



UNIVERSIDAD  
**MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

---

**ESCUELA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

---

**Los efectos de la proteína tirosina fosfatasa de  
receptor tipo D (PTPRD) en la neurodegeneración  
mediada por Tau en *Drosophila melanogaster***

Pablo Andrés Jiménez Flores

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Santiago – Chile

Año 2023



**UNIVERSIDAD  
MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias  
**ESCUELA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

**Los efectos de la proteína tirosina fosfatasa de  
receptor tipo D (PTPRD) en la neurodegeneración  
mediada por Tau en *Drosophila melanogaster***

Pablo Andrés Jiménez Flores

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Tutor: Mario Sanhueza Cubillos PhD

Co-tutor: Guilherme Gischkow Rucatti

Laboratorio de Metabolismo del envejecimiento,  
Sede Huechuraba, Universidad Mayor

**Tipo de tesis: Científica**

Santiago – Chile

Año 2023

### **INFORMACIÓN DEL LABORATORIO Y/O CENTRO DE INVESTIGACIÓN**

Este proyecto fue realizado en el “Laboratorio de Metabolismo del envejecimiento”, en la sede Huechuraba de la Universidad Mayor. Esta investigación de tesis fue financiada por el proyecto Fondecyt iniciación #11200981.

SOLO USO ACADÉMICO

## ABREVIATURAS.

- **A $\beta$**  = *beta-amyloid peptide*.
- **APP** = *amyloid precursor protein*.
- **ARN** = ácido ribonucleico.
- **ARNi** = ácido ribonucleico de interferencia.
- **BACE** =  *$\beta$ -site APP-cleavage enzyme*.
- **CDC25** = *Cell division cycle 25*
- **CS** = *Canton-S*.
- **DAPI** = 4',6-diamidino-2-fenilindol.
- **DSPs** = *Dual specificity phosphatases*.
- **EA** = enfermedad de Alzheimer.
- **EH** = enfermedad de Huntington.
- **ELA** = Esclerosis Lateral Amiotrófica.
- **EP** = enfermedad de Parkinson.
- **EYA** = *Eyes Absent*.
- **HRP** = *horseradish peroxidase*.
- **LAR, Lar** = *leukocyte antigen receptor*.
- **LAR-SE** = sobreexpresor de Lar
- **LAR RNAi** = RNA inhibidor de Lar
- **LMWP** = fosfatasas de clase II.
- **MAP** = *microtubule-associated proteins*.
- **MT** = microtúbulos.
- **NFT** = *neurofibrillary tangles*.
- **ns** = no significativo
- **NSC** = *neural stem cells*.
- **p Tau** = *hyperphosphorylated tau*.
- **PTP** = proteína tirosina fosfatasa.
- **PTPRD** = proteína tirosina fosfatasa de receptor delta.
- **SE** = sobreexpresión.
- **yw** = *yellow white*.

## INDICE

(i). RESUMEN	7
(ii). SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Enfermedades neurodegenerativas	9
1.1.1 Consecuencias de las enfermedades neurodegenerativas	9
1.1.2 Profundizando en la enfermedad de Alzheimer	9
1.1.3 Las taupatías	12
1.2. PTPRD en el sistema nervioso	12
1.2.1. Historia, función y estructura de PTPRD	12
1.2.2. PTPRD en el neurodesarrollo	14
1.2.3. PTPRD en la neurodegeneración	14
1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> y Lar	15
1.3.1. Descripción del modelo p neurodegeneración en <i>Drosophila</i>	15
1.3.2. Ortología entre PTPRD y LAR en moscas	16
1.3.3. Uso de <i>Drosophila</i> en experimentos de modificaciones de Lar en p neurodegeneración	17
2. HIPÓTESIS CIENTÍFICA	18
3. OBJETIVOS	19
4. METODOLOGÍA	20
4.1. Selección y mantención de moscas por genotipo	20
4.2. Inducción de la expresión de Lar en moscas	20
4.3. Integridad del ojo de las moscas	20
4.4. Supervivencia	20
4.5. Ensayo de escalada	21
4.6. Inmunofluorescencia de cerebros de larvas	21
4.7. Cuantificación de proteínas Lar	22
4.7.1 Cuantificación de proteínas actina	24
4.8. Actividad espontánea	24
4.8.1 Actividad espontánea de 15 días con p Tau	24

4.9 Ensayo viabilidad de moscas	25
4.10. Inmunofluorescencia de cerebros de moscas adultas y lóbulos olfatorios	26
<b>5.RESULTADOS</b>	<b>28</b>
5.1. El anticuerpo anti-PTPRD reconoce su ortólogo LAR en <i>Drosophila</i>	28
5.2. El anticuerpo anti PTPRD predicho en ratas logró identificar cambios de expresión en la proteína LAR en diferentes genotipos	28
5.3. Las variaciones de PTPRD afectan a la morfología de los ojos de las moscas	30
5.4. El déficit de la molécula Lar reduce significativamente la esperanza de vida de las moscas.	31
5.5. El déficit de Lar afecta la actividad motriz durante 50 días de vida.	32
5.6. El déficit de Lar por parte del RNAi 40 afecta la actividad espontanea a los 50 días de vida.	33
5.7. Los cambios en la expresión de Lar no interfieren con los comportamientos de procreación.	34
5.8. La coexpresión (p)Tau + <i>Lar RNAi 40</i> no muestra efectos negativos en la actividad motriz y espontanea.	35
5.9. La coexpresión de Tau + <i>Lar RNAi 40</i> tiene mayor intensidad en la inmunofluorescencia de canal (p) TAU.	36
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>7. CONCLUSIÓN</b>	<b>40</b>
<b>8. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS</b>	<b>41</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>42</b>

## **(i). RESUMEN.**

Los trastornos neurológicos son uno de los mayores problemas para la salud pública, considerándose a nivel mundial como la primera causa de discapacidad. Estos trastornos se han convertido en un tema prioritario para los estudios científicos, los cuales utilizan modelos animales a fin de aportar la mayor cantidad de información posible para hacerle frente a estas enfermedades.

De las investigaciones hechas, varias se han enfocado en estudiar las proteínas que pueden guardar relación con este tipo de patologías. En este sentido, una de las analizadas es la de la Proteína Tirosina Fosfatasa de Receptor tipo Delta (PTPRD, del inglés *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type D*), un regulador de la señalización de la tirosina quinasa que tiene implicancia en varios procesos como los de crecimiento, migración y unión celular, entre otros, siendo muy importante su función de fosfatasa en las proteínas. Estudios recientes describen que el gen que codifica para PTPRD se encuentra mutado en distintas enfermedades neurológicas, lo que puede tener relación con la capacidad de esta proteína de desfosforilar e inactivar los receptores de tipo tirosina quinasa, que están involucrados en el destino de las células progenitoras neurales (NSCs, por sus siglas en inglés *neural stem cells*).

Y una de las neuropatías donde la actividad de PTPRD está afectada es la enfermedad de Alzheimer causada por la hiperfosforilación de Tau, una proteína que, al estar unida a más fosfatos de lo normal, contribuye a un mal ensamble proteico perjudicando a los microtúbulos que conforman la vía para el transporte neuronal. Aquí se hace necesaria la función fosfatasa de PTPRD.

Para demostrar que los cambios en los niveles de la expresión del Antígeno Receptor de Leucocitos (LAR, por sus siglas en inglés *Leukocyte Antigen Receptor*), que es ortólogo de PTPRD, contribuían a obstaculizar el progreso neurodegenerativo causado por la hiperfosforilación de Tau (p-Tau), se experimentó con *Drosophila melanogaster* (modelo animal elegido para la tesis), sometiéndola bajo diferentes niveles de LAR evaluando sus actividades motrices, a la vez que se cuantificaban las proteínas de LAR. Luego los *Drosophila* resultantes fueron expuestos a un p-Tau, y nuevamente sometidos a nuevas pruebas fisiológicas que buscaban evidenciar los efectos sobre el p-Tau en presencia de LAR. Como principal resultado de este estudio se comprobó la importancia de la PTPRD a lo largo del ciclo vital para la mantención de las capacidades cognitivas. Lo que abre un nuevo camino para complementar los tratamientos actuales y crear terapias más efectivas en un futuro.

**(ii). SUMMARY.**

Neurological disorders are one of the major problems for public health, being considered worldwide as the first cause of disability. These disorders have become a priority topic for scientific studies, which use animal models in order to provide as much information as possible to address these diseases.

Of the research done, several have focused on studying the proteins that may be related to this type of pathology. In this sense, one of those analyzed is Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Delta (PTPRD), a regulator of tyrosine kinase signaling that is involved in several processes such as growth, migration and cellular binding, among others, being very important its function as a phosphatase in proteins. Recent studies describe that the gene coding for PTPRD is mutated in different neurological diseases, which may be related to the ability of this protein to dephosphorylate and inactivate tyrosine kinase type receptors, which are involved in the fate of neural progenitor cells (NSCs).

And one of the neuropathies where PTPRD activity is affected is Alzheimer's disease caused by hyperphosphorylation of Tau, a protein that, being bound to more phosphates than normal, contributes to protein misassembly by damaging the microtubules that make up the pathway for neuronal transport. Here the phosphatase function of PTPRD becomes necessary.

To demonstrate that changes in the levels of Leukocyte Antigen Receptor Receptor (LAR) expression, which is an orthologue of PTPRD, contributed to hinder the neurodegenerative progression caused by Tau (p-Tau) hyperphosphorylation, was experimented with *Drosophila melanogaster* (animal model chosen for the thesis), subjecting it under different levels of LAR by evaluating its motor activities, while quantifying LAR proteins. The resulting *Drosophila* were then exposed to p-Tau, and again subjected to new physiological tests that sought to demonstrate the effects on p-Tau in the presence of LAR. The main result of this study was the importance of PTPRD throughout the life cycle for the maintenance of cognitive abilities. This opens a new path to complement current treatments and create more effective therapies in the future.



## **1.INTRODUCCIÓN.**

### **1.1 Enfermedades neurodegenerativas.**

#### **1.1.1 Consecuencias de las enfermedades neurodegenerativas.**

Las enfermedades neurodegenerativas son consideradas mundialmente como la primera causa de discapacidad y la segunda causa de muerte (después de las enfermedades cardiovasculares) (1). Actualmente un tercio de la población mundial sufre alguno de estos trastornos, y más de 50 millones de personas padecen de enfermedad de Alzheimer (EA), cifra que probablemente irá en aumento debido al envejecimiento de la población. Se calculó además que en 2010 las afecciones neurológicas costaron 798 000 millones de euros sólo en Europa. Y también se estima que en 2019 esta enfermedad costó a la sociedad mundial un total de US \$1,3 billones, cifra equivalente al 1,5% del PIB Mundial (2–6).

De estas patologías, un 5% tiene un origen hereditario y el otro 95% guarda aun un origen un tanto incierto, pero que tiene estrecha relación con diversos factores de riesgo como la hipertensión, obesidad, diabetes, inactividad física, pérdida de la audición, tabaquismo, depresión, bajo nivel educativo y baja frecuencia de sociabilización (7–11).

A pesar de que actualmente no existen tratamientos que reviertan o retarden tales enfermedades, se sabe que hay una gran diversidad de fenotipos clínicos que comparten un rasgo característico en común: la acumulación de proteínas específicas en agregados insolubles en (y entre) las neuronas y células gliales vulnerables (1). Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la de Parkinson (EP), la de Huntington (EH) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) presentan la aparición progresiva de esos cúmulos proteicos anormales en el sistema nervioso, los cuales inician con la agregación de proteínas específicas mal plegadas que luego proliferan y terminan acumulándose, ocasionando lesiones intra y/o extracelulares (12).

#### **1.1.2. Profundizando en la enfermedad de Alzheimer.**

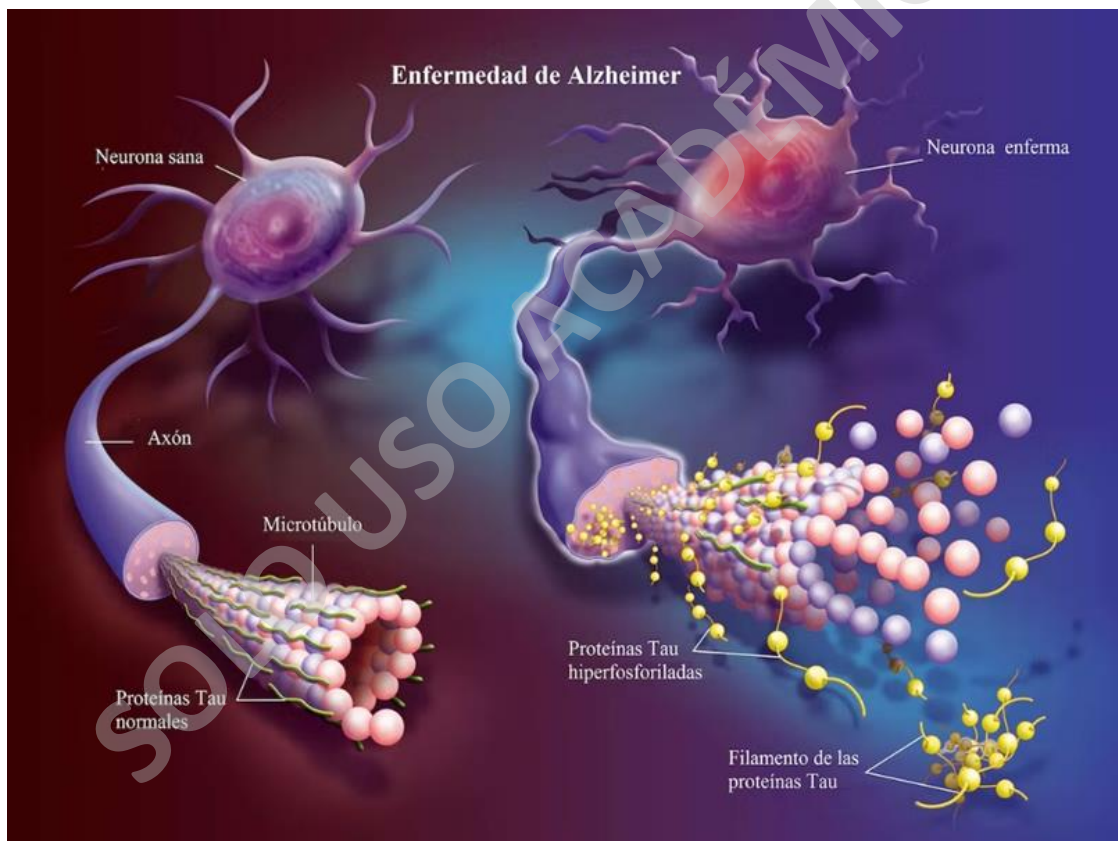
La EA es la causa irreversible más común de demencia senil. Este trastorno implica la pérdida de conexiones sinápticas, la retracción de axones y dendritas, y la muerte de las neuronas; perjudicando principalmente la corteza cerebral y el hipocampo (zona relacionada con la memoria). Los pacientes que sufren de esto se caracterizan por presentar pérdida de la memoria, dificultad para pensar y razonar, cambios en su personalidad y comportamientos que antes no presentaban (13). Estos síntomas son el resultado de una neurodegeneración progresiva que conlleva un importante deterioro cognitivo. Para el diagnóstico de EA, se identifican signos neuropatológicos como placas amiloides

extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares (13–15), que son, respectivamente, cúmulos de proteínas mal plegadas y agrupaciones densas de neurofilamentos y microtúbulos (16).

Las placas de péptido beta-amiloide (A $\beta$ ) son producidas por la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas del inglés *amyloid precursor protein*) por medio de una escisión proteolítica diferencial en el receptor transmembranal. La endoproteólisis se realiza mediante una enzima de escisión en el sitio  $\beta$  de la APP (BACE, por el inglés  *$\beta$ -site APP-cleavage enzyme*), apoyada de un conjunto de  $\gamma$ -secretasas, que corresponden a presenilina 1/2, nicastrina, APH-1 y PEN-2 (17). Una escisión proteolítica imprecisa resulta en la generación de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42. Aunque de estos A $\beta$ 42 toma más protagonismo debido a que este es el componente principal de las placas de A $\beta$  en cerebros con EA (18). Mientras que los ovillos neurofibrilares (NFT por el inglés *neurofibrillary tangles*) están compuestos por proteínas Tau hiperfosforiladas (p-Tau), las que se encuentran dentro de las neuronas afectadas (19–21).

Antes de seguir profundizando en los NFT, es necesario describir a esta proteína que toma protagonismo: Tau. Esta es una proteína que se asocia a los microtúbulos (MT) al interactuar con la tubulina, promoviendo el ensamblaje de MT. Cabe decir que los MT son componentes fundamentales del citoesqueleto, necesarios para la formación y mantenimiento de la morfología neuronal. De Tau se han descrito cuatro regiones: una región N-terminal, un dominio rico en prolinas, otro de unión a los microtúbulos y una región de proyección C-terminal. La región N-terminal contiene secuencias ácidas y tiene un tamaño variable; la región rica en prolinas posee una gran cantidad de residuos potencialmente fosforilables, y todo indica que esta región parece tener un rol importante en la asociación de Tau a los MT (22). La región de unión a MT posee 3 o 4 repeticiones de alrededor de 30 residuos similares, de las cuales solo la 2da serie se expresa en el cerebro adulto. Finalmente, la región C-terminal también presenta una zona rica en prolinas con residuos fosforilables y otra zona más ácida hacia su proyección C-terminal (23). En una situación libre de enfermedad, Tau se une a los MT estabilizándolos dentro de la neurona (Ver figura 1) (24). Su afinidad por los MT es regulada por la fosforilación de los sitios de unión que esta proteína posee para estos. Y en la búsqueda de factores que afecten su ensamblaje se ha observado que Tau promueve la polimerización de los MT in vitro (25), teniendo la capacidad de suprimir la dinámica de estos, logrando su estabilización; respecto a esto último, se ha demostrado que esta función estabilizadora de Tau es reemplazable por otras proteínas asociadas a microtúbulos (23), pero a pesar de ello, la ausencia de Tau resulta perjudicial para la actividad neuronal, la plasticidad cerebral y la neurogénesis. Además puede regular el transporte axonal al unirse a los microtúbulos a lo largo del axón, pudiendo separarlo de las proteínas motoras, gracias a lo cual incrementa la eficacia del transporte axonal (26,27).

Cuando hay un alto nivel de fosforilación, Tau pierde su capacidad de unión a los MT y estos se desprenden, desestabilizando el citoesqueleto. Y como consecuencia de su hiperfosforilación, Tau presenta modificaciones en su estructura con efectos tóxicos. Así, factores que regulan las Tau quinazas terminan produciendo la agregación desastrosa de Tau. Ejemplo de estos factores son las proteínas quinazas dirigidas a prolina o motivos prolina-serina/treonina (P-ST); las quinazas activadoras de mitógenos y las quinazas que fosforilan motivos distintos a P-ST, como la proteína quinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (24). Este desequilibrio lleva a la posterior acumulación de Tau, e incluso al secuestro de otras proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), resultando en la desorganización de toda la red de MT, la formación de filamentos helicoidales apareados (PHF) y finalmente, de los NFT (28–31).



**Figura 1:** La formación de ovillos neurofibrilares empieza dentro de la neurona en las proteínas de Tau. En la situación de la izquierda se ven las proteínas tau representadas como líneas amarillas que ayudan a estabilizar la red de MT. En el lado derecho se ilustra lo que sucede en una neurona afectada por EA, ahora Tau está hiperfosforilado (línea con bultos) y no puede adherirse a los MT, los que pierden su estabilidad y se desorganizan. En la esquina inferior derecha se observa una acumulación de proteínas Tau hiperfosforiladas, lo que corresponde a un NFT. Lo descrito es lo que se conoce como taupatía (32).

### **1.1.3. Las taupatías.**

Numerosas enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con anomalías en Tau, debido a lo cual reciben el nombre de taupatías (30). En la actualidad éstas se originan mayoritariamente por alteraciones proteicas (como la acumulación, oligomerización y/o multimerización de proteínas tóxicas), por ejemplo: la afectación de MAPK5, una quinasa asociada con la hiperfosforilación de tau e implicada en enredos de proteínas (20). Incluso se sabe que las p-Tau pueden disminuir los niveles de Tau funcional y dificultar aún más, por motivos ya descritos, el transporte axonal (33–35).

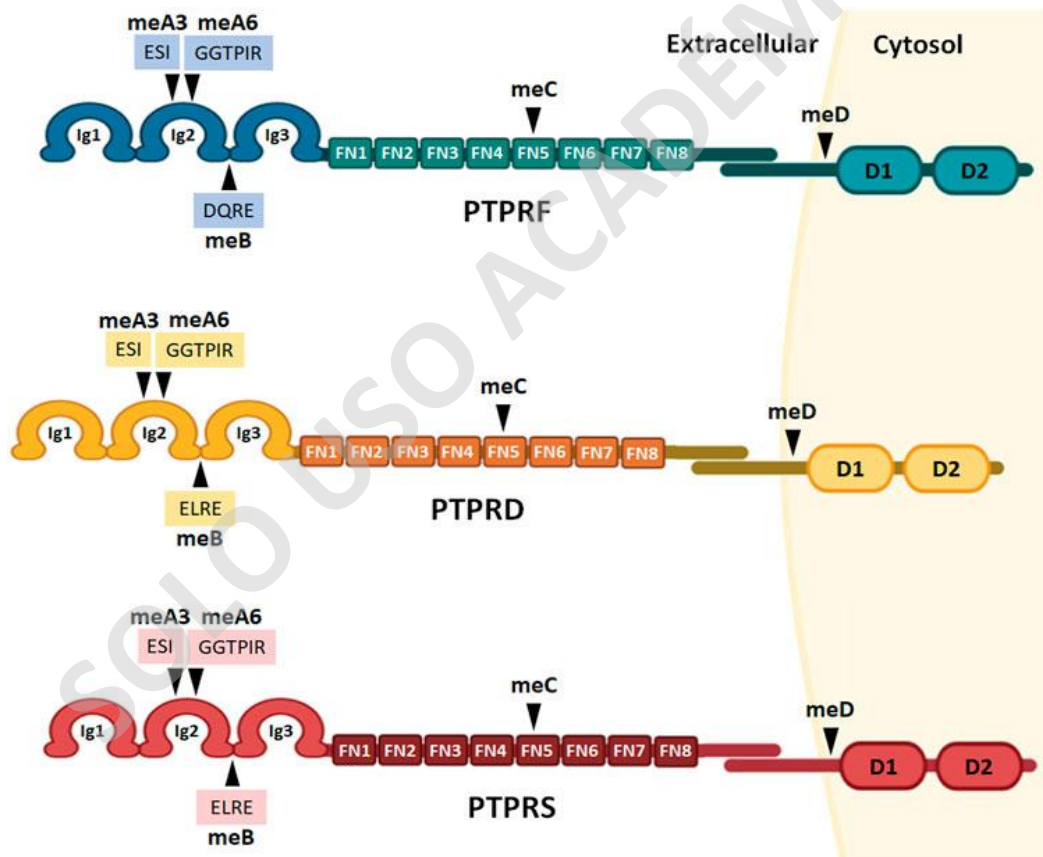
En las taupatías, las proteínas afectadas dentro de una neurona pueden originar otros problemas celulares, ya sea una transcripción alterada, disfunciones mitocondriales o un deterioro significativo en el sistema de ubiquitina-proteosoma, la que funciona como control de calidad degradando las proteínas mal plegadas; todo esto converge en una enfermedad neurodegenerativa progresiva donde se acumulan proteínas mal plegadas que no pudieron degradarse. Pero a pesar del oscuro escenario antes descrito, las alteraciones proteicas son factores controlables, lo que abre una ventana a evitar y desacelerar el desarrollo de varios signos patológicos de las taupatías; uno de estos medios es utilizar proteínas que cumplan con roles inhibitorios para estas enfermedades, como proteínas tirosinas fosfatasas, las cuales desfosforilan proteínas (36–38).

## **1.2. PTPRD en el sistema nervioso.**

### **1.2.1. Historia, función y estructura de PTPRD.**

Entre las diversas proteínas involucradas en el sistema nervioso, existen unas que desempeñan roles importantes como contribuir a la sinapsis, a la organización y transporte de neuronas, entre otras actividades. Entre estas destaca la Proteína Tirosina Fosfatasa de receptor tipo Delta (PTPRD, *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type D*). Esta molécula fue descubierta en 1990 mediante una sonda de hibridación de proteínas tirosina fosfatasas (PTP) en un cribado (screening) de baja rigurosidad de ADNc humano en *Drosophila* (39). La PTPRD pertenece a la familia de PTP (*protein tyrosine phosphatase*), que incluyen PTPRA, PTPRE, PTPRS (PTPR sigma, o PTPR $\sigma$ ) y PTPRF (también conocido como antígeno relacionado con leucocitos o LAR por el inglés *Leukocyte common antigen-related*), familia que a su vez se divide en dos clases: las PTP citosólicas y las PTP receptoras. Las primeras poseen un dominio PTP en su región intracelular mientras que las segundas contienen una o dos repeticiones de estos dominios en la misma región. Las PTP intervienen en las actividades reguladoras de los receptores tirosina quinasa, en el crecimiento celular, en la migración celular y en la angiogénesis (40,41).

Las PTPRD poseen en su estructura tres dominios de inmunoglobulina y una serie de dominios de fibronectina III, otro de transmembrana y otros dominios intracelulares de tipo fosfatasa D1 y D2 (ver Figura 2). Los primeros dos tipos de dominios nombrados le otorgan a PTPRD funciones fisiológicas derivadas como la de adherencia celular y la capacidad de servir como un especificador sináptico para moléculas homófilas de PTPRD-PTPRD en células neuronales. Mientras, los dominios tipo fosfatasa D1 y D2 permiten desfosforilar los residuos de fosfotirosina en un grupo de proteínas citoplasmáticas. El dominio fosfatasa D1, que está próximo a la membrana, es el que se encarga de mediar esta actividad desfosforiladora (40,42,43). Mientras que el dominio D2, que contiene una secuencia homóloga a las fosfatasas, no tiene actividad enzimática, por lo que este debe unirse a los dominios D1 para regular la actividad de la PTPRD y de varias otras proteínas tirosina fosfatasas de tipo receptor relacionadas, como PTPRA, PTPRE, PTPRS y PTPRF (ver figura 2) (43,44).



**Figura 2.** Se observan las estructuras de tres de las cuatro familias de PTP: PTPRF, PTPRD, PTPRS; con sus respectivos componentes de Inmunoglobulina (Ig) con miniexones (me), la fibronectina tipo III (FN) como una serie de rectángulos, un dominio en la región transmembrana y sus dos dominios intracelulares de fosfatasa: el de tirosina fosfatasa activo (D1) y el otro que funciona como un regulador enzimáticamente inactivo (D2) en el citosol (47).

Analizando la selectividad del dominio fosfatasa D1 de PTPRD, se observa la ausencia de una secuencia consenso altamente específica para los aminoácidos que rodean a la fosfotirosina, y la preferencia por aminoácidos hidrófobos grandes, especialmente los adyacentes a esta proteína; otra preferencia por residuos ácidos en las proximidades de la proteína y por otro lado la aversión a los desechos básicos; y es observable una afinidad relativamente menor por los sustratos de fosfotirosina en comparación con otras PTP. También se ve una suficiente actividad catalítica cerca de las de otras proteínas tirosina fosfatasas que evidencia su potencial para actuar como una enzima de alta eficiencia catalítica. A partir de aquí es sabido que la inhibición del dominio de fosfatasa PTPRD D1 proporciona una ruta aparentemente exitosa para modular la actividad de PTPRD, además de posibilitar el aumento de la actividad fosfatasa de PTPRD al reducir el efecto inhibitor por la unión del dominio D2 al dominio fosfatasa D1 activo (39,45,46).

### **1.2.2. PTPRD en el neurodesarrollo.**

Estas características de la PTPRD le permiten regular el desarrollo del cerebro, expresándose en zonas precursoras como en el hipocampo, en los núcleos del hipotálamo, y en los de las amígdalas cortical y lateral, que están bien implicados en interacciones talamocorticales que son intervenidas por otras interacciones talamocorticales reticulares recíprocas, además de su participación en las interconexiones corticales y moto-neuronales del tronco encefálico y de la médula espinal (41). Esto promueve el desarrollo de las funciones motoras, mnemotécnicas y de recompensa subcortical-cortical. Además, la PTPRD es participe de procesos celulares como el crecimiento, la proliferación y la migración celular, así como de la búsqueda de rutas axonales y la sinaptogénesis. A su vez, experimentos basados en la disminución o eliminación de PTPRD en ratones demostraron el crecimiento de la porción celular progenitora intermedia durante la proliferación celular, y también el aumento de neuronas corticales, lo que terminaba alterando la actividad cortical (40,41).

### **1.2.3. PTPRD en la neurodegeneración.**

Dada su importancia, la PTPRD se encuentra asociada genéticamente con varios trastornos neuronales, como los del espectro autista, el de déficit de atención e hiperactividad, la esquizofrenia, el trastorno obsesivo-compulsivo, el síndrome de piernas inquietas y la enfermedad de Alzheimer. Incluso se ha informado de la presencia de PTPRD mutados en cánceres neurales derivados de precursores neurales desregulados (40,41).

La ineficiente regulación de esta molécula es una causal importante en diversas enfermedades, ya sea por su sobreexpresión o deficiencia. La PTPRD se relaciona con las taupatías mediante la MAPK5, una quinasa asociada a la hiperfosforilación de tau y la posterior formación de NFT; dicha quinasa resulta ser un objetivo de desfosforilación por parte de PTPRD (40). Este vínculo patogénico es la razón por la que PTPRD ha recibido atención para su uso como diana terapéutica, estudiando el control y manejo de las taupatías mediante el uso de modelos experimentales (49–52).

### **1.3. *Drosophila Melanogaster* y LAR.**

#### **1.3.1. Descripción del modelo p neurodegeneración en *Drosophila*.**

Las *Drosophila melanogaster*, conocidas como moscas del vinagre, son insectos holometábolos (es decir, que pasan por metamorfosis) del orden Díptera, pertenecientes a la familia *Drosophilidae*. A menudo se encuentran en materia orgánica en descomposición, como la fruta podrida. Esta especie habita en todos los continentes excepto en la Antártida. Hace unos 15.000 años, *D. melanogaster* emigró de su hogar natal en el sur de África subsahariana a Europa y luego llegó a colonizar gran parte del resto del mundo gracias al comercio de frutas durante los últimos siglos (53–55).

Hoy en día las moscas son usadas en más de 1800 laboratorios alrededor del mundo. *D. melanogaster* representa un sistema clásico para la investigación científica debido a su facilidad de cultivo en laboratorio, obteniendo muchas generaciones en poco tiempo. Además, tienen un genoma compacto, lo que las hace fáciles de manipular genéticamente, junto con una elevada capacidad reproductiva y un corto ciclo de vida de 2-3 meses (56–58). Características que la convierten en un organismo eficiente. Pero, a pesar de ser un organismo bastante simple en comparación con los mamíferos, esta mosca tiene un sistema nervioso central complejo, cuyas neuronas tienen dendritas que se originan desde el axón (conocidas como neuronas unipolares) a diferencia de los vertebrados, cuyas dendritas neuronales se despliegan desde el soma de la neurona (neuronas multipolares). Otra característica es que las glías de *D. melanogaster* conforman sólo el 10% del total de células del sistema nervioso central (v/s el 50% en humanos), y poseen cierta similitud con el cerebro de vertebrados, como por ejemplo: los circuitos neuronales de la visión (59, 60). Las similitudes moleculares, funcionales y de desarrollo entre estos sistemas testifican que los principios básicos de los circuitos neuronales se conservan desde las moscas hasta los humanos, proporcionando una ventaja importante para los estudios de enfermedades neurodegenerativas (61–63).

La manipulación genética de *D. melanogaster* para su uso como herramienta permite la expresión de transgenes específicos, que en el caso del presente estudio se utilizó para el sistema de *GAL4-UAS*, un

factor de transcripción de levadura (GAL4) que se puede usar para controlar la expresión de los genes (bajo una secuencia UAS) y así dirigir la actividad de los genes a un tejido específico. En base a ese sistema, se manipula la expresión del gen de interés para una pérdida y/o ganancia de función, bajo un promotor celular-específico, como el pan-neuronal Elav(x)-GAL4, el cual dirige la expresión génica del sistema nervioso (64, 65).

### 1.3.2. Ortología entre PTPRD y LAR en moscas.

El genoma de *D. melanogaster* contiene 44 genes de PTP, con datos de RNA-seq (que fueron obtenidos de la plataforma FlyBase) que apoyan tanto la expresión robusta como las estructuras intrón-exón de todos los genes PTP (68). El catálogo genético de la mosca presenta 16 PTP específicos de tirosina (clásicos) con 21 fosfatasa de especificidad dual (DSP), 4 fosfatasa de clase II (LMWP), 2 fosfatasa de clase III (CDC25) y 1 homólogo de ojos ausentes (EyA). A diferencia del 65% de las PTP humanas que son proteínas multidominio, la mitad de las PTP de las moscas tienen dominios accesorios que mejoran las capacidades de las enzimas (66–69). Entre estas familias de PTP, se destaca la PTPRD o Lar, la cual forma parte la familia de PTP tipo II. Lar es posiblemente el subtipo mejor caracterizado entre las familias de PTP, compartiendo el 90% de las secuencias aminoacídicas en sus dominios de fosfatasa, y una homología del 75 % con la secuencia de su ortólogo humano (Figura 3), cumpliendo con funciones moleculares en la actividad de fosfatasa (70).

Término de búsqueda: PTPRD Especie: <i>Homo sapiens</i> (humano) Gen: PTPRD Informes de genes: NCBI Ensembl OMIM HGNC							
Gene	Informes de genes	A través de DIOPT (v8.0)			Fuente	Alinear	Transgén en mosca
		Puntaje	Mejor puntuación	Mejor puntuación de revoluciones			
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca de la fruta)							
lar	Flybase del NCBI	12 de 15	si	si (+)	eggNOG, Hieranoid, Homologene, Inparanoid, OMA, OrthoFinder, OrthoInspector, orthoMCL, Panther, Phylome, RoundUp, TreeFam	(+)	
Ptp36E	Flybase del NCBI	2 de 15	No	no (+)	ponche de huevo, pantera	(+)	
CG7607	Flybase del NCBI	1 de 15	No	si (+)	Buscador de ortopedia	(+)	
nkt	Flybase del NCBI	1 de 15	No	si (+)	Buscador de ortopedia	(+)	
Ptp10D	Flybase del NCBI	1 de 15	No	no (+)	Redondeo	(+)	
Ptp4E	Flybase del NCBI	1 de 15	No	no (+)	Redondeo	(+)	
Ptp52F	Flybase del NCBI	1 de 15	No	no (+)	Pantera	(+)	
Ptp69D	Flybase del NCBI	1 de 15	No	no (+)	Ponche de huevo	(+)	
Ptp99A	Flybase del NCBI	1 de 15	No	no (+)	TreeFam	(+)	
wsk	Flybase del NCBI	1 de 15	No	no (+)	Ponche de huevo	(+)	

**Figura 3.** Lar es la proteína ortóloga a la PTPRD humana en *Drosophila*. Datos tomados de la plataforma FlyBase (FBgn0000464) que demuestran cuantitativamente (Score) la similitud del alineamiento proteico entre las secuencias de PTPRD humana y Lar, su ortólogo en *Drosophila* (67).



### **1.3.3. Uso de *Drosophila* en experimentos de modificaciones de Lar en p neurodegeneración.**

La sobre expresión de Tau humana en el sistema nervioso de *D. melanogaster* recapitula varias características de la EA, lo que proporciona un modelo experimental útil para la disección genética funcional de los mecanismos de esta enfermedad (64, 71–73). Además, se han realizado “screenings” a gran escala de modificadores genéticos relevantes para la EA en *D. melanogaster*, lo que ha demostrado que estos resultados pueden ser casi tan válidos como si hubiesen sido obtenidos a partir de un ser humano (74, 75). La lista de modificadores asociados al EA en *D. melanogaster* ha proporcionado buenas pistas sobre los mecanismos moleculares que son regulados por proteínas homólogas en mamíferos, por lo que la descripción y análisis de estos datos es una herramienta importante para avanzar hacia una potencial terapia futura (76–80).

Para el presente estudio, la mosca *D. melanogaster* se utilizó como modelo buscando verificar si los cambios en los niveles de la expresión de la proteína Lar contribuyen en la progresión de la neurodegeneración causada por la hiperfosforilación de Tau (58). Para ello se cruzaron moscas que padecían trastornos neurodegenerativos, de las cuales su descendencia fue cruzada con moscas que inducían la sobreexpresión de Lar (el homólogo de PTPRD en moscas); luego las crías resultantes fueron estudiadas en busca de algún cambio significativo en su sistema nervioso (73, 77, 81–85).

## **2. HIPÓTESIS CIENTÍFICA.**

Los cambios en los niveles de la expresión de PTPRD contribuyen en la progresión de la taupatías.

SOLO USO ACADÉMICO

### **3. OBJETIVOS.**

#### **Objetivo general:**

Evaluar los cambios de hiperfosforilación de Tau mediante modificaciones en la expresión del gen Lar en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*.

#### **Objetivos específicos:**

- I. Caracterizar los efectos de la modulación de los niveles de expresión de Lar en el sistema nervioso de *D. melanogaster*.
- II. Evaluar los cambios de la hiperfosforilación de Tau inducidos por cambios en la expresión del gen Lar en el sistema nervioso de *D. melanogaster*.
- III. Examinar la neurodegeneración provocada por cambios en los niveles de expresión del gen Lar en el sistema nervioso de *D. melanogaster*.

SOLO USO ACADÉMICO

#### 4. METODOLOGÍA.

**4.1. Selección y mantención de moscas por genotipo.** Se seleccionaron los genotipos obtenidos de *Bloomington Drosophila Stock Center* en base a su información, utilizando como control los genotipos *Canton-S* (CS), *yellow white* (*yw*) y *UAS-trip* (el cual no tiene función biológica aparte de ser fluorescente bajo cierta intensidad de luz), y como base de mutación los genotipos transgénicos *Elav(x)-GAL4* (promotor pan-neuronal), *GMR-GAL4* (un promotor retinal). De estos *Elav(x)-GAL4* fue cruzado con los tres genotipos control, y *GMR-GAL4*, sólo con *yw*. Además, *Elav(x)-GAL4* y *GMR-GAL4* fueron también cruzados cada uno con un genotipo *UAS Lar RNAi* (#34965, #40938, inhibidores de Lar), los cuales cumplen con la misma función, pero están ubicados en distintos cromosomas: *Lar RNAi 34* está en el cromosoma 3; mientras que *Lar RNAi 40*, en el cromosoma 2. Se seleccionaron además los siguientes genotipos: *UAS-Lar* (#8591) para sobreexpresar Lar; *UAS-pTau* (#51363), que genera taupatías; y *CyO/tm6*, un genotipo marcador utilizado para la coexpresión de dos genotipos diferentes (67, 86–88). Las cepas de *D. melanogaster* se reprodujeron durante 3 días y luego fueron transferidas a un nuevo tubo de cultivo, cabe decir que se requieren entre 10 a 12 días para obtener una mosca adulta, la cual emerge de la fase de pupa y madura sexualmente en ~8-12 hrs. Este proceso de cultivo se repitió hasta conseguir 60 moscas hembra vírgenes (que se diferencian por la presencia de un punto negro en su abdomen) que luego fueron cruzadas con machos de los genotipos inductores (89).

**4.2. Inducción de la expresión de Lar en moscas.** De las crías obtenidas anteriormente, se seleccionaron las que contenían los genotipos de Lar RNAi #34965, Lar RNAi #40938, UAS-Lar #8591, Tau #51363, y luego estas fueron cruzadas con moscas con genotipos marcadores de coexpresión *CyO/tm6b* (90–93). Una vez obtenida la descendencia con el patrón dictado por el promotor elegido, se expusieron las crías a nuevas experimentaciones (61, 94–99).

**4.3. Integridad del ojo de las moscas.** Para verificar la presencia de cambios fenotípicos, se seleccionaron los descendientes de la cruce entre el genotipo *GMR-GAL4* con *yw*. Estos fueron separados según su género, y se seleccionaron hembras para congelarlas a -20° C, lo que las dejó en un estado suspendido temporalmente para un fotografiado de alta definición, donde fueron observables cambios en la forma y color de los ojos (100–103).

**4.4. Sobrevivencia.** Con tal de observar cambios en la esperanza de vida, se cruzaron moscas hembras *Elav(x)-GAL4* con machos CS en cuatro viales: un vial para *UAS-Lar #8591*, dos para *Lar-RNAi 34* y el

último para *Lar-RNAi 40*. Después de los cruces se esperaron 20 días para la selección de 25 moscas hembra de cada vial (es decir, 100 moscas en total), ya que los machos son agresivos entre sí. Después de ello las moscas seleccionadas fueron cambiadas de vial día por medio hasta la muerte de la última mosca, llevando la cuenta de las moscas fallecidas por día (104).

**4.5. Ensayo de escalada.** Para evaluar cambios en la actividad locomotora, se seleccionaron 20 moscas hembra de 10 días de edad de cada genotipo y se anestesiaron con CO<sub>2</sub>, para luego colocarlas en cuatro tubos viales (uno por genotipo) el día previo a realizar la escalada. A la mañana siguiente, 10 moscas de cada vial se transfirieron a un cilindro de vidrio de 30 cm donde se evaluó su escalada, el que fue limpiado después de cada uso. Estos experimentos se realizaron con luz ambiental a una temperatura de 22°C y humedad del 40%. Y para evitar la confusión del ritmo circadiano, todos los experimentos fueron realizados a la misma hora de cada día (105).

Al momento de evaluar la escalada se conectó el escáner medidor al computador y se usó el programa DAMSystem. Luego 10 moscas de cada genotipo se trasladaron a tubos marcados, los que luego se depositaron en una columna del medidor para escanear las moscas, cuyos datos obtenidos fueron enviados al monitor del programa DAMSystem. Después de 2 segundos se golpeó levemente el contenedor contra el suelo para que las moscas cayeran y volvieran a subir. Este proceso fue repetido doce veces en total cada 30 segundos mientras los datos eran registrados por el programa DAMSystem. Estos fueron enviados a Excel Data Sheet para su filtración en replicas técnicas. Los datos filtrados fueron enviados al programa "Prism Graph". Luego de someterlos a una normalización se probaron mediante el control "D Agostino-Pearson" para determinar si eran paramétricos. Enseguida fueron sometidos a una prueba de ANOVA de una vía para detectar la diferencia de promedio y varianza, seguido de una prueba de comparaciones múltiples para determinar la diferencia de promedios. Con esto se graficaron los datos donde el valor de  $P < 0,05$ . Para graficar la escalada a lo largo del tiempo se utilizó ANOVA de 2 vías para determinar el efecto sobre los porcentajes de escalada, comparándolos en distintos tramos de tiempo.

**4.6. Inmunofluorescencia de cerebros de larva.** Para determinar los niveles de proteínas en el cerebro de las moscas, se diseccionaron los cerebros de 15-20 larvas en buffer PBS 1X durante 20 minutos para no destruir el tejido. Los cerebros fueron transferidos a un tubo de PFA 4% (paraformaldehído) y sometidos a rotación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego dicho tubo fue enfriado hasta

que los cerebros precipitaron en el fondo del contenedor. Entonces se les aplicaron tres lavados rápidos con buffer PBT (PBS con Tritón), siempre manteniéndolos en el fondo. Luego fueron llevados a rotación 3 veces durante 5 minutos, aplicando un lavado rápido entre cada una. Finalmente, el tubo fue sometido a un último lavado rápido con buffer PBS (106).

A continuación, se bloquearon las muestras con suero de cabra (NGS, *normal goat suerum*) al 5% durante una hora mediante una solución de PBT al 0,1%. Luego se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios a 1:1000 en una solución de NGS al 5% con 5 ul de anticuerpo 1° PTPRD# NBP2-49153 de ratón (MS) y 469,5 ul de PBS.

Luego de aplicar 6 lavados con buffer PBT 0,1% durante 10 minutos, los cerebros fueron incubados con los anticuerpos 2° durante una hora en una solución de NGS al 5% con 0,5 ul de DAPI (para el núcleo), 469,5 ul de PBS y 5 ul de anticuerpo 2° de ratón 488 (#145822), usando mismo hospedero que el del anticuerpo 1° (ninguno de estos reactivos fue expuesto a la luz). Después se enjuagaron 6 veces con PBT 0,1% durante 10 minutos para posteriormente montarlos en *fluoromount* entre 2 placas de cristal (2, 107–111).

Las placas fueron llevadas a microscopía para una inmunofotorrepción y fotografiarlas con una magnificación de 40x. La imagen obtenida fue visualizada con el programa de “Image J” arrastrando el archivo “: LIF a image”. Para ver los niveles de HRP, se seleccionó “channel 3” → “Z; 18” cliqueando “imagen”. Entonces se cliqueó “stacks” → “z Project” → “max intenst” para crear una copia con comando Shift D.

Las placas fueron llevadas a microscopía para una inmunofotorrepción y fotografiarlas con una magnificación de 40x. Después las fotos obtenidas fueron archivadas y arrastradas al programa de “Image J” donde fueron procesadas para determinar la concentración de las proteínas de Lar.

Para graficar se usó el software “Graphpad Prism”, se eligió el gráfico tipo “column” → “Intend”. Se cliqueó “create” y se copiaron los datos del Excel en cada casillero; luego se fue a la opción “Analyze” → “ONE Way ANOVA” → “Multiple comparison” → “compare the mean column with other column”. Finalmente se seleccionó “graphs” → “individual values” y luego se eligieron gráficos de barras y puntos.

Las fotos fueron seleccionadas determinando el promedio de la intensidad de las fotos en HRP para cada genotipo y luego se eligió la foto que tuviera el valor más cercano al promedio de todos sus datos.

**4.7. Cuantificación de proteínas Lar.** Para cuantificar los niveles de la proteína de Lar en los distintos genotipos, se guardaron 20 hembras de cada uno de estos en tubos de microcentrífuga (Eppendorf) y

fueron congeladas en nitrógeno líquido para facilitar la decapitación de las moscas. Las cabezas fueron trituradas con 500 ul de solución RIPA (Tris -HCl 10-50 mM (pH 7–8), NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, 0,1-0,5% desoxicolato), se sonicaron y se centrifugaron a 12000 fuerzas G por 10 minutos en una centrífuga previamente enfriada a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y se eliminó el excedente que quedó en el fondo. El sobrenadante fue cuantificado con el Kit de ensayo de proteínas BCA (*bicinchoninic acid*) de 96 microplacas marca Thermo Cientific (siendo la primera fila un estándar) y se aplicó una dilución seriada a los pocillos continuos de la fila añadiendo 180 ul de H<sub>2</sub>O/PBS a la primera celda y 100 ul a las demás. Después se añadieron 20 ul de BSA (*bovine serum albumin*) a la primera celda para una dilución en serie de 100 ul desde la derecha, exceptuando la última celda que quedó vacía (112).

Las muestras se cargaron por triplicado en cantidades de 98 ul de H<sub>2</sub>O/PBS con 2 ul de la muestra, y después a cada celda se les añadió 100 ul de la mezcla de reactivos del kit de BCA A y B, en razón de 50:1. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C y se cuantificaron en el equipo de “multiscan” para determinar la concentración final.

Con los datos obtenidos de “multiscan” se prepararon las proteínas (bajo la premisa de una concentración inicial de 1 ug y una concentración final de 50 ug). Luego se preparó un gel de contención para determinar la presencia Lar, se agregaron 20 ul de una solución de 8 ul de beta-mercapto, 5 ul de Ladder y 7 ul de agua destilada en la primera abertura del gel, y en los demás casilleros se agregaron 8 ul de beta-mercapto con 8 ug/ul de las proteínas de cada genotipo y en la última casilla del gel se agregó un compuesto con 8 ul de beta-mercapto y 12 ul de agua.

Con las proteínas ya cargadas, el gel se depositó en la cámara de electroforesis a 100 V durante 2 horas hasta bajar todas las proteínas. Después se removió el gel con pinzas que para no contaminarlo y fue puesto entre 7 capas de papel filtro en buffer y una membrana activa en metanol durante 3 minutos, obteniendo la membrana con las respectivas marcas protéicas. Esto fue lavado en PBS/Tween x1% 3 veces por 5 minutos y después puesto en anticuerpos 1º de conejo PTPRD ab103013 toda la noche a 4°C. Luego pasaron por un lavado de PBS Tween para su incubación con los anticuerpo 2º de anti conejo 488 (# 146644) a temperatura ambiente y bajo agitación, posteriormente la membrana fue sometida a un lavado con PBS Tween, y así se le preparó para revelarla usando los reactivos de “Clarity Western ECL Substrate” (Bio Rad) en proporción 1:1, preparando 2ml en total de la mezcla de “lumiflash” (1ml de cada uno). Luego la membrana fue transferida a otro contenedor e incubada con el lumiflash durante 5 minutos. Después de ello se pone en el equipo “chemidoc” con el programa “Imagelab”, se

selecciona “gel scanning” → “blot” → “chemis hi sensitive” → “run scan”, para luego amplificar la imagen obtenida (111).

**4.7.1. Cuantificación de proteínas de actina.** Primero se lavó la membrana del experimento de Western Blot anterior con PBS Tween 0,1% durante 10 minutos para limpiar el BSA, se puso en anticuerpos primarios de ratón “actin monoclonal antibody ma1 744 uk 293170” para detectar actina en las muestras y se incubó con el anticuerpo toda la noche a 4° C. Luego se sometió a un lavado de PBS Tween 0,1% para su incubación con los anticuerpos secundario de anti ratón 488 (#145822), y posteriormente a otro lavado con PBS Tween, y así se preparó nuevamente la membrana para revelarla al igual que en el paso anteriormente descrito, usando exactamente los mismos reactivos y repitiendo el método que se siguió anteriormente. Finalmente, la membrana utilizada fue guardada en un contenedor lleno de BSA para su mantención junto con las proteínas (112, 113).

**4.8. Actividad espontánea.** Para comprender si hay cambios en el comportamiento de sueño y vigilia, se analizó un triplicado biológico de 10 moscas hembra de 15 días de vida y 2 réplicas técnicas que se sincronizaron exponiéndolas al régimen de luz/oscuridad (12h de luz y 12H de oscuridad, es decir, 12:12 LD) para su análisis en datos de 24 horas. Luego se organizaron las moscas en forma vertical durante 3 días usando el equipo de DAMSystem (114). Se usó este régimen al basarse en la idea de que *Drosophila* es de origen africano (115,116).

Al finalizar el experimento, los datos binarios recopilados con el software del sistema DAM que no han sido procesados se descargaron en un dispositivo portátil de almacenamiento. Para cada análisis se usó “ANOVA 2 Way” con la corrección de “Geisser-Greenhouse”(117).

Luego se repitió el mismo experimento de actividad espontánea de 15 días, pero esta vez con los genotipos de Tau.

**4.8.1. Actividad espontánea de 15 días con p Tau.** Se realizó un análisis con un triplicado biológico de 10 moscas con 15 días de vida y 2 réplicas técnicas que se analizaron en datos de 24 horas (separadas en ciclos claros y oscuros), utilizando el equipo de “DAMSystem” (114). Las moscas se sincronizaron exponiéndolas al régimen de luz/oscuridad durante 2 a 5 días completos. El ciclo era de 12hrs de luz y 12hrs de oscuridad (12:12 LD) a 28 °C. Los episodios matutinos de estos empezaban a las 8:00 AM, por lo cual todos los segundos contados iniciaban desde la medianoche hasta las 7:49 hrs (115, 116).

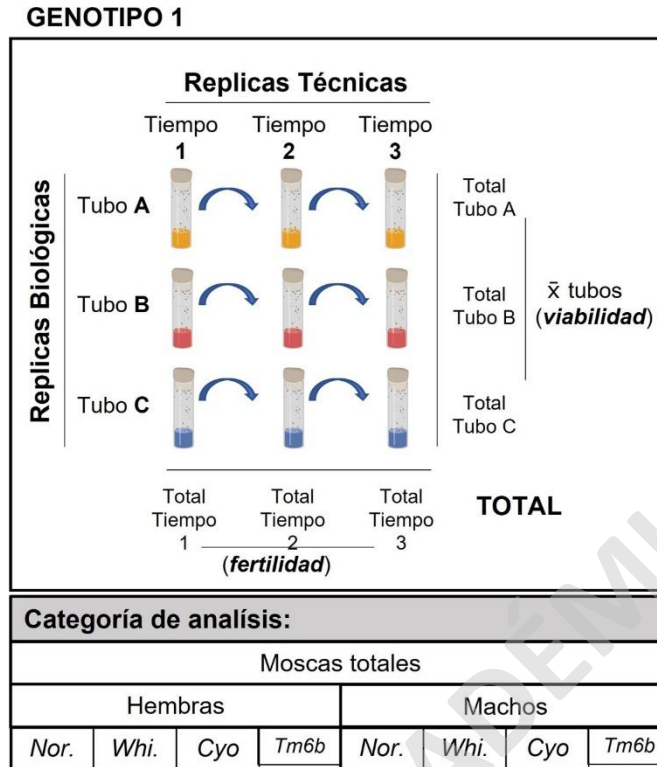


Al finalizar el experimento, los datos binarios recopilados con el software del sistema DAM se enviaron a Excel para asignar el genotipo a diferentes grupos de muestra con tal de examinar el ciclo circadiano. Para cada análisis se usó “ANOVA 2 Way” con la corrección de “Geisser-Greenhouse”(117).

**4.9. Ensayo viabilidad de moscas.** Para analizar los cambios en el nivel de natalidad se seleccionaron moscas de Elav(x)-GAL4 para un cruce: 30 hembras vírgenes y 24 machos, los genotipos usados para el cruce fueron UAS-trip como control estándar, UAS-Lar-RNAi 40, UAS-pTau y tau coexpresada con Lar (87).

Se preparó un triplicado para cada genotipo, con 10 hembras y 8 machos cada uno. Las moscas eran trasladadas de tubo día por medio, contabilizando previo a cada cambio las nuevas moscas nacidas. Cada tubo tenía su propia fecha límite para seguir realizando traslados (con tal de evitar contaminar la información con la segunda generación, pues solo debía contabilizarse los nacimientos pertenecientes a la primera generación) existiendo en total 3 fechas diferentes (118). Luego de 10 días y hasta que salieron las primeras moscas del cruce (F1), se contabilizaron las moscas descendientes de cada genotipo durante otros 10 días obteniendo replicas biológicas y replicas técnicas, siendo las réplicas biológicas las moscas obtenidas del triplicado de cada genotipo en la fecha que fueron recolectadas y las réplicas técnicas las moscas obtenidas durante cada día de recolección para cada genotipo (Ver figura 4).

Los datos de réplicas biológicas y técnicas obtenidas fueron graficados en “Prism Graph”, aplicando “ANOVA” → “test chi square” → “test de Fisher” para conseguir la significancia de los datos.



**Figura 4.** Se observan como son separados los triplicados de los cruces, cada genotipo se categorizaba según el fenotipo que presentaba. De estos, *Nor* eran las moscas que presentan los genes de interés; *Whi*, las de ojos blancos; *Cyo*, el fenotipo de alas curvas y *Tm6b*, el fenotipo de pelo largo en el tórax. Eran trasladadas de tubo día por medio para la obtención de réplicas técnicas. Mientras que para conseguir réplicas biológicas, se obtenían las moscas del triplicado de cada genotipo en una fecha específica (fecha que dependía del ciclo de vida de cada genotipo).

**4.10. Inmunofluorescencia de cerebros de moscas adultas y lóbulos olfatorios.** Para observar la presencia de proteínas en los lóbulos olfatorios del cerebro se diseccionaron 15 cerebros de moscas adultas de 10 días, y luego se mantuvieron en un buffer PBS 1X durante 20 minutos para no destruir el tejido. Los cerebros ya listos fueron trasladados a un tubo de PFA 4% y se sometieron a rotación durante 20 minutos a temperatura ambiente e iluminación estándar, y luego el tubo fue enfriado hasta que los cerebros precipitaron al fondo del contenedor. Luego se les aplicó un lavado rápido con buffer PBT 3 veces manteniéndolos en el fondo, y se llevaron a rotación durante 5 minutos. Finalmente, el tubo se sometió a un lavado rápido con buffer PBS 1X (106).

A continuación se bloquearon las muestras con suero de cabra (NGS) durante una hora a temperatura ambiente, y luego se incubaron toda la noche a 4° C con anticuerpos primarios en una solución de NGS

al 5% con 5 ul de anticuerpo 1° Phosfo-Tau (Ser202, Thr205) (que es anticuerpo monoclonal (AT8) de ratón (MS)), 469,5 ul de PBS y 0,5 ul Anti-GFP (A11122) de ratón para los lóbulos olfatorios del cerebro (119).

Luego de seis lavados con buffer PBT 0,1% durante 10 minutos, los cerebros se incubaron con los anticuerpos secundarios de ratón durante una hora en una solución de NGS al 5 % con 0,5 ul de DAPI (para el núcleo), 469,5 ul de PBS y 5 ul de anticuerpo 2º de ratón 488 (#145822). Después fueron enjuagados con PBT 0,1% durante 10 minutos para su posterior montaje en Fluoromount (Thermo Fisher Scientific) entre 2 placas de cristal (2, 107–109).

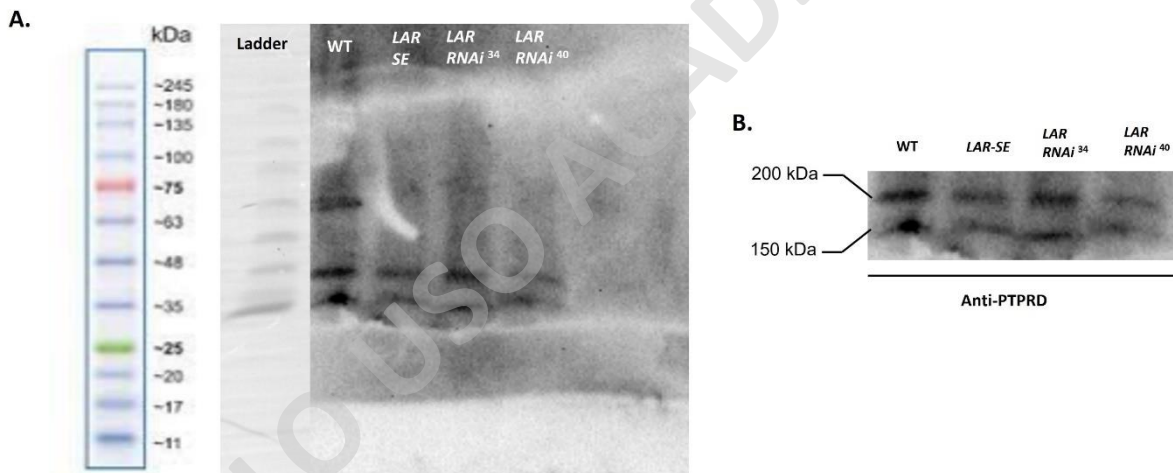
Para graficar los datos de GFP se abrieron las imágenes en “Image J” y se procesaron para obtener la concentración de proteínas. Se copiaron los datos obtenidos anteriormente de cada casillero a un Excel y se fue a “Analyze” → “ONE Way ANOVA” → “Multiple comparison” → “compare the mean column with other column”.

Finalmente se cliqueó en “graphs” → “individual values” eligiendo gráficos de barras y puntos. Las fotos de los cerebros fueron seleccionadas determinando el promedio de sus datos de intensidad para cada genotipo, eligiendo de entre todas la foto que tuvo el valor más cercano al promedio de todos sus datos.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. El anticuerpo anti-PTPRD reconoce su ortólogo Lar en *Drosophila*.

En este experimento se buscó identificar la presencia de Lar y sus diferentes niveles en cada genotipo de mosca adulta y confirmar la funcionalidad del anticuerpo con respecto a su homólogo en mamíferos. En la membrana se localizó la presencia de Lar en la descendencia de los cruces de genotipos durante la cuantificación de proteínas en el Western Blot, no obstante, la medida del peso molecular de esta proteína (ver figura 5A) no coincidió con la medida de la proteína (Figura 5B), por lo que es plausible que se hayan cometido un error al sacar antes de tiempo el gel de la electroforesis, cuya elaboración no se repitió para optimizar los recursos del experimento. Sin embargo, este error no impidió la presencia de resultados, pues aun así fue posible observar la presencia de bandas proteínas, indicativo de que el anticuerpo anti-PTPRD utilizado en mamíferos (ratas) fue capaz de reconocer molecularmente a su ortólogo Lar en *Drosophila* (111,112,121)

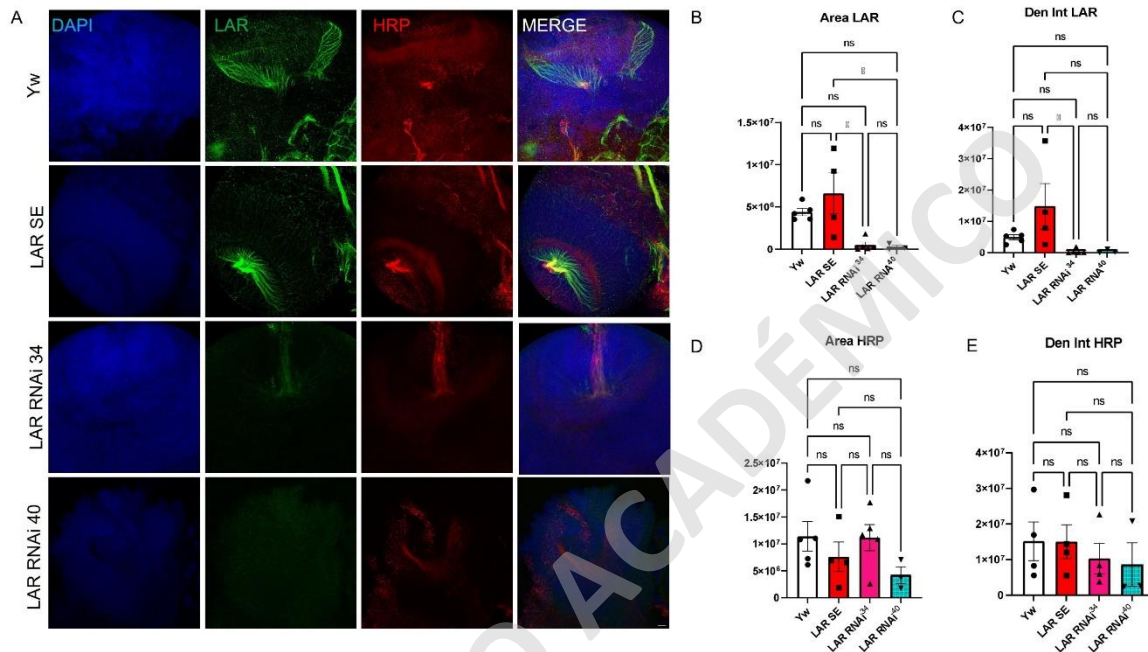


**Figura 5. Anti-PTPRD reconoce su ortólogo LAR en *Drosophila*.** En la figura A) se puede observar el peso molecular de las proteínas obtenidas de los genotipos usados, el genotipo control usado como estándar refleja una banda más elevada a -75 KDa y los demás genotipos de sobreexpresión y ARNi están casi igualados entre -35 a -48 KDa. Cabe recalcar que el resultado fue obtenido de un error cometido en el experimento. De hecho, la figura B) expone cual debería ser la concentración de las proteínas en presencia de Anti-PTPRD.

### 5.2. El anticuerpo anti PTPRD predicho en ratas logro identificar cambios de expresión en la proteína LAR en diferentes genotipos.

En este experimento de inmunofluorescencia se buscó la diferencia de concentración de la proteína Lar entre los diferentes genotipos de *Drosophila*, mediante un control *UAS-yw*, *UAS-Lar SE* y dos

genotipos de RNAi: *UAS Lar RNAi 34* y *UAS Lar RNAi 40*, con tal de observar cuál de estos dos genotipos era más efectivo en función de cuánto interferían a Lar (121). En las fotos obtenidas de microscopia (ver figura 6A) el genotipo SE obtuvo un brillo más intenso en el canal “LAR”. Este dato se respaldó gracias al cálculo del área y de la densidad de Lar en los gráficos (figuras 6B y 6C), de donde obtuvieron los valores más elevados superando al control (2,105,109).



**Figura 6. El anticuerpo anti PTPRD predicho en ratas logro identificar cambios de expresión en la proteína LAR en diferentes genotipos.** Las fotos mostradas de la figura A) se seleccionaron a partir del promedio de las proteínas; en esta figura la imagen DAPI del control Yw muestra cómo el tinte azul usado para teñir el núcleo de las células, usa una mayor superficie. Y en la foto de LAR de este, la proteína Lar expuesta a los anticuerpos se visualiza en verde, lo que asegura la presencia de esta proteína. En la imagen siguiente HRP diferencia la membrana de las neuronas en rojo y finalmente MERGE es la superposición de todas las muestras expuestas anteriormente. En *UAS Lar-SE*, DAPI muestra un color más opaco, pero más brillante en LAR, mientras que su HRP indica una presencia leve pero más condensada; en MERGE estas dos últimas imágenes sobresalen del núcleo haciéndose más notables. En *UAS Lar RNAi 34*, DAPI muestra mayor superficie y un color más cercano al estándar, en LAR expone menos superficie y un color menos nítido, al igual que HRP que también muestra una falta de brillo, por lo que era esperable que MERGE mostrara a un DAPI más sobresaliente y un LAR y HRP apenas notados. En *UAS Lar RNAi 40*, DAPI muestra una menor superficie y un color opaco, LAR muestra tonos más oscuros y ocupa la misma superficie que DAPI, en HRP se visualiza menos superficie y un color opaco nuevamente, y en MERGE el LAR no es bien percibido en toda la imagen, siendo HRP el más distinguible.

En la figura B) el área de LAR (la cantidad de Lar que se encuentra desplegada en el espacio de las neuronas) muestra que el genotipo de sobreexpresión es el dato con el mayor valor superando al control estándar mientras que los genotipos de interferencia obtuvieron los menores valores.

En la figura C) la densidad integrada de LAR (la masa de Lar contenida en el volumen entre las neuronas) tiene sus mayores valores en los genotipos de sobreexpresión.

La figura D) mide el área de HRP, siendo el control estándar el de más alto valor. Se puede observar que uno de los ARNi iguala su valor, mientras que el otro ARN de interferencia presenta el valor más bajo.

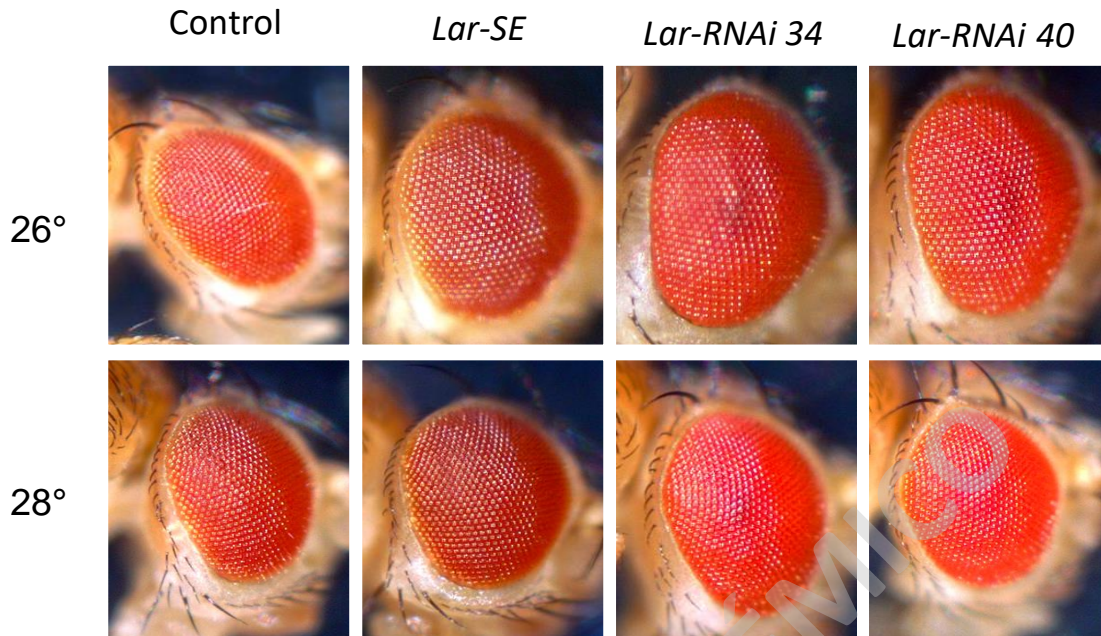
En la figura E) la densidad integrada de HRP, tanto como el genotipo control y como el de la sobreexpresión muestran valores muy similares, a la vez que ambos genotipos de interferencia poseen valores bajos (109).

### **5.3. Las variaciones de PTPRD afectan a la morfología de los ojos de las moscas.**

En este experimento se utilizó el ojo de *Drosophila* como modelo para evaluar cambios en los patrones, forma, tamaño, simetría y pigmentación. Esto se hizo mediante el cruce de GMR-GAL4 con los genotipos *yw*, *UAS Lar SE*, *UAS Lar RNAi 34* y *UAS Lar RNAi 40*, los que expuestos a diferentes temperaturas muestran un color diferente de ojo.

Como se observa a una temperatura de 26° C, *yw* (control) (Ver figura 7) usado como un estándar presenta un rojo más brillante, mientras que en *SE* el exceso de Lar resulta en ojos de un color más oscuro y una forma más redondeada, y luego se ambos genotipos de Lar RNAi también evidencian un color más oscuro.

Posteriormente se utilizaron las mismas moscas, pero criadas en una temperatura de 28° C para verificar si este factor genera cambios en el desarrollo de las moscas. El *yw* (control) usado presenta un rojo más oscuro, el *SE* presenta las mismas características que la temperatura anterior y los genotipos *Lar RNAi 34* y *Lar RNAi 40* tienen un color más claro comparado a la temperatura anterior. Todo esto parece indicar que la presencia de Lar parece afectar la interacción de GMR entre los diferentes genes, todo esto a raíz de la observación de las proteínas que conforman la pigmentación de los omatidios de *Drosophila* durante su desarrollo (100,102).

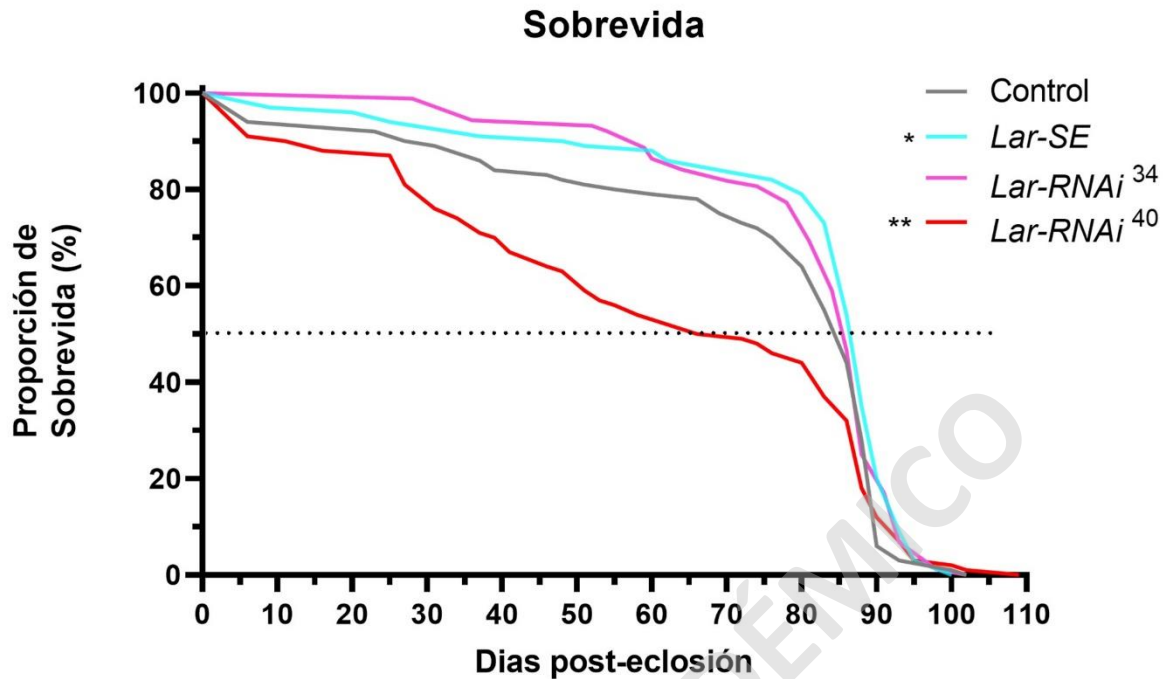


**Figura 7. Alteraciones morfológicas del ojo bajo regulación de Lar.** Fotos de la fisonomía óptica de los genotipos de *GMR-GAL4* cruzados con un control (*yw*), un sobreexpresor de la proteína LAR (*Lar-SE*) y dos ARNi Lar (marcados como *ARNi 34* y *RNAi 40*) siendo estas las réplicas biológicas, y las incubaciones a temperaturas de 26°C y 28°C las réplicas técnicas.

#### 5.4. El déficit de la molécula Lar reduce significativamente la esperanza de vida de las moscas.

Con la finalidad de comprender los cambios que traen las enfermedades neurodegenerativas durante el desarrollo se identificó, durante el experimento de sobrevivencia de *Drosophila*, el descenso temprano de las moscas expresando *Lar-RNAi 40*. Esto demostró la importancia de la función que cumple la molécula PTPRD a lo largo de su ciclo vital, siendo *Lar-RNAi 40* el primero en sufrir muertes tempranas (ver figura 7), cuyo descenso fue observado a los 60 días de vida. El efecto de *Lar-RNAi 40* fue mayor en comparación con *Lar-RNAi 34*, que se mantuvo constante con el control durante un conteo a lo largo de 100 días. Finalmente, la población de sobreexpresión del gen es la que presentó una mayor viabilidad antes de su descenso final, comparado con lo observado en el control estándar durante los 90 días (104). Este resultado sugiere un importante rol biológico de parte de Lar para el sistema nervioso, ya que la pérdida de sus funciones acorta la vida de la población estudiada.



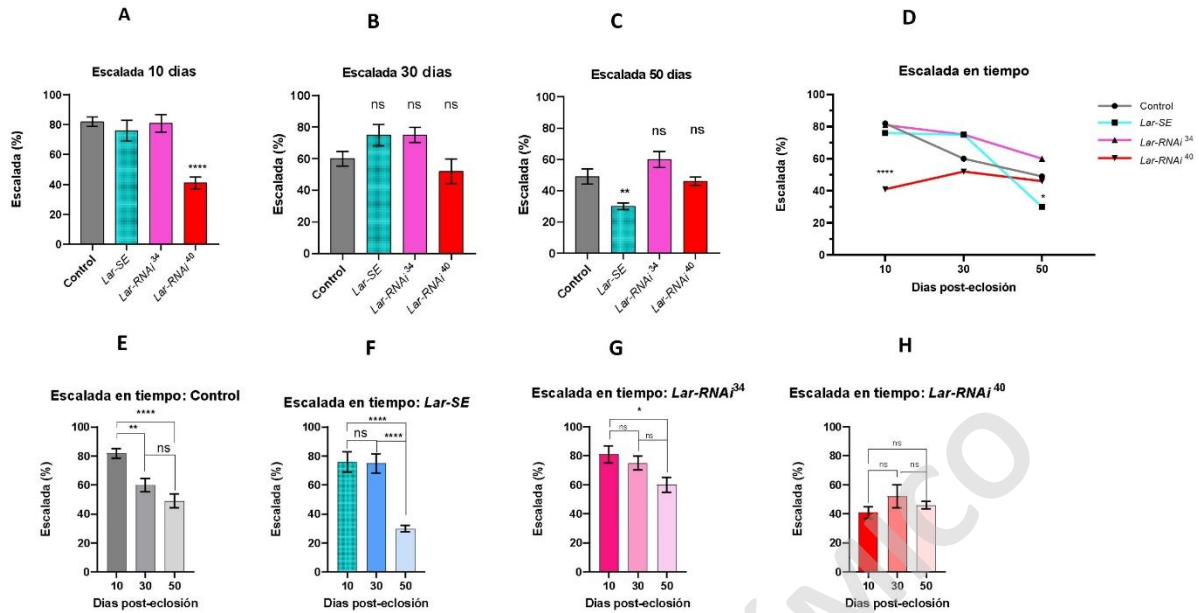


**Figura 8. Gráfico de sobrevivencia durante 100 días.** Los genotipos utilizados demostraron diferentes esperanzas de vida, donde los genotipos control, Lar-SE y Lar-RNAi 34 obtuvieron un descenso de población a partir del día 90, mientras que el genotipo Lar-RNAi 40 obtuvo un descenso desde los 60 días, aunque aun así se mantuvieron algunos pocos ejemplares durante varios días más, acercándose a la duración de los otros genotipos (n=100 moscas, \*\* P= 0,0057). El Lar-SE por otra parte muestra una leve pero significativa mayor durabilidad con respecto a la sobrevivencia de las moscas (n=100 moscas, \*P= 0,0159).

### 5.5. El déficit de Lar afecta la actividad motriz durante 50 días de vida.

En este experimento se evaluaron los cambios en la actividad motriz de *Drosophila* durante 50 días. Para ello se evaluó la escalada de los genotipos durante los días n°10, 30 y 50 (Ver figura 9). Iniciando con el control (Figura 9E) que va cambiando a lo largo del tiempo, se pueden comparar los demás genotipos: la SE (Figura 9F) obtuvo valores constantes por tener mayor concentración de Lar durante 30 días, pero tuvo una recaída al llegar a los 50 días llegando a tener un porcentaje de escalada más bajo que el control. Mientras que el RNAi 34 (Figura 9G), carente de Lar, muestra una escalada más cercana al valor del control, por lo que este genotipo no parece haber sido perjudicado en sus capacidades motrices, esto a diferencia de la escalada de las moscas de RNAi 40 (Figura 9H), quienes obtuvieron los resultados más bajos (105). Ante esto se concluyó que el déficit de Lar puede perjudicar las actividades motrices a corto plazo.

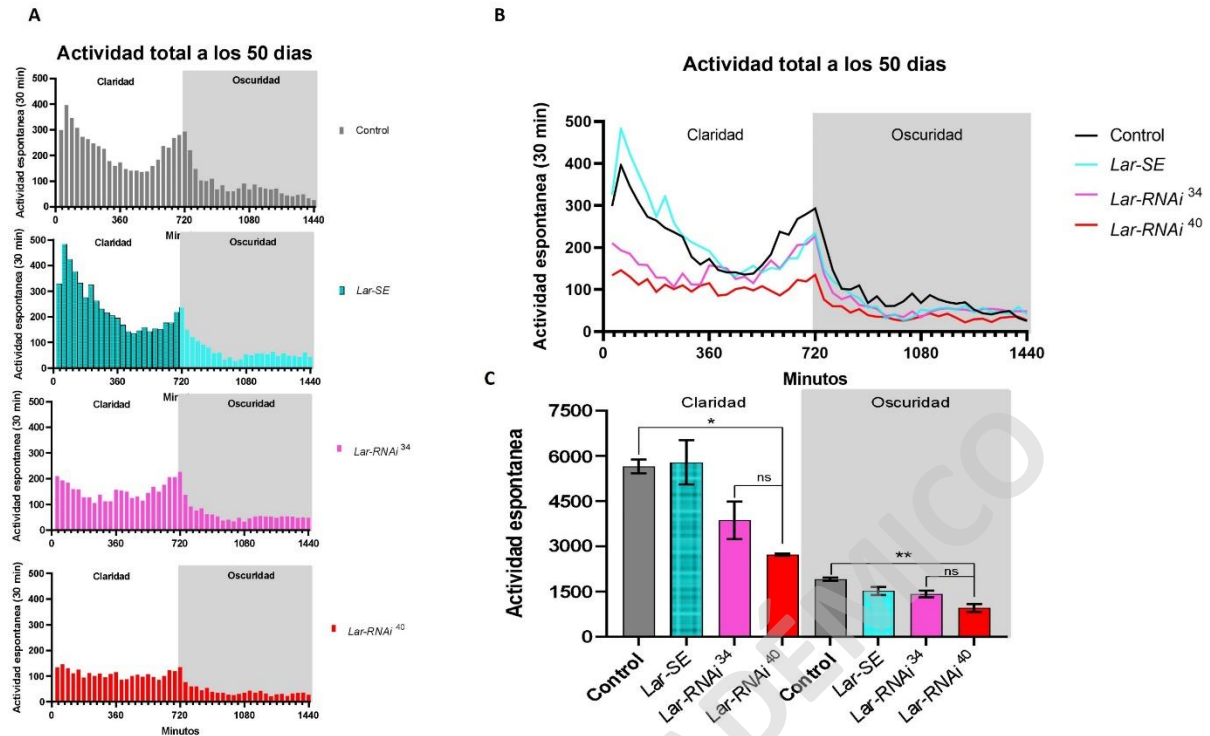




**Figura 9.** Estos gráficos muestran los resultados de escalada de los primeros 10 a 50 días en los gráficos A), B) y C), mientras que D) ilustra la comparación general de los genotipos control, SE y los RNAi. Y bajo estos se grafican las diferencias existentes entre los diferentes puntos de tiempo. En la figura E) la escalada control muestra el descenso más significativo durante los días 30 (\*\*P=0,0035) y 50 (\*\*\*\*P<0,0001). En el gráfico de Lar-SE de la figura F) los datos de la escalada se han mantenido durante los primeros 30 días, pero tienen una recaída al llegar al día 50 (30 vs. 50 \*\*\*\*P <0,0001). En el grafico G) la escalada de LAR RNAi 34 tiene unas leves recaídas en el día 30 y 50 (10 vs. 50 \*P=0,0239). Finalmente en el grafico H) se ve que la escalada de LAR RNAi 40 obtuvo los valores más bajos a lo largo de los 50 días, y aunque evidenciara un leve ascenso al día 30, no fue algo significativo, por lo que los valores fueron catalogados como constantes a lo largo del tiempo.

### 5.6. El déficit de Lar por parte del RNAi 40 afecta la actividad espontanea a los 50 días de vida.

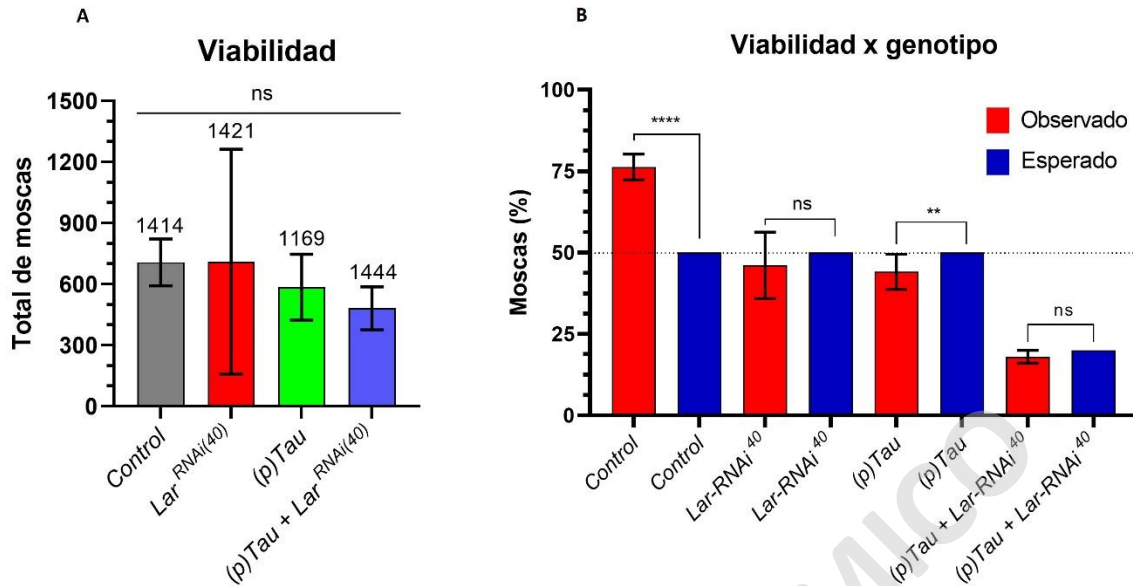
Se analizaron los cambios del ciclo sueño/vigilia en las *Drosophila* midiendo el rango de actividad de las moscas durante las fases claras/oscuras. Se identificó que los genotipos con RNAi (Ver figura 10A) obtuvieron los valores más bajos comparados al genotipo control, siendo RNAi 40 el valor más bajo en el ciclo diurno. Ocurre lo mismo en la fase oscura (Figura 10B y 10C), donde el RNAi 40 tiene el valor más bajo comparado con el control. De esto se puede concluir que el ciclo circadiano se ve afectado ante los cambios en los niveles de Lar (115–117)



**Figura 10.** Los gráficos indican la actividad espontánea de los diferentes genotipos en los ciclos de fase clara/oscura, utilizando el gráfico del control como estándar. En la fase clara el control tiene niveles altos de actividad a inicios del ciclo, la cual va disminuyendo hasta las 6 horas, para luego subir levemente durante otras 6 horas, mientras que en su fase oscura su actividad muestra valores bastante bajos. El gráfico del genotipo *Lar-SE* indica los valores más cercanos al control teniendo la varianza más elevada, mientras que los genotipos *Lar RNAi 34* y *40* tienen valores más bajos en comparación al control, en especial el *Lar RNAi 40* que fue el exponente más bajo. El gráfico B) muestra de forma más generalizada de los valores de los genotipos comparados con los demás, siendo *Lar-SE* el que tuvo un pico más alto a principios de la fase clara superando al control, pero decreciendo de igual manera hasta llegar a la fase oscura. En el gráfico C) se muestran los valores de los genotipos y la significancia de la diferencia entre niveles a través de asteriscos.

### 5.7. Los cambios en la expresión de Lar no interfieren con los comportamientos de procreación.

En este experimento se inicia la validación de la hipótesis, pues se observaron los cambios en el índice de fertilidad de los diferentes genotipos. Aquí los datos de viabilidad del total de la descendencia obtenida a partir del cruce de moscas *Elav(x)* con *Lar RNAi 40* y la coexpresión (p) *Tau + Lar RNAi 40* no muestran cambios significativos en la viabilidad de las *Drosophilas*, teniendo un valor casi equitativo al estándar (Ver figura 11A y 11B), sin embargo, no superó su porcentaje promedio de moscas debido a la cantidad de variables en su genotipo (87,118).



**Figura 11.** En el gráfico A) se observan los valores de cada genotipo con el número de nacimientos obtenidos a partir del conteo de moscas adultas encima, siendo el genotipo (p)Tau + Lar-RNAi 40 el que btuvo la mayor cantidad de nacimientos, de 1444 (P value= 0,5680 para Control vs. (p)Tau + Lar RNAi(40)), mientras que la varianza más elevada fue del genotipo de Lar RNAi 40 (P value >0,9999 para Control vs. Lar RNAi(40) y (p) Tau siendo el valor más bajo con 1169 crías (p value= 0,9437 para Control vs. (p)Tau).

Mientras, el gráfico B) de “viabilidad x genotipo” muestra la diferencia que hay entre los datos esperados contra los datos obtenidos sobre la cantidad de moscas (en porcentaje). Los datos observados se ilustran en color rojo y los datos esperados en color azul, los asteriscos indican el grado de significancia de la diferencia existente entre ambos tipos de datos. Los datos de la media son \*\*\*\*P value <0,0001, ns P value=0,5593, \*\*P value=0,0072.

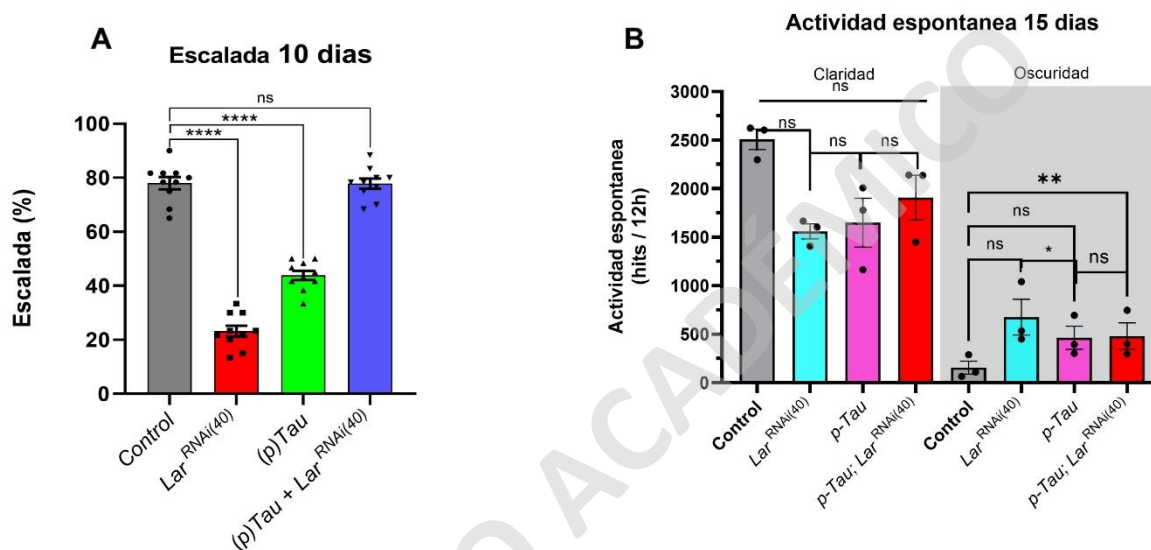
### 5.8. La coexpresión (p)Tau + Lar RNAi 40 no muestra efectos negativos en la actividad motriz y espontanea.

Se analizaron las escaladas de 10 días y la ctividad espontánea con el fin de observar las particularidades que presentaba el nuevo genotipo coexpresión (p)Tau + Lar RNAi 40. De entre los genotipos, (p)Tau + Lar RNAi 40 fue el único en alcanzar valores semejantes al control durante el experimento de escalada (Control vs. p-Tau; Lar RNAi 40, p>0,9999), además de obtener el valor más elevado de actividad espontánea durante la fase oscura (Control vs. p-Tau; Lar RNAi 40, p=0,0082).

No obstante, aunque la actividad de esta coexpresión durante la fase clara fue la segunda más alta, el cambio no fue significativo; mientras, los genotipos Lar 40 (Control vs. Lar RNAi 40, p=0,0578) y (p)Tau (Control vs. p-Tau, p=0,1214) obtuvieron los valores esperados respecto a los roles que cumplen en el sistema nervioso. Adicionalmente, una comparación realizada entre (p)Tau y (p)Tau + Lar RNAi 40

durante la escalada indicó una notable diferencia en sus valores siendo la coexpresión el valor más elevado, mientras que ambos en su actividad espontánea poseen niveles similares (105). Aquí se logra hacer una observación importante: la anulación del déficit motor causado por (p) Tau co-expresado junto al *Lar RNAi 40*, sugiriendo el rol fundamental que puede tener esta proteína en la patogénesis causada por p Tau en el sistema nervioso.

**Figura 12.** En el grafico A) se observa como el genotipo *p)Tau + Lar RNAi 40* tuvo el mismo valor que el control



llegando a no ser significativo (ns), comparado con los genotipos Lar RNAi 40 y (p) Tau tuvieron los valores de motricidad más bajos establecidos durante la escalada comparado con el control, cuyo grado de diferencia es señalado con asteriscos.

En el grafico B) se ilustra la actividad espontánea en un curso de 12 horas; el control tomado como estándar fue el valor más alto, seguido de la coexpresión de p-Tau; luego de Lar RNAi 40, después de p-Tau y finalmente de Lar RNAi 40, aunque ninguno de estos datos fue significativo durante la fase clara (ns) dando a entender que la diferencia resultó nula, siendo ns P=0,2943, nsP=0,3771, nsP=0,2522. En la fase oscura p-Tau; Lar RNAi 40 demostró un mayor valor superando al control. Señalado como Control vs. Lar RNAi(40) ns P=0,0578, Control vs. p-Tau ns P=0,1214, Control vs. p-Tau; Lar RNAi(40) \*\*P=0,0082.

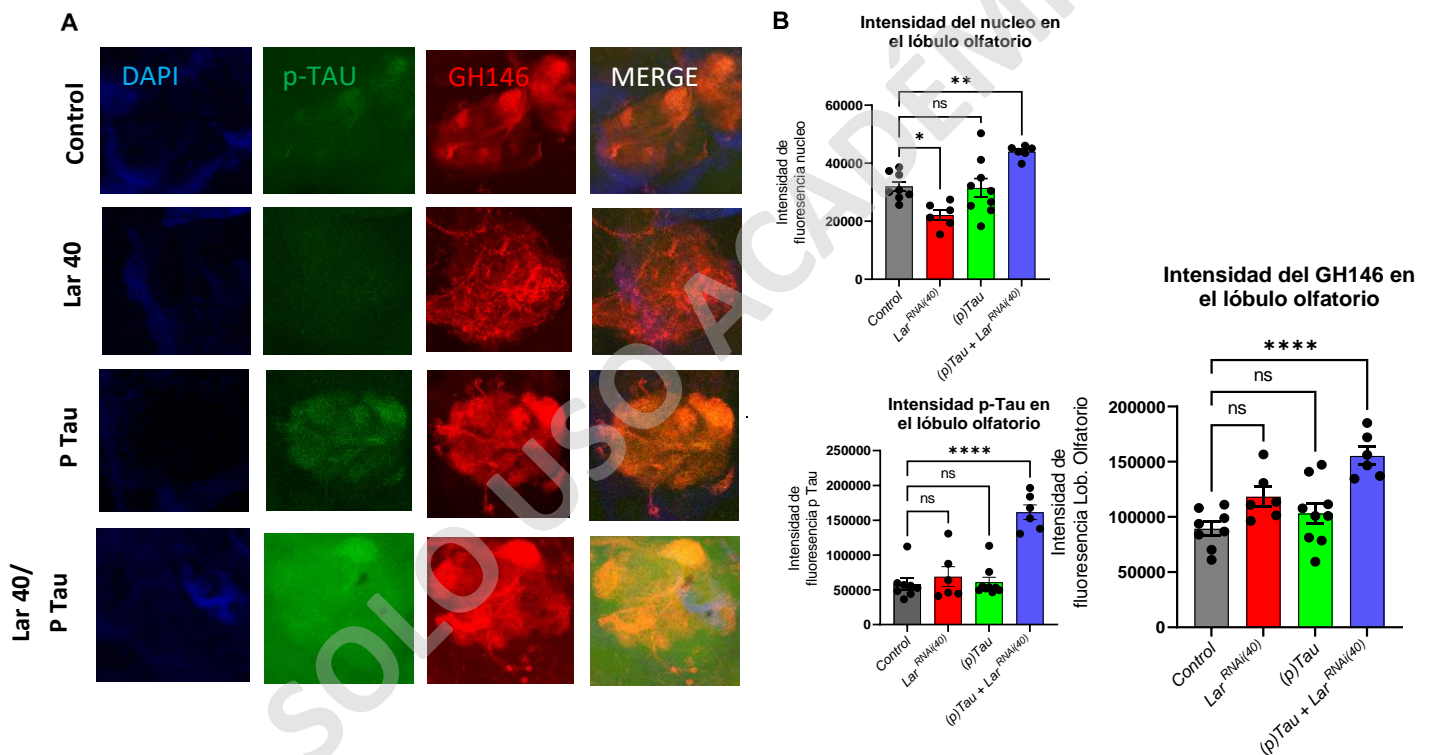
### 5.9. La coexpresión de Tau + Lar RNAi 40 tiene mayor intensidad en la inmunofluorescencia de canal (p) TAU.

El experimento de inmunofluorescencia de cerebros adultos de *Drosophila* en los lóbulos olfativos buscaba verificar cambios en las proteínas de p Tau, y se identificó durante el muestreo que la coexpresión de genotipos Lar 40/ Tau expone una mayor concentración de p Tau, pues esta proteína

abarcaba más área de pigmentación que los demás canales de TAU y GH146 (marcador de lóbulos olfativos) (Ver figura 13A).

Respaldado en los gráficos (figura 13B), se observa en el canal del núcleo que el Lar 40 tiene el valor más bajo, Tau(p) está más cercano al valor del control y Tau (p) + Lar RNAi 40 tiene el valor más alto, superando al control. En p-TAU, el Lar 40 y Tau(p) están igualados, mientras que el valor del Tau (p) + Lar 40 fue el más alto. Finalmente en la intensidad de GH146, el Lar 40 y Tau(p) están igualados, mientras que al valor del Tau (p) + Lar 40 fue el valor más alto, nuevamente superando al control.

Observando esto se puede determinar una relación entre p-Tau y Lar 40 en las neuronas olfativas, cuya inmunofluorescencia se ve incrementada por el déficit de Lar, pero sin afectar el número de células nerviosas (107,108).



**Figura 13.** En la figura A) están las fotos de los cerebros de moscas adultas bajo imágenes de inmunofluorescencia centradas en p Tau y los lóbulos olfatorios de la mosca (GH146), observando las fotos del núcleo en azul, el “TAU” en verde, el “GH146” en rojo y el “merge” como una amalgama de los 3 canales anteriores. Los datos graficados en la figura B) indican el promedio de la intensidad de inmunofluorescencia de cada cerebro de los genotipos, la cantidad varía en cada caso en los canales del núcleo, en TAU y el GH146. La media en la intensidad de núcleo en el lóbulo olfatorio fue de \*P=0,0241, ns P=0,9969, \*\*P=0,0057, en la intensidad p-tau en el lóbulo olfatorio la media fue de ns P=0,7943, ns P=00,9940, \*\*\*\*P<0,0001 y en intensidad del GH146 en el lóbulo olfatorio fue ns P=0,0693, ns P =0,4724, \*\*\*\*P <0,0001.

## 6. DISCUSIÓN.

En este trabajo se buscaba encontrar la importancia de PTPRD en las taupatías, evidenciando su estrecha implicancia en su relación con las moléculas de fosfatos, dicha relación dio paso a una serie de experimentos que tenían como objetivo explorar una posible diana terapéutica para una enfermedad neurodegenerativa que ha afectado a una importante cantidad de personas a nivel mundial.

Los resultados obtenidos con la experimentación de Western Blot y la cuantificación, a pesar de que las proteínas continuaron comprimidas en la membrana por estar poco tiempo en la electroforesis, mostraron que los anticuerpos para PTPRD reconocieron al Lar de las moscas en la membrana, lo que da un punto de inicio a los avances del experimento, lo mismo aplica para la inmunofluorescencia realizada, que fue refutada por los elevados niveles de Lar en el área y densidad obtenidos en los genotipos de SE, mientras que los genotipos de RNAi tenían niveles de Lar más bajos demostrando la similitud y funcionalidad de un anticuerpo mamífero aplicado en la fisiología de la *Drosophila* apoyado por la asimilación del anticuerpo de anti PTPRD en la proteína Lar.

En las observaciones de la morfología de ojos, los ojos de las moscas pasaron por diferentes cambios en base a su coloración y forma, y aunque no se midió si Lar afectaba la funcionalidad de este órgano se tomó en cuenta que las diferencias de temperatura afectaron el desarrollo de la mosca.

En la escalada, las moscas con SE tuvieron valores más elevados a diferencia de *Lar RNAi 34* y *Lar RNAi 40*, dando a entender la importancia que tiene Lar a lo largo del desarrollo en el sistema nervioso.

Mientras los resultados las moscas *Lar RNAi 34* fueron valores bastante cercanos a los del control establecido, a diferencia de *Lar RNAi 40*, la cual demostró valores de escalada menores a la media durante 50 días, esta diferencia parece ser por una variabilidad en la expresión de los transgenes utilizados, generando diferencias de activación en los genotipos de las moscas (92,93).

En la sobrevivencia se confirmó la importancia de Lar en los genotipos de RNAi Lar 40 al tener valores bajos con respecto a la esperanza de vida y en efecto fue el único genotipo cuyos individuos sufrieron de muertes tempranas, esto implica que la importancia de Lar en el sistema nervioso permite un funcionamiento adecuado del sujeto.

En la escalada de 10 días el valor de tau + RNAi 40 fue el valor más elevado en la gráfica casi igualando al control, caso bastante curioso considerando que se expuso en el mismo experimento el potencial negativo que tienen *LAR RNAi 40* que interfiere con la producción de la PTPRD y (p)Tau que expresa Tau, que puede ser hiperfosforilado de humanos en moscas, sin embargo, la coexpresión de estos dos genotipos en las moscas obtuvieron valores bastantes cerca del control, a pesar de ello sus valores son

semejantes a los demás genotipos en el experimento de los ciclos sueño/vigilia, dado que ambos experimentos fueron realizados en un lapso de 10 días (45, 93).

La inmunofluorescencia de los lóbulos olfativos identificó que la coexpresión tau + Lar 40 obtuvo los valores más altos en los datos de intensidad de fluorescencia de tau hiperfosforilado, en cada sección del cerebro (DAPI, (p)Tau y GH146), de este último su área estaba específicamente ligada a los lóbulos olfativos, esto da a entender que la coexpresión de tau + Lar 40 aumenta la cantidad de tau hiperfosforilado en el cerebro de la mosca, lo cual puede llegar a ser perjudicial a largo plazo, pues las moscas utilizadas tenían no más de 10 días. El conteo del número de moscas nacidas de cada genotipo cruzado se registró teniendo replicas biológicas y replicas técnicas para obtener una medida de la fertilidad de los cruces.

SOLO USO ACADÉMICO

## 7. CONCLUSIÓN.

Para finalizar este estudio determinó los efectos de la proteína tirosina fosfatasa de receptor delta (PTPRD) en el desarrollo, mientras se observaba su relación con las taupatías. Los anticuerpos anti-PTPRD utilizados en la cuantificación de proteínas (usados previamente en modelos mamíferos) resultaron ser compatibles con la proteína homóloga, Lar, encontrada en las moscas *D. melanogaster*. En los experimentos realizados se encontró que los cambios en la expresión de Lar afectaron a las proteínas de pigmentación y a la forma de los ojos de las *Drosophilas*. El déficit de Lar durante el desarrollo reduce significativamente la esperanza de vida de las moscas, lo que llevó a una reducción de la actividad motriz, que fue medida durante la escalada y durante el estudio del ciclo circadiano. Para finalizar, a partir de las comparaciones hechas en el presente estudio sobre la relación de PTPRD con las taupatías en el sistema nervioso, se concluyó que la importancia de la PTPRD está sujeta a las condiciones fisiológicas del sujeto y a los niveles que presente a lo largo del tiempo (tal como se observó en los experimentos de vivencia y disección de adultos). Por esto su uso terapéutico contra las taupatías debe ser visto de forma cuidadosa y medida para no desencadenar problemas a largo plazo.

SOLO USO ACADÉMICO



## **8. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS.**

La PTPRD es una proteína que ha tomado interés por su relación con las taupatías, la experimentación de esta proteína usando moscas como modelo experimental puede ser un excelente método para la industria farmacéutica en la búsqueda de potenciales terapias para el tratamiento de estas taupatías, dado que las funciones que cumple PTPRD controlan de manera coordinada los niveles de fosforilación de las proteínas para los procesos celulares, como lo son el crecimiento, la diferenciación, la migración, la supervivencia y la apoptosis (45).

Dicho esto, las estrategias para modular la proteína y usarlas con fines terapéuticos han sido temas de investigación importantes en el ámbito biomédico y como tal los avances de este estudio pueden ayudar a reducir las enfermedades neurodegenerativas retrasando sus efectos. Y para proseguir con este trabajo, la disponibilidad de tiempo y la constancia a la hora de sacar nuevos resultados es crucial para su continuación.

SOLO USO ACADÉMICO

## 9. REFERENCIAS.

1. Garre-Olmo J. Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias. *Rev Neurol*. 2018 Jun 1;66(11):377–86.
2. Cindy Beharry MEA and A del CA. Expression of Alzheimer-Like Pathological Human Tau Induces a Behavioral Motor and Olfactory Learning Deficit in *Drosophila melanogaster*. New York, USA; 13AD May.
3. Rachel Drysdale. The *Drosophila melanogaster* genome sequencing and annotation projects: A status report. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2003 Apr 9;2(2):128–34.
4. Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 Oct [cited 2022 Nov 7];2(7):1–25. Available from: /pmc/articles/PMC3385935/
5. von Bernhardt M. R. Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil Neuropsiquiatr* [Internet]. 2005 Jun [cited 2022 Nov 5];43(2):123–32. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-92272005000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92272005000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
6. Organización Mundial de la Salud. Seguimiento de la declaración política de la tercera reunión de alto nivel de la Asamblea General sobre la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles. 2022 Apr.
7. Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2019 [cited 2022 Nov 13];4(1). Available from: /pmc/articles/PMC6799833/
8. Lu B, Vogel H. *Drosophila* Models of Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2022 Nov 6];4:315. Available from: /pmc/articles/PMC3045805/
9. Ambegaokar SS, Jackson GR. Functional genomic screen and network analysis reveal novel modifiers of tauopathy dissociated from tau phosphorylation. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 Dec 12 [cited 2022 Nov 4];20(24):4947. Available from: /pmc/articles/PMC3221533/
10. Brettschneider J, del Tredici K, Lee VMY, Trojanowski JQ. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Nov 2];16(2):109. Available from: /pmc/articles/PMC4312418/
11. Gallo G. Tau is actin up in Alzheimer's disease. *Nature Cell Biology* 2007 9:2 [Internet]. 2007 Feb [cited 2022 Nov 29];9(2):133–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb0207-133>

12. Eshraghi M, Adlimoghaddam A, Mahmoodzadeh A, Sharifzad F, Yasavoli-sharahi H, Lorzadeh S, et al. Alzheimer's Disease Pathogenesis: Role of Autophagy and Mitophagy Focusing in Microglia. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Nov 2];22(7):3330. Available from: /pmc/articles/PMC8036323/
13. Chakraborty R, Vepuri V, Mhatre SD, Paddock BE, Miller S, Michelson SJ, et al. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's Disease Model: Pharmacological Rescue of Cognitive Defects. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2022 Nov 4];6(6). Available from: /pmc/articles/PMC3108982/
14. Iqbal K, del C. Alonso A, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2005 Jan 3;1739(2–3):198–210.
15. Medeiros R, Baglietto-Vargas D, Laferla FM. The Role of Tau in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *CNS Neurosci Ther* [Internet]. 2011 Oct [cited 2022 Nov 5];17(5):514. Available from: /pmc/articles/PMC4072215/
16. Enfermedad de Alzheimer: parte 2 [Internet]. [cited 2023 Jan 15]. Available from: <https://www.hipocampo.org/alzheimer-2.asp>
17. LESTER I. BINDER AF and LIR. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. Charlottesville, Virginia ; 2022 Nov.
18. Gu L, Guo Z. Alzheimer's A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J Neurochem*. 2013 Aug;126(3):305–11.
19. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, et al. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2022 Nov 2];12(3):292. Available from: /pmc/articles/PMC6417794/
20. Jucker M, Walker LC. Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Nov 2];21(10):1341. Available from: /pmc/articles/PMC6375686/
21. Nativio R, Donahue G, Berson A, Lan Y, Amlie-Wolf A, Tuzer F, et al. Dysregulation of the epigenetic landscape of normal aging in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Nov 3];21(4):497. Available from: /pmc/articles/PMC6124498/
22. Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L, et al. Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1997 [cited 2023 Jan 15];8(2):353. Available from: /pmc/articles/PMC276085/?report=abstract
23. Kristie Stefanoska. Alzheimer's disease: Ablating single master site abolishes tau hyperphosphorylation. *SCIENCE ADVANCES*. 2022 Jul 6;1–15.

24. Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer [Internet]. [cited 2022 Nov 3]. Available from: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0016-38132004000300014](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132004000300014)
25. El rol de la proteína Tau en las enfermedades neurodegenerativas | CONICET [Internet]. [cited 2023 Jan 15]. Available from: <https://www.conicet.gov.ar/el-rol-de-la-proteina-tau-en-las-enfermedades-neurodegenerativas/>
26. LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* [Internet]. 2005 [cited 2022 Nov 4];11(4):170–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15823755/>
27. Bird TD. Genetic Aspects of Alzheimer Disease. *Genet Med* [Internet]. 2008 Apr [cited 2022 Nov 3];10(4):231. Available from: </pmc/articles/PMC2690397/>
28. Hsieh YC, Guo C, Yalamanchili HK, Abreha M, Al-Ouran R, Li Y, et al. Tau-Mediated Disruption of the Spliceosome Triggers Cryptic RNA Splicing and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Cell Rep* [Internet]. 2019 Oct 10 [cited 2022 Nov 3];29(2):301. Available from: </pmc/articles/PMC6919331/>
29. Spires-Jones TL, Stoothoff WH, de Calignon A, Jones PB, Hyman BT. Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci* [Internet]. 2009 Mar [cited 2022 Nov 4];32(3):150–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19162340/>
30. Barbier P, Zejneli O, Martinho M, Lasorsa A, Belle V, Smet-Nocca C, et al. Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2023 Jan 11];11(JUL). Available from: </pmc/articles/PMC6692637/>
31. Takeda S. Tau Propagation as a Diagnostic and Therapeutic Target for Dementia: Potentials and Unanswered Questions. *Front Neurosci*. 2019 Dec 13;13:1274.
32. ▷ Cómo afecta el Alzheimer al cerebro y su diagnóstico mediante la tomografía por emisión de positrones (PET) - Ocronos - Editorial Científico-Técnica [Internet]. [cited 2023 Mar 23]. Available from: <https://revistamedica.com/alzheimer-cerebro-diagnostico-tomografia-emision-de-positrones-pet/>
33. Gao YL, Wang N, Sun FR, Cao XP, Zhang W, Yu JT. Tau in neurodegenerative disease. *Ann Transl Med* [Internet]. 2018 May [cited 2022 Nov 5];6(10):175–175. Available from: <https://atm.amegroups.com/article/view/19456/html>
34. Mandelkow EM, Schweers O, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Trinczek B, et al. Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1996 [cited 2022 Nov 4];777:96–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8624133/>
35. Chung CG, Lee H, Lee SB. Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Nov 7];75(17):3159. Available from: </pmc/articles/PMC6063327/>

36. Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow E, Mandelkow EM. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1995 [cited 2022 Nov 4];6(12):1887. Available from: </pmc/articles/PMC366657/?report=abstract>
37. Ciechanover A, Kwon YT. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Experimental & Molecular Medicine* 2015 47:3 [Internet]. 2015 Mar 13 [cited 2022 Nov 7];47(3):e147–e147. Available from: <https://www.nature.com/articles/emm2014117>
38. Tudor A, Fulg IESVKMLSTLSBTH and MBF. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol*. 2014 May 30;9(2):139–48.
39. Krueger NX, Streuli M, Saito H. Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J* [Internet]. 1990 [cited 2022 Nov 3];9(10):3241. Available from: </pmc/articles/PMC552056/?report=abstract>
40. Uhl GR, Martinez MJ. PTPRD: neurobiology, genetics, and initial pharmacology of a pleiotropic contributor to brain phenotypes. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Nov 2];1451(1):112. Available from: </pmc/articles/PMC6629525/>
41. Tomita H, Cornejo F, Aranda-Pino B, Woodard CL, Rioseco CC, Neel BG, et al. The Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Delta Regulates Developmental Neurogenesis. *Cell Rep*. 2020 Jan 7;30(1):215-228.e5.
42. Uhl GR, Henderson IM, Martinez Phd M, Stokes MP, Uhl G, Facnp F. Reduced PTPRD expression differentially alters brain phosphotyrosine phosphoproteomic profiles of 2 and 12 month-old mice. *bioRxiv* [Internet]. 2021 Mar 2 [cited 2022 Nov 2];2021.03.02.433536. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.03.02.433536v1>
43. PTPRD - Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Nov 2]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P23468/entry>
44. Krueger NX, Reddy RS, Johnson K, Bateman J, Kaufmann N, Scalice D, et al. Functions of the Ectodomain and Cytoplasmic Tyrosine Phosphatase Domains of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Dlar In Vivo. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2022 Nov 5];23(19):6909–21. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.23.19.6909-6921.2003>
45. He RJ, Yu ZH, Zhang RY, Zhang ZY. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2014 Sep 25 [cited 2022 Nov 3];35(10):1227. Available from: </pmc/articles/PMC4186993/>
46. Yu ZH, Zhang ZY. Regulatory Mechanisms and Novel Therapeutic Targeting Strategies for Protein Tyrosine Phosphatases. *Chem Rev* [Internet]. 2018 Feb 2 [cited 2022 Nov 3];118(3):1069. Available from: </pmc/articles/PMC5812791/>

47. Cornejo F, Cortés BI, Findlay GM, Cancino GI. LAR Receptor Tyrosine Phosphatase Family in Healthy and Diseased Brain. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Dec 13;9:3475.
48. Uhl GR, Martinez MJ. PTPRD: neurobiology, genetics, and initial pharmacology of a pleiotropic contributor to brain phenotypes. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Mar 22];1451(1):112. Available from: [/pmc/articles/PMC6629525/](#)
49. Hatzihristidis T, Desai N, Hutchins AP, Meng TC, Tremblay ML, Miranda-Saavedra D. A Drosophila-centric view of protein tyrosine phosphatases. *FEBS Lett* [Internet]. 2015 Apr 13 [cited 2022 Nov 3];589(9):951–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2015.03.005>
50. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: From genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Nov;7(11):833–46.
51. Streuli M, Krueger NX, Tsai AYM, Saito H. A family of receptor-linked protein tyrosine phosphatases in humans and Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1989 [cited 2022 Nov 2];86(22):8698. Available from: [/pmc/articles/PMC298355/?report=abstract](#)
52. Meehan M, Parthasarathi L, Moran N, Jefferies CA, Foley N, Lazzari E, et al. Protein tyrosine phosphatase receptor delta acts as a neuroblastoma tumor suppressor by destabilizing the aurora kinase a oncogene. *Mol Cancer* [Internet]. 2012 Feb 5 [cited 2022 Nov 2];11:6. Available from: [/pmc/articles/PMC3395855/](#)
53. Chan HYE, Bonini NM. Drosophila models of human neurodegenerative disease. *Cell Death & Differentiation* 2000 7:11 [Internet]. 2000 Nov 9 [cited 2022 Nov 6];7(11):1075–80. Available from: <https://www.nature.com/articles/4400757>
54. Trotter MB, Stephens TD, McGrath JP, Steinhilb ML. The Drosophila model system to study tau action. *Methods Cell Biol* [Internet]. 2017 [cited 2022 Nov 3];141:259–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28882306/>
55. Bellen HJ, Tong C, Tsuda H. 100 years of Drosophila research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2010 Apr [cited 2022 Nov 2];11(7):514. Available from: [/pmc/articles/PMC4022039/](#)
56. Adrion JR, Hahn MW, Cooper BS. Revisiting classic clines in Drosophila melanogaster in the age of genomics. *Trends Genet* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2022 Nov 3];31(8):434. Available from: [/pmc/articles/PMC4526433/](#)
57. Ackermann M, Bijlsma R, James AC, Partridge L, Zwaan BJ, Stearns SC. Effects of assay conditions in life history experiments with Drosophila melanogaster. *J Evol Biol* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2022 Nov 3];14(2):199–209. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1420-9101.2001.00281.x>

58. Markow TA. The secret lives of *Drosophila* flies. *Elife* [Internet]. 2015 Jun 4 [cited 2023 Mar 24];4(JUNE). Available from: [/pmc/articles/PMC4454838/](#)
59. Yao Z, Macara AM, Lelito KR, Minosyan TY, Shafer OT. Analysis of functional neuronal connectivity in the *Drosophila* brain. *J Neurophysiol* [Internet]. 2012 Jul 7 [cited 2022 Nov 5];108(2):684. Available from: [/pmc/articles/PMC3404787/](#)
60. Scheffer LK, Xu CS, Januszewski M, Lu Z, Takemura SY, Hayworth KJ, et al. A connectome and analysis of the adult *drosophila* central brain. *Elife*. 2020 Sep 1;9:1–74.
61. Gatto CL, Broadie K. *Drosophila* Modeling of Heritable Neurodevelopmental Disorders. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2022 Nov 5];21(6):834. Available from: [/pmc/articles/PMC3172335/](#)
62. Jeibmann A, Paulus W. *Drosophila melanogaster* as a Model Organism of Brain Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2009 Feb [cited 2022 Nov 4];10(2):407. Available from: [/pmc/articles/PMC2660653/](#)
63. Jackson GR. Guide to Understanding *Drosophila* Models of Neurodegenerative Diseases. *PLoS Biol* [Internet]. 2008 Feb [cited 2022 Nov 2];6(2):0236–9. Available from: [/pmc/articles/PMC2253643/](#)
64. McGurk L, Berson A, Bonini NM. *Drosophila* as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 Nov 2];201(2):377. Available from: [/pmc/articles/PMC4596656/](#)
65. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* [Internet]. 1993 Jun 1 [cited 2023 Mar 24];118(2):401–15. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/118/2/401/37970/Targeted-gene-expression-as-a-means-of-altering>
66. Kosmidis S, Grammenoudi S, Papanikolopoulou K, Skoulakis EMC. Differential Effects of Tau on the Integrity and Function of Neurons Essential for Learning in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2022 Nov 5];30(2):464. Available from: [/pmc/articles/PMC6632986/](#)
67. WM Gelbart MCBMWRJCSRTDEMARDEWGMA de GTKKMDGVS y CT. FlyBase: a *Drosophila* database. *Nucleic Acids Res*. 1996 Sep 19;25(1):63–6.
68. Yamamoto S, Jaiswal M, Charng WL, Gambin T, Karaca E, Mirzaa G, et al. A *Drosophila* genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell* [Internet]. 2014 Sep 9 [cited 2022 Nov 5];159(1):200. Available from: [/pmc/articles/PMC4298142/](#)
69. Hales KG, Korey CA, Larracuenta AM, Roberts DM. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2022 Nov 2];201(3):815–42. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/201/3/815/5930114>

70. Larkin A, Marygold SJ, Antonazzo G, Attrill H, dos Santos G, Garapati P v, et al. FlyBase: updates to the *Drosophila melanogaster* knowledge base. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 Jan 8 [cited 2022 Nov 2];49(D1):D899–907. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D899/5997437>
71. Moloney A, Sattelle DB, Lomas DA, Crowther DC. Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2010 Apr [cited 2022 Nov 3];35(4):228. Available from: </pmc/articles/PMC2856915/>
72. Prüßing K, Voigt A, Schulz JB. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2013 Nov 22 [cited 2022 Nov 2];8(1):35. Available from: </pmc/articles/PMC4222597/>
73. Cheng X, Song C, Du Y, Gaur U, Yang M. Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease: Insights from *Drosophila melanogaster*. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Nov 2];21(13):1–17. Available from: </pmc/articles/PMC7370071/>
74. Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* [Internet]. 2001 [cited 2022 Nov 4];11(6):1114. Available from: </pmc/articles/PMC311089/>
75. Fortini ME, Skupski MP, Boguski MS, Hariharan IK. A Survey of Human Disease Gene Counterparts in the *Drosophila* Genome. *J Cell Biol* [Internet]. 2000 Jul 7 [cited 2022 Nov 3];150(2):23. Available from: </pmc/articles/PMC2180233/>
76. Cowan CM, Sealey MA, Quraishe S, Targett MT, Marcellus K, Allan D, et al. Modelling Tauopathies in *Drosophila*: Insights from the Fruit Fly. *Int J Alzheimers Dis* [Internet]. 2011 [cited 2022 Nov 3];2011:16. Available from: </pmc/articles/PMC3255107/>
77. Gistelink M, Lambert JC, Callaerts P, Dermaut B, Dourlen P. *Drosophila* Models of Tauopathies: What Have We Learned? *Int J Alzheimers Dis* [Internet]. 2012 [cited 2022 Nov 5];2012:14. Available from: </pmc/articles/PMC3373119/>
78. Cowan CM, Chee F, Shepherd D, Mudher A. Disruption of neuronal function by soluble hyperphosphorylated tau in a *Drosophila* model of tauopathy. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2010 Apr [cited 2022 Nov 4];38(2):564–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20298222/>
79. Shulman JM, Imboywa S, Giagtzoglou N, Powers MP, Hu Y, Devenport D, et al. Functional screening in *Drosophila* identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2014 Feb 15 [cited 2022 Nov 2];23(4):870–7. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/23/4/870/635149>
80. Mutsuddi M, Nambu JR. Neural disease: *Drosophila* degenerates for a good cause. *Current Biology* [Internet]. 1998 Nov 5 [cited 2022 Nov 6];8(22):R809–11. Available from: <http://www.cell.com/article/S0960982207005064/fulltext>



81. Qiao S, Iwashita T, Furukawa T, Yamamoto M, Sobue G, Takahashi M. Differential Effects of Leukocyte Common Antigen-related Protein on Biochemical and Biological Activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B Mutant Proteins. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2001 Mar 23 [cited 2022 Nov 5];276(12):9460–7. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925819462546/fulltext>
82. Burnouf S, Grönke S, Augustin H, Dols J, Gorsky MK, Werner J, et al. Deletion of endogenous Tau proteins is not detrimental in *Drosophila*. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Mar 15 [cited 2022 Nov 5];6. Available from: </pmc/articles/PMC4792132/>
83. Lu B. Recent advances in using *Drosophila* to model neurodegenerative diseases. *Apoptosis* [Internet]. 2009 Aug [cited 2022 Nov 4];14(8):1008. Available from: </pmc/articles/PMC3045821/>
84. Talmat-Amar Y, Arribat Y, Redt-Clouet C, Feuillet S, Bougé AL, Lecourtois M, et al. Important neuronal toxicity of microtubule-bound Tau in vivo in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2022 Nov 4];20(19):3738–45. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/20/19/3738/600907>
85. Tan FHP, Azzam G. *Drosophila melanogaster*: Deciphering Alzheimer’s Disease. *Malays J Med Sci* [Internet]. 2017 [cited 2022 Nov 3];24(2):6. Available from: </pmc/articles/PMC5566057/>
86. Informe de alelos FlyBase: Dmel\w[1118] [Internet]. [cited 2022 Nov 5]. Available from: <https://flybase.org/reports/FBal0018186.html>
87. Perkins LA, Holderbaum L, Tao R, Hu Y, Sopko R, McCall K, et al. The transgenic RNAi project at Harvard medical school: Resources and validation. *Genetics* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2022 Nov 5];201(3):843–52. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/201/3/843/5930088>
88. Bloomington *Drosophila* Stock Center: Universidad de Indiana Bloomington [Internet]. [cited 2022 Nov 5]. Available from: <https://bdsc.indiana.edu/Home/Search>
89. del Valle Rodríguez A, Didiano D, Desplan C. Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat Methods* [Internet]. 2012 Jan [cited 2022 Nov 2];9(1):47. Available from: </pmc/articles/PMC3574576/>
90. Li WZ, Li SL, Zheng HY, Zhang SP, Xue L. A broad expression profile of the GMR-GAL4 driver in *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res* [Internet]. 2012 [cited 2022 Nov 2];11(3):1997–2002. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22911584/>
91. Barwell T, DeVeale B, Poirier L, Zheng J, Seroude F, Seroude L. Regulating the UAS/GAL4 system in adult *Drosophila* with Tet-off GAL80 transgenes. *PeerJ* [Internet]. 2017 [cited 2022 Nov 2];2017(12). Available from: </pmc/articles/PMC5733373/>
92. Ni JQ, Liu LP, Binari R, Hardy R, Shim HS, Cavallaro A, et al. A *Drosophila* Resource of Transgenic RNAi Lines for Neurogenetics. *Genetics* [Internet]. 2009 Aug [cited 2023 Jan 9];182(4):1089. Available from: </pmc/articles/PMC2728850/>

93. Ni JQ, Markstein M, Binari R, Pfeiffer B, Liu LP, Villalta C, et al. Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* [Internet]. 2008 Jan [cited 2023 Jan 9];5(1):49. Available from: [/pmc/articles/PMC2290002/](#)
94. Duffy JB. GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*. 2002;34(1–2):1–15.
95. Mohr SE. RNAi screening in *Drosophila* cells and in vivo. *Methods* [Internet]. 2014 Jun 6 [cited 2022 Nov 5];68(1):82. Available from: [/pmc/articles/PMC4206080/](#)
96. Venken KJT, Bellen HJ. Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2005 Mar [cited 2022 Nov 4];6(3):167–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15738961/>
97. Iijima-Ando K, Iijima K. Transgenic *Drosophila* models of Alzheimer's disease and tauopathies. *Brain Struct Funct* [Internet]. 2010 Mar [cited 2022 Nov 3];214(2–3):245. Available from: [/pmc/articles/PMC2849836/](#)
98. Acasuso-Rivero C, Murren CJ, Schlichting CD, Steiner UK. Adaptive phenotypic plasticity for life-history and less fitness-related traits. *Proceedings of the Royal Society B* [Internet]. 2019 Jun 12 [cited 2022 Nov 3];286(1904). Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2019.0653>
99. Sonnenfeld MJ. GAL4/UAS Expression System. *Encyclopedia of Neuroscience* [Internet]. 2009 Nov 21 [cited 2022 Nov 2];1662–6. Available from: [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-540-29678-2\\_1904](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-540-29678-2_1904)
100. Ray M, Lakhotia SC. The commonly used eye-specific sev-GAL4 and GMR-GAL4 drivers in *Drosophila melanogaster* are expressed in tissues other than eyes also. *J Genet* [Internet]. 2015 Aug 9 [cited 2022 Nov 2];94(3):407–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26440079/>
101. Iyer J, Wang Q, Le T, Pizzo L, Grönke S, Ambegaokar SS, et al. Quantitative assessment of eye phenotypes for functional genetic studies using *Drosophila melanogaster*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2022 Nov 4];6(5):1427–37. Available from: [/pmc/articles/PMC4856093/](#)
102. Sarkar A, Gogia N, Farley K, Payton L, Singh A. Characterization of a morphogenetic furrow specific Gal4 driver in the developing *Drosophila* eye. *PLoS One* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Nov 2];13(4). Available from: [/pmc/articles/PMC5922546/](#)
103. Garrity PA, Lee CH, Salecker I, Robertson HC, Desai CJ, Zinn K, et al. Retinal axon target selection in *Drosophila* is regulated by a receptor protein tyrosine phosphatase. *Neuron* [Internet]. 1999 Apr 1 [cited 2022 Nov 2];22(4):707–17. Available from: <http://www.cell.com/article/S0896627300807308/fulltext>
104. Fitzpatrick KA, Gorski SM, Ursuliak Z, Price J v. Expression of protein tyrosine phosphatase genes during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* [Internet]. 1995 [cited 2022 Nov 2];53(2):171–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8562420/>

105. Madabattula ST, Strautman JC, Bysice AM, O'Sullivan JA, Androschuk A, Rosenfelt C, et al. Quantitative Analysis of Climbing Defects in a Drosophila Model of Neurodegenerative Disorders. *J Vis Exp* [Internet]. 2015 Jun 13 [cited 2022 Nov 3];2015(100):52741. Available from: [/pmc/articles/PMC4544889/](https://www.jove.com/doi/10.1038/52741)
106. Tito AJ, Cheema S, Jiang M, Zhang S. A Simple One-step Dissection Protocol for Whole-mount Preparation of Adult Drosophila Brains. *J Vis Exp* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 Nov 3];2016(118):55128. Available from: [/pmc/articles/PMC5226341/](https://www.jove.com/doi/10.1038/55128)
107. Kelly SM, Elchert A, Kahl M. Dissection and immunofluorescent staining of mushroom body and photoreceptor neurons in adult Drosophila melanogaster brains. *Journal of Visualized Experiments* [Internet]. 2017 Nov 6 [cited 2022 Nov 5];2017(129). Available from: <https://www.jove.com/t/56174/dissection-immunofluorescent-staining-mushroom-body-photoreceptor?language=Spanish>
108. Wilson RI. Early Olfactory Processing in Drosophila: Mechanisms and Principles. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 2013 Jul 7 [cited 2022 Nov 4];36:217. Available from: [/pmc/articles/PMC3933953/](https://www.jove.com/doi/10.1038/217)
109. Daul AL, Komori H, Lee CY. Immunofluorescent staining of Drosophila larval brain tissue. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2010 Jul [cited 2022 Nov 4];2010(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20647364/>
110. Mershin A, Pavlopoulos E, Fitch O, Braden BC, Nanopoulos D v., Skoulakis EMC. Learning and Memory Deficits Upon TAU Accumulation in Drosophila Mushroom Body Neurons. *Learning & Memory* [Internet]. 2004 May [cited 2022 Nov 5];11(3):277. Available from: [/pmc/articles/PMC419730/](https://www.jove.com/doi/10.1038/277)
111. Anti-MAPT Antibodies | Invitrogen [Internet]. [cited 2022 Nov 22]. Available from: [https://www.thermofisher.com/antibody/gene/mapt?gclid=CjwKCAiApvebBhAvEiwAe7mHSIc76gahGc4TIJMVbS9h1aFM4dIBSmdm6Lz8zPXUEyAPaIE8E6tQfBoCuNMQAvD\\_BwE&s\\_kwcid=AL!3652!3!419725211257!e!!g!!at8%20antibody&s\\_kwcid=AL!3652!3!419725211257!e!!g!!at8%20antibody!352132362!94011034205&ef\\_id=CjwKCAiApvebBhAvEiwAe7mHSIc76gahGc4TIJMVbS9h1aFM4dIBSmdm6Lz8zPXUEyAPaIE8E6tQfBoCuNMQAvD\\_BwE:G:s&cid=bid\\_pca\\_aup\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_gaw\\_nt\\_pur\\_con#](https://www.thermofisher.com/antibody/gene/mapt?gclid=CjwKCAiApvebBhAvEiwAe7mHSIc76gahGc4TIJMVbS9h1aFM4dIBSmdm6Lz8zPXUEyAPaIE8E6tQfBoCuNMQAvD_BwE&s_kwcid=AL!3652!3!419725211257!e!!g!!at8%20antibody&s_kwcid=AL!3652!3!419725211257!e!!g!!at8%20antibody!352132362!94011034205&ef_id=CjwKCAiApvebBhAvEiwAe7mHSIc76gahGc4TIJMVbS9h1aFM4dIBSmdm6Lz8zPXUEyAPaIE8E6tQfBoCuNMQAvD_BwE:G:s&cid=bid_pca_aup_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con#)
112. Eslami A, Lujan J. Western Blotting: Sample Preparation to Detection. *J Vis Exp* [Internet]. 2010 [cited 2022 Nov 27];44(44). Available from: [/pmc/articles/PMC3185633/](https://www.jove.com/doi/10.1038/44)
113. Schroeder CM, Tomlin SA, Natividad IM, Valenzuela JR, Young JM, Malik HS. An actin-related protein that is most highly expressed in Drosophila testes is critical for embryonic development. *Elife* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2022 Nov 6];10. Available from: [/pmc/articles/PMC8291977/](https://www.jove.com/doi/10.1038/10)
114. TriKinetics [Internet]. [cited 2022 Nov 17]. Available from: <https://trikinetics.com/>

115. Chiu JC, Low KH, Pike DH, Yildirim E, Edery I. Assaying Locomotor Activity to Study Circadian Rhythms and Sleep Parameters in *Drosophila*. *J Vis Exp* [Internet]. 2010 [cited 2022 Nov 17];(43):2157. Available from: [/pmc/articles/PMC3229366/](#)
116. Agrawal P, Hardin PE. The *Drosophila* Receptor Protein Tyrosine Phosphatase LAR Is Required for Development of Circadian Pacemaker Neuron Processes That Support Rhythmic Activity in Constant Darkness But Not during Light/Dark Cycles. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. 2016 Mar 3 [cited 2022 Nov 3];36(13):3860. Available from: [/pmc/articles/PMC4812141/](#)
117. Tataroglu O, Emery P. Studying circadian rhythms in *Drosophila melanogaster*. *Methods* [Internet]. 2014 Jun 6 [cited 2022 Nov 4];68(1):140. Available from: [/pmc/articles/PMC4049855/](#)
118. Chavarrías D, López-Fanjul C, García-Dorado A. The rate of mutation and the homozygous and heterozygous mutational effects for competitive viability: a long-term experiment with *Drosophila melanogaster*. *Genetics* [Internet]. 2001 [cited 2022 Nov 4];158(2):681. Available from: [/pmc/articles/PMC1461667/?report=abstract](#)
119. Sweeney ST, Hidalgo A, Steven de Belle J, Keshishian H. Antibody staining of the central nervous system in adult *Drosophila*. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2012 Feb [cited 2022 Nov 4];2012(2):235–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22301645/>
120. Brazill JM, Zhu Y, Li C, Zhai RG. Quantitative Cell Biology of Neurodegeneration in *Drosophila* Through Unbiased Analysis of Fluorescently Tagged Proteins Using ImageJ. *J Vis Exp* [Internet]. 2018 Aug 3 [cited 2022 Nov 3];2018(138). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30124668/>
121. Heidary G, Fortini ME. Identification and characterization of the *Drosophila* tau homolog. *Mech Dev*. 2001 Oct 1;108(1–2):171–8.