatoria. Es esta desaparición y procesamiento silenciosos de los cuerpos apoptóticos generados lo que hace que la apoptosis sea considerada por muchos autores como un tipo de muerte celular fisiológica.

MODELOS EXPERIMENTALES

Muchos grupos de investigación se han esforzado para llegar a entender el proceso apoptótico y han recurrido a modelos experimentales menos complejos que el mamífero para poder dilucidar los pasos de este complejo fenómeno.

Ya que se trata de un proceso evolutivamente conservado, organismos como el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* han sido útiles para estudiar este fenómeno. Gracias a estos organismos ha sido posible identificar numerosos factores genéticos, adaptadores, reguladores, receptores y enzimas implicados en la iniciación, ejecución y

regulación del proceso apoptótico. Por el gran número y la relevancia de las aportaciones realizadas al campo de la apoptosis, en esta sección se mencionarán exclusivamente los hallazgos principales empleando a *D. melanogaster* como sistema experimental (2).

APOPTOSIS EN *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, como modelo experimental, provee un sistema de complejidad intermedia entre el nemátodo *C. elegans* y el mamífero para estudiar con un enfoque multidisciplinario los mecanismos de la muerte celular, ya que presenta componentes y vías similares al mamífero pero con menos redundancia.

La muerte celular es importante durante el desarrollo embrionario y la metamorfosis en la *Drosophila*. Estudios moleculares, han permitido identificar algunos genes involucrados en la muerte celular apoptótica, como *reaper*, *head involution defective (hid)* y *grim*.

El gen *reaper* se expresa en células que están destinadas a morir y su patrón de expresión corresponde a las células que con su desaparición depuran el desarrollo embrionario. Este gen codifica para una proteína que se asemeja a las regiones intracelulares de los receptores a FAS y del factor de necrosis tumoral y que es esencial para la actividad promotora de muerte. Los genes *hid* y *grim* modulan la actividad del gen *reaper* durante la muerte apoptótica en la *Drosophila* (Dr. Michael Wride and Dr. Leon Browder).

En el genoma de *D. melanogaster*, también se han reconocido siete genes que codifican para enzimas con actividad de caspasa: *dcp-1*, *dredd*, *drice*, *dronc*, *decay*, *strica* y *damm*. En estudios realizados en

las regiones pro-dominio de estas enzimas, se ha logrado identificar a las caspasas iniciadoras *Dronc*, *Dredd* y *Strica*, y a las efectoras, *drICE*, *Dcp-1*, *Decay* y *Damm* (8, 10).

En este díptero, las proteínas *Dronc* (*Drosophila* "Nedd-2 like caspase") y *Dredd* ("Nedd2 like protein") son caspasas activadoras. *Dronc* contiene motivos CARD ("Caspase activation and recruitment domain") en la región pro-dominio, y sus contrapartes en mamíferos son las caspasas 2 y 9. Mutantes de *Dredd* muestran defectos en la apoptosis. Por otra parte *Dredd* es estructuralmente similar a la caspasa 8 de mamíferos. Algunas evidencias experimentales indican que *Dredd* está también relacionada con la respuesta inmune innata. *Strica* es otra caspasa iniciadora, contiene un pro-dominio rico en residuos de serina y treonina y se ha señalado que no posee una contraparte en mamíferos, ya que no muestra similitud con el pro-dominio de las caspasas de eucariontes superiores (8, 10).

Las caspasas *drICE*, *Dcp-1* ("Death caspase"), *Decay* y *Damm* (*Drosophila* "activity monitor") no contienen pro-dominios iniciadores, y por esta razón se les ha reconocido como caspasas efectoras. Se ha demostrado que la función de estas proteínas es esencial en determinados tipos de apoptosis. La caspasa *Dcp-1* induce apoptosis cuando los nutrientes disminuyen durante los estadios tempranos del desarrollo, mientras que la ausencia de *DrICE* inhibe la apoptosis (8, 10).

La contraparte de APAF1 en la *Drosophila* se denomina *Dark* (*Drosophila* "Apaf-1 related killer"). *Dark* contiene en su región amino terminal un dominio CARD y varios dominios WD-40 (del inglés "winged domain"). La activación de *Dark* también involucra la liberación

del citocromo C de la mitocondria. Dark puede ser inmunoprecipitado con el citocromo C y su asociación depende de los dominios WD-40. Se ha demostrado que este complejo de la *D. melanogaster* puede activar a las caspasas efectoras en lisados de células de vertebrados (8).

DIAP1 (*Drosophila* "inhibitor of apoptosis protein I") es un miembro de la familia de IAPS ("inhibitors of apoptosis proteins") en la *Drosophila*. Se ha demostrado que la ausencia de esta proteína promueve una entrada rápida a la ruta apoptótica en diversos tejidos. En moscas las proteínas pro-apoptóticas Reaper (Rpr), Grim, Hid y Sickle actúan como inhibidores de la actividad de IAPS, y se ha publicado evidencia experimental de que la ausencia de Rpr, Grim e Hid evita la muerte por apoptosis en varios tejidos (8).

En la figura 1 se ilustra un esquema comparativo entre los diversos componentes moleculares que forman y regulan al apoptosoma en células humanas y en *Drosophila*. Es evidente que la estructura general de este complejo macromolecular se ha conservado a lo largo del proceso evolutivo que separa estas dos especies.

Algunos ejemplos de procesos en el desarrollo y fenómenos fisiológicos en los que la apoptosis juega un papel central en la mosca de la fruta se enuncian a continuación.

Durante el desarrollo embrionario de la *Drosophila*, la muerte celular apoptótica elimina un gran número de células, especialmente aquellas que no completan exitosamente su programa de desarrollo. La selección de las células que deben morir está influenciada por diversas señales, entre las cuales se incluyen hormonas, factores de crecimiento y estímulos tróficos (11, 12).

Durante el desarrollo de *Drosophila*, la ecdisona (20-hidroxiecdisona), que

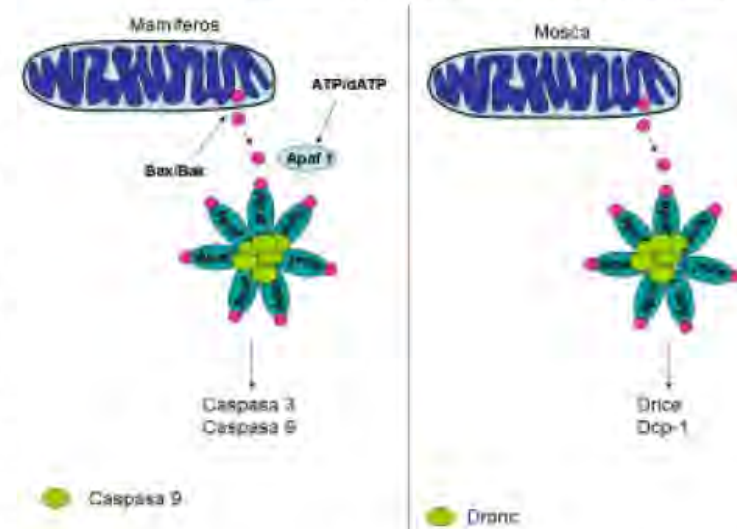


Figura 1. Modelos comparativos de la regulación del apoptosoma en mamíferos y en *D. melanogaster*. Ambas rutas presentan un alto grado de similitud. La formación del apoptosoma inicia cuando el citocromo C es liberado de la mitocondria en mamíferos. Sin embargo, en *D. melanogaster*, se especula la existencia de esta proteína o de algún factor relacionado. APAF-Dark son las proteínas que unen al citocromo C y junto con caspasa 9 Drice forman el apoptosoma. Posteriormente, se activan las caspasas efectoras: caspasa 3 y 7 Drice y Dcp-1. En ambos procesos XIAP/DIAP inhiben la apoptosis. Otras proteínas específicas (Smac/Diabolo y Rpr, Hid y Grim) promueven la auto-ubiquitación de XIAP/DIAP provocando la formación del apoptosoma. Modelo modificado a partir de las referencias 8, 9 y 10.

es una hormona que regula la muda, participa en la inducción de muerte celular en diversos tejidos. En la metamorfosis temprana esta hormona dirige la muerte de ciertas células, a concentraciones elevadas, pero en estadios posteriores, es capaz de inducir apoptosis en concentraciones menores (11).

Durante la embriogénesis de la mosca, los primeros eventos de muerte celular programada se observan en la región cefálica dorsal durante el estadio 11, cuando la banda germinal empieza a retraerse. A medida que la banda germinal se encoge (etapa 12 y 13), la muerte celular empieza a extenderse ampliamente a lo largo del resto del embrión, particularmente en las regiones ventrolateral y alrededor de los lóbulos procefálicos.

En la etapa 14, durante el cerrado dorsal, una zona de células dege-

nerantes se organizan en forma de anillo alrededor del tejido que se está ocluyendo y hacia la etapa 16, aparece una gran cantidad de eventos apoptóticos a lo largo del sistema nervioso (13).

Se ha acumulado una gran cantidad de información en relación a la muerte apoptótica en tejidos pertenecientes al sistema sensorial de la *Drosophila*. Por ejemplo, las células que componen la antena de este insecto provienen de líneas gliogénica y no gliogénica y estudios diversos han sugerido que la diferencia en la presencia de estos linajes celulares en la antena del adulto, son resultado de este tipo de muerte celular programada. Los genes necesarios para la iniciación de la apoptosis en la glia y en otros tipos celulares afines son reaper (*rpr*), grim y head involution defective (*hid*). Como ya se mencionó anteriormente, las

proteínas codificadas por estos genes actúan en conjunto al formar un complejo e inactivar a DIAP1. Adicionalmente a estas proteínas, para que el proceso se lleve a cabo se necesita de factores tróficos emitidos por los axones contiguos a las células gliales que sufrirán la apoptosis (10).

La muerte celular apoptótica en la mosca adulta, también está implicada en conferir la arquitectura más adecuada a estructuras bien diferenciadas y que requieren de un patrón morfológico preciso para ser exitosas en su función. Muchas estructuras en la mosca adulta derivan de los llamados discos imaginales. Estos son células embrionarias que están destinadas a proliferar y crecer en la vida larvaria sin diferenciarse, pero que dan origen a estructuras adultas desde la pupa.

Durante la formación del ala aparecen células apoptóticas en racimos de 3 a 4 células en el disco imaginal correspondiente. Estos racimos de células también se encuentran en los halteros (estructuras balanceadoras situadas a los lados del tórax) y en los discos que dan origen a las patas. Las células apoptóticas se mantienen en el epitelio de 2-4 horas, antes de ser digeridas por células de la hemolinfa (14).

Otro ejemplo interesante de muerte apoptótica es la formación de la estructura del ojo, la cual depende de un número ya definido de células con un arreglo espacial preciso.

El ojo de la mosca de la fruta, está compuesto de ~750 unidades oculares llamadas omatidias, arregladas en un patrón hexagonal exacto. Antes de la metamorfosis de la larva hacia el adulto, las células del ojo de la mosca tienen ya destinos especificados. Aproximadamente, una tercera parte de estas células, son

removidas por apoptosis en un proceso que constituye el paso final que dará arreglo preciso al ojo. Este proceso involucra una señalización célula-célula, y una vez activado es similar a lo que ocurre en tejidos de mamíferos.

Durante la vida larvaria, el disco imaginal del ojo cambia de ser una capa epitelial no diferenciada a un neuroepitelio altamente organizado. Las primeras células que se transforman corresponden al grupo de fotorreceptores. Durante la etapa larvaria tardía y la etapa temprana de pupa, los fotorreceptores se retraen por debajo de la superficie apical del ojo y reclutan al siguiente tipo celular, que son las 4 células cono. Cada célula cono recluta 2 células pigmentarias primarias. Las células restantes formarán la superficie inter-omatidia de las células pigmentarias secundarias, terciarias y las quetas mecanosensoras. Este sistema celular en conjunto delimita la vecindad de las omatidias y permite el patrón hexagonal exacto del ojo. Las células pigmentarias secundarias y terciarias que están en exceso, sufren apoptosis en un proceso altamente regulado. Si este exceso de células no es eliminado, por alguna mutación o tratamiento experimental, el ojo se desarrolla rugoso y mal alineado, lo que afecta su buen funcionamiento.

La especificación de los tipos celulares (fotorreceptores, conos, células pigmentarias primarias) se completa a las 20 h después de la formación de la pupa. A las 22 h estas células se reorganizan, y a las 24 h empieza la muerte celular por apoptosis (15).

El gen *pineapple* ("*pie*") del ojo de la mosca codifica para una proteína nuclear que interviene en el procesamiento del RNA mensajero y que es requerida para la supervi-

vencia celular. A diferencia de otros genes, la mutación del gen *pie* no es completamente inviable, pero predispone a las células en el disco imaginal a presentar una tasa alta de apoptosis. Por lo tanto la omatidia, que es la unidad ocular en la mosca, inicia su desarrollo de forma normal, pero llega a ser muy defectuosa en su conformación final. Los tipos celulares que se forman más tardíamente en el desarrollo del ojo, como los conos, las células pigmentarias y algunos fotorreceptores, usualmente están ausentes en estos mutantes. Los individuos adultos con la mutación en el gen *pie* tienen ojos rugosos e irregulares, pero aún no se saben con certeza los mecanismos moleculares o bioquímicos responsables de estas alteraciones. Si la muerte celular ocurre en tiempos tardíos a los establecidos, queda sólo un pequeño remanente de células precursoras y la pérdida de células en esta etapa no puede ser reemplazada por divisiones celulares compensatorias.

APOPTOSIS EN CÉLULAS HUMANAS

El fenómeno de muerte celular apoptótica ha sido estudiado a profundidad en células humanas. En esencia, la apoptosis en células de mamífero es similar a la descrita con anterioridad en el modelo de *Drosophila*. Sin embargo, se han reconocido que los 2 sistemas se diferencian en algunos detalles. A continuación se mencionan las principales diferencias.

Se ha reportado que las caspasas iniciadoras que contienen pro-dominios reguladores, se encargan de recibir las señales pro-apoptóticas que llegan desde los receptores extracelulares como Fas, que es un receptor con actividad de cinasa de residuos de tirosina o de los compo-

nentes mitocondriales como el citocromo C. En el pro-dominio de algunas caspasas se localiza el motivo CARD, mientras que en otras se encuentra el motivo DED ("Death effector domain"). Estos motivos son indispensables para el reclutamiento de los componentes que conforman el complejo activador de las caspasas conocido como apoptosoma (Fig. 1) (8-10).

En mamíferos se han identificado a la fecha 14 caspasas que participan en la muerte apoptótica, aunque también se ha reportado que algunas de estas enzimas son también necesarias en la respuesta celular asociada a la inflamación (8).

Apoptosoma y APAF-1

Ya se ha mencionado en este escrito que un componente esencial para la transducción de señales de muerte es el citocromo C, que es necesario para la activación de una proteína adaptadora denominada APAF. Ambos factores son requeridos para la formación del apoptosoma (16). En esta sección se ampliará la información sobre la estructura y función de este complejo.

La asociación del citocromo C con APAF1 depende de la presencia de ATP/dATP y de los dominios WD-40, estos últimos son regiones ricas en residuos de triptofano y de aspártico separadas por 40 aminoácidos en el extremo carbonilo terminal que regulan negativamente la función de APAF1 a través de interacciones intramoleculares con el amino-terminal. Esta unión induce un cambio conformacional en APAF1 y la exposición del dominio CARD (locali-

zado en el amino-terminal) y da como resultado el ensamblaje del apoptosoma y la activación de la pro-caspasa 9 (8, 9 y 16). Esta serie de eventos se han descrito en un gran número de tejidos y líneas celulares.

El apoptosoma es una estructura en forma de rueda que contiene siete monómeros de APAF1. El dominio CARD de APAF1 interactúa con el dominio CARD de la pro-caspasa 9 para activarla. Los dominios CARD se localizan en el centro de la rueda, mientras que los dominios WD-40 se localizan en la parte externa, lo que favorece la interacción con el citocromo C. El APAF1 en su estado inactivo mantiene unidos sus dominios CARD y WD-40, pero después de que interactúa con el citocromo C, el dominio CARD es desplazado del dominio WD-40. Esta unión y desplazamiento es regulado por el dominio central que a su vez es modulado por la unión de ATP/dATP. De esta manera APAF1 sufre un cambio conformacional que permite una estructura más desplegada (16).

INHIBIDORES DE LA APOPTOSIS

Tanto en mamíferos como en la *D. melanogaster* las caspasas son inactivadas por la unión de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPS). Las IAPS son proteínas altamente conservadas que se han encontrado en casi todos los eucariontes desde la levadura hasta el ser humano. Las IAPS tienen motivos estructurales denominados BIR, que están formados por aproximadamente 80 aminoácidos y como sello característico presentan sitios

de unión a Zn^{2+} , que son esenciales para su función anti-apoptótica. Además del motivo BIR, algunas IAPS presentan dominios llamados RING ("Really Interesting New Gene"), que presentan actividad de ubiquitin-ligasa (10). Las IAPS inhiben a las caspasas al unirse al sitio BIR, y promover así su degradación (8).

En mamíferos, las proteínas mitocondriales con actividad de serín-proteasas SMAC/Diablo y OMI/HTRA2, son los factores que presentan dominios de unión a IAPS mejor caracterizados. En estos sistemas las proteínas que unen las IAPS no parecen tener un gran actividad apoptótica autónoma. Normalmente son secuestradas por la mitocondria y son liberadas sólo en células cuya integridad mitocondrial se ve afectada. Mucho se ha especulado de su función, pero se cree que estas proteínas promueven el aumento en la actividad del citocromo C y en consecuencia la actividad de caspasas efectoras (8, 10).

CONCLUSIÓN

Es claro que la muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo fascinante y de grandes alcances dentro del estudio de la biología del desarrollo y de otras disciplinas. A pesar de que existen varios estudios al respecto, quedan todavía muchas preguntas por resolver para entender los alcances de la apoptosis. Los modelos experimentales como la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, resultan ser medios muy convenientes y exitosos para estos propósitos.

REFERENCIAS

1. Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219.
2. Twomey C, McCarthy JV (2005) Pathways of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med* 9: 343-359.
3. Bowie AG, Zhan J, Marshall WL (2004) Viral appropriation of apoptotic and NF-kappa B signaling pathways. *J Cell Biochem* 91: 1099-1108.
4. Giannetti L, Consolo U, Magnoni C, Muzio L (2004) Apoptosis: Escaping strategies in human skin cancer. *Oncol Rep* 11: 401-5.
5. Hardwick JM (1998) Viral interference with apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 9: 339-49.
6. van den Eijnde SM, Boshart L, Baehrecke EH, De Zeeuw CI, Reutelingsperger CPM, Vermeij-Keers C (1998) Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. *Apoptosis* 3: 9-16.
7. Yan N, Shi Y (2005) Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 35- 56.
8. Kornbluth S, White K (2005) Apoptosis in *Drosophila*: neither fish nor fowl (nor man, nor worm). *J Cell Sci.* 118:1779-87.
9. Schafer Z, Kornbluth S (2006) The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Develop Cell* 10: 549-561.
10. Cashio P, Lee TV, Bergman A (2005) Genetic control of programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. *Semin Cell Dev Biol* 16: 225-235.
11. Martin DN, Baehrecke EH (2003) Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development* 131: 275-284.
12. Baehrecke EH (2003) Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation* 10: 940-945.
13. Abrams JM, White K, Fessler LI, Steller H (1993) Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 117: 29-43.
14. Milán M, Campuzano S, Garcia-Bellido A (1997) Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5691- 5696.
15. Brachmann CB, Cagan RL (2003) Patterning the fly eye: the role of apoptosis. *TIGS* 19: 91-96.
16. Ferraro E, Corvaro M, Cecconi F (2003) Physiological and pathological roles of Apaf1 and the apoptosome. *J Cell Mol Med.* 7:21-34.