



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia



# **Evaluación del efecto protector de derivados de imidazol en modelos invertebrados de las enfermedades neurodegenerativas de Parkinson y Huntington**

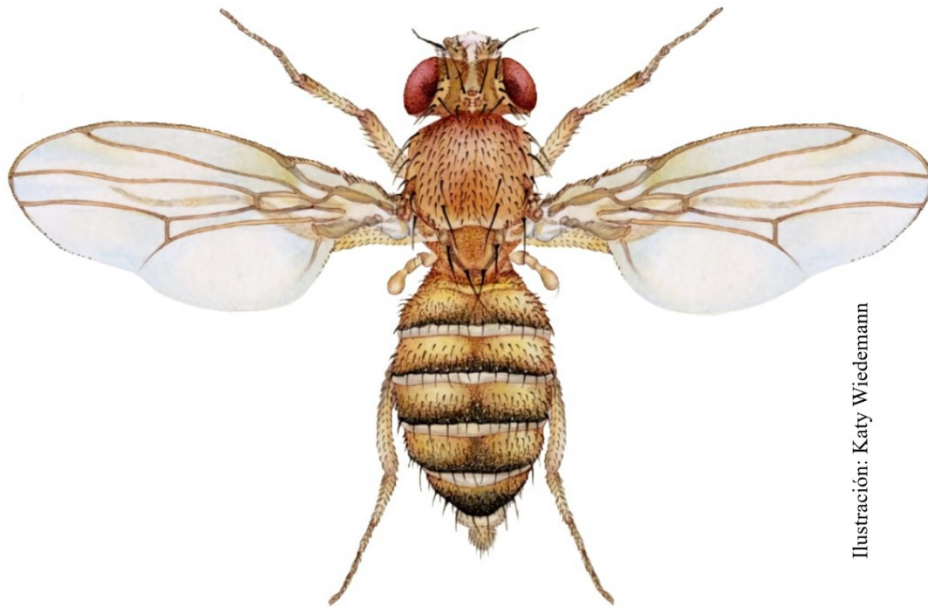


Ilustración: Katy Wiedemann

**ALUMNO: Gorosito, Cristóbal**

**DIRECTOR: Garelli, Andrés**

*Bahía Blanca*

2025

Fecha de defensa oral: 5 de Diciembre, 2025



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia



# **Evaluación del efecto protector de derivados de imidazol en modelos invertebrados de las enfermedades neurodegenerativas de Parkinson y Huntington**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Gorosito Cristóbal**

**Alumno**

**Garelli Andrés**

**Director**

**Título Abreviado:** Evaluación del efecto de derivados de Imidazol sobre Enfermedades Neurodegenerativas.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia



# **Evaluation of the protective effect of imidazole derivatives on invertebrate models of Parkinson's and Huntington's diseases**

**BACHELOR'S THESIS IN BIOLOGICAL SCIENCES**

**Short Title:** Evaluation of the effect of imidazole derivatives on Neurodegenerative Diseases.

## Agradecimientos

A mi director, el Doctor Andrés Garelli, quien con paciencia me guió a través de los variados pasos y enseñanzas necesarias para hacer posible la realización de esta Tesis. Agradezco su dedicación y esfuerzo por hacerme sentir bienvenido, no solo en el ámbito profesional sino también en el INIBIBB.

A mi profesora consejera, la Doctora Natalia Stefanazzi, por proporcionarme invaluable ayuda durante mis últimos años como alumno universitario y valiosas herramientas para transitar de la etapa de alumno a la de investigador profesional.

A la Universidad Nacional del Sur, pública, gratuita e inquebrantable, por otorgarme la oportunidad de profundizar mis conocimientos y expandir mis horizontes hacia futuros antes inciertos.

A mi madre, Rosana Rizzo, por su incesante amor y apoyo durante toda mi formación, desde el primer día de jardín hasta el último examen final universitario. Gracias por inspirarme cada día por tu espíritu y voluntad inconmensurables, al igual que otorgar amor eterno incluso en las situaciones más desamparadas.

A mi tía, la Doctora Guillermina Rizzo, por su conocimiento infalible en el cual dependí y confié durante innumerables situaciones a lo largo de mi carrera al igual que por su constante deseo de ayudar sin importar la situación.

A mi padre, el Doctor Gerardo Gabriel Gorosito, por ayudar a nutrir en mí el deseo de aventurarme en el extraño y maravilloso mundo de la Biología.

A todos los demás miembros de mi familia, presentes y ausentes, por ser los pilares de mi desarrollo como persona en un mundo lleno de adversidades.

A todos mis queridos amigos y compañeros, que me han hecho reír en tiempos difíciles y me han ayudado a superar las dificultades de este camino hasta ahora transitado.

Finalmente, pero jamás menos importante, a mi bisabuela Esther, a quién le prometí hace años superar todos los obstáculos que yacían en mi camino y triunfar sin importar las circunstancias. Gracias por siempre verme y cuidarme desde arriba. Con la frente en alto, siempre mantendré mi promesa.

Con trabajo constante y perseverancia inquebrantables, todo sueño es posible.

## Resumen

*Drosophila melanogaster*, invertebrado artrópodo empleado comúnmente como modelo de estudio, permite la generación de modelos de Enfermedades Neurodegenerativas en investigaciones científicas. Gracias a ellas es posible no solo estudiar los síntomas de estas condiciones a nivel de los variados sistemas del cuerpo, sino también evaluar el efecto de la exposición a distintos compuestos químicos sobre las alteraciones que causan estas enfermedades de alta prevalencia a nivel global. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial efecto protector de los compuestos 1-Mesitil-3-(3-sulfonatopropil) Imidazol (MSI) y 1-(3-Sulfonatopropil) Imidazol (SI) sobre modelos de las Enfermedades de Huntington y Parkinson, a través del análisis de las capacidades motrices mediante múltiples ensayos de Geotaxia Negativa y a través de la examinación de la estructura del ojo compuesto.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que el compuesto SI presenta un efecto positivo notable sobre las capacidades motrices de los ejemplares afectados por la Enfermedad de Huntington, mientras que ninguno de los dos compuestos muestra un efecto observable sobre los ejemplares que expresaron la Enfermedad de Parkinson. No se observó efecto sobre la estructura ocular de los ejemplares expuestos a los compuestos empleados.

**Palabras clave:** *Drosophila*, Neurodegeneración, Imidazol

## Abstract

*Drosophila melanogaster*, an invertebrate arthropod, is commonly used as a model organism for the study of Neurodegenerative Diseases in scientific research. Through these investigations and models it is possible not only to study the symptoms of these conditions throughout the various invertebrate bodily systems, but also to evaluate the effect of exposure to various chemical compounds on the alterations that these globally-prevalent diseases cause. The current investigation had the goal of evaluating the potential protective effect of the 1-Mesityl-3-(3-sulfonatopropyl) Imidazole (MSI) and 1-(3-sulfonatopropyl) Imidazole (SI) compounds on Parkinson's and Huntington's Disease models, via the evaluation of motor capabilities through various Negative Geotaxis assays and the examination of the compound eye structure.

The obtained results allowed us to determine that the SI compound shows a significant positive effect on the motor capabilities of the specimens affected by Huntington's disease, with neither of the two compounds showing an observable effect on the flies which expressed Parkinson's disease. No noticeable effect was observed on the ocular structure of the specimens evaluated under exposure to either utilized compound.

**Keywords:** *Drosophila*, Neurodegeneration, Imidazole.

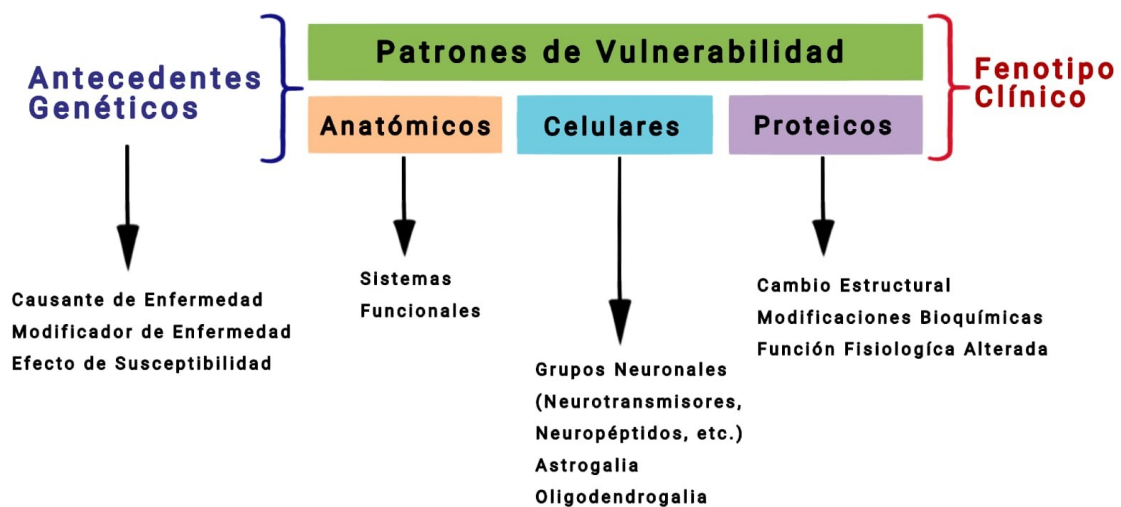
# Índice

Introducción.....	8
Condiciones Neurodegenerativas .....	8
Enfermedad de Parkinson .....	9
Enfermedad de Huntington.....	10
<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio .....	11
Compuestos derivados del Imidazol .....	11
Objetivos.....	12
Objetivo General.....	12
Objetivos Específicos .....	12
Materiales y Métodos .....	13
Expresión de Alelos Mutados .....	13
Mantenimiento de los ejemplares y obtención de los cruces.....	13
Exposición a derivados de Imidazol .....	14
Evaluación General del Aspecto del Ojo.....	15
Ensayos de Geotaxia Negativa o de Evaluación de la Capacidad Motora .....	15
Recopilación y Análisis de Datos .....	16
Resultados.....	17
Evaluación de la toxicidad de derivados de Imidazol.....	17
Establecimiento de modelos .....	18
Ojo Compuesto.....	18
Geotaxia Negativa.....	21
Evaluación del efecto protector de los derivados de Imidazol SI y MSI.....	30
Sobre modelos de degeneración del Ojo Compuesto.....	30
Sobre modelos de Geotaxia Negativa .....	34
Discusión .....	38
Derivados de Imidazol como potenciales agentes terapéuticos.....	38
Modelos de enfermedad neurodegenerativa basados en la expresión de alelos mutados causantes de Parkinson y Huntington .....	38
Efecto de los compuestos de Imidazol.....	40
Conclusiones.....	42
Bibliografía.....	43

# Introducción

## Condiciones Neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de patologías caracterizadas por la disfunción y progresiva pérdida de células neuronales, lo cual resulta en cambios y defectos comportamentales, cognitivos y posiblemente físicos en los individuos afectados. Estas enfermedades pueden clasificarse según sus síntomas clínicos principales, las patologías celulares y/o subcelulares involucradas e incluso las modificaciones tanto conformacionales como bioquímicas que pueden sufrir las proteínas del sistema nervioso ([Kovacs et al., 2016](#)).



**Figura 1.** Resumen del concepto de patrones de vulnerabilidad en enfermedades neurodegenerativas, adaptado de "Clasificación patológica molecular de las enfermedades neurodegenerativas hacia la medicina de precisión." ([Kovacs et al., 2016](#)).

El incremento gradual en la expectativa de vida humana, debido a los múltiples hallazgos y progresos tanto médicos como científicos de las últimas décadas, ha resultado en que los riesgos de manifestación de condiciones neurodegenerativas hayan tomado una prevalencia gradualmente mayor a nivel global ([Rosas-Arellano et al., 2018](#)). En los casos en los cuales estas condiciones afectan a las proteínas, sus principales efectos se caracterizan por la disfunción en la proteostasis, el conjunto de mecanismos y sistemas naturalmente presente en los organismos vivos que asegura el mantenimiento y función de las variadas proteínas halladas en las estructuras anatómicas de los sistemas corporales, por lo que se generan proteínas con propiedades físico-químicas alteradas. Este sistema tiende a sufrir alteraciones con el avance de la edad y el envejecimiento corporal, con factores tanto ambientales como genéticos incrementando el riesgo de surgimiento de enfermedades neurodegenerativas, ya que las proteínas con estructuras anómalas pueden formar depósitos intracelulares y resultar en condiciones conocidas como proteinopatías.

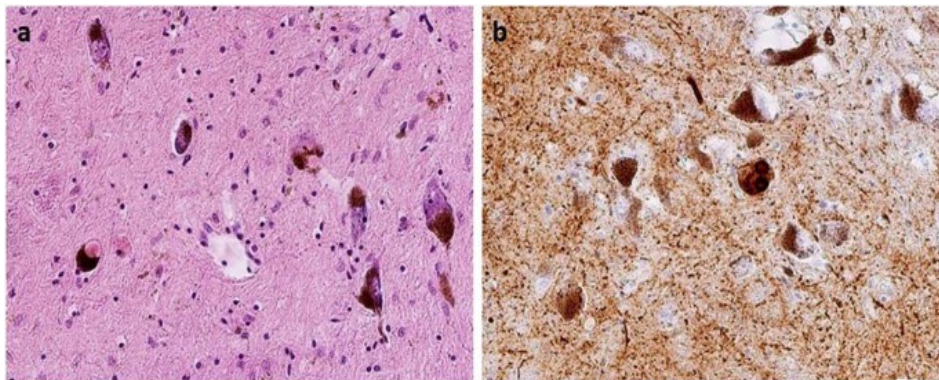


Las proteinopatías neurodegenerativas se caracterizan por causar agregaciones de proteínas plegadas incorrectamente, neuro-inflamación, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y degeneración del tejido celular neuronal ([Santarelli et al., 2023](#)). La identidad de la enfermedad y la selectividad del tejido neuronal afectado conllevan además condiciones físicas como la disminución en las capacidades motoras, problemas musculares, pérdida de reflejos, movimientos y patrones oculares inusuales, alteraciones en el equilibrio y la postura e incluso condiciones psiquiátricas como la demencia y eventualmente posiblemente la muerte. Las organelas dañadas, como mitocondrias, y los procesos intracelulares afectados, como la autofagia, estrés del retículo endoplásmico y proteostasis, son características compartidas por múltiples proteinopatías, entre ellas la Enfermedad de Parkinson y la Enfermedad de Huntington ([Rosas-Arellano et al., 2018](#)).

## Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson es una proteinopatía neurodegenerativa que afecta al sistema extra-piramidal y está caracterizada por deterioro cognitivo, movimientos involuntarios severos, pérdida de las capacidades motoras, aumento de la rigidez corporal y pérdida del balance. Uno de los cambios patológicos claves de la enfermedad es la degradación y pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de la pars compacta del mesencéfalo ventral, con la pérdida de estas células estando asociada con la presencia intra-neuronal de Cuerpos de Lewy, agregados citoplasmáticos nerviosos multi-proteicos mal plegados e inmuno-reactivos en los cuales la  $\alpha$ -sinucleína es una de las proteínas prevalentemente halladas ([Pendleton et al., 2002](#)).

Mutaciones en proteínas como la ubiquitina, una proteína de choque térmico (HSP), encargada de la degradación de proteínas a través de proteosomas, y la parkina alteran los patrones de ubiquitinación proteicos y resultan en el mal funcionamiento de procesos intracelulares que mantienen la viabilidad celular. Como resultado de esto se generan mutaciones a nivel del ADN mitocondrial que alteran la función de estas organelas ([Aryal et al., 2019](#)), llevando a un incremento del estrés oxidativo que posee un rol clave en la progresión de la Enfermedad de Parkinson.



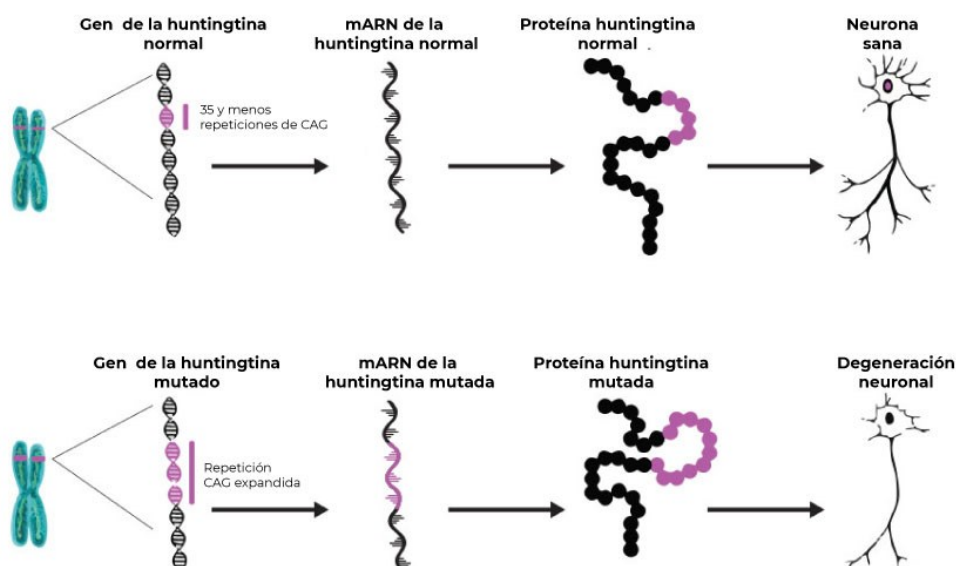
**Figura 2.** a. Cuerpos de Lewy clásicos en las neuronas pigmentadas de la sustancia negra, tinción HE, aumento original  $\times 200$ . b. Depósitos patológicos de  $\alpha$ -sinucleína en la sustancia negra: Cuerpos de Lewy, positividad

citoplasmática granular y neuritas distróficas, teñidos con un anticuerpo contra de  $\alpha$ -sinucleína, aumento original  $\times 200$ .  
([Menšíková et al., 2022](#))

## Enfermedad de Huntington

La Enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo caracterizado por un conjunto de síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos, que a menudo se superponen. Entre los más prevalentes se observa la corea o movimientos corporales bruscos e involuntarios, la rigidez y falta de coordinación muscular, disfagia o dificultad en la ingesta de alimentos, pérdida de coordinación y motricidad fina, deterioro del juicio racional y dificultad para el aprendizaje, irritabilidad, cambios de humor y en algunos casos psicosis ([Ross et al., 2011](#)).

Esta enfermedad es causada por una mutación dominante hallada en el primer exón del gen que codifica a la proteína Huntingtina (Htt), una variante de la poliglutamina-Q normalmente presente en el núcleo, citoplasma y dendritas así como asociada a organelas como el retículo endoplásmico y la mitocondria. Mutaciones en estas secuencias genéticas reguladoras resulta en una expansión de la secuencia del trinucleótido CAG por encima de las 35 repeticiones y genera una variante mutada de Huntingtina con un tramo de poliglutamina-Q extendido (mHtt). En condiciones normales, el número de repeticiones del triplete CAG en el ADN oscila entre 9 a 36 veces (rango normal: 11-27), y la forma mutada se sitúa por encima de 36 tripletes en pacientes que padecen la enfermedad. La presencia de esta forma mutada de Huntingtina induce la muerte de las neuronas presentes en el cuerpo estriado y la corteza cerebral, resultando en una declinación rápida de las capacidades cognitivas y defectos motores ([Bates et al., 2015](#); [Tasset et al., 2008](#)).



**Figura 3.** Diferencias genéticas y moleculares entre una proteína de Huntingtina normal y mutada y sus efectos en una neurona. ([Tuyo, R. C. \(n.d.\). \*Huntingtina: la proteína de gran impacto.\*](#))

## ***Drosophila melanogaster* como modelo de estudio**

*Drosophila melanogaster* es un artrópodo perteneciente a la familia *Drosophilidae*, una familia cosmopolita del orden *Diptera*, conocidas vulgarmente como moscas de la fruta. Este invertebrado presenta gran valor y utilidad como un modelo de estudio extensamente utilizado en múltiples trabajos de investigación en el área de la biología y la genética ([Feany et al., 2000](#); [Pesah et al., 2005](#)), ya que cumple con múltiples criterios esenciales: presenta una alta facilidad de mantenimiento en el ambiente de laboratorio y un ciclo de vida corto de 9 o 10 días, lo que resulta en la posibilidad de obtener una gran cantidad de individuos genéticamente idénticos en un corto lapso de tiempo. Pueden llegar a vivir entre 40 y 120 días según variaciones en los niveles de estrés y dieta. Además, su complejo comportamiento incluye patrones de aprendizaje. Posee 38 de los 59 genes conocidos por causar enfermedades neurodegenerativas en humanos, lo cual permite establecer disfunciones cognitivas, conductuales o físicas al igual que fisiopatologías celulares inducidas por la formación de agregados proteicos intracelulares. Su genoma se encuentra codificado en aproximadamente 13.600 genes y en 4 pares de cromosomas, lo que ha permitido una extensa y detallada exploración de su desarrollo y anatomía mediante el uso de complejas herramientas de genética molecular.

*Drosophila melanogaster* carece de un ortólogo de  $\alpha$ -sinucleína, por lo que modelos de estudio para la Enfermedad de Parkinson son producidos mediante la expresión de formas mutantes con  $\alpha$ -sinucleína humana, con dichos modelos siendo utilizados para examinar el efecto de agentes tanto genéticos como farmacológicos sobre la condición neurodegenerativa. *Drosophila melanogaster* también carece de Huntingtina con una secuencia de poliglutamina-Q en su dominio terminal amino, pero comparte aproximadamente el 49% de homología positiva y 27% de identidad con proteínas humanas ([Rosas-Arellano et al., 2018](#)).

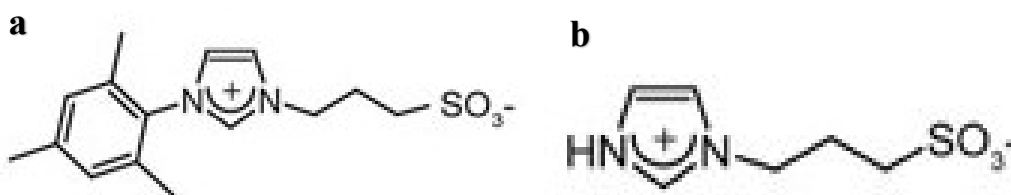
Mediante el uso de moscas transgénicas es posible replicar características como síndromes motrices, la acumulación de agregados proteotóxicos, expectativa de vida reducida y neurodegeneración. Muchos estudios y ensayos realizados con *Drosophila* pueden ser extrapolados a seres humanos, presentando gran potencial para el desarrollo de nuevas drogas y medicamentos eficaces ([Hirth., 2010](#)).

## **Compuestos derivados del Imidazol**

Los compuestos con anillos de Imidazol tienen un gran potencial para el desarrollo de drogas debido a que pueden ser fácilmente modificados para presentar diversas propiedades tanto fármaco-cinéticas como fármaco-dinámicas y poseen alta biocompatibilidad ([Anderson et al., 2010](#)), lo cual implica la cualidad de generar una respuesta biológica aceptable durante el tiempo y modo de contacto de una aplicación específica. Estas características permiten su uso en un amplio espectro de actividades terapéuticas, incluyendo anti-inflamatorias, analgésicas y anticonvulsivantes ([Shalmali et al., 2018](#); [Blanco et al., 2018](#); [Tolomeu et al., 2023](#)). Los derivados de Imidazol 1-(3-sulfonatopropil) Imidazol (MSI) y 1-mesitil-3-(3-sulfonatopropil) Imidazol (SI) están

involucrados en mecanismos protectores al mediar procesos que alteran e incrementan la resistencia al estrés oxidativo. MSI induce resistencia al estrés oxidativa al actuar en la vía HSF-1, activándose en respuesta al estrés celular y manteniendo la proteostasis celular ([Andersen et al., 2022](#)).

HSF-1 es un factor de transcripción que se activa ante señales de estrés, como el shock térmico, e induce la expresión de proteínas de choque térmico que facilitan el plegamiento de proteínas y previenen su agregación para así ayudar a proteger a las células de los efectos dañinos del estrés oxidativo. Debido a que el origen de las Enfermedades de Parkinson y Huntington radica en acumulaciones anormales de estructuras proteicas, estos compuestos químicos muestran gran potencial para evitar o retrasar el desarrollo de las alteraciones asociadas a estas patologías.



**Figura 4.** Estructura química de las 2 respectivas sales de Imidazol: **a** 1-mesitil-3-(3-sulfonatopropil) Imidazol (MSI) **b** 1-(3-sulfonatopropil) Imidazol (SI) ([Blanco et al.,2018](#))

## Objetivos

### Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es evaluar el potencial efecto protector del 1-Mesitil-3-(3-sulfonatopropil) Imidazol (MSI) y 1-(3-Sulfonatopropil) Imidazol (SI) utilizando modelos de Enfermedad de Parkinson y Huntington generados en *Drosophila melanogaster*.

### Objetivos Específicos

- Validar los modelos de enfermedad neurodegenerativa basados en la expresión en moscas de alelos mutados causantes de Parkinson y Huntington en humanos, utilizando como parámetros la capacidad motora y la estructura del ojo compuesto.
- Evaluar la toxicidad individual de ambos compuestos de Imidazol.
- Evaluar el potencial efecto protector de los compuestos de Imidazol sobre ambos modelos.
- Determinar la concentración óptima de ambos compuestos a utilizar.

- Monitorear y describir los efectos de las Enfermedades de Parkinson y Huntington tanto a nivel de capacidad motriz como a nivel de alteraciones en la estructura ocular.

## Materiales y Métodos

### Expresión de Alelos Mutados

La expresión génica se manipuló empleando el sistema bipartito *Gal4/UAS*, caracterizado por dos componentes: el gen *Gal4* que codifica una proteína activadora de la transcripción y la secuencia de ADN *UAS* a la que se une *Gal4* y activa la expresión de las secuencias río abajo. El promotor bajo cuyo control se localiza *Gal4* determina el sitio y momento de expresión de los componentes, mientras que la secuencia *UAS* controla la expresión de un gen blanco. Se emplearon las líneas nombradas a continuación:

- Cepa Control: *w[1118]*
- Enfermedad de Parkinson: *UAS- $\alpha$ syn-WT*, *UAS- $\alpha$ syn-A53T*, *UAS- $\alpha$ syn-A30P*. ([Auluck et al., 2002](#)), son las formas salvajes y mutadas de  $\alpha$ -sinucleína humana asociadas al desarrollo de Parkinson, alelos con falta de función. También se utilizaron las formas salvajes optimizadas para expresión en *Drosophila* *UAS- $\alpha$ syn (II)* y *UAS- $\alpha$ syn (III)* ([Chouhan et al., 2016](#)). Con estas construcciones se logra un nivel de expresión 20 veces mayor que con la forma sin optimizar.
- Enfermedad de Huntington: *UAS-Htt-Q15-mRFP*, *UAS-Htt-Q138-mRFP*. Variantes con 15 y 138 repeticiones de poliQ fusionadas con la proteína fluorescente roja mRFP, que permite evaluar la formación de agregados sin necesidad de realizar tinciones ([Weiss et al., 2012](#)). La versión *UAS-Htt-Q15-mRFP* contiene 15 repeticiones de glutamina, un valor que no está asociado al desarrollo de la enfermedad y se utiliza como condición control.

Se logró una expresión en todo el tejido nervioso mediante las líneas *R57C10-Gal4* y *elav-Gal4*, de expresión pan-neuronal, así como expresión en forma específica el ojo mediante *GMR-Gal4*.

### Mantenimiento de los ejemplares y obtención de los cruces

Los ejemplares de *Drosophila* fueron mantenidos en tubos de ensayo de plástico transparentes, de 9 centímetros de largo y 2.5 centímetros de diámetro, con una tapa de esponja, dentro de incubadoras a 25 grados Celsius.

El alimento empleado en los tubos se realizó mezclando agua con harina, levadura, azúcar, agar, ácido propiónico y Nipagin 5% en las concentraciones detalladas en la [Tabla 1](#).

	Para 1 litro de Agua
Agua [Litros]	1
Harina [Gramos]	85
Levadura [Gramos]	20
Azúcar [Gramos]	40
Agar [Gramos]	10
Ácido Propiónico [Mililitros]	4.5
Nipagin 5% [Mililitros]	8.7

**Tabla 1.** Composición y receta de la comida utilizada para alimentar y mantener vivos a los ejemplares de *Drosophila melanogaster* durante las investigaciones realizadas.

Para realizar los cruces se extrajeron hembras vírgenes 2 veces por día en intervalos regulares durante la mañana y la tarde. Luego de obtener una cantidad apropiada de hembras vírgenes y machos para realizar los respectivos cruces, 10 hembras y 10 machos, los ejemplares fueron colocados en una cámara de puesta de huevos, compuesta por un vaso cerrado con una placa de Petri, y dejados en la incubadora durante un período de 4 horas para asegurar la puesta de huevos. Posteriormente los ejemplares fueron removidos y luego de un período de 48 horas se trasladaron las larvas de las placas a tubos de ensayo con comida. Las placas de Petri empleadas estaban compuestas por 2 capas, una inferior translúcida y una superior de alimento cuya receta fue mencionada en el párrafo previo. A continuación se encuentran las concentraciones empleadas para la síntesis de la capa inferior utilizada en las placas de Petri.

	Para 500 mililitros de Agua
Agua [Mililitros]	375
Azúcar [Gramos]	10
Agar [Gramos]	12.5
Jugo de Manzana [Mililitros]	125
Nipagin 5% [Mililitros]	4.35

**Tabla 2.** Composición de la capa inferior de las placas de Petri, sobre la cual se depositó el alimento durante la preparación de los ensayos de toxicidad y la obtención de moscas de la generación F1 para ensayos de escalada.

## Exposición a derivados de Imidazol

Los compuestos MSI y SI fueron sintetizados por el Dr Gustavo Silbestri (Departamento de Química, UNS). Se disolvieron en agua en una concentración 30 mM. En primer lugar se realizó un ensayo de toxicidad evaluando el efecto de concentraciones crecientes en el rango 300 uM a 1200 uM, basado en la información obtenida de investigaciones previas empleando MSI (Andersen et al., 2022). Para ello, se diluyeron volúmenes apropiados de soluciones stock 30 mM de ambos compuestos en 3 mL de comida fundida, a los que se transfirieron larvas de 48 hs de edad.

En los experimentos destinados a evaluar la pérdida progresiva de la capacidad motora, los animales se desarrollaron en comida suplementada con derivados de Imidazol o con



agua para actuar como controles. Tras la eclosión, fueron alimentados con comida suplementada o no, la cual se renovó cada 3 o 4 días.

## **Evaluación General del Aspecto del Ojo**

La expresión en el ojo mediante *GMR-Gal4* se utilizó como una herramienta para monitorear la muerte celular ocasionada por proteo-toxicidad, permitiendo evaluar si la manipulación genética realizada afecta la organización celular del ojo compuesto de *Drosophila melanogaster* al alterar la disposición de los omatidios. Se evaluó el efecto protector de los compuestos de Imidazol en presencia MSI y SI y condiciones control bajo exposición a agua destilada.

## **Ensayos de Geotaxia Negativa o de Evaluación de la Capacidad Motora**

El efecto de la expresión de formas mutadas de huntingtina y  $\alpha$ -sinucleína se evaluó mediante un análisis de la capacidad motora, empleando un ensayo de Geotaxia Negativa o ensayo de escalada.

Se realizaron ensayos de escalada empleando múltiples cruces para evaluar el efecto de ambas condiciones neurodegenerativas sobre la capacidad motora de las moscas y su progresión entre los 4 y 26 días de edad

Los ensayos de escalada iniciales fueron realizados para validar los modelos de enfermedades neurodegenerativas basados en la expresión de alelos mutados, determinar el lapso de tiempo en el cual la expresión de dichos alelos afecta de forma significativa las capacidades motrices y familiarizarse con los protocolos involucrados en el mantenimiento de los ejemplares, la generación de los cruces y la recopilación de datos. Posteriormente se realizaron otros ensayos en los cuales las moscas fueron expuestas a SI y MSI, así como los respectivos controles.

Las moscas inicialmente fueron monitoreadas en intervalos regulares, consistiendo en ensayos a los 4, 8/9, 10/11, 15/16, 18/19 y 25/26 días de vida desde la eclosión de la forma adulta. En el caso que uno de los cruces o copia de los mismos haya superado los 25/26 días de vida, se realizó un ensayo adicional final a los 29/30 días. Luego de establecer el intervalo de tiempo en el cual se observó el efecto de las condiciones neurodegenerativas, dichas fechas se redujeron a 8/9 y 15/16 días de vida de la forma adulta.

Todos los ensayos de escalada se realizaron siguiendo los siguientes protocolos:

- Se movilizaron entre 5 y 10 moscas de cada cruce a tubos limpios y vacíos, variando el número según la mortalidad para asegurar una cantidad equitativa de moscas por tubo. El pasaje de las moscas se realizó sin utilizar anestesia.

- Luego de la movilización de las moscas se realizó un período de aclimatación de 20 minutos para asegurar la consistencia de los resultados.
- Las moscas fueron grabadas por un período de 30 segundos, con 90 segundos de descanso y repitiendo el proceso entre 5 y 10 veces con individuos diferentes, según la cantidad de copias de cada cruce.

## **Recopilación y Análisis de Datos**

Los ojos compuestos de los ejemplares de *Drosophila melanogaster* fueron evaluados en el Laboratorio de Microscopía del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur empleando un microscopio binocular Leica DM750, tomando fotos a distintos aumentos y a variados ángulos de luz y posteriormente utilizando la aplicación AmScope con su función Profundidad de Campo Extendida (EDF) para obtener las imágenes necesarias.

Para el análisis del ensayo de Geotaxia Negativa, se tomaron capturas de pantalla de los videos grabados empleando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ, analizando la posición de las moscas antes y al final de cada repetición del ensayo de escalada para evaluar el porcentaje de moscas que superan una marca ubicada en el tubo de ensayo a 6 centímetros de altura en un lapso de tiempo de 10 segundos. Dicha información fue luego recopilada en forma de gráficos de barras, evidenciando y comparando el decrecimiento de capacidad motora de cada cruce.

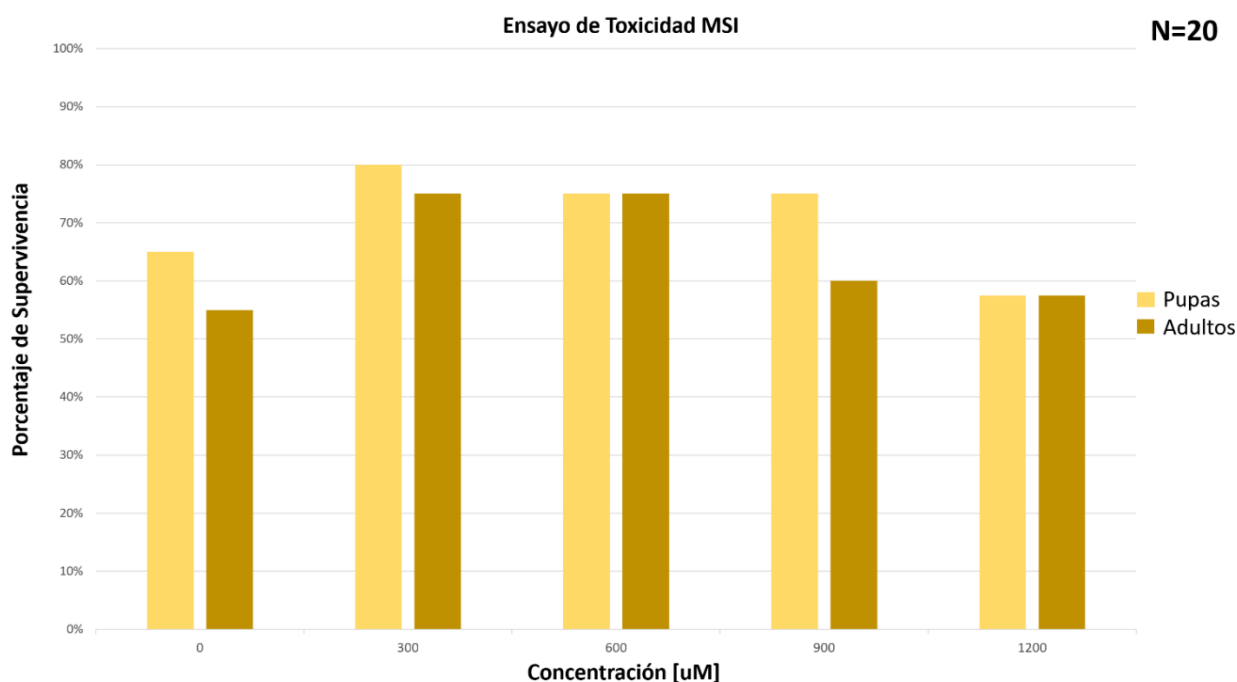
Posteriormente todos los datos de los ensayos de Geotaxia Negativa fueron analizados mediante la Prueba t de Student para muestras independientes, con el objetivo de determinar si existen diferencias entre las medias de los grupos evaluados. Dicho análisis estadístico se realizó a 2 colas con un  $\alpha$  igual a 0,05.



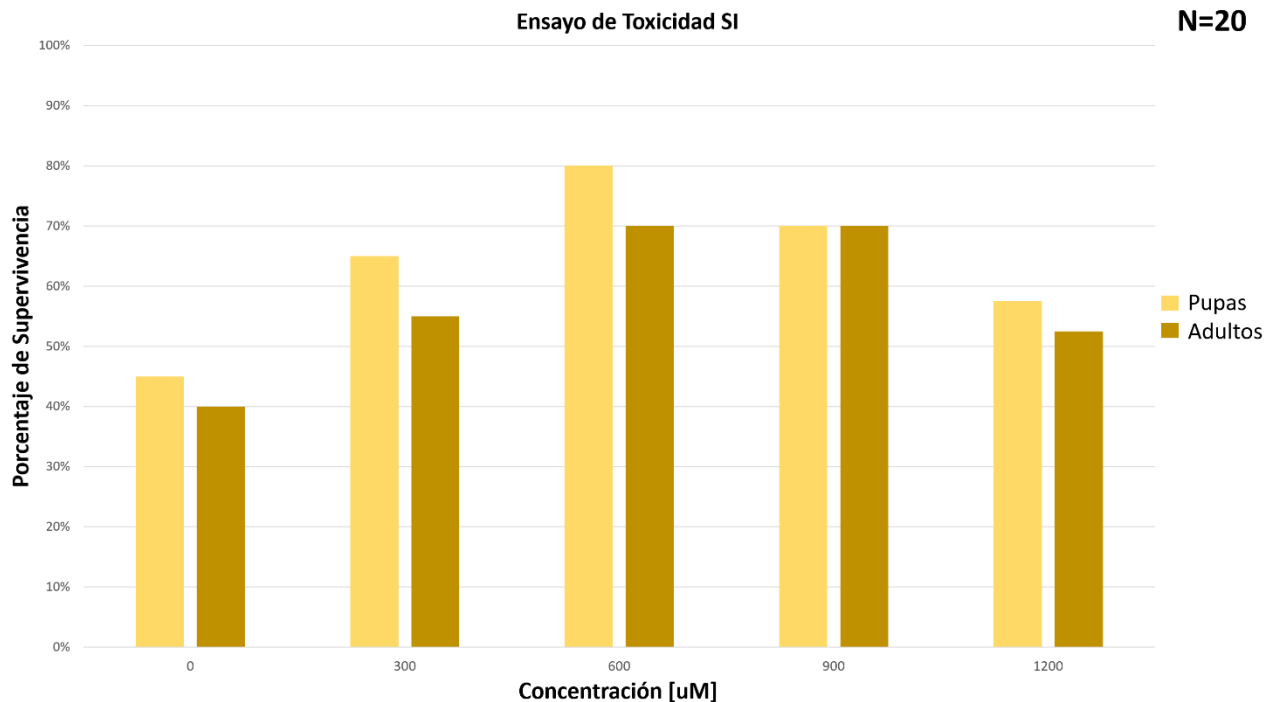
## Resultados

### Evaluación de la toxicidad de derivados de Imidazol

Con el objetivo de evaluar la toxicidad de los derivados de Imidazol empleados y determinar la concentración de ambos compuestos a utilizar en los Ensayos de Geotaxia Negativa, se extrajeron larvas del cruce *GMR-Gal4 x w[1118]*, una condición control, y expuso a concentraciones gradualmente crecientes de ambos compuestos, junto con un control consistiendo de agua pura y destilada. Para cada concentración evaluada, se utilizaron 20 larvas. Este fue un ensayo preliminar que se realizó en una única oportunidad como orientación acerca de la toxicidad de los compuestos.



**Figura 5.** Porcentaje de ejemplares de *Drosophila melanogaster* que llegaron al estado de pupa y al estado adulto frente a distintas concentraciones del compuesto MSI, 1-mesitil-3-(3-sulfonatopropil) Imidazol, y un control empleando agua pura y estéril. En la parte superior derecha se incluye el número de ejemplares utilizados para cada condición.



**Figura 6.** Porcentaje de ejemplares de *Drosophila melanogaster* que llegaron al estado de pupa y al estado adulto frente a distintas concentraciones del compuesto SI, 1-(3-sulfonatopropil) Imidazol, y un control empleando agua pura y estéril. En la parte superior derecha se incluye el número de ejemplares utilizados para cada condición.

Debido a que el ensayo se realizó una única vez, no fue posible realizar un análisis estadístico. Sin embargo, pudo observarse que ninguno de los compuestos produjo mayor letalidad que la condición control en el rango de concentraciones evaluadas, en forma semejante a otros derivados de Imidazol ([Blanco et al., 2018](#)). Se decidió continuar trabajando con la concentración de 900 uM.

## Establecimiento de modelos

### Ojo Compuesto

Inicialmente se realizaron estos ensayos en un grupo sin exposición a los compuestos de Imidazol, con el objetivo de evaluar el efecto de las condiciones neurodegenerativas a través de la expresión de alelos mutados y de obtener un modelo de la estructura del ojo para comparación con los ejemplares expuestos a SI y MSI. Todos los ejemplares fueron evaluados a los 10 días de vida, siendo preservados en 4 mL de Etanol 70% hasta su examinación bajo microscopio. A continuación se detallan los cruces empleados en el ensayo exploratorio.

- Condiciones control:

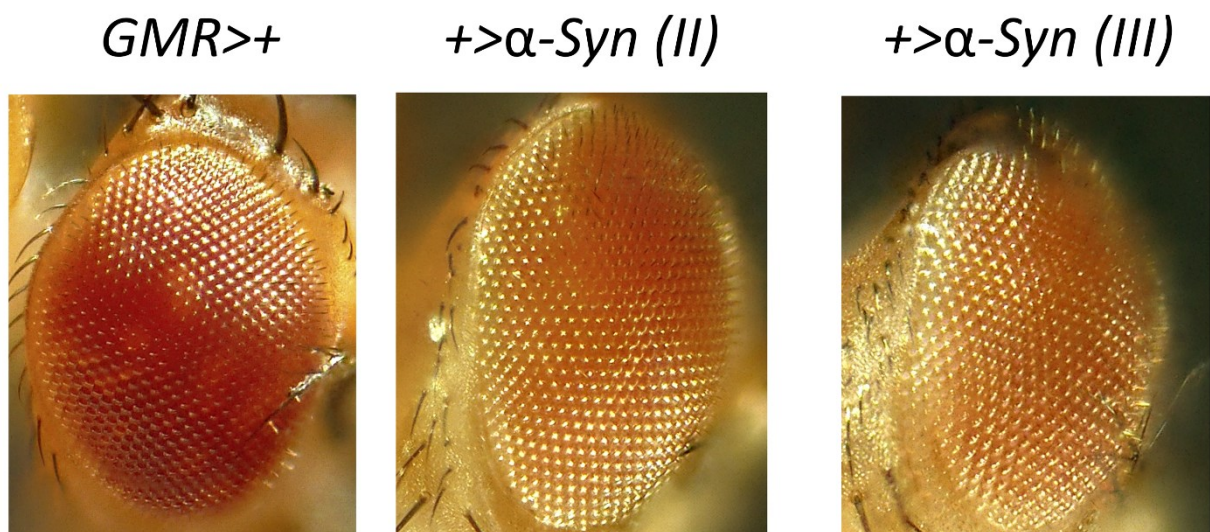
- *GMR-Gal4 x w[1118]*
- *w[1118] x UAS- $\alpha$ syn (II)*

- *w[1118] x UAS- $\alpha$ syn (III)*

- Condiciones experimentales:

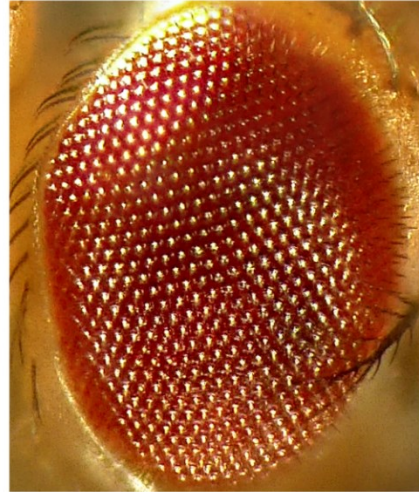
- *GMR-Gal4 x UAS- $\alpha$ syn (II)*
- *GMR-Gal4 x UAS- $\alpha$ syn (III)*
- *GMR-Gal4 x UAS-Htt-Q15-mRFP*
- *GMR-Gal4 x UAS-Htt-Q138-mRFP*

En este primer ensayo no se realizaron los cruces  $+>Htt-Q15-mRFP$  y  $+>Htt-Q138-mRFP$  ya que la expresión de *Htt-Q15* con *GMR-Gal4* puede considerarse un control de la expresión de *Htt-Q138*.



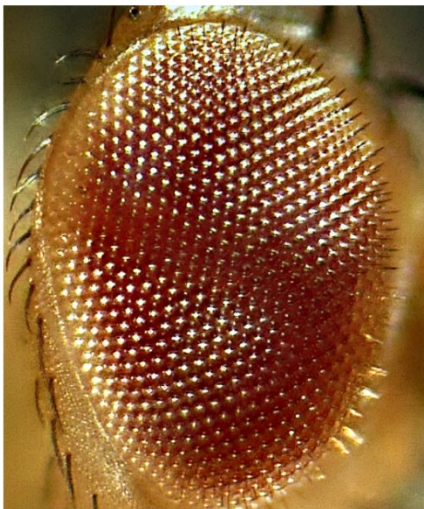
**Figura 7:** Aspecto del ojo en condiciones control *GMR-Gal4 x w[1118]*, *w[1118] x UAS- $\alpha$ syn (II)* y *w[1118] x UAS- $\alpha$ syn (III)*.

No se observó ninguna alteración en la disposición de los ommatidios de los ojos compuestos de los ejemplares de los cruces  $+>\alpha$ syn (II) y  $+>\alpha$ syn (III). Esto es un resultado esperado ya que estos cruces son controles de la inserción y no expresan las formas mutadas de  $\alpha$ -sinucleína en ningún tejido en específico al no estar combinados con líneas *Gal4*.

*GMR> $\alpha$ -Syn (II)**GMR> $\alpha$ -Syn (III)*

**Figura 8:** Comparación de la apariencia de los ojos compuestos de ejemplares de los cruces *GMR-Gal4 x UAS- $\alpha$ syn (II)* y *GMR-Gal4 x UAS- $\alpha$ syn (III)*.

Como se puede ver en la [Figura 8](#), el cruce *GMR-Gal4 x UAS- $\alpha$ syn (II)* presentó ommatidios con una disposición irregular y alterada, aunque con baja expresividad, lo cual causó que el ojo compuesto posea una apariencia levemente rugosa ausente en los demás cruces evaluados.

*GMR>Htt-Q15**GMR>Htt-Q138*

**Figura 9:** Comparación de la apariencia de los ojos compuestos de ejemplares de los cruces *GMR-Gal4 x UAS-Htt-Q15-mRFP* y *GMR-Gal4 x UAS-Htt-Q138-mRFP*.

Por otra parte, *GMR>Htt-Q138* presentó ojos compuestos con omatidios desorganizados, resultando en un aspecto rugoso ausente en el cruce *GMR>Htt-Q15* ([Figura 9](#)).

En estos ensayos no se evaluó el efecto de la sobreexpresión de las líneas *UAS-*asyn*-WT*, *UAS-*asyn*-A53T* ni *UAS-*asyn*-A30P*. Como se describe más adelante, estas líneas no presentaron un fenotipo robusto de declinación de la actividad motora, a diferencia de lo que ocurrió con la sobreexpresión de las construcciones optimizadas para expresión en *Drosophila*. Por esta razón se excluyeron de este análisis.

En conclusión, observamos que solamente la expresión de la forma *Htt-Q138* alteró en forma consistente la disposición de los omatidios. Con respecto a las versiones optimizadas de  $\alpha$ -sinucleína, sólo una de ellas tuvo efecto, aunque sutil. Por estas razones sólo se procedió a evaluar el posible efecto protector en el modelo de enfermedad de Huntington.

### Geotaxia Negativa

Nos propusimos utilizar dos métodos para evaluar el efecto de la neurodegeneración. Uno manipulando la expresión en el ojo con *GMR*, que ya fue descrito, y otro induciendo la expresión en todo el sistema nervioso con las líneas *R57C10-Gal4* o *elav-Gal4*. Ambas líneas se utilizaron para expresar las variantes mutantes de *asyn* y *Htt-Q*.

Para evaluar el efecto degenerativo de las versiones mutadas de  $\alpha$ -sinucleína se las expresó en todo el sistema nervioso con la línea *R57C10-Gal4*. El primer conjunto de ensayos tuvo como objetivo familiarizarse con los protocolos involucrados en el mantenimiento de los ejemplares, la generación de los cruces y la recopilación de datos. Se realizaron empleando los siguientes cruces:

- Control:

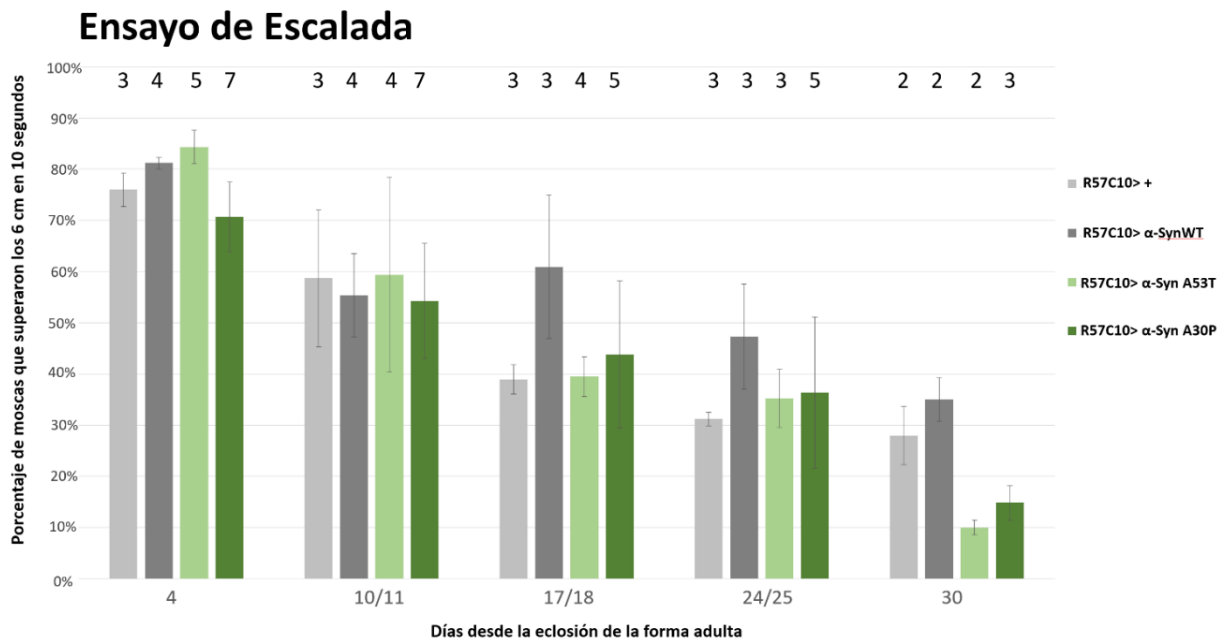
- *R57C10-Gal4 x w[1118]*: Control de la inserción.

- Experimental:

- *R57C10-Gal4 x UAS-*asyn*-WT*: Expresión de una línea salvaje.
- *R57C10-Gal4 x UAS-*asyn*-A53T*: Expresión de una forma mutada.
- *R57C10-Gal4 x UAS-*asyn*-A30P*: Expresión de una forma mutada.

Se emplearon múltiples copias de cada cruce y evaluó su capacidad motora durante un período de 30 días, específicamente a los 4, 10/11, 17/18, 24/25 y 30 días. Todas las copias nacieron en el mismo lapso de tiempo y se analizaron en conjunto, sin recopilar datos pertenecientes a fechas distintas.





**Figura 10.** Representación gráfica de la proporción total de moscas que superaron los 6 centímetros de altura en un lapso de 10 segundos, correspondiente a los cruces *R57C10-Gal4 x w[1118]*, *R57C10-Gal4 x UAS- $\alpha$ -syn-WT*, *R57C10-Gal4 x UAS- $\alpha$ -syn-A53T* y *R57C10-Gal4 x UAS- $\alpha$ -syn-A30P*. Los números en la parte superior del gráfico indican el número de repeticiones de cada cruce empleado.

En este experimento se comparó la expresión de las formas mutadas con los dos controles disponibles, uno que consiste sólo en la línea *Gal4 (R57C10>+)* y otro en la expresión de una forma salvaje de la proteína humana. Los controles mostraron un decrecimiento progresivo en la capacidad motora. El porcentaje de moscas que superó la altura de 6 cm disminuyó 48% y 46% respectivamente entre el día 4 y 30. A los 4 días, entre el 76% y 81% de los individuos superó esa marca, mientras que a los 30 días, este valor disminuyó a aproximadamente 30% (Figura 10). Por otro lado, los cruces *R57C10> $\alpha$ -syn-A53T* y *R57C10> $\alpha$ -syn-A30P* evidenciaron decrecimientos más significativos, mostrando valores a los 4 días iguales a 84% y 71% y terminando a los 30 días con valores iguales a 10% y 15%.

En base a los datos utilizados para la creación de la Figura 10, se realizó un análisis estadístico mediante la Prueba t de Student para determinar si existía una diferencia significativa entre las medias de los conjuntos de datos evaluados. Los resultados se detallan en la Tabla 3.

Cruces	R57C10 > +	R57C10> $\alpha$ -SynWT	R57C10> $\alpha$ -Syn A53T	R57C10> $\alpha$ -Syn A30P
R57C10> $\alpha$ -SynWT	4: NS 10/11: NS 17/18: * 25/26: * 30: ND			
R57C10> $\alpha$ -Syn A53T	4: * 10/11: NS 17/18: NS 25/26: NS 30: ND	4: NS 10/11: NS 17/18: * 25/26: NS 30: **		
R57C10> $\alpha$ -Syn A30P	4: NS 10/11: NS 17/18: NS 25/26: NS 30: ND	4: * 10/11: NS 17/18: * 25/26: NS 30: ND	4: * 10/11: NS 17/18: NS 25/26: NS 30: ND	

**Tabla 3.** Resultados de los análisis estadísticos realizados empleando la Prueba t de Student, habiendo comparado las medias de los cruces *R57C10-Gal4 x w<sup>1118</sup>*, *R57C10-Gal4 x UAS- $\alpha$ syn-WT*, *R57C10-Gal4 x UAS- $\alpha$ syn-A53T* y *R57C10-Gal4 x UAS- $\alpha$ syn-A30P*. NS= No Significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . \* = Significativo para  $\alpha/2= 0,025$  pero no para  $\alpha/2=0,005$ . \*\* = Altamente significativo, tanto para  $\alpha/2= 0,025$  como  $\alpha/2= 0,005$ . ND= No Determinado. Los cuadros grises indican comparaciones de media mediante t de Student no realizadas en este ensayo.

En este primer ensayo se analizaron las respectivas medias correspondientes a cada edad, evaluando el cruce control *R57C10>+* contra *R57C10> $\alpha$ syn-WT*, el cual expresó una forma salvaje de Huntingtina a nivel del tejido nervioso. Este cruce posteriormente se evaluó en conjunto a los cruces *R57C10> $\alpha$ syn-A53T* y *R57C10> $\alpha$ syn-A30P*, los cuales expresan formas mutadas de  $\alpha$ -sinucleína en el tejido nervioso, finalmente comparando estos dos cruces entre sí. El efecto de las formas mutadas sólo se consideró estadísticamente significativo cuando la comparación contra ambos controles lo fue.

Encontramos que las condiciones mutadas fueron significativamente diferentes del control *R57C10> $\alpha$ syn-WT* al día 17/18, pero no al día 25/26, a pesar de que se observa una tendencia en ese sentido. Sería relevante realizar más repeticiones para comprobar si tal diferencia se vuelve significativa. Sin embargo, al utilizar el criterio indicado más arriba y comparar con ambos controles en simultáneo, podemos concluir que la expresión de las formas mutadas no produce un efecto deletéreo consistentemente mayor que el de los controles entre los días 4 y 25. Diferente fue el resultado a los 30 días, cuando se evidenció una disminución mayor que los controles ([Figura 10](#)). La tendencia fue clara, pero lamentablemente no se pudo realizar un análisis estadístico en moscas de esta edad porque la cantidad de réplicas disponibles fue menor a 3 en la mayoría de las condiciones, consecuencia del envejecimiento y muerte de los individuos.

Debido a que con los cruces *R57C10> $\alpha$ syn-A53T* y *R57C10> $\alpha$ syn-A30P* sólo se observó un efecto significativo a los 30 día de vida y a la dificultad involucrada en lograr que los ejemplares lleguen a esta edad, se probó otra construcción que expresa una versión salvaje de  $\alpha$ -sinucleína optimizada para la expresión en *Drosophila*. Se han descrito casos de pacientes en los que la enfermedad parece estar relacionada con el aumento de la expresión del gen y no con una forma mutada ([Chouhan et al., 2016](#)). En estas nuevas

líneas, la secuencia de ADN estaba modificada de manera que codifique la misma secuencia proteica, pero utilizando los codones de uso más frecuente en *Drosophila*. Con esta estrategia se logró una expresión 20 veces mayor que con las otras construcciones. Hay disponibles dos inserciones de la misma construcción, una en el cromosoma 2 y otra en el 3, por lo que evaluamos el efecto de la expresión pan-neuronal de ambas inserciones en un lapso de 4 a 30 días para encontrar el tiempo más corto en que tienen un efecto consistente sobre la actividad motora.

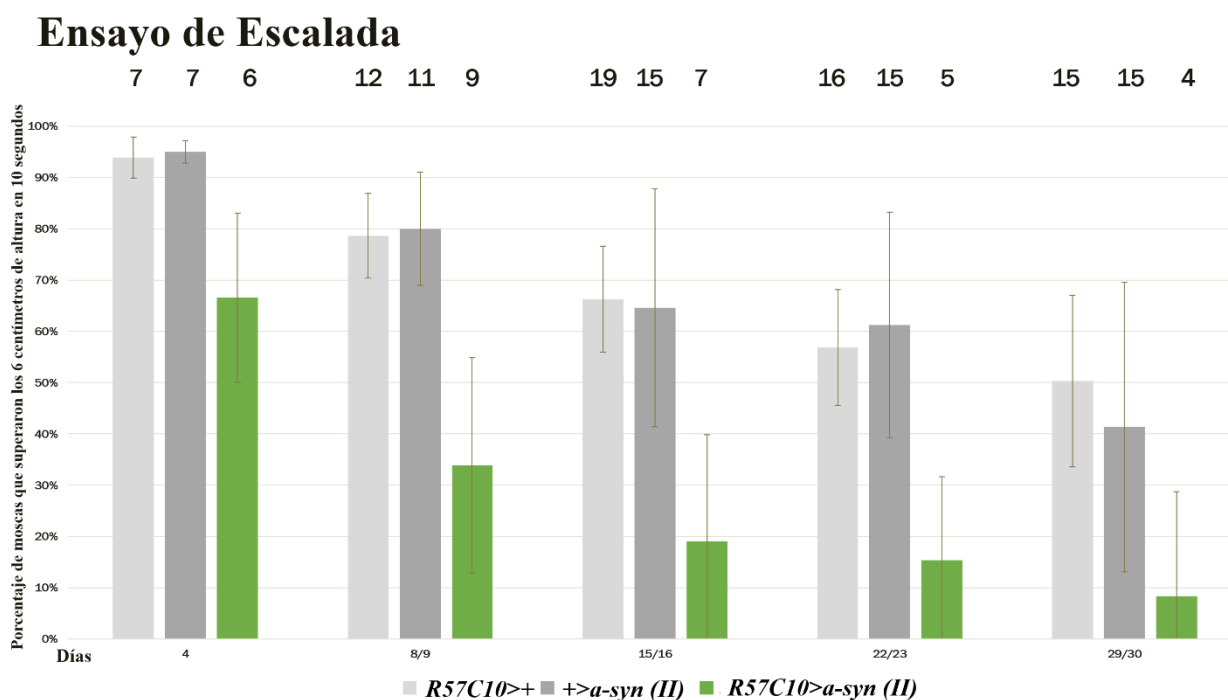
Para el primer ensayo de este nuevo conjunto, se emplearon los siguientes cruces:

- Controles:

- *R57C10-Gal4 x w[1118]*: Control de la inserción.
- *w[1118]x UAS-asyn (II)*: Control de la inserción.

- Experimental:

- *R57C10-Gal4 x UAS-asyn (II)*: Expresión de una forma salvaje a alto nivel.



**Figura 11.** Representación gráfica de la proporción total de moscas que superaron los 6 centímetros de altura en un lapso de 10 segundos, correspondiente a los cruces *R57C10-Gal4 x w[1118]*, *w[1118]>UAS-asyn (II)* y *R57C10-Gal4 x UAS-asyn (II)*. Los números en la parte superior del gráfico indican el número de repeticiones de cada cruce empleado.



Cruces	<i>R57C10&gt;+</i>	<i>+&gt;<math>\alpha</math>-Syn (II)</i>
<i>R57C10&gt;<math>\alpha</math>-Syn (II)</i>	4: ** 8/9: ** 15/16: ** 22/23: ** 29/30: **	4: ** 8/9: ** 15/16: ** 22/23: ** 29/30: **

**Tabla 4.** Resultados de los análisis estadísticos realizados empleando la Prueba t de Student, habiendo comparado las medias de los cruces *R57C10-Gal4 x w[1118]*, *w[1118]>UAS- $\alpha$ syn (II)* y *R57C10-Gal4 x UAS- $\alpha$ syn (II)*. \*\*= Altamente significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ .

Se observó una diferencia altamente significativa al comparar ambos cruces control con el cruce *R57C10> $\alpha$ syn (II)*, con este último presentando un decrecimiento desde 66% en el día 4 hasta un valor ligeramente menor al 10% en el día 29/30 y con el decrecimiento más significativo ocurriendo en las fechas 8/9 y 15/16. Esta diferencia altamente significativa de las medias del cruce *R57C10> $\alpha$ syn (II)* en comparación a los 2 cruces control, al igual que la disposición rugosa del ojo resultó en el uso de la línea *UAS- $\alpha$ syn (II)* para los ensayos de escalada empleando los compuestos MSI y SI.

Los controles presentaron una declinación gradual de la capacidad motora entre el día 4 y 30. En este caso la sobreexpresión de *UAS- $\alpha$ syn (II)* produjo un efecto aún mayor que en los ensayos empleados con *syn-A53T* y *syn-A30P*. La diferencia con respecto a los dos controles fue estadísticamente significativa en todas las edades testeadas, según se indica en la [Tabla 4](#). Es importante destacar que ya al día 8 y 15, se observó una diferencia notable en la capacidad motora, lo que convierte a esta línea en un buen candidato para testear las drogas de interés.

Pasando al segundo ensayo del nuevo conjunto, a continuación se encuentran los cruces utilizados:

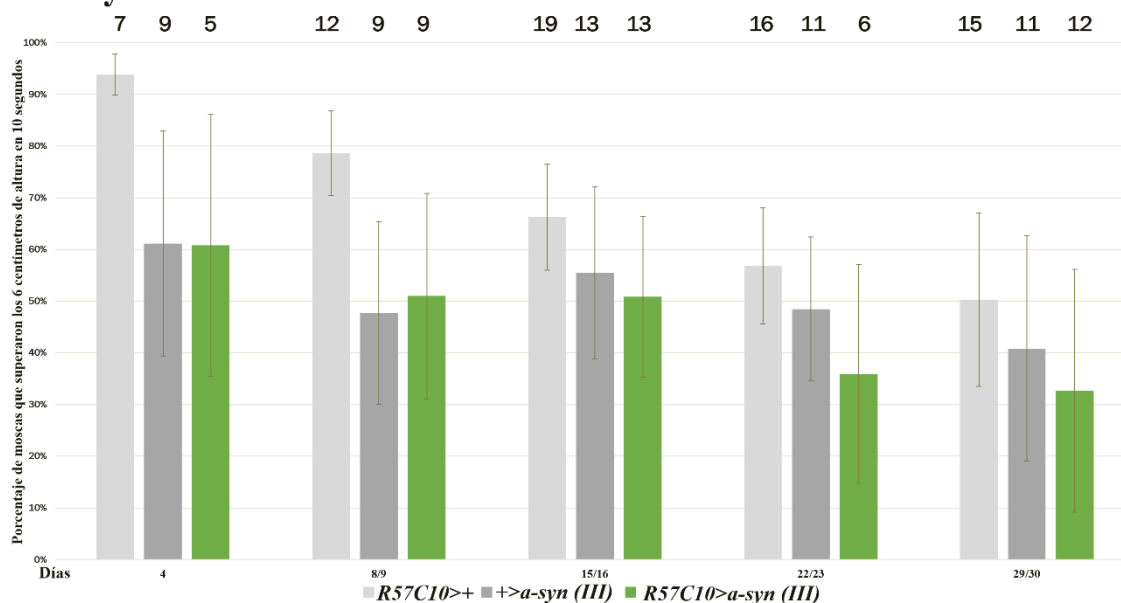
- Controles:

- *R57C10-Gal4 x w[1118]*: Control de la inserción, fue el mismo cruce que en el ensayo previo.
- *w[1118] x UAS- $\alpha$ syn (III)*: Control de la inserción.

- Experimental:

- *R57C10-Gal4 x UAS- $\alpha$ syn (III)*: Expresión de una forma mutada.

## Ensayo de Escalada



**Figura 12.** Representación gráfica de la proporción total de moscas que superaron los 6 centímetros de altura en un lapso de 10 segundos, correspondiente a los cruces *R57C10-Gal4 x w[1118]*, *UAS-asyn (III) x w[1118]* y *R57C10-Gal4 x UAS-asyn (III)*. Los números en la parte superior del gráfico indican el número de repeticiones de cada cruce empleado.

Cruces	<i>R57C10&gt;+</i>	+> <i>α-Syn (III)</i>
<i>R57C10&gt;α-Syn (III)</i>	4: * 8/9: ** 15/16: ** 22/23: * 29/30: *	4: NS 8/9: NS 15/16: NS 22/23: NS 29/30: NS

**Tabla 5.** Resultados de los análisis estadísticos realizados empleando la Prueba t de Student, habiendo comparado las medias de los cruces *R57C10-Gal4 x w[1118]*, *UAS-asyn (III) x w[1118]* y *R57C10-Gal4 x UAS-asyn (III)*. NS= No Significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . \* = Significativo para  $\alpha/2= 0,025$  pero no para  $\alpha/2=0,005$ . \*\*= Altamente significativo, tanto para  $\alpha/2= 0,025$  como  $\alpha/2= 0,005$ .

A diferencia de lo ocurrido con la sobreexpresión de la inserción de *UAS-asyn* en el cromosoma II, la inserción en el cromosoma III no presentó un efecto muy notorio ni consistente. Si bien hubo una tendencia a alterar la capacidad motora mayor que los controles, no fue consistentemente significativa.

La sobreexpresión de *UAS-asyn (III)* indujo una mayor pérdida de movilidad que fue estadísticamente significativa respecto del control *R57C10*, pero no del control de la inserción en ninguno de los momentos ensayados. Estos resultados, junto con los datos de sobreexpresión en el ojo *GMR-Gal4* nos condujeron a descartar esta construcción para los estudios posteriores.

A continuación, evaluamos la afectación progresiva de la capacidad motora como consecuencia de la expresión de *UAS-Htt-Q15-mRFP* y *UAS-Htt-Q138-mRFP*. En este caso, evaluamos en primer lugar el efecto de la construcción con un número de repeticiones de glutamina normal, que no está asociado al desarrollo de Enfermedad de Huntington, y luego de una construcción con 138 repeticiones.

En ensayos preliminares encontramos que la expresión de *Htt-Q138* con *R57C10* produjo una alta mortalidad. La mayoría de los individuos morían durante el estadio larval o durante la metamorfosis, logrando que muy pocos animales eclosionaran como adultos. Para disminuir la alta letalidad, usamos otra línea *Gal4* pan-neuronal que tiene menor nivel de expresión, *elav-Gal4*.

Realizamos los siguientes cruces:

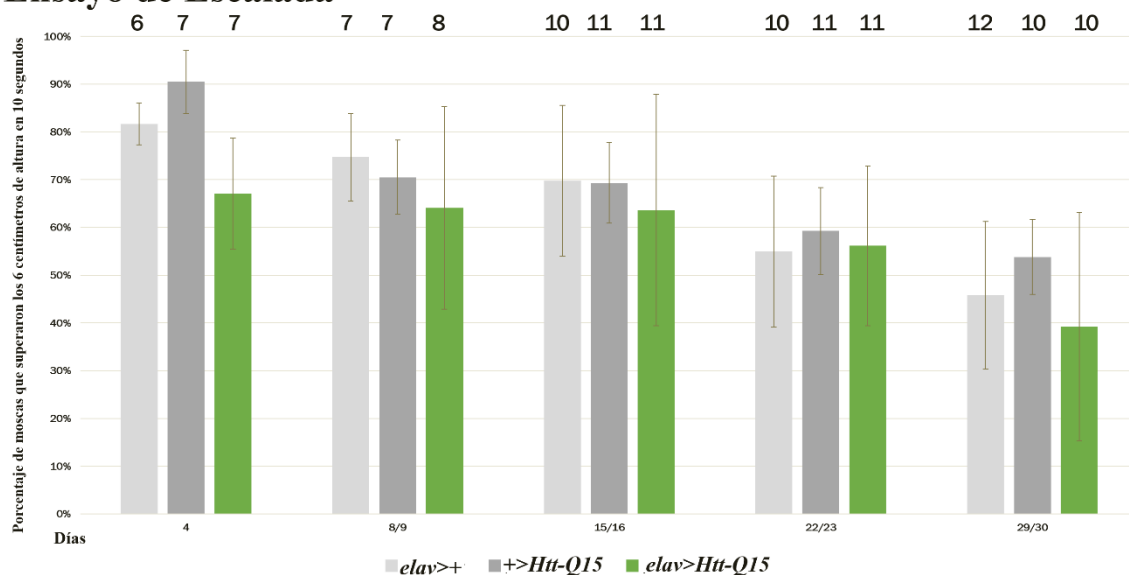
- Controles:

- *elav-Gal4 x w[1118]*
- *w[1118] x UAS-Htt-Q15-mRFP*

- Experimental:

- *elav-Gal4 x UAS-Htt-Q15-mRFP*

### Ensayo de Escalada



**Figura 13.** Representación gráfica de la proporción total de moscas que superaron los 6 centímetros de altura en un lapso de 10 segundos, correspondiente a los cruces *elav-Gal4 x w[1118]*, *w[1118] x UAS-Htt-Q15-mRFP* y *elav-Gal4 x UAS-Htt-Q15-mRFP*. Los números en la parte superior del gráfico indican el número de repeticiones de cada cruce empleado.

Cruces	<i>elav</i> > +	+> <i>Htt-Q15</i>
<i>elav</i> > <i>Htt-Q15</i>	4: * 8/9: NS 15/16: NS 22/23: NS 29/30: NS	4: ** 8/9: NS 15/16: NS 22/23: NS 29/30: NS

**Tabla 6.** Resultados de los análisis estadísticos realizados empleando la Prueba t de Student, habiendo comparado las medias de los cruces *elav-Gal4 x w[1118]*, *w[1118] x UAS-Htt-Q15-mRFP* y *elav-Gal4 x UAS-Htt-Q15-mRFP*. NS= No Significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . \* = Significativo para  $\alpha/2= 0,025$  pero no para  $\alpha/2=0,005$ . \*\* = Altamente significativo, tanto para  $\alpha/2= 0,025$  como  $\alpha/2= 0,005$ .

Como puede observarse en las [Figura 13](#), la reducción en la capacidad motriz de los ejemplares que expresaron la forma de Huntingtina con 15 repeticiones de Glutamina nunca llegó a una diferencia significativa en comparación con ambas condiciones control, con dicho decrecimiento siendo solo del 27% desde el día 4 hasta el día 29/30, mientras que ambas condiciones control la diferencia de capacidad motriz entre la fecha inicial y final solamente fue igual a 36%.

Los resultados mayoritariamente no significativos de la Prueba t de Student, al igual que la falta de alteraciones observadas en la disposición de los ommatidios en el cruce *elav*>*Htt-Q15* resultaron en el descarte de esta línea para la realización de los ensayos con MSI y SI ya que se comportó como era esperado de un control.

La última condición evaluada fue la sobreexpresión de *UAS-Htt-Q138-mRFP*, a través de los siguientes cruces:

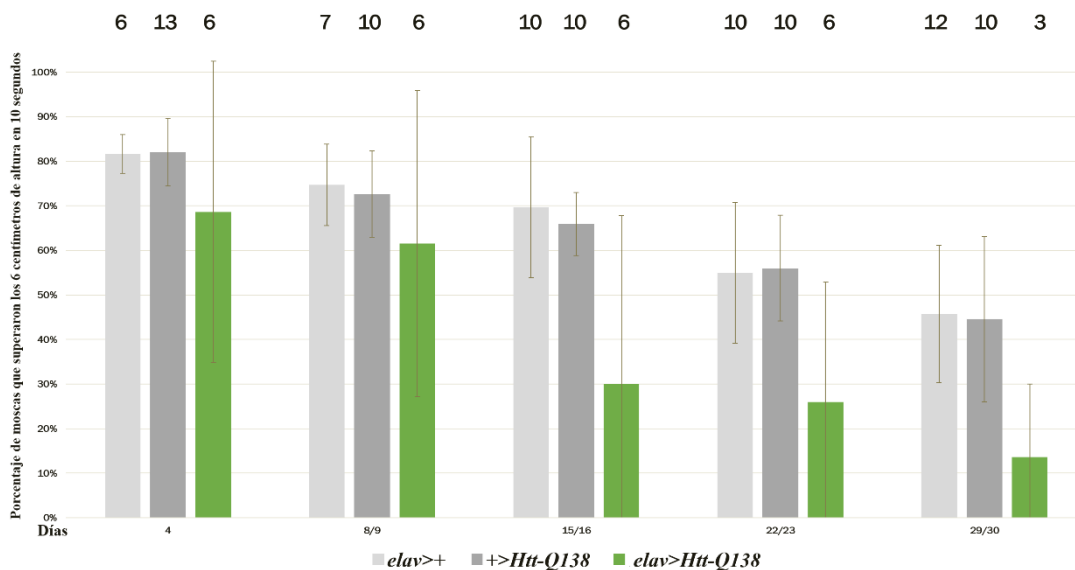
- Controles:

- *elav-Gal4 x w[1118]*: Control de la inserción, fue el mismo cruce que en el ensayo previo.
- *w[1118] x UAS-Htt-Q138-mRFP*: Control de la inserción.

- Experimental:

- *elav-Gal4 x UAS-Htt-Q138-mRFP*: Expresión de una forma mutada.

## Ensayo de Escalada



**Figura 14.** Representación gráfica de la proporción total de moscas que superaron los 6 centímetros de altura en un lapso de 10 segundos, correspondiente a los cruces *elav-Gal4 x w[1118]*, *w[1118] x UAS-Htt-Q138-mRFP* y *elav-Gal4 x UAS-Htt-Q138-mRFP*. Los números en la parte superior del gráfico indican el número de repeticiones de cada cruce empleado.

Cruces	<i>elav&gt;+</i>	<i>+&gt;Htt-Q138</i>
<i>elav&gt;Htt-Q138</i>	4: NS 8/9: NS 15/16: * 22/23: * 29/30: *	4: NS 8/9: NS 15/16: * 22/23: * 29/30: *

**Tabla 7.** Resultados de los análisis estadísticos realizados empleando la Prueba t de Student, habiendo comparado las medias de los cruces *elav-Gal4 x w[1118]*, *w[1118] x UAS-Htt-Q138-mRFP* y *elav-Gal4 x UAS-Htt-Q138-mRFP*. NS= No Significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . \* = Significativo para  $\alpha/2=0,025$  pero no para  $\alpha/2=0,005$ . Los cuadros grises indican comparaciones de media mediante t de Student no realizadas en este ensayo.

Observando la [Figura 14](#) se puede determinar que no hay diferencias entre las medias de los controles en todas las fechas evaluadas, con ambos conjuntos de datos presentando la misma declinación de la capacidad motora en relación al avance de la edad. En estos controles, dicha capacidad disminuyó entre el 7% y 15% entre cada fecha evaluada, mientras que los ejemplares del cruce *elav>Htt-Q138* presentaron una declinación estadísticamente significativa a partir de los 15/16 días, la cual se mantuvo hasta el final de este ensayo ([Tabla 7](#)).

La expresión pan-neuronal con *elav>Htt-Q138* resultó en un menor número de moscas que sobrevivieron hasta la edad adulta, con la mayoría de los ejemplares adultos expresando la forma mutada de Huntingtina a una tasa menor ([Krench., 2016](#)) y siendo descartadas de este ensayo. Los ejemplares capaces de eclosionar que fueron incluidos en

este ensayo presentaron una incapacidad para desplegar las alas, junto con motilidad altamente reducida y la falta de capacidad para escalar superficies verticales por un período de tiempo superior a 4 segundos. La extensión de las alas está controlada por las neuronas CCAP, un conjunto de neuronas centrales cuya estimulación ocasiona la liberación de bursicona. Este conjunto de neuronas media también comportamientos relacionados con las ecdisis insensibles al ambiente en el desarrollo de estos animales, antes de la emergencia de la forma adulta ([Peabody et al., 2009](#)). La aparición del fenotipo de incapacidad de extensión de las alas en una proporción variable de individuos puede ser el resultado de la variabilidad poblacional en la expresión de los transgenes. Si bien todas las moscas evaluadas son genéticamente idénticas, el nivel de expresión de *Htt-Q138* no necesariamente lo es. Podemos suponer que aquellos individuos con un alto nivel de expresión de *Htt-Q138* mueren durante el estadio larvario o pupal, los que tienen niveles intermedios son capaces de eclosionar pero ya presentan algún tipo de daño neuronal que se manifiesta en la incapacidad de desplegar las alas, y finalmente, los de menor expresión despliegan las alas normalmente y son aparentemente normales en sus primeros días de vida. Sin embargo, todos ellos presentan algún grado de pérdida de la motilidad con el envejecimiento.

La observación de que las moscas *elav>Htt-Q138* no despliegan las alas sugiere que estas u otras neuronas están afectadas. Durante este trabajo no se caracterizó en profundidad este fenotipo, pero es recomendado realizarlo en el futuro, ya que la imposibilidad de plegar y extender las alas pero la capacidad de caminar indican que la población neuronal involucrada es particularmente sensible a la acumulación de *Htt-Q138* y apta para estudiar mecanismos patogénicos.

Los resultados mayoritariamente significativos junto con la organización ocular alterada del cruce *elav>Htt-Q138* resultaron en la inclusión de esta línea en los ensayos de escalada realizados con los compuestos MSI y SI.

## **Evaluación del efecto protector de los derivados de Imidazol SI y MSI**

### **Sobre modelos de degeneración del Ojo Compuesto**

Los siguientes ensayos se realizaron exponiendo a los cruces empleados a una condición control caracterizada por el uso de agua pura y destilada y 2 condiciones en las cuales se emplearon los compuestos MSI y SI, aunque debido a la cantidad limitada del compuesto MSI su uso se limitó al cruce *GMR>Htt-Q138*.

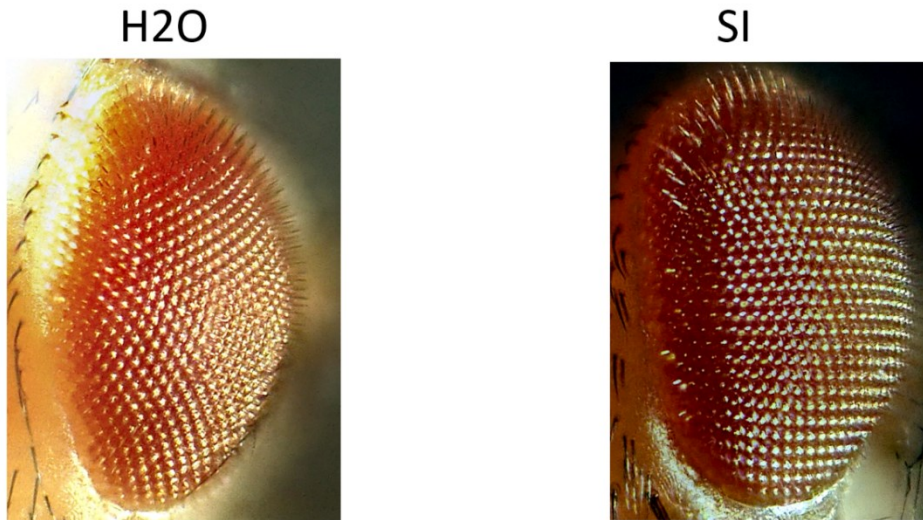
- Condiciones Control:

- *GMR-Gal4 x w[1118]*
- *w[1118] x UAS-Htt-Q138-mRFP*

- Condición Experimental:

- *GMR-Gal4 x UAS-Htt-Q138-mRFP*

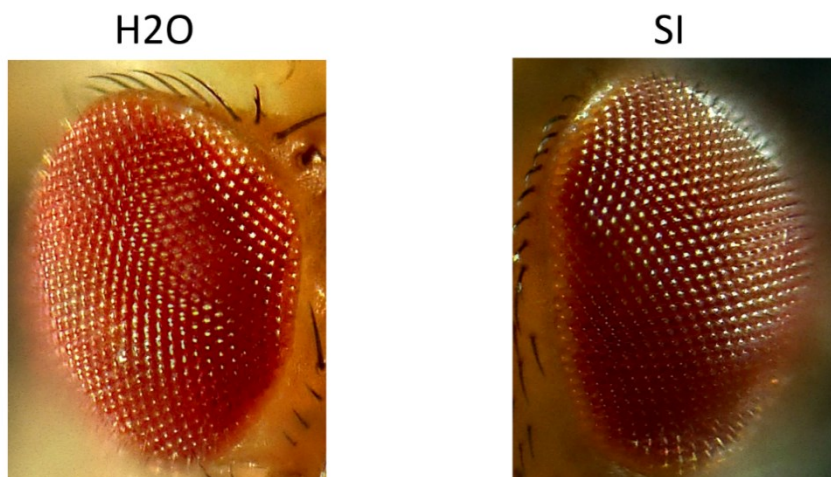
## *GMR>+*



**Figura 15:** Comparación de la apariencia de los ojos compuestos de ejemplares del cruce *GMR-Gal4*  $\times$  *w[1118]*, expuestos tanto a agua pura y destilada como a SI.

La primera condición es *GMR>+*, un cruce control en el que los ejemplares no mostraron ninguna alteración en la organización de sus omatidios, como era de esperar. Se puede observar que el compuesto SI no tuvo efecto adverso sobre la estructura del ojo compuesto, con ambas condiciones presentando un ojo de aspecto normal.

## *+>Htt-Q138*



**Figura 16:** Comparación de la apariencia de los ojos compuestos de ejemplares del cruce *w[1118]*  $\times$  *UAS-Htt-Q138*, expuestos tanto a agua pura y destilada como a SI.



La segunda condición también es un control de la inserción obtenida mediante el cruzamiento de *UAS-Htt-Q138-mRFP* con la cepa control *w[1118]*. Nuevamente, no se observó ningún efecto adverso sobre la estructura del ojo compuesto por parte de SI, por lo que podemos concluir que el compuesto no resulta tóxico a la concentración evaluada, confirmando la evaluación de toxicidad inicial.

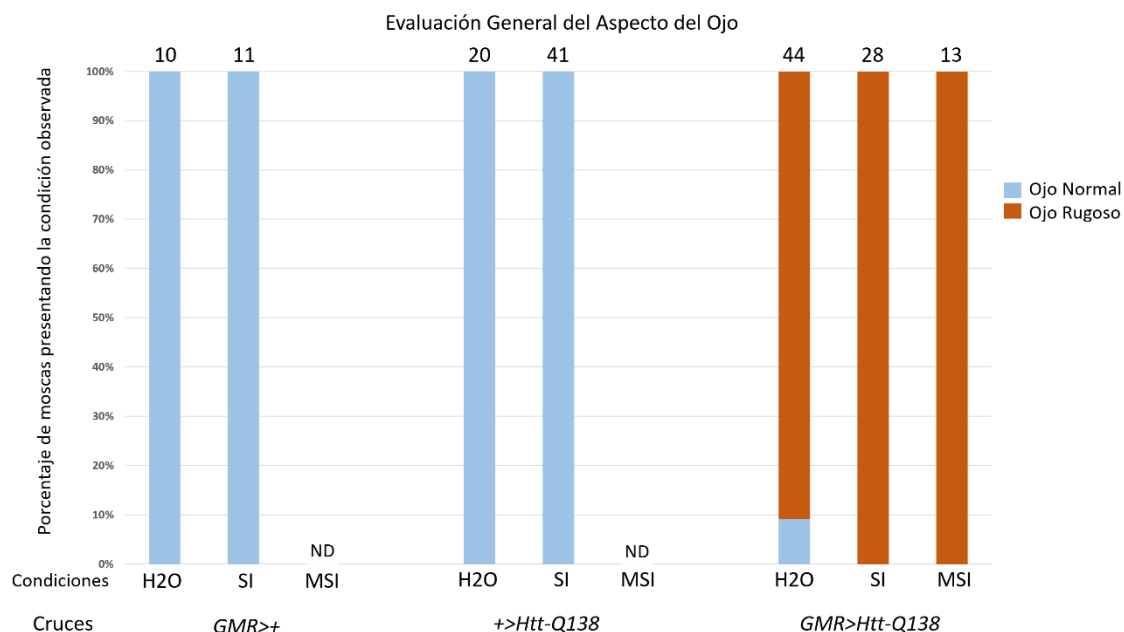
### *GMR>Htt-Q138*



**Figura 17:** Comparación de la apariencia de los ojos compuestos de ejemplares del cruce *GMR-Gal4* x *UAS-Htt-Q138*, expuestos tanto a agua pura y destilada como a SI.

Finalmente, se evaluó si SI y MSI eran capaces de evitar la degeneración asociada a la expresión de la forma mutada de Huntingtina. Encontramos que ninguno de los dos compuestos evaluados tuvo el efecto buscado. Los animales que expresaron la versión de Huntingtina con una expansión de 138 glutaminas (*Htt-Q138*) y se les administró agua presentaron un ojo rugoso y lo mismo ocurrió cuando se les administró en la comida los compuestos SI y MSI ([Figura 17](#)). Mostraron ojos compuestos de apariencia rugosa debido a la disposición desorganizada de sus ommatidios.





**Figura 18.** Gráfico de barras representando la proporción de ejemplares de *Drosophila* correspondientes a cada cruce y condición que presentaron ojos normales, con omatidios de disposición normal, o rugosos, con omatidios de disposición desorganizada. En la parte superior de cada columna se encuentra el número de ejemplares perteneciente a dicho cruce y condición. ND = No Determinado.

La expresión de *Htt-Q138* en el ojo presenta el fenotipo rugoso con alta penetrancia, es decir, todos los individuos muestran consistentemente un ojo con un patrón de omatidios desorganizado. En este experimento se encontraron 4 de los 44 ejemplares de este cruce expuestos a agua pura y destilada con un aspecto normal. Consideramos que esto puede deberse a que las moscas, teniendo el genotipo correcto (*GMR-Gal4>UAS-Htt-Q138-mRFP*) carecieron del elemento activador de la transcripción *Gal4*. Esto se debe a que la línea *GMR-GAL4* se encuentra insertada en el cromosoma 2 y está balanceada con un cromosoma balanceador que incluye la mutación conocida como *Curly*, que produce alas curvas. Esta mutación asociada permite identificar y remover a las moscas que no presentaron el genotipo buscado durante esta investigación mediante selección negativa. Las moscas que no heredan *Curly* reciben *GMR-Gal4*. Sin embargo, la expresividad de esta mutación está influenciada por la temperatura. Aproximadamente el 92% de las hembras y el 41% en machos expuestos a una temperatura de 24 grados Celsius durante el estado larval y adulto presentan alas curvas (Nozawa., 1956), por lo que es posible que las 4 moscas que mostraron propiedades oculares anómalas para el cruce hayan presentado el gen *Curly* sin expresarlo, y por lo tanto, no hubieran recibido *GMR-Gal4*.

En resumen, los ensayos realizados en esta primera sección, en que usamos la estructura del ojo para evaluar el efecto tóxico de la expresión de *asyn* y *Htt* asociadas a neurodegeneración, nos permiten concluir que no todas las construcciones tuvieron el efecto esperado. La expresión de *asyn (III)* no resultó en alteraciones en la estructura del ojo compuesto, mientras que la de *Htt-Q138* y *asyn (II)* sí produjeron alteraciones en la disposición de omatidios. La identificación del tipo celular afectado requerirá de estudios histológicos (Bolus et al., 2020; Chouhan et al., 2016; Feany et al., 2000).

La observación de un patrón de degeneración asociado a la expresión de *Htt-Q138* nos permite concluir también que, aunque en el caso de SI y MSI no hayamos obtenido el resultado esperado, el sistema puede constituir un buen modelo para testear otras drogas.

### **Sobre modelos de Geotaxia Negativa**

Habiendo analizado la variación y decrecimiento en la capacidad motriz de los ejemplares de *Drosophila* durante los períodos de tiempo asignados, se determinaron las edades correspondientes a los 8 y 15 días desde la eclosión de la forma adulta como los tiempos óptimos para la evaluación del posible efecto de los derivados de Imidazol, siendo estas fechas además las más convenientes para la optimización del tiempo disponible durante la redacción de esta Tesis de Grado.

Los ensayos de Geotaxia Negativa finales se realizaron mediante la exposición de los cruces seleccionados mediante los ensayos previos a 3 condiciones: Una condición control empleando 90 uL de agua pura y destilada y 2 condiciones experimentales en las cuales se utilizaron 90 uL del compuesto MSI y 90 uL de SI en copias separadas de los cruces (concentración final de 900 uM), con el objetivo de evaluar el efecto de estos compuestos sobre la disminución en la capacidad motriz observada en los ensayos previos. Al igual que en los ensayos anteriores, las copias de cada cruce se recolectaron al mismo tiempo y los datos obtenidos se distribuyeron y evaluaron según la edad y condiciones expuestas. A continuación se detallan los cruces empleados:

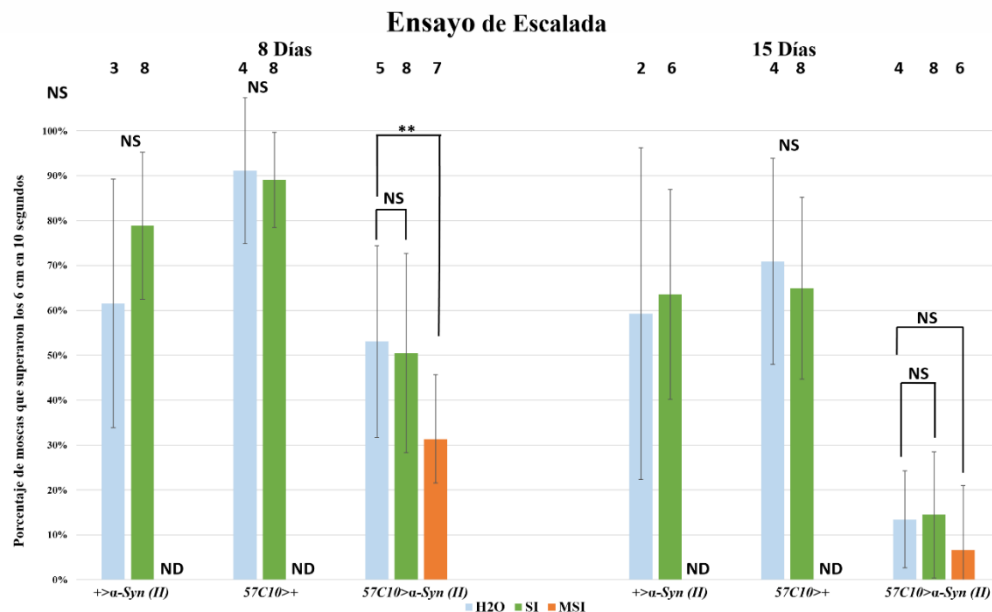
- Controles:

- *elav-Gal4 x w[1118]*: Control de la inserción.
- *w[1118] x UAS-Htt-Q138-mRFP*: Control de la inserción.
- *R57C10-Gal4 x w[1118]*: Control de la inserción.
- *w[1118] x UAS-*asyn* (II)*: Control de la inserción.

- Experimental:

- *elav-Gal4 x UAS-Htt-Q138-mRFP*: Expresión de una forma mutada de Htt.
- *R57C10-Gal4 x UAS-*asyn* (II)*: Expresión de una forma salvaje a alto nivel.

En primer lugar evaluamos el potencial efecto protector de los derivados de Imidazol en el modelo de Enfermedad de Parkinson ([Figura 19](#)). Para cada cruce control se compararon estadísticamente las medias de los ejemplares expuestos a agua pura contra las medias de los ejemplares expuestos a SI y MSI, mientras que al evaluar los cruces experimentales las medias de las poblaciones expuestas a cada derivado de Imidazol se evaluaron contra las medias de los ejemplares expuestos a agua ([Tablas 8 y 9](#)).



**Figura 19.** Representación gráfica de la proporción total de moscas que superaron los 6 centímetros de altura en un lapso de 10 segundos, correspondiente a los *R57C10-Gal4 x w[1118], w[1118] x UAS-αsyn (II)* y *R57C10-Gal4 x UAS-αsyn (II)* en una edad de los ejemplares adultos igual a 8 y 15 días. NS= No Significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . \*\* = Altamente significativo, tanto para  $\alpha/2= 0,025$  como  $\alpha/2= 0,005$ . ND= No Determinado. Los números en la parte superior del gráfico indican el número de repeticiones de cada cruce empleado.

### 8 Días

Cruces	<i>w[1118]&gt;UAS-α-Syn (II)</i>	<i>R57C10-GAL4&gt;w[1118]</i>	<i>R57C10-GAL4&gt;UAS-α-Syn (II)</i>
<i>R57C10-GAL4&gt;UAS-α-Syn (II)</i>	SI: ** H2O: NS	SI: ** H2O: **	SI: NS MSI: **

**Tabla 8.** Resultados de los análisis estadísticos realizados empleando la Prueba t de Student, habiendo comparado las medias de los cruces *R57C10-Gal4 x w[1118], w[1118] x UAS-αsyn (II)* y *R57C10-Gal4 x UAS-αsyn (II)* en una edad de los ejemplares adultos igual a 8 días. NS= No Significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . \*\* = Altamente significativo, tanto para  $\alpha/2= 0,025$  como  $\alpha/2= 0,005$ .

### 15 Días

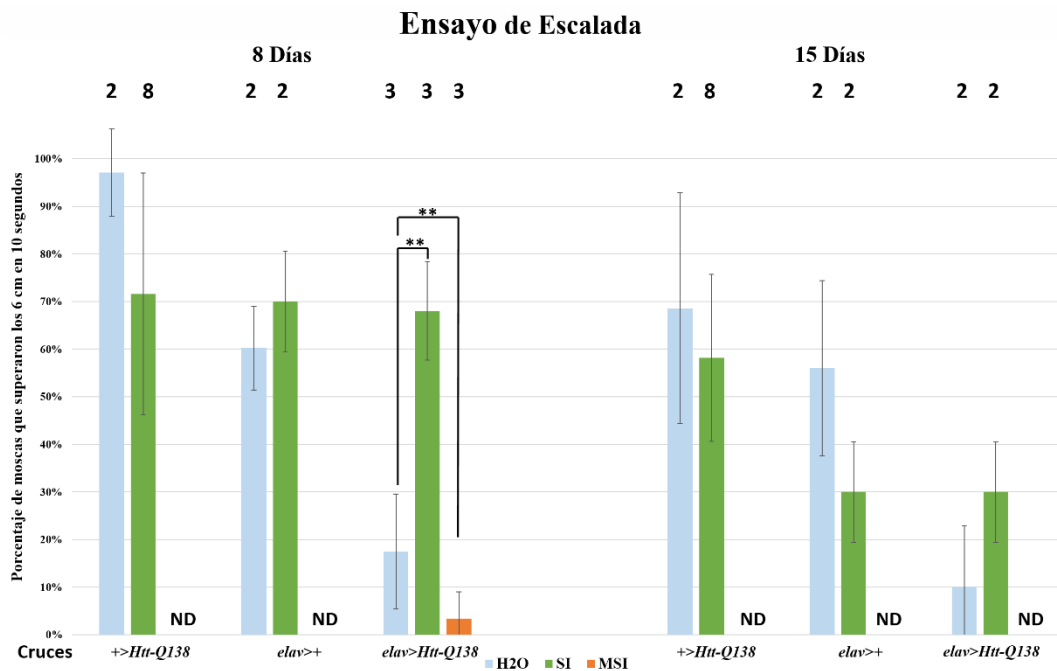
Cruces	<i>w[1118]&gt;UAS-α-Syn (II)</i>	<i>R57C10-GAL4&gt;w[1118]</i>	<i>R57C10-GAL4&gt;UAS-α-Syn (II)</i>
<i>R57C10-GAL4&gt;UAS-α-Syn (II)</i>	SI: ** H2O: **	SI: ** H2O: **	SI: NS MSI: NS

**Tabla 9.** Resultados de los análisis estadísticos realizados empleando la Prueba t de Student, habiendo comparado las medias de los cruces *R57C10-Gal4 x w[1118], w[1118]x UAS-αsyn (II)* y *R57C10-Gal4 x UAS-αsyn (II)* en una edad de los ejemplares adultos igual a 15 días. NS= No Significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . \*\* = Altamente significativo, tanto para  $\alpha/2= 0,025$  como  $\alpha/2= 0,005$ .

Se observó que, en concordancia con los resultados previos, la expresión de *αsyn (II)* indujo una pérdida de la capacidad motora, la cual fue mayor a los 15 que a los 8 días de edad.

El tratamiento con SI no tuvo ningún efecto benéfico en el desarrollo de la patología. No se encontraron diferencias significativas en las capacidades motrices de los ejemplares que expresan  $\alpha$ -sinucleína expuestos a SI en comparación a aquellos que sólo recibieron agua, tanto a los 8 como a los 15 días (Figura 19, Tablas 8 y 9). Por otra parte, el tratamiento con MSI sí tuvo un efecto sobre la capacidad motora, pero en el sentido contrario al esperado. Este efecto sólo fue estadísticamente significativo al día 8, pero mantuvo la misma tendencia al día 15 (Figura 19).

Similar análisis se hizo sobre el modelo de Huntington. Como puede observarse tanto en la Figura 20 como en las Tablas 10 y 11, se produjo un declive progresivo en la capacidad motora con la edad en las condiciones control, que fue agravado por la expresión pan-neuronal de Htt-Q138. Como ya explicamos antes, la limitada disponibilidad del compuesto MSI no permitió administrarlo a todas las condiciones genéticas y sólo lo administramos al cruce experimental *elav>Htt-Q138*. Esto, sumado a la alta tasa de letalidad de esta condición hizo que sólo pudiéramos evaluar su efecto en moscas de 8 días. El tratamiento con MSI no previno la neurodegeneración, sino que, en concordancia con el resultado obtenido para el modelo de Parkinson, disminuyó aún más la capacidad motora.



**Figura 20.** Representación gráfica de la proporción total de moscas que superaron los 6 centímetros de altura en un lapso de 10 segundos, correspondiente a los cruces *elav-Gal4 x w[1118]*, *w[1118] x UAS-Htt-Q138-mRFP* y *elav-Gal4 x UAS-Htt-Q138-mRFP* en las edades de los ejemplares adultos correspondientes a 8 y 15 días. NS= No Significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . \*\* = Altamente significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . ND= No Determinado. Los números en la parte superior del gráfico indican el número de repeticiones de cada cruce empleado.

Muy diferente fue el resultado del tratamiento con el compuesto SI. En este caso, se obtuvieron resultados muy auspiciosos que requieren investigar este compuesto con mayor profundidad. Los animales tratados con este compuesto conservaron la capacidad de ascender por las paredes del tubo en el ensayo de escalada. El efecto protector fue muy notable en moscas de 8 días y se mantuvo también a los 15 días de edad. Nuevos experimentos son necesario para confirmar este hallazgo y desvelar los mecanismos moleculares subyacentes.

## 8 Días

Cruces	<i>w[1118]&gt;UAS-Htt-Q138</i>	<i>elav-GAL4&gt;w[1118]</i>	<i>elav-GAL4&gt;UAS-Htt-Q138</i>
<i>elav-GAL4&gt;UAS-Htt-Q138</i>	SI: NS H2O:ND	SI: ND H2O: ND	SI: ** MSI: **

**Tabla 10.** Resultados de los análisis estadísticos realizados empleando la Prueba t de Student, habiendo comparado las medias de los cruces *elav-Gal4 x w[1118]*, *w[1118] x UAS-Htt-Q138-mRFP* y *elav-Gal4 x UAS-Htt-Q138-mRFP*, en una edad de los ejemplares adultos igual a 8 días. NS= No Significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . \* = Significativo para  $\alpha/2= 0,025$  pero no para  $\alpha/2=0,005$ . \*\* = Altamente significativo, tanto para  $\alpha/2= 0,025$  como  $\alpha/2= 0,005$ . ND= No Determinado

## 15 Días

Cruces	<i>w[1118]&gt;UAS-Htt-Q138</i>	<i>elav-GAL4&gt;w[1118]</i>	<i>elav-GAL4&gt;UAS-Htt-Q138</i>
<i>elav-GAL4&gt;UAS-Htt-Q138</i>	SI: ND H2O:ND	SI: ND H2O: ND	SI:ND MSI: ND

**Tabla 11.** Resultados de los análisis estadísticos realizados empleando la Prueba t de Student, habiendo comparado las medias de los cruces *elav-Gal4 x w[1118]*, *w[1118] x UAS-Htt-Q138-mRFP* y *elav-Gal4 x UAS-Htt-Q138-mRFP*, en una edad de los ejemplares adultos igual a 15 días. NS= No Significativo, tanto para  $\alpha/2=0,025$  como  $\alpha/2=0,005$ . \* = Significativo para  $\alpha/2= 0,025$  pero no para  $\alpha/2=0,005$ . \*\* = Altamente significativo, tanto para  $\alpha/2= 0,025$  como  $\alpha/2= 0,005$ . ND= No Determinado

## Discusión

### Derivados de Imidazol como potenciales agentes terapéuticos

Los derivados de Imidazol son compuestos que presentan un anillo heterocíclico de Imidazol, un compuesto orgánico aromático el cual presenta gran potencial para el desarrollo de compuestos de aplicación médica debido a su elevada biocompatibilidad ([Anderson et al., 2010](#)), lo cual implica la cualidad de generar una respuesta biológica aceptable durante el tiempo y modo de contacto de una aplicación específica. El primer paso para evaluar su uso fue la evaluación de la toxicidad en un rango de concentraciones desde 300 uM a 1200 uM.

Los ensayos de toxicidad realizados con ambos compuestos derivados de Imidazol ([Figuras 5 y 6](#)) mostraron la ausencia de toxicidad en todas las concentraciones empleadas, con las tasas de supervivencia para los individuos que transicionaron del estado larval al pupal y del pupal al adulto nunca difiriendo notablemente de los valores obtenidos para las condiciones control. Estos ensayos fueron orientativos, habiendo usado sólo una réplica para cada concentración. A pesar de esta limitación, los resultados pueden ser considerados válidos ya que igual falta de toxicidad se encontró cuando se realizaron los ensayos de prevención de degeneración del ojo y pérdida de motilidad. En ninguno de los casos el tratamiento con ninguno de los dos compuestos afectó la supervivencia ni produjo alteraciones en la estructura del ojo compuesto en las condiciones control ([Figuras 15 y 16](#)). Teniendo en cuenta los 4 ejemplares anómalos registrados en el cruce *GMR>Htt-Q138*, probablemente ocasionados por la expresión variable del gen *Curly* bajo las condiciones ambientales establecidas en las incubadoras a 25 grados Celsius ([Nozawa., 1956](#)), la exposición a SI y MSI no resultó en ojos compuestos con características distintas en comparación a las condiciones control.

Tampoco tuvo un efecto consistente sobre la motilidad de las condiciones control. La capacidad motora de las moscas con los genotipos *elav>+, +>UAS-Htt-Q138, R57C10>+ y +>asyn (II)* ([Figuras 19 y 20](#)) ([Tablas 8, 9, 10 y 11](#)) no se vio afectada por el tratamiento con SI. Debido a una limitada disponibilidad del compuesto MSI, no fue posible ensayar su efecto sobre los respectivos controles.

En conjunto, estos resultados van en la misma línea que resultados previos los cuales mostraron que el compuesto DII ([Blanco et al., 2018](#)) no afecta la viabilidad de larvas en el mismo rango de concentraciones testeado, lo que constituyó un buen punto de partida para evaluar su potencial efecto terapéutico en la prevención del daño asociado a la expresión de alelos mutantes causantes de las Enfermedades de Huntington y Parkinson.

### Modelos de enfermedad neurodegenerativa basados en la expresión de alelos mutados causantes de Parkinson y Huntington

El primer paso consistió en la validación de los modelos de enfermedades neurodegenerativas en nuestro laboratorio mediante la evaluación del efecto de la sobreexpresión de estas construcciones en dos tejidos y momentos del desarrollo

diferentes. Esta validación es importante porque existen reportes de diferencias notables en cuanto al grado de neurodegeneración y afectación de la capacidad locomotora utilizando diferentes construcciones de alelos humanos vinculados al desarrollo de patologías neurodegenerativas desarrolladas por distintos laboratorios, e incluso falta de reproducibilidad utilizando las mismas líneas transgénicas ([Auluck et al., 2002](#), [Pesah et al., 2005](#)).

Uno de los tejidos sobre los que se realizaron manipulaciones fue el ojo, utilizando la línea *GMR-Gal4*. Esta línea comienza su expresión en el disco imaginal de ojo, posterior al surco morfo-genético, en fotorreceptores y células accesorias, como células pigmentadas ([Freeman., 1996](#)). La ventaja de realizar manipulaciones restringidas al ojo radica en que, en caso de ser deletéreas, no producen letalidad. En el peor de los casos, se desarrolla un individuo con severas alteraciones en el ojo, o incluso su ausencia, pero que sigue siendo viable. El ojo, y en particular, la línea *GMR-Gal4*, es ampliamente utilizado para evaluar efectos tóxicos porque la pérdida de células altera el empaquetamiento normal y provoca un ojo rugoso. Sin embargo, este tipo de manipulación no permite evaluar aspectos característicos de las enfermedades neurodegenerativas, como la pérdida progresiva de neuronas y de la función asociada a ellas, como la capacidad motora.

El segundo tejido blanco de la manipulación fue el sistema nervioso en su conjunto, mediante las líneas de expresión pan-neuronal *elav-Gal4* y *R57C10-Gal4*. Ambas líneas se expresan en las neuronas de todo el sistema nervioso central, aunque con diferente intensidad, siendo *elav-Gal4* la de menor nivel expresión. La selección de una u otra depende del caso particular. Por ejemplo, si el gen que se desea expresar tiene un fenotipo suave, se prefiere *R57C10-Gal4*. Por el contrario, si la expresión pan-neuronal es muy intensa y provoca letalidad, como sucedió en nuestro caso, se opta por la línea de menor expresión.

Durante los múltiples ensayos realizados en la duración de esta Tesis de Grado se emplearon las construcciones *UAS-*asyn*-A53T*, *UAS-*asyn*-A30P*, *UAS-*asyn* (WT)* ([Auluck et al., 2002](#)) *UAS-*asyn* (II)*, *UAS-*asyn* (III)*, y versiones salvajes optimizadas para la expresión en *Drosophila* ([Chouhan et al., 2016](#)) para modelar la enfermedad de Parkinson. Por otra parte, para modelar la enfermedad de Huntington, se utilizaron las construcciones *UAS-*Htt*-Q15*, no patológica, y *UAS-*Htt*-Q138* ([Weiss et al., 2012](#)).

La expresión de las construcciones vinculadas a la enfermedad de Parkinson durante el desarrollo del ojo con *GMR-Gal4* no produjo alteraciones groseras ([Figura 8](#)) en concordancia con las observaciones previas ([Feany et al., 2000](#); [Pesah et al., 2005](#); [Chouhan et al., 2016](#)). Sólo se observó una pequeña alteración de la estructura ocular cuando se sobreexpresó la versión optimizada de  $\alpha$ -sinucleína, aunque debido a su escasa magnitud, se prefirió no seguir trabajando con ella. No hay que dejar de considerar que en trabajos previos, en que tampoco se encontró alteración de la estructura externa del ojo, sí se puso en evidencia la degeneración progresiva de la retina mediante análisis histológico. Sería interesante hacer este tipo de análisis para luego poder evaluar el efecto de los derivados de Imidazol. Por otra parte, la expresión de la forma patológica de Htt con 138 repeticiones de glutamina, pero no el control *Htt-Q15*, alteró consistentemente la estructura ocular.



Con respecto a la capacidad motora, evaluada mediante el ensayo de escalada, se verificó que las versiones mutadas *A53T* y *A30P* de  $\alpha$ -sinucleína produjeron una disminución mayor que los controles, pero recién a los 30 días de edad ([Figura 10](#)), en concordancia con estudios previos ([Feany et al., 2000](#)). La versión optimizada para expresión en *Drosophila* insertada en el cromosoma 2 también produjo una diferencia estadísticamente significativa en el ensayo de escalada, la cual comenzó a manifestarse más temprano, en moscas jóvenes. A partir del día 4 el 66% de los ejemplares superaban el parámetro establecido y 31% al día 8, valor que continuó gradualmente declinando hasta el día 30 ([Figura 11](#)). Por el contrario, la inserción de la misma construcción en el cromosoma 3 no fue capaz de alterar la capacidad de escalar por las paredes del tubo ([Figura 12](#)). Estos resultados refuerzan la noción de que las diversas herramientas que se han desarrollado para modelar enfermedades neurodegenerativas humanas no son robustas y deben ser debidamente evaluadas, ya que pueden dar resultados opuestos incluso al utilizarse bajo las mismas condiciones ([Chouhan et al., 2016](#)).

La última construcción genética empleada fue la de Huntingtina humana. En este caso los resultados obtenidos fueron acordes a los esperados. La versión con una expansión no patogénica de glutaminas, *Htt-Q15*, no afectó la declinación en la actividad motora asociada a la edad más allá del nivel de los controles, mientras que la versión con 138 copias de glutamina produjo un defecto aun mayor a partir de los 15 días de edad ([Figura 14](#)). Como se señaló en la sección de resultados, fue necesario cambiar la línea de expresión pan-neuronal *R57C10-Gal4* por *elav-Gal4* para minimizar, aunque no evitar completamente, la letalidad provocada por la expresión de *Htt-Q138*.

Sin embargo debido a la alta letalidad del cruce *elav>Htt-Q138*, la cual resulta en la supervivencia de ejemplares con un nivel de expresión más bajo ([Krench., 2016](#)), se recomienda establecer un riguroso criterio de selección para los ejemplares evaluados y contemplar la posibilidad de eliminar datos anómalos o ejemplares cuyo desempeño en los ensayos de escalada sea demasiado alto para asegurar el uso de moscas con el nivel de expresión apropiado de Huntingtina mutada.

En conclusión, podemos decir que se debe ser extremadamente cautos al diseñar ensayos para evaluar el potencial terapéutico de drogas. Se debe buscar cuáles son las manipulaciones y condiciones experimentales que producen alteraciones consistentes y reproducen las condiciones patológicas típicas de la enfermedad. En nuestro caso, decidimos utilizar la expresión de Htt en el ojo y la de Htt y  $\alpha$ -sinucleína optimizadas en el sistema nervioso central.

## **Efecto de los compuestos de Imidazol**

La evaluación de los dos compuestos derivados de Imidazol, SI y MSI, sobre el modelo de enfermedad de Parkinson no tuvo el efecto buscado. La capacidad motora de las moscas de 8 y 15 días de edad no se vio alterada por la exposición a SI. En cambio, sí encontramos un efecto estadísticamente significativo del MSI, exclusivamente en los ensayos realizados a los 8 días, pero en el sentido opuesto al deseado. El tratamiento con MSI disminuyó aún más la capacidad de ascender por las paredes del tubo. ([Figuras 19 y 20](#)) ([Tablas 8, 9, 10 y 11](#)).



Un resultado mucho más prometedor se obtuvo con el modelo de Huntington, aunque no con ambos compuestos. El MSI también produjo un empeoramiento de la capacidad motora, en forma semejante a lo observado en el modelo de Parkinson. Este comportamiento sólo se pudo verificar en moscas de 8 días de edad, pero no en las de 15, debido a la dificultad para conseguir un número suficiente de animales por la letalidad que produce la manipulación. Sin embargo, a pesar de esta dificultad, el hecho de que en ambos casos el MSI tenga el efecto opuesto al buscado nos hace concluir que no parece ser una droga con potencial terapéutico. Este resultado es llamativo porque esta misma droga presenta efecto protector en fenotipos asociados a proteo-toxicidad en modelos de Parkinson y Huntington desarrollados en *C.elegans* ([Andersen et al., 2022](#)).

Por otra parte, el compuesto SI produjo una preservación notable de la capacidad motora tanto a los 8 como a los 15 días de edad. Aunque en ambos casos el número de réplicas testeadas fue bajo, la magnitud de la diferencia permite confiar en nuestras observaciones. Trabajos futuros permitirán confirmar esta observación con un mayor número de muestras. Si el resultado se confirmara, el paso siguiente sería estudiar los efectos a nivel celular y molecular del SI sobre la formación de agregados de *Htt-Q138*, algo que resulta factible porque la construcción está fusionada con una proteína fluorescente roja.

Llamativamente, la exposición de ejemplares del cruce *GMR>Htt-Q138* a ambos compuestos de Imidazol no resultó en una diferencia observable en la estructura del ojo compuesto en comparación a la condición control, con las 3 condiciones presentando ojos de aspecto rugoso debido a la disposición desorganizada de los omatidios ([Figura 17](#)). El efecto de ojo rugoso es consecuencia de la expresión de huntingtina con expansión de poliglutamina durante el desarrollo. En este trabajo no evaluamos la estructura de la retina, ni el efecto de la manipulación durante el envejecimiento. Otros modelos de enfermedades neurodegenerativas no presentan alteración de la estructura externa del ojo, pero sí una progresiva pérdida de integridad y funcionalidad de la retina con la edad ([Chouhan et al., 2016](#)). Sería apropiado evaluar si la expresión de *GMR>Htt-Q138* también produce una pérdida de organización normal de la retina y si puede ser prevenida por SI. Esto nos permitiría separar el efecto durante el desarrollo de aquel asociado al envejecimiento. Alternativamente, se podría considerar utilizar otras líneas *Gal4*, como *rhl-Gal4*, que sólo se expresan en los fotorreceptores, para restringir la manipulación a las neuronas, en lugar de hacerlo en todas las células del ojo.

En este trabajo pusimos a punto modelos de neurodegeneración para estudiar el potencial efecto protector de dos derivados del Imidazol. Encontramos que uno de ellos tuvo un notable efecto protector frente al modelo de Huntington, pero no de Parkinson. Sería relevante evaluar en un futuro si las diferencias en la estructura química pueden explicar este efecto diferencial. Por otra parte, sería también importante estudiar los blancos moleculares del SI, para comprender por qué es efectivo en el modelo de Huntington pero no en el de Parkinson, y también poner a prueba otros derivados con modificaciones distintas a las ya testeadas.

## Conclusiones

- Las líneas *UAS- $\alpha$ syn-WT*, *UAS- $\alpha$ syn-A53T*, *UAS- $\alpha$ syn-A30P*, *UAS- $\alpha$ syn (II)*, empleadas para la generación de modelos de la Enfermedad de Parkinson, fueron efectivos en generar ejemplares que presentaron alteraciones significativas en sus capacidades motrices al expresar los alelos mutados a nivel de todo el tejido nervioso y el ojo, aunque los efectos se manifestaron a distintas edades.
- La expresión de la línea *UAS- $\alpha$ syn (III)* tanto a nivel del tejido nervioso como a nivel ocular no resultó en la generación de un modelo de la Enfermedad de Parkinson.
- De las dos líneas empleadas para la expresión de alelos mutados causantes de la Enfermedad de Huntington a nivel ocular y pan-neuronal solamente *UAS-*Htt-Q138-mRFP** presentó resultados significativos tanto a nivel ocular como en la reducción de las capacidades motrices de los ejemplares evaluados.
- A la concentración empleada, 900  $\mu$ M, ninguno de los compuestos derivados de Imidazol evaluados, 1-(3-sulfonatopropil) Imidazol y 1-mesitil-3-(3-sulfonatopropil) Imidazol, resultaron en una reducción notable de la viabilidad de los ejemplares de *Drosophila*.
- No se observaron alteraciones en la estructura del ojo compuesto resultantes de la exposición a SI y MSI, con ambos compuestos careciendo de efectos tanto adversos como benéficos sobre la disposición de los omatidios en los cruces con alteraciones oculares.
- El compuesto SI aparentó presentar un efecto positivo sobre las capacidades motrices de los ejemplares del cruce *elav>Htt-Q138*, los cuales expresaron alelos mutados causantes de la Enfermedad de Huntington, pero este efecto no se observó con el compuesto MSI.
- Ambos compuestos no aparentaron presentar efecto sobre los ejemplares del cruce *R57C10> $\alpha$ syn (II)*, los cuales expresaron alelos mutados causantes de la Enfermedad de Parkinson.

## Bibliografía

Anderson, E. B., & Long, T. E. (2010). Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. *Polymer*, *51*(12), 2447–2454. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.02.006>

Andersen, N., Veuthey, T., Blanco, M. G., Silbestri, G. F., Rayes, D., & De Rosa, M. J. (2022). 1-Mesityl-3-(3-sulfonatopropyl) imidazolium protects against oxidative stress and delays proteotoxicity in *C. elegans*. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 908696. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.908696>

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

Auluck, P. K., Chan, H. Y. E., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., & Bonini, N. M. (2002). Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, *295*(5556), 865–868. <https://doi.org/10.1126/science.1067389>

Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzell, R., Wild, E. J., & Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews. Disease Primers*, *1*, 15005. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>

Blanco, M. G., Vela Gurovic, M. S., Silbestri, G. F., Garelli, A., Giunti, S., Rayes, D., & De Rosa, M. J. (2018). Diisopropylphenyl-imidazole (DII): A new compound that exerts anthelmintic activity through novel molecular mechanisms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(12), e0007021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007021>

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

Peabody, N. C., Pohl, J. B., Diao, F., Vreede, A. P., Sandstrom, D. J., Wang, H., Zelensky, P. K., & White, B. H. (2009). Characterization of the decision network for wing expansion in *Drosophila* using targeted expression of the TRPM8 channel. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(11), 3343–3353. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4241-08.2009>

Chouhan, A. K., Guo, C., Hsieh, Y.-C., Ye, H., Senturk, M., Zuo, Z., Li, Y., Chatterjee, S., Botas, J., Jackson, G. R., Bellen, H. J., & Shulman, J. M. (2016). Uncoupling neuronal death and dysfunction in *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0333-4>

*Demencia por Cuerpos de Lewy*. (2019, December 23). Clínica Josefina Arregui. <https://www.josefinaarregui.com/es/enfermedades-y-tratamientos/demencia-por-cuerpos-de-lewy/>

*El mantenimiento de la proteostasis puede retrasar el envejecimiento y las enfermedades asociadas*. (2021, December 17). CORDIS | European Commission; Publication Office/CORDIS. <https://cordis.europa.eu/article/id/435462-maintaining-proteostasis-may-slow-ageing-and-related-diseases/es>

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

Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell*, *87*(4), 651–660. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81385-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81385-9)

Hirth, F. (2010). *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, *9*(4), 504–523. <https://doi.org/10.2174/187152710791556104>

Kovacs, G. G. (n.d.). *Clasificación patológica molecular de las enfermedades neurodegenerativas- hacia la medicina de precisión*. Org.Ar. Retrieved June 3, 2025, from [https://smiba.org.ar/curso\\_medico\\_especialista/lecturas\\_2022/Clasificaci%C3%B3n%20opatol%C3%B3gica%20molecular%20de%20las%20enfermedades%20neurodegenerativas.pdf](https://smiba.org.ar/curso_medico_especialista/lecturas_2022/Clasificaci%C3%B3n%20opatol%C3%B3gica%20molecular%20de%20las%20enfermedades%20neurodegenerativas.pdf)

Krench, M. (2016). *Investigating toxicity in Drosophila models of Huntington's Disease and Huntington's Disease-Like 2*. <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/103211?show=full> [Tesis de Maestría, Pennsylvania State University]

Menšíková, K., Matěj, R., Colosimo, C., Rosales, R., Tučková, L., Ehrmann, J., Hraboš, D., Kolaříková, K., Vodička, R., Vrtěl, R., Procházka, M., Nevrlý, M., Kaiserová, M., Kurčová, S., Otruba, P., & Kaňovský, P. (2022). Lewy body disease or diseases with Lewy bodies? *NPJ Parkinson's Disease*, *8*(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00273-9>

Nozawa, K. (1956). THE EFFECTS OF THE ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON CURLY EXPRESSIVITY IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *The Japanese Journal of Genetics*, *31*(6), 163–171. <https://doi.org/10.1266/jjg.31.163>

Pesah, Y., Burgess, H., Middlebrooks, B., Ronningen, K., Prosser, J., Tirunagaru, V., Zysk, J., & Mardon, G. (2005). Whole-mount analysis reveals normal numbers of dopaminergic neurons following misexpression of alpha-Synuclein in *Drosophila*. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, *41*(4), 154–159. <https://doi.org/10.1002/gene.20106>

Pendleton, R. G., Parvez, F., Sayed, M., & Hillman, R. (2002). Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *300*(1), 91–96. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.1.91>

Rosas-Arellano, A., Estrada-Mondragón, A., Piña, R., Mantellero, C. A., & Castro, M. A. (2018). The tiny *Drosophila melanogaster* for the biggest answers in Huntington's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8), 2398. <https://doi.org/10.3390/ijms19082398>

Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurology*, *10*(1), 83–98. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70245-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3)

Santarelli, S., Londero, C., Soldano, A., Candelaresi, C., Todeschini, L., Vernizzi, L., & Bellosta, P. (2023). *Drosophila melanogaster* as a model to study autophagy in neurodegenerative diseases induced by proteinopathies. *Frontiers in Neuroscience*, *17*, 1082047. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1082047>

Shalmali, N., Ali, M. R., & Bawa, S. (2018). Imidazole: An essential edifice for the identification of new lead compounds and drug development. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *18*(2), 142–163. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170228113656>

Tasset, I., Sánchez, F., & Túnez, I. (2009). The molecular bases of Huntington's disease: the role played by oxidative stress. *Revista de neurología*, *49*(8), 424–429.

Tolomeu, H. V., & Fraga, C. A. M. (2023). Imidazole: Synthesis, functionalization and physicochemical properties of a privileged structure in medicinal chemistry. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *28*(2), 838. <https://doi.org/10.3390/molecules28020838>

Tuyo, R. C. (n.d.). *Huntingtina: la proteína de gran impacto*. Com.ar. <https://www.rochecercatuyo.com.ar/enfermedad-de-huntington-huntingtina> (N.d.). Gerochile.Cl.

Weiss, K. R., Kimura, Y., Lee, W.-C. M., & Littleton, J. T. (2012). Huntingtin aggregation kinetics and their pathological role in a *Drosophila* Huntington's disease model. *Genetics*, *190*(2), 581–600. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133710>