



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Cambios rítmicos en las mitocondrias de la
terminal neuromuscular de *Drosophila*
melanogaster.

Martin Baccino

Orientador: Mag. Santiago Ruiz

Co-orientador: Dr. Rafael Cantera

Departamento de Biología del Neurodesarrollo, Instituto de Investigaciones
Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

Tribunal:

Mag. Carmen Bolatto, Depto. de Histología y Embriología, Facultad de Medicina,
UdelaR.

Mag. Andrea Toledo, Sección Biología Celular, Dpto. Biología Celular y
Molecular, Facultad de Ciencia, UdelaR.

Febrero, 2013

Resumen

La motoneurona de vuelo 5 de *Drosophila melanogaster* cambia la morfología de su terminal motora entre el día y la noche. Estos cambios circadianos incluyen cambios en el tamaño y número de sus botones sinápticos y de las vesículas, y del número de sinapsis. Aún son desconocidos los mecanismos que gobiernan este tipo de reorganización sináptica. En esta tesina de grado nos propusimos estudiar qué sucede con las mitocondrias de la terminal motora en este contexto. Combinando el uso de moscas transgénicas, inmunohistoquímica y microscopía láser confocal, cuantificamos el número, tamaño y localización de las mitocondrias entre el día y la noche en condiciones de luz-oscuridad (LD) y oscuridad constante (DD). Los resultados muestran que las mitocondrias se localizan mayoritariamente en los botones sinápticos y que hay más mitocondrias en la noche en condiciones LD. Observamos también una tendencia que podría sugerir que por la noche las mitocondrias disminuyen de tamaño. Además, los resultados muestran que existe una tendencia similar en oscuridad constante lo que nos permite especular que podrían corresponder a cambios independientes de la luz.

Introducción

Ritmos circadianos

La rotación de la tierra impone un ritmo de iluminación (luz-oscuridad) al cual los organismos se han adaptado. Esta adaptación incluye el establecimiento de varios ritmos biológicos que duran aproximadamente 24 horas llamados ritmos circadianos. La organización de las actividades biológicas en ritmos circadianos está ampliamente distribuida en la filogenia y es común a organismos tan diversos como cianobacterias, hongos, algas, plantas, moscas y humanos. (Glossop y Hardin, 2003; Bell-Pedersen et al., 2005). A lo largo de la evolución encontramos distintos ejemplos de adaptaciones al ciclo de luz oscuridad: desde la restricción de la fase S de la mitosis a la noche, por parte de organismos unicelulares como las bacterias para evitar daños en el ADN por la radiación UV (Gery and Koeffler, 2010); hasta uno de los ejemplos más claros en animales y humanos, el ritmo de actividad locomotora/vigilia y reposo/sueño (Bell-Pedersen et al., 2005; Allada y Chung, 2010). A pesar de que los componentes del reloj circadiano no son los mismos para todos los seres vivos, el mecanismo básico es universal para todas las formas de vida que lo poseen (Gery and Koeffler, 2010). La importancia de los ritmos circadianos no sólo se evidencia a nivel filogenético, sino que los estudios de los últimos años permiten afirmar que ocupan un lugar muy importante en la biología de los organismos y que los genes involucrados se encuentran en una posición jerárquica en la regulación génica, dado que controlan la expresión de un gran número de genes (Harmer et al., 2000; McDonald et al., 2001; Schaffer et al., 2001). Además, ha sido documentado que las alteraciones del reloj circadiano pueden tener consecuencias negativas para la salud (Fleury et al., 2000; Gery y Koeffler, 2010).

Gracias a estos relojes biológicos, los animales pueden “predecir” el cambio de fase del ciclo luz/oscuridad y ajustar su fisiología y comportamiento con anticipación. Estos ritmos son controlados por un mecanismo endógeno llamado reloj circadiano que mantiene constancia del pasaje del tiempo. Existe una vía de entrada por la cual estímulos externos como la luz y la temperatura son capaces de sincronizar el reloj biológico (es decir, de ponerlo en hora; Glossop y Hardin, 2002) y varias vías de salida por las cuales se controlan los distintos ritmos. Si bien pueden ser sincronizados por la luz, los relojes circadianos funcionan de forma autónoma. Dos ejemplos lo constituyen los ritmos de actividad motora y eclosión en *Drosophila melanogaster* que persisten en condiciones de oscuridad constante (Konopa y Benzer, 1971).

El mecanismo molecular del reloj circadiano ha sido estudiado en detalle en varios organismos. Sin embargo, las investigaciones que han utilizado la mosca *Drosophila melanogaster* han estado a la vanguardia en este campo científico (Hendricks, 2003). *Drosophila* presenta diversas ventajas como modelo que incluyen un corto ciclo de vida, la relativa facilidad para la construcción de distintas cepas transgénicas y su mantenimiento en el laboratorio y el vasto conocimiento de su biología del desarrollo (Lessing y Bonini, 2009). Por ejemplo, el primer gen al que se le atribuyó una función como parte del mecanismo del reloj fue descubierto por Konopka y Benzer (1971) en *Drosophila* al encontrar que el ritmo de actividad locomotora (actividad-reposo) estaban afectado en moscas con mutaciones en un gen que llamaron *period*. Actualmente se conocen siete genes responsables del reloj circadiano en *Drosophila* (Konopka y Benzer, 1971; Sehgal et al., 1994; Rutila et al., 1998; Allada et al., 1998; Blau y Young, 1999; Price et al., 1998; Martinek et al., 2001). El mecanismo del reloj consiste en dos bucles de expresión génica interconectados (Figura 1). El primero de ellos controla la expresión de los genes *period* (*per*) y *timeless* (*tim*) por parte del heterodímero CLOCK/CYCLE. Los transcriptos de *period* y *timeless* llegan a su expresión máxima al atardecer. A su vez, las proteínas *Period* y *Timeless* se acumulan y translocan al núcleo donde actúan como un dímero que inhibe la expresión de CLOCK y CYCLE. En ausencia de CLOCK, cesa la expresión de los genes *per* y *tim* y su transcripción comienzan a disminuir alcanzando su mínimo al amanecer. El segundo bucle controla la transcripción de *Clock*. Los transcriptos de este gen tienen una dinámica de expresión aproximadamente inversa a la de *Period* y *Timeless*, con picos al comienzo del día y una disminución de la expresión por la noche. El modelo aceptado plantea que el heterodímero CLOCK/CYCLE activa la transcripción del gen *vrille* (*vri*) que codifica para un represor del gen *Clock* (Glossop et al., 2003). Como consecuencia de esto, los niveles del transcripto CLOCK alcanzan su mínimo al atardecer gracias a la represión por parte de VRI sumada a la represión por parte del dímero *Period/Timeless*. El último elemento que completa este sistema es el gen *Pdp1* que es activado por CLOCK/CYCLE junto con *vri* y que funciona como activador de *Clock*. VRI se acumula y desaparece más rápido que *Pdp1*. Por lo tanto, primero se da una represión por parte de VRI, y posteriormente, cuando ya desapareció VRI, se acumula una cantidad suficiente de PDP1 que permite la activación (Cyrán et al., 2003). Por último, es importante mencionar que la luz es capaz de afectar este ciclo y sincronizarlo. La proteína *Timeless* es degradada por la luz lo cual indirectamente desestabiliza a *Period*. Dependiendo de en qué fase del ciclo se encuentre la célula, la fase se corre al día anterior o al día siguiente (Dunlap, 1999).

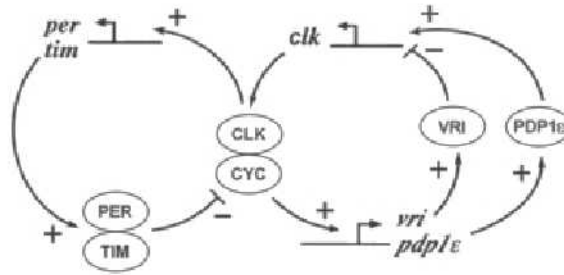


Figura 1. Esquema del mecanismo molecular del reloj circadiano de *Drosophila melanogaster*. Imagen obtenida y modificada de <http://www.circadian.org/biorhyt.html>.

En los seres vivos más simples, como cianobacterias, el reloj circadiano es simplemente una célula que funciona como un oscilador. Pero en organismos más complejos, el reloj circadiano involucra a varios tipos celulares, tejidos y órganos. En los animales, el marcapasos u oscilador central está situado en el cerebro (Glossop y Hardin, 2002). En mamíferos esta función es llevada a cabo por el núcleo supraquiasmático (Schwartz, 1991), mientras que en *Drosophila* y otros insectos estudiados, el marcapasos central está formado por una población de neuronas cerebrales ubicadas en el protocerebro y denominadas “neuronas del reloj”. Por último, a este sistema se agregan los llamados relojes periféricos que se encuentran en distintos tejidos y que funcionan en paralelo con el oscilador central. En *Drosophila melanogaster* se ha demostrado la presencia de Period y Timeless en tejidos periféricos en los cuales constituyen relojes independientes del reloj central en el cerebro. (Allada and Chung, 2010). Plautz y colaboradores (1997) demostraron la existencia de relojes independientes en distintos tejidos del abdomen, tórax y cabeza.

Cambios circadianos en la morfología de las neuronas

La plasticidad neuronal define una de las características más importantes de las neuronas: su capacidad de cambiar y adaptarse a distintas condiciones. La plasticidad neuronal circadiana refiere a las variaciones que se dan en las neuronas con un ritmo circadiano. Se ha demostrado que tanto la excitabilidad como la morfología de las neuronas están sujetas a ritmos circadianos (Cao y Nitabach, 2008; Mehnert et al, 2007). Este tipo de plasticidad neuronal fue descubierto primero en insectos por Pyza y Meinertzhagen (1993a; Pyza y Górska-Andrzejak, 2008) y más recientemente en vertebrados (Becquet et al., 2008; Appelbaum et al., 2010; Girardet et al., 2010). Pyza y Meinertzhagen encontraron que en condiciones LD (12 horas de luz y 12 de oscuridad), los axones de las interneuronas visuales L1

y L2 del primer neuropilo óptico (Lamina) de la mosca *Musca domestica* tienen mayor diámetro durante el día que en la noche. Este proceso es en parte controlado por la luz, neurotransmisores (Pyza y Meinertzhagen, 1993b, 1995, 1998), células gliales (Pyza y Górska-Andrzejak, 2004) y por una ATPasa vacuolar (Pyza et al., 2004). Estos cambios rítmicos también fueron encontrados en las mismas neuronas en *Drosophila* (Pyza y Meinertzhagen, 1999). Estos ritmos incluyen un cambio diario en el número de sinapsis, específico para cada tipo neuronal estudiado (Pyza y Meinertzhagen, 1993a; Barth et al., 2010).

Otro ejemplo lo representan las neuronas del reloj llamadas laterales ventrales (LNvs) de *Drosophila*. Aprovechando que estas neuronas utilizan “pigment dispersing factor” (PDF) como neurotransmisor, Fernandez y colaboradores (2008) utilizaron inmunohistoquímica con anticuerpos anti-PDF y expresión transgénica de la proteína fluorescente verde (GFP) como marcador de neuronas PDF para estudiar su morfología a lo largo de ciclos LD o en oscuridad constante (DD). Ambos métodos demostraron que las terminales axonales de las LNvs aumentan su complejidad en el día y la disminuyen en la noche. Tal como había sido demostrado para la MN5, el ritmo diario de las LNvs también es mantenido en condiciones DD y requiere la expresión de *period* y *timeless* (Fernandez et al., 2008). Este descubrimiento es de especial interés dado que la reorganización morfológica de las neuronas del reloj podría resultar en cambios circadianos en las conexiones entre los circuitos de las neuronas del reloj; similar a la función propuesta para los cambios circadianos en las sinapsis de ciertas neuronas en el núcleo supraquiasmático en la rata (Girardet et al., 2010). El establecimiento rítmico de contactos y sinapsis entre neuronas podría formar parte de un nuevo mecanismo para distribuir la información circadiana desde las neuronas del reloj a la periferia, resultando esto en la generación de un comportamiento circadiano. También hay evidencia de que los ritmos circadianos existen en otros tipos neuronales. La terminal motora MN5 que inerva dos músculos de vuelo de *D. melanogaster*, ha sido objeto de varios estudios que probaron la existencia de un ritmo circadiano y que se discutirán a continuación.

Antecedentes

En *Drosophila melanogaster* el movimiento de arriba-abajo de las alas se logra gracias a los músculos longitudinales y transversales que se encuentran dentro del tórax. Existen seis músculos longitudinales de los cuales el 5 y el 6 son inervados por la motoneurona MN5 (Ikeda et al., 1980; Ikeda y Koenig, 1988). La MN5 tiene una morfología muy particular: se ramifica enormemente recorriendo los músculos en su totalidad y tiene una enorme cantidad de botones sinápticos a lo largo de sus ramas (Mehnert et al., 2007). Mehnert y colaboradores (2007) demostraron que el tamaño de sus botones sinápticos aumenta durante el día y disminuye durante la noche. Este aumento del tamaño de los botones se mantiene en condiciones de oscuridad constante y es abolido en mutantes para los genes *timeless* y *period*, lo cual evidencia que se trata de un ciclo circadiano. Además, se sabe que el ritmo es independiente de la actividad sináptica del músculo y que persiste incluso en moscas decapitadas. Esto último implica que persiste incluso en ausencia del marcapasos en el cerebro y que es dirigido por un reloj periférico (Mehnert y Cantera, 2008). La mosca presenta un patrón de actividad mayor en el día que en la noche (Hendricks et al., 2000; Shaw et al., 2000) con picos de actividad al amanecer y al atardecer (Allada y Chung, 2010). De acuerdo a esto, se ha planteado de forma especulativa que la reducción del tamaño en los botones sinápticos podría responder a una estrategia adaptativa que permitiría reducir el gasto metabólico por la noche cuando la mosca no vuela (Mehnert et al., 2007). El estudio por microscopía electrónica de las vesículas sinápticas mostró que estas cambian de tamaño con un ciclo circadiano, siendo más grandes por la noche (Ruiz et al., 2010). Más recientemente, Ruiz y colaboradores demostraron que el número y distribución de botones y sinapsis de la MN5 cambia rítmicamente en condiciones LD, con más botones y sinapsis durante la noche (Ruiz et al., manuscrito en revisión). En resumen, la MN5 tiene botones más abundantes, más pequeños y con vesículas más grandes durante la noche. Todo lo anterior demuestra que existen verdaderas reorganizaciones circadianas en la terminal de la MN5. Considerando que estas transformaciones circadianas podrían tener algún valor adaptativo en la medida que impliquen una reducción en el gasto energético, ya sea por la reducción del tamaño de los botones por la noche, o la reducción del número de botones durante el día, es indispensable considerar la posibilidad de que existan variaciones en el organelo encargado de la producción de energía: la mitocondria. En este trabajo, nos enfocamos en las mitocondrias de la MN5 en el contexto del ciclo circadiano.

Mitocondrias en las terminales neuronales

Las mitocondrias son esencialmente organelos productores de energía pero también están involucradas en otras funciones celulares como la homeostasis del calcio (Cali et al., 2012) y la apoptosis (Wang, 2001; Mayer y Oberbauer, 2003). Suministran la energía necesaria para las funciones celulares y en la neurona producen la mayor parte del ATP (Verstreken et al., 2005; Lee y Peng, 2008). Las mitocondrias poseen una alta dinámica de movimiento anterógrado y retrógrado en los axones de las motoneuronas al unirse a los denominados motores moleculares, quinesinas y dineínas, que permiten su movimiento sobre el citoesqueleto (Pilling et al., 2006). Su transporte está estrictamente regulado en respuesta a cambios en el estado energético local y la demanda metabólica. Existe evidencia de que el transporte mitocondrial puede ser regulado activamente por procesos biológicos como el nacimiento de nuevos axones, la formación y establecimiento de nodos de Ranvier y la formación de nuevas conexiones sinápticas (Bindokas et al., 1998; Shepherd y Harris, 1998; Morris y Hollenbeck, 1993). Wang y Schwarz (2009) propusieron un modelo en el que el calcio (presente en los botones y terminales sinápticas) actúa como un interruptor cuya presencia desencadena la liberación de la mitocondria de la maquinaria molecular que las transporta a través del axón, obteniéndose como resultado que la mitocondria quede anclada en ese lugar. El transporte de mitocondrias a través del axón es de gran importancia y su funcionamiento defectuoso ha sido implicado en desórdenes neurológicos humanos y en enfermedades neurodegenerativas (Youle y van der Bliek, 2012). Respecto a su función en las terminales neuronales, estudios realizados en mutantes incapaces de transportar mitocondrias a las terminales, demuestran que el ATP que las mitocondrias producen es indispensable para movilizar las vesículas de reserva y así lograr la transmisión sináptica luego de una estimulación prolongada (Verstreken et al., 2005). Otra propiedad de las mitocondrias es la capacidad que éstas poseen de experimentar fisión y fusión. Estos procesos ocurren en todas las mitocondrias y son fundamentales para su correcto funcionamiento, además de intervenir en la regulación de los tamaños y funcionalidad mitocondriales (Chan, 2012). Por último, es importante considerar que las mitocondrias son capaces de cambiar su tamaño según la demanda energética siendo las mitocondrias de mayor tamaño capaces de producir más energía (Youle y van der Bliek, 2012).

Hasta el momento no tenemos evidencias que muestren un cambio en el número, distribución o tamaño de las mitocondrias como parte de la reorganización circadiana descrita para la MN5. El hecho de que la mosca sea más activa en el día, implicaría un mayor gasto

metabólico asociado a la transmisión sináptica que debería ser cubierto por las mitocondrias. Esto sugiere que podría existir un mecanismo de naturaleza circadiana, dependiente de la actividad sináptica, o una combinación de ambos, que le permita a la mosca anticiparse al alto gasto metabólico del día.

Hipótesis

Considerando las evidencias presentadas hasta el momento, planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: existe un mayor número y/o densidad y/o tamaño de las mitocondrias de la MN5 que responde a la mayor demanda energética del día.

Objetivos

Objetivo general

Determinar si las mitocondrias presentes en la terminal sináptica de una motoneurona de la mosca *Drosophila melanogaster* muestran alguna variación rítmica entre el día y la noche.

Objetivos específicos

- Determinar si cambia el número de mitocondrias en la terminal sináptica de la motoneurona de vuelo MN5 de *Drosophila melanogaster* entre el día y la noche en condiciones de luz-oscuridad (LD).
- Determinar si cambia la distribución de las mitocondrias en la terminal sináptica de la MN5 en condiciones de LD.
- Determinar si cambia el tamaño de las mitocondrias en la terminal sináptica de la MN5 en condiciones LD.
- Determinar si algunos de los parámetros mencionados cambian en condiciones de oscuridad constante.

Materiales y Métodos

Cepas de moscas

Las moscas fueron mantenidas en condiciones estándar para *Drosophila melanogaster* utilizando tubos con medio de cultivo fabricado en el laboratorio a base de levadura, harina de maíz y glucosa (Ver anexo). Utilizamos ácido propiónico como antibiótico y nipagina como antifúngico para conservar la comida. Las moscas fueron mantenidas en incubadora a 25°C bajo un ciclo de luz-oscuridad (LD) de 12 horas cada fase. Para los experimentos de oscuridad constante (DD) las moscas fueron mantenidas al menos 3 días bajo el ciclo de luz-oscuridad previo al pasaje a oscuridad constante. Las cepas de moscas utilizadas fueron ok371-GAL4 y UAS-mito-GFP (generosamente cedida por el Dr. Andlauer, Rudolf-Virchow Center, University of Würzburg).

Uso del sistema GAL4-UAS

El sistema GAL4-UAS permite el control de la expresión de un gen de interés en un grupo de células o en un tejido a elección de forma específica. Brevemente, consiste en la acción de dos módulos genéticos que inicialmente están separados en dos cepas de moscas. Al cruzar estas dos cepas ambos módulos se combinan y activan. Uno de los módulos genéticos contiene un promotor que dirige la expresión de un gen específico de un grupo celular o de un tejido (por ejemplo: promotor del transportador vesicular de glutamato que se activa en todas las neuronas glutamatérgicas) unido corriente arriba a la secuencia que codifica para la proteína GAL4 de levadura (Brand y Perrimon, 1993; Duffy, 2002). El otro módulo contiene una secuencia de unión para la proteína GAL4 llamada UAS (upstream activation sequence) unida corriente arriba a una secuencia codificante de interés (por ejemplo: la proteína fluorescente verde, GFP) (Figura 2). Las posibilidades que ofrece el sistema son varias, desde la sobreexpresión de un gen, su expresión ectópica, e incluso el silenciamiento de su expresión utilizando ARN de interferencia. En este trabajo, se utilizó el sistema GAL4-UAS para expresar GFP en las mitocondrias de las motoneuronas de vuelo utilizando la cepa ok371 GAL4 y la cepa UAS-mito-GFP. El promotor ok371 dirige la expresión de GAL4 en la motoneurona. La secuencia UAS es activada y expresa una GFP que contiene una variación que consiste en una cola con los 25 aminoácidos N-terminales de la Citocromo C oxidasa que actúan como una secuencia de entrada a la mitocondria (Pilling et al., 2006). El resultado es una mosca que expresa GFP en las mitocondrias de las motoneuronas.

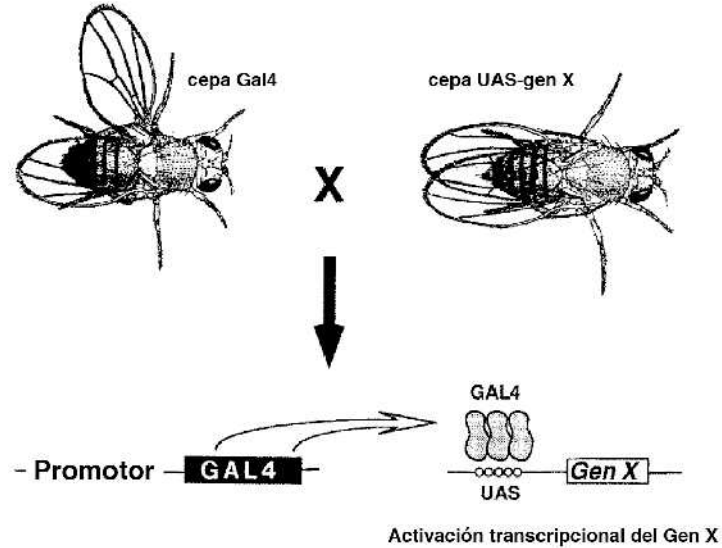


Figura 2. Sistema GAL4-UAS para la expresión de genes en *Drosophila melanogaster*. La activación de la secuencia UAS y la consecuente expresión del Gen X es dirigida por GAL4 cuya expresión es a su vez controlada por un promotor específico de célula o tejido. Imagen obtenida y modificada de Brand y Perrimon (1993).

Disección de los músculos de vuelo, inmunohistoquímica y microscopía laser confocal

Realizamos la disección en dos momentos del ciclo: en el día y la noche en moscas mantenidas en condiciones LD y en el día subjetivo y la noche subjetiva en DD. Cada hora de un ciclo LD reciben el nombre de Zeitgeber ("sincronizador o marcador de tiempo" en alemán; ZTs). En este trabajo optamos por analizar dos ZT específicos, en base a resultados de experimentos previos en los cuales se observó que estos tiempos muestran las mayores variaciones uno respecto al otro (Ruiz y colaboradores., datos no publicados): ZT 19,5 (noche; 4 horas y media antes de encenderse la luz) y ZT7,5 (día; 4 horas y media antes de apagarse la luz ; ver Figura 3). Los experimentos en DD fueron realizados de la misma forma que en LD. En DD los momentos del ciclo se denominan CT ("tiempos circadianos"; CT19,5 y CT7,5).

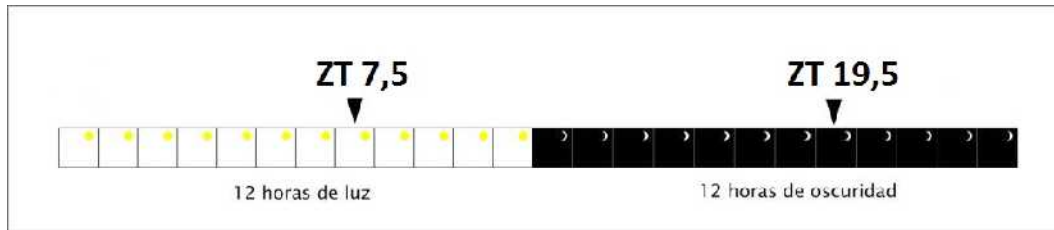


Figura 3. Esquema temporal del ciclo LD. Cada fase tiene una duración de 12 horas (representadas en cubos en el esquema) y cada hora recibe el nombre Zeitgeber (ZT). Las disecciones fueron realizadas en dos momentos del ciclo, uno durante el día (ZT7,5) y otro durante la noche (ZT19,5). Figura cedida por Flavio Pazos.

Los músculos de vuelo 5 y 6 (músculos de vuelo indirecto, longitudinales) se encuentran en la porción más dorsal del tórax. Para obtener muestras de la terminal neuromuscular que inerva estos dos músculos, las moscas fueron anestesiadas con óxido nítrico generado por un surtidor Inject+Matic Sleeper y colocadas sobre un porta objeto en una gota de PBS (Buffer fosfato salino) 1x. Las moscas fueron decapitadas en menos de 5 minutos a partir del ZT indicado. Luego, con una pinceta y una aguja, se cortó el abdomen, las alas y las patas de cada mosca. El tórax se cortó sagitalmente en dirección dorso-ventral conservando una de sus dos mitades, a la que se le retiró la mitad ventral. Trabajar con hemitorax en lugar del torax completo permite mejorar la penetración de los anticuerpos durante la tinción. Posteriormente las muestras fueron fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS sobre hielo, durante 2 horas y media. Pasado el tiempo de fijación, realizamos 3 lavados de 15 minutos en PBS 1X. Para la tinción inmunohistoquímica permeabilizamos el tejido con 3 lavados de 5 minutos y 4 lavados de 15 minutos usando Triton X100 al 0.3% en PBS 1X (PBT). La incubación con el anticuerpo primario anti-HRP (dilución 1:600 en PBT; anti-Horse Radish Peroxidase, usado como marcador de membrana neuronal en insectos; Jan y Jan, 1982) se realizó durante toda la noche a 4°C en agitación, luego se lavó con PBT (3 lavados de 5 minutos y 4 de 15 minutos) y se incubó con los anticuerpos secundarios (anti-conejo Alexa Fluor 568, Molecular Probes, dilución 1:2000 en PBT) durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último, las muestras fueron montadas en glicerol al 80%. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio láser confocal Olympus Fluoview FV300 (IIBCE) usando un objetivo 60x y un aumento digital de 3,5x. Cada imagen fue generada como proyección de máxima intensidad de planos focales cada 0,6 um en el eje Z cubriendo la totalidad del espesor de los axones observados. Se realizaron dos "stacks" por mosca y se estudiaron un mínimo de 18 moscas por muestra. El procesamiento de las imágenes y cuantificación se llevó a cabo con el programa ImageJ.

Procesamiento de imágenes

Una vez obtenidos los "stacks" estos fueron abiertos en el programa ImageJ utilizando el plugin UCSD Confocal Microscopy (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/ucsd.html>) que permite trabajar con las imágenes obtenidas en el microscopio. Para el análisis fue realizada la proyección en el eje Z de los planos focales de cada stack. En cada imagen obtenida se contó el número total de botones sinápticos, el número total de mitocondrias, el número de botones con mitocondrias y se midió el largo total de las ramas axonales existentes en la imagen. También se midió el área individual de cada mitocondria encontrada. A partir de estos datos se obtuvo el valor promedio de tamaño mitocondrial para cada ZT y CT.

Análisis Estadístico

Con los resultados obtenidos realizamos el análisis estadístico utilizando el software Statistica 7.0. Realizamos los test paramétricos ANOVA (para comparaciones entre más de dos muestras) y Student (para comparaciones entre dos muestras) estableciendo el p valor en 0,05. Para ello, analizamos los supuestos de normalidad y homogeneidad usando el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente, con valor $p=0,05$. Para las muestras con una varianza desigual se realizó el test de Student con la corrección de Welch. De no cumplirse los supuestos, realizamos los test no paramétricos Kluskal-Wallis (para comparaciones entre más de dos muestras) o Mann-Whitney (para comparaciones entre dos muestras).

Resultados

Inicialmente nos centramos en conseguir imágenes de las terminales motoras de la MN5 de la mejor calidad posible. El protocolo utilizado permitió conseguir imágenes en las que claramente se pueden definir y contar los botones sinápticos (Figura 4). Al mismo tiempo, la buena calidad de la señal generada por expresión transgénica de la GFP permitió identificar y contar individualmente las mitocondrias y definir si estaban localizadas en los botones sinápticos o en los tramos de axón que interconectan los botones. Pude observar que no todos los botones tienen mitocondrias (Flecha roja en Fig. 4) y la mayoría de los botones con mitocondria tienen una sola (Flecha verde en Fig.4).

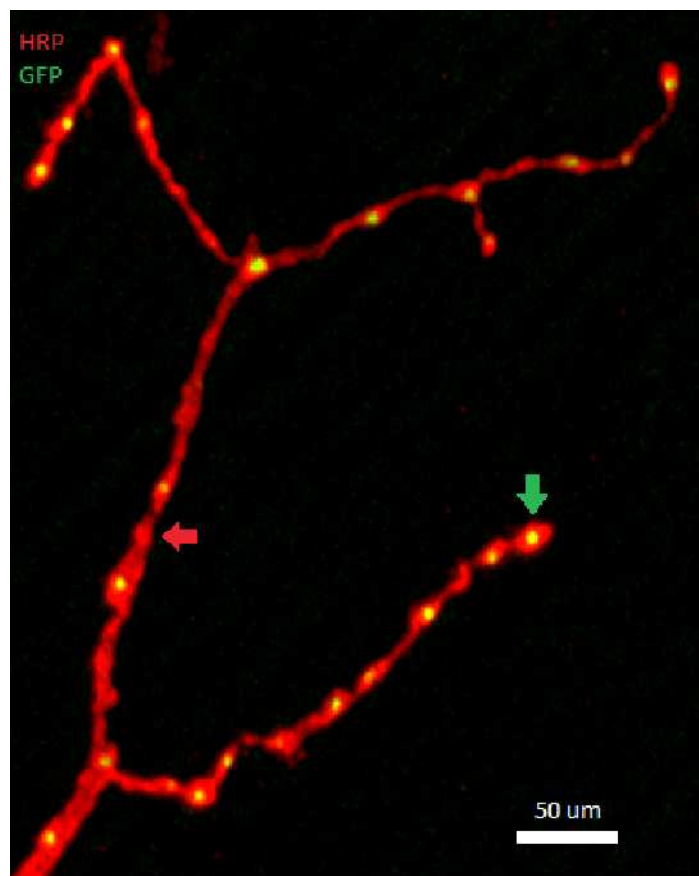


Figura 4. Rama de la terminal motora de la MN5 de *Drosophila melanogaster*. La motoneurona inerva los músculos de vuelo 5 y 6 por medio de cientos de ramas similares a las que muestra esta foto. La terminal se ramifica a lo largo de la superficie dentro músculo recorriéndolo en toda su extensión. Se observa un gran número de botones sinápticos. Algunos de ellos tienen mitocondrias en su interior (flecha verde) mientras que otros carecen de mitocondrias (flecha roja). En rojo se observa la motoneurona (anti-HRP) y en verde las mitocondrias (GFP). La imagen corresponde a la proyección de máxima intensidad de 36 planos focales separados 0,6 μm .

Estudio del número de botones sinápticos en la MN5

Se realizó el conteo de botones sinápticos totales para compararlo con los números obtenidos por Ruiz y colaboradores (datos no publicados) y evaluar la concordancia de los mismos. Esta cuantificación mostró que el número total de botones sinápticos es mayor de noche en condiciones LD (Figura 5A), en concordancia con los resultados previos de Ruiz y colaboradores. El experimento en DD muestra una tendencia similar pero no se encontraron diferencias significativas (Figura 5B).

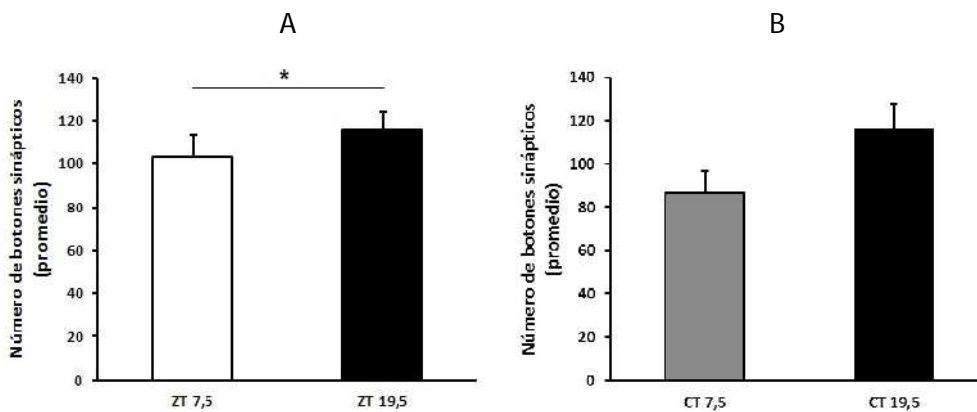


Figura 5. Número total de botones sinápticos en LD y DD. Número promedio de botones sinápticos para cada ZT y CT. A) Gráfico para la condición LD: ZT 7,5: $103,3 \pm 8,16$; ZT 19,5: $116,14 \pm 10,13$, Mann-Whitney, $p=0,0037$. B) Gráfico para la condición DD: ZT 7,5: $86,56 \pm 10,15$; ZT 19,5: $116,10 \pm 11,85$, Mann-Whitney, $p=0,114$.

Observaciones sobre las mitocondrias en la MN5

En esta instancia nos centramos en estudiar la localización y otro aspectos de las mitocondrias en la terminal motora.

Al analizar las imágenes obtenidas encontramos mitocondrias tanto en el axón principal de la MN5 (antes de su inserción en los músculos; Figura 6) como en su tramo más distal, sobre el músculo y donde el axón forma los botones sinápticos (Figura 4). Observamos que el axón principal contenía mitocondrias más grandes y alargadas que las observadas más distalmente, a lo largo de la terminal neuromuscular. Centrándonos en la terminal

neuromuscular, descubrimos que la gran mayoría de las mitocondrias parecían ser redondeadas u ovaladas y encontrarse en botones sinápticos. Encontramos que los botones con mitocondrias generalmente tienen una única mitocondria en su interior y que no todos los botones tienen mitocondrias.

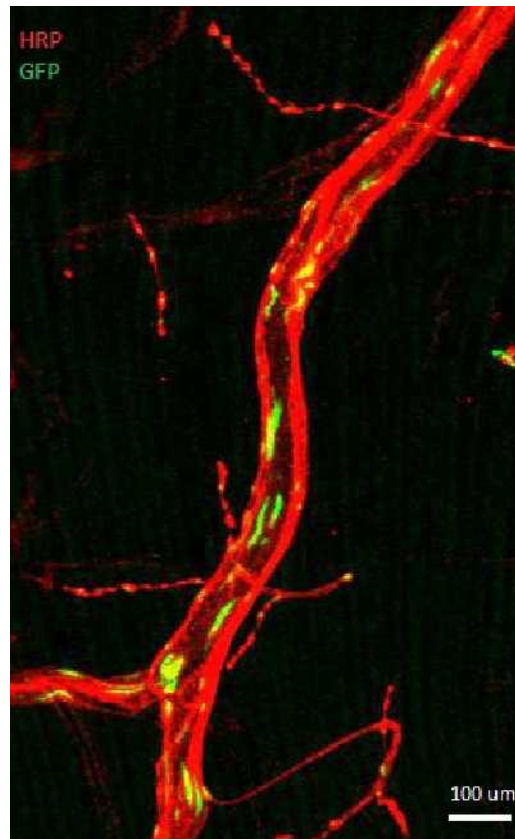


Figura 6. La imagen muestra el axón principal de la MN5. En rojo se observa la neurona cuya membrana está marcada por la tinción con anti-HRP. En verde (GFP) se observan las mitocondrias. La imagen es el resultado de la proyección de 20 planos focales en el eje z tomados con un objetivo de 60x.

Estudio del número de mitocondrias en la terminal neuromuscular de la MN5

Al comparar el número promedio de mitocondrias en la terminal neuromuscular de la MN5 observamos más mitocondrias en las muestras de la noche en condiciones LD (Figura 7A). Nuestros datos muestran una tendencia similar en DD pero el análisis estadístico no mostró diferencias (Figura 7B).

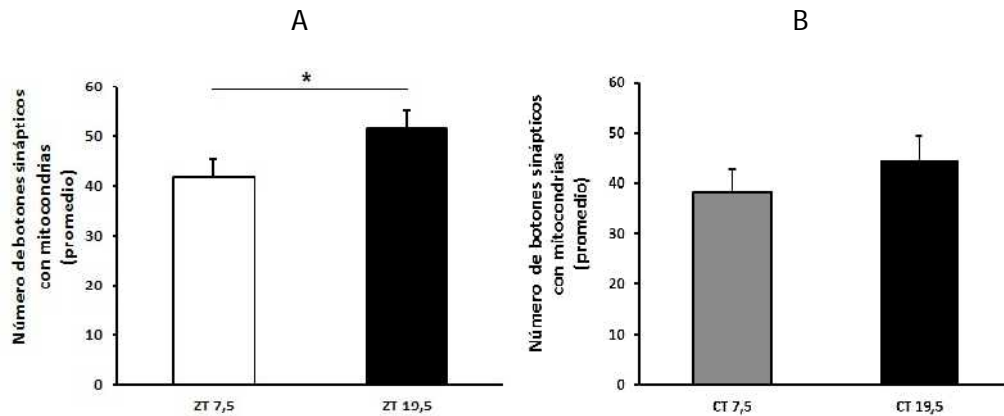


Figura 7. Número total de botones sinápticos con mitocondrias en LD y DD. Número de botones sinápticos con mitocondrias para cada ZT y CT. A) Gráfico para la condición LD: ZT 7,5: $41,7 \pm 3,81$; ZT 19,5: $51,4 \pm 3,0$, Mann-Whitney, $p=0.0109$. B) Gráfico para la condición DD: CT 7,5: $38,22 \pm 4,54$; CT 19,5: $44,66 \pm 4,76$ Mann-Whitney, $p=0.0914$.

Densidad de las mitocondrias en la terminal neuromuscular de la MN5

Inicialmente, el objetivo de medir el largo de la terminal motora analizada en nuestras imágenes fue pensado con el fin de calcular la densidad de mitocondrias en base al largo de la terminal motora. Sin embargo, el resultado obtenido adquirió un valor en sí mismo ya que encontramos que el largo promedio de la terminal motora varía, siendo mayor en la noche en condiciones LD (Figura 8A). En DD obtuvimos una tendencia similar pero el análisis estadístico no mostro diferencias entre las muestras (Figura 8B).

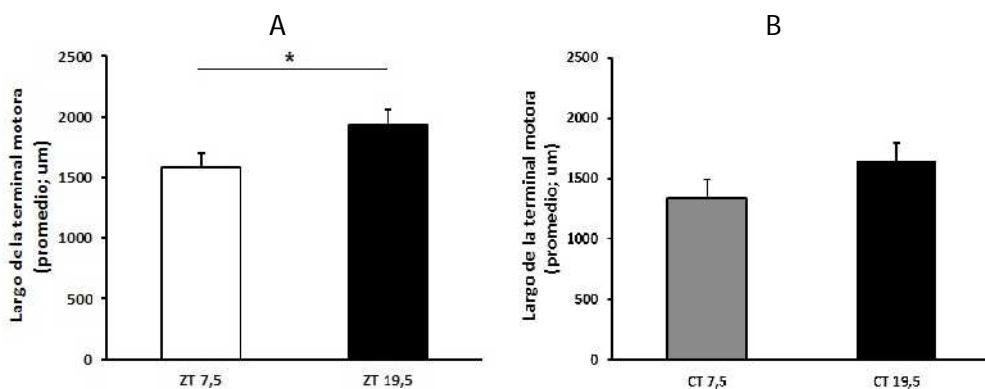


Figura 8. Largo de la terminal motora en LD y DD. Largo de la terminal motora en um para cada ZT y CT. A) Gráfico para la condición LD: ZT 7,5: 1578,78 ± 121,68; ZT 19,5: 1932,06 ± 123,96, Mann-Whitney, p=0.002. B) Gráfico para la condición DD: CT 7,5: 1334,36 ± 158,64; CT 19,5: 1637,51 ± 161,67, Mann-Whitney, p=0.0914). (Test Mann-Whitney, p=0.002).

Una vez realizada la normalización por largo de la terminal motora, encontramos que la densidad de mitocondrias es muy similar entre la noche y el día. (Figura 9).

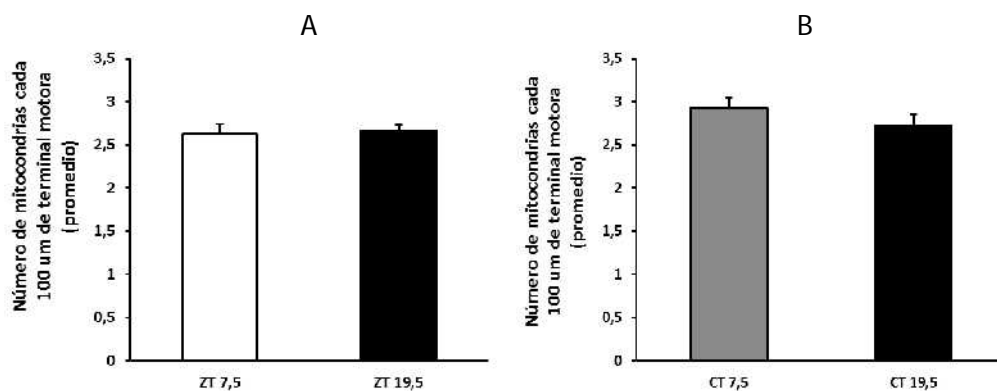


Figura 9. Densidad de las mitocondrias en la terminal motora. Número promedio de mitocondrias por cada 100 um de terminal motora para cada ZT y CT. A) Gráfico para la condición LD: ZT 7,5: 2,62 ± 0,11; ZT 19,5: 2,66 ± 0,07, Mann-Whitney, p=0.153. B) Gráfico para la condición DD: CT 7,5: 2,92 ± 0,11; CT 19,5: 2,93 ± 0,11, Mann-Whitney p=0,118.

Estudio del tamaño de las mitocondrias en la terminal neuromuscular de la MN5.

Por último hicimos un análisis más fino de posibles diferencias circadianas en el tamaño de las mitocondrias de la terminal motora. A partir de la medición del área de cada mitocondria por imagen, se calculó el valor promedio de tamaño mitocondrial. Observamos que este muestra una tendencia según la cual sería mayor en ZT y CT 7,5. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 10).

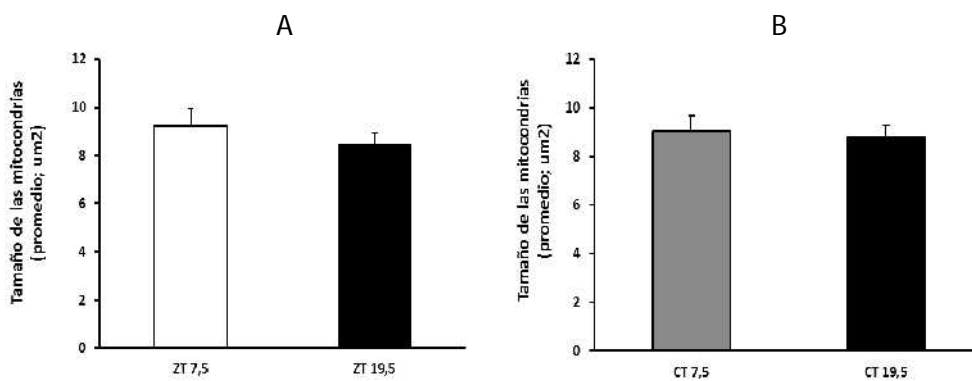


Figura 10. Tamaño promedio de las mitocondrias en LD y DD. Tamaño promedio de las mitocondrias para cada ZT y CT. A) Gráfico para la condición LD: ZT 7,5: $9,23 \pm 0,72$; ZT 19,5: $8,23 \pm 0,50$, Mann Whitney, $p=0,096$. B) Gráfico para la condición DD: CT 19,5: $8,98 \pm 0,66$; CT 19,5: $8,74 \pm 0,48$, Mann Whitney, $p=0,189$.

Discusión

La mosca *Drosophila melanogaster* es un organismo diurno y vuela de día pero no de noche, por lo tanto, las terminales de la MN5 tendrán una mayor demanda energética durante el día. De acuerdo a esto propusimos que existirían cambios cuantificables en el número, distribución y tamaño del organelo productor de energía: la mitocondria. Nuestros resultados sugieren que existe una reorganización en las mitocondrias de la MN5 entre el día y la noche.

Número y distribución de mitocondrias

Nuestros resultados contradicen nuestra hipótesis inicial en lo referente al número y distribución de mitocondrias. El número total de mitocondrias en la terminal neuromuscular formada por la neurona MN5 sobre los músculos de vuelo 5 y 6 es mayor en la noche en condiciones LD y la diferencia se mantendría en oscuridad constante. De acuerdo a estos resultados la idea de un mecanismo adaptativo que produjera un aumento en el número de mitocondrias en el día para producir la energía necesaria para el funcionamiento de las sinapsis (mediante un mecanismo de naturaleza circadiana o simplemente una respuesta a la demanda energética) no coincide con los datos obtenidos y nos obliga a postular una hipótesis alternativa.

Al analizar nuestros resultados consideramos dos alternativas que podrían explicar un posible aumento del número de mitocondrias observadas con nuestro método: un aumento de la densidad de mitocondrias en una terminal que no varía de tamaño o un aumento del número de mitocondrias en una terminal que varía de tamaño. Un detalle importante a tener en cuenta es qué ocurre con la densidad de las mitocondrias en la terminal. El aumento en la densidad de las mitocondrias en los axones ha sido documentado en eventos celulares que requieren una alta demanda energética como la actividad sináptica o el crecimiento neuronal (Morris and Hollenbeck, 1993; Bindokas et al., 1998). Nuestros resultados muestran que durante ciclos de LD o DD en moscas "jóvenes" mantenidas en condiciones de laboratorio estándar la densidad de mitocondrias se mantiene constante entre el día y la noche.

Nuestros resultados indican que el número de mitocondrias existentes en la terminal motora de la MN5 aumenta de modo rítmico, durante la noche del ciclo LD, y sugieren al menos una tendencia similar durante la noche subjetiva en ciclos DD. Además, no observamos diferencias en la densidad de las mitocondrias a lo largo de la terminal de la MN5 si bien esta última parece aumentar de tamaño en la noche. Esto nos hace proponer que el aumento del

número de mitocondrias se da por el crecimiento de la terminal con una densidad constante de mitocondrias. Además, sugiere la existencia de un mecanismo que permite mantener la densidad de las mitocondrias cuando la terminal crece, durante la noche. Existen varias publicaciones que informan sobre mecanismos que regulan la distribución y posición de las mitocondrias en el axón. Por ejemplo Chada y Hollembeck (2004) descubrieron que la activación del receptor de tirosina quinasa por parte del NGF (el factor de crecimiento neuronal, una molécula inductora que está involucrada en el crecimiento de las neuritas) permite el desensamblaje del complejo que une las mitocondrias al citoesqueleto, lo que resulta en la acumulación de mitocondrias en las zonas en que este factor está presente. Por otra parte, se ha propuesto que el calcio actuaría en la liberación de la mitocondria del citoesqueleto, terminando su movilización y posicionándola en la cercanía de la sinapsis (Wang y Schwarz, 2009). Mecanismos de este tipo podrían estar regulando y coordinando la distribución de las mitocondrias en la MN5 junto con el crecimiento de la terminal motora manteniendo la densidad de las mitocondrias.

Una posible explicación para nuestra observación de mayor número de mitocondrias durante la noche sería que la MN5 necesita más energía durante la noche, durante la fase del crecimiento de la terminal motora detectada en este estudio y el consiguiente aumento del número de botones sinápticos, también detectado en este estudio, así como en un estudio previo de nuestro laboratorio, aún no publicado (Ruiz y colaboradores, en preparación). Las nuevas mitocondrias producirían la energía necesaria para el crecimiento y para el mantenimiento de las sinapsis de la nueva porción de terminal generada.

Por otra parte, el crecimiento de las terminales motoras por la noche concuerda con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio respecto a fagocitosis neuronal mediada por hemocitos, donde fue demostrado que los hemocitos fagocitan partes de la MN5 y que esta fagocitosis se incrementa durante el día (Pazos et al., datos no publicados).

Los cambios que encontramos entre el día y la noche en moscas mantenidas en ciclo LD no fueron confirmados estadísticamente en moscas mantenidas en ciclos DD. Esto podría significar que el ritmo estudiado requiere luz, o bien que en ausencia de la luz su amplitud disminuye a tal grado que sería necesario examinar un número de muestras mayor para que el análisis estadístico confirme su permanencia en DD.

Número de mitocondrias, tamaños mitocondriales y su posible relación con la fisión y fusión

El estudio de las motoneuronas en *Drosophila* ha demostrado que las mitocondrias presentan una dinámica intensa de movimiento anterógrado y retrógrado sobre el citoesqueleto axonal (Pilling et al., 2006). Un aumento de la cantidad de mitocondrias en la terminal motora de la MN5 en la noche podría deberse al transporte de éstas desde las porciones proximales del axón principal de la MN5. Una disminución de la cantidad de mitocondrias en el día podría ocurrir por el proceso inverso. De acuerdo a esto, deberíamos encontrar mitocondrias que se encuentren en los tramos de axón entre botones sinápticos dirigiéndose a estos mismos. Sin embargo, encontramos muy pocas mitocondrias en las porciones de axón entre los botones sinápticos. Este descubrimiento nos lleva a sugerir que el aumento de las mitocondrias en la terminal no se debería en su totalidad al transporte a través del axón. Es probable que exista un mecanismo complementario o alternativo para esto. Una posible explicación sería la dinámica de las mitocondrias y su capacidad para la fisión y fusión. Estos procesos coordinados son fundamentales en las células en desarrollo y crecimiento ya que es necesario poblar las nuevas células con un número adecuado de mitocondrias (Youle y van der Bleik, 2012). También son procesos muy importantes en células diferenciadas como las neuronas ya que estas no pueden sobrevivir si estos no ocurren (Youle y van der Bleik, 2012). Hoy sabemos que la fusión y fisión de mitocondrias son procesos normales y frecuentes, absolutamente necesarios para mantener el funcionamiento correcto de las células y estado de salud mitocondrial.

A través de la fusión, se logra una homogeneidad funcional y bioquímica en la población de mitocondrias (Chen y Chan, 2010). La actividad mitocondrial produce la acumulación de daños en el ADN, proteínas y lípidos. La fusión ocurre normalmente como un mecanismo que permite compensar los daños producidos en sus componentes (Yoneda et al., 1994; Nakada et al., 2001). En este proceso las mitocondrias intercambian ARNm, proteínas y lípidos pudiendo mitigar los efectos de daños ambientales y del estrés maximizando su capacidad oxidativa, siempre y cuando el estrés este por debajo de un valor umbral (Yoneda et al., 1994; Nakada et al., 2001). La fisión mitocondrial funciona como un mecanismo para producir nuevas mitocondrias pero al mismo tiempo tiene funciones importantes para el mantenimiento de una población funcional de mitocondrias. Youle y van der Bleik (2012) proponen un modelo según el cual las mitocondrias severamente dañadas realizan un tipo de fisión en la que los componentes dañados son repartidos asimétricamente entre las

mitocondrias hijas. El resultado es una mitocondria sana y con los componentes sanos; y una mitocondria que heredó todo los componentes dañinos y cuyo destino es la mitofagia por parte de los lisosomas.

Se considera que una de las funciones del sueño es brindarle al organismo un período de reparación de los daños sufridos en el ADN, proteínas y organelos durante la fase activa. Parece probable que la población de mitocondrias de la MN5 sufra más daños durante el día, por el alto metabolismo y actividad sináptica del día, comparado a la noche, cuando la mosca no vuela. Durante el día, la intensa actividad sináptica causaría daño mitocondrial que en parte llevaría a una destrucción de mitocondrias dañadas (disminuyendo el número de las mitocondrias observadas). Esto parece concordar con otros datos: de día aumenta la fagocitosis de material neuronal (Pazos et al., datos no publicados) y disminuye el número de botones (Ruiz et al., datos no publicados) y el largo de las terminales axonales. A su vez, la alta demanda energética y el daño causado por la actividad podrían estar favoreciendo la fusión de mitocondrias, que actuaría durante el día como un mecanismo de generación de mitocondrias más grandes y más eficientes. Durante la noche, una fase de reparación generaría nuevos botones, restableciéndose el largo de las terminales y el número de mitocondrias, muchas de las cuales se formarían por fisión, lo cual concuerda con la tendencia observada de un menor tamaño en las mitocondrias nocturnas.

Conclusiones

En conjunto, nuestros resultados sugieren que las mitocondrias en la terminal motora de la neurona MN5 sufren modificaciones entre el día y la noche. Este ritmo parecería ser independiente de la luz, lo cual sugiere que es circadiano y autónomo. Sin embargo, para determinar inequívocamente que se trata de un ritmo circadiano y autónomo será necesario aumentar el número de muestras analizadas en condiciones DD y estudiar también moscas mutantes nulos para genes del reloj circadiano.

Otra aproximación interesante sería estudiar marcadores de fisión y fusión de mitocondrias. Drp1 cumple un rol fundamental en el proceso de fisión mitocondrial (Smirnova et al., 2001; Labrousse et al., 1999) y su presencia o mayor concentración en la terminal en determinado momento del ciclo de luz-oscuridad sería un claro indicador de que la fisión mitocondrial juega un rol fundamental en las reorganizaciones circadianas de las mitocondrias de la MN5.

Referencias

Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M. 1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* 93:791-804.

Allada R, Chung BY. 2010. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annu. Rev. Physiol.* 72:605-624.

Appelbaum L, Wang G, Yokogawa T, Skariah GM, Smith SJ, Mourrain P, Mignot E. 2010. Circadian and homeostatic regulation of structural synaptic plasticity in hypocretin neurons. *Neuron* 68:87-98.

Barth M, Schultze M, Schuster CM, Strauss R. 2010. Circadian plasticity in photoreceptor cells controls visual coding efficiency in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 5:e9217.

Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6:544-56.

Bindokas VP, Lee CC., Colmers WF, Miller RJ. 1998. Changes in mitochondrial function resulting from synaptic activity. *J. Neurosci.* 18: 4570-4587.

Blau J, Young MW. 1999. Cycling *vri* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 99:661-71.

Block G, Geusz M, Khalsa S, Michel S, Whitmore D (1995) Cellular analysis of a molluscan retinal biological clock. *Ciba Found Symp* 183: 51-60.

Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-15.

Cao G, Nitabach MN. 2008. Circadian control of membrane excitability in *Drosophila melanogaster* lateral ventral clock neurons. *The journal of Neuroscience* 28 (25): 6493-6501.

Chada SR, Hollenbeck PJ. 2004. Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria *Current Biology* 14: 1272-1276.

Chan DC. 2012. Fusion and Fission: Interlinked processes critical for mitochondrial health *Annu. Rev. Genet.* 46:265-87.

Cali T, Ottolini D, Brini M. 2012. Mitochondrial Ca²⁺ and neurodegeneration. *Cell Calcium*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2012.04.015>.

Chen H y Chan DC. 2010. Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201: 21-25.

Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NR, Hardin PE, Young MW, Storti RV, Blau J. 2003. *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 7;112(3):329-41.

Dunlap J C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, Vol. 96, 271-290. Konopka RJ, Benzer S. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:2112-6.

Duffy JB. 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34:1-15.

Fernandez MP, Berni J, Ceriani MF. 2008. Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behaviour. *PLoS Biol.* 6(3): e69. doi: 10.1371/journal.pbio.0060069.

Fleury F, Allemand R, Vavre F, Fouillet P, Boulétreau M. 2000. Adaptive significance of a circadian clock: temporal segregation of activities reduces intrinsic competitive inferiority in *Drosophila* parasitoids. *Proc. Biol. Sci.* 267:1005-10.

Gery S, Koeffler HP. 2010. Circadian rhythms and cancer. *Cell Cyc.* 9:1097-1103.

Girardet C, Blanchard MP, Ferracci G, Lévêque C, Moreno M, François-Bellan AM, Becquet D, Bosler O. 2010. Daily changes in synaptic innervation of VIP neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: contribution of glutamatergic afferents. *Eur. J. Neurosci.* 31:359-70.

Glossop NR, Hardin PE. 2002. Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals. *J. Cell Sci.* 115:3369-3377.

Glossop NRJ, Houl JH, Zheng H, Ng FS, Dudek SM, Hardin PE. 2003. VRILLE Feeds Back to Control Circadian Transcription of Clock in the Drosophila Circadian Oscillator. *Neuron* 37: 249-261.

Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang TX, Kreps JA, Kay SA. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 290: 2110–2113.

Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA, Chavkin J, Williams JA, Sehgal A, Pack AI. 2000. Rest in Drosophila is a sleep-like state. *Neuron* 25:129-138.

Hendricks JC. 2003. Invited review: Sleeping flies don't lie: the use of Drosophila melanogaster to study sleep and circadian rhythms. *J. Appl. Physiol.* 94:1660-72.

Ikeda K, Koenig JH, Tsuruhara T. 1980. Organization of identified axons innervating the dorsal longitudinal flight muscle of Drosophila melanogaster. *J. Neurocytol.* 9:799-823.

Ikeda K, Koenig JH. 1988. Morphological identification of the motor neurons innervating the dorsal longitudinal flight muscle of Drosophila melanogaster. *J. Comp. Neurol.* 273:436-444.

Jan LY, Jan YN. 1982. Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in Drosophila and grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2700-2704.

Konopka RJ, Benzer S. 1971. Clock mutants of Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:2112-6.

Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA, van der Blik AM. 1999. C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell* 4:815–26.

Lee CW, Peng HB. 2008. The function of mitochondria in presynaptic development at the neuromuscular junction. *Molecular Biology of the Cell* 19: 150-158.

Lessing D, y Bonini NM. 2009. Maintaining the brain: insight into human neurodegeneration from *Drosophila melanogaster* mutants. *Nature Reviews in Genetics* 10:359-370.

Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, Young MW. 2001. A role for the polarity segment polarity gene *shaggy/GSK-3* in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 105:769-779.

Mayer B, Oberbauer R. 2003. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol. Sci.* 18: 89-94.

Mcdonald MJ, Rosbash M. 2001. Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell*. 107: 567–578.

Mehnert KI, Beramendi A, Elghazali F, Negro P, Kyriacou CP, Cantera R. 2007. Circadian changes in *Drosophila* motor terminals. *Dev. Neurobiol.* 67:415-421.

Mehnert KI, Cantera R. 2008. A peripheral pacemaker drives the circadian rhythm of synaptic boutons in *Drosophila* independently of synaptic activity. *Cell Tissue Res.* 334:103-109.

Morris RL, Hollenbeck PJ. 1993. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal out-growth. *J. Cell Sci.* 104: 917-927.

Nakada K, Inoue K, Ono T, Isobe K, Ogura A, Goto Y-I, Nonaka I, Hayashi J-I. 2001. Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nature Medicine* 7: 934-940.

Pilling A D, Horiuchi D, Lively CM, Saxton WM. 2006. Kinesin-1 and dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Molecular Biology of the Cell* 17:2057-2068.

Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. 1997. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278:1632–1635.

Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B, Young MW. 1998. Double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94:83-95.

Pyza E, Borycz J, Giebultowicz, Meinertzhagen IA. 2004. Involvement of V-ATPase in the regulation of cell size in the fly's visual system. *J. Insect. Physiol.* 50:985-994.

Pyza E, Górzka-Andrzejak J. 2004. Involvement of glial cells in rhythmic size changes in neurons of the house fly's visual system. *J. Neurobiol.* 59:205-215.

Pyza E, Górska-Andrzejak J. 2008. External and internal inputs affecting plasticity of dendrites and axons of the fly's neurons. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68:322-333.

Pyza E, Meinertzhagen IA. 1993a. Daily and circadian rhythms of synaptic frequency in the first visual neuropile of the Housefly's (*Musca domestica* L.) optic lobe. *Proc. Biol. Sci.* 254:97-105.

Pyza E, Meinertzhagen IA. 1993b. The regulation of circadian rhythms in the fly's visual system: involvement of FMRFamide-like neuropeptides and their relationship to pigment dispersing factor in *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster*. *Neuropeptides* 37:277-289.

Pyza E, Meinertzhagen IA. 1995. Monopolar cell axons in the first optic neuropile of the housefly, *Musca domestica* L., undergo daily fluctuations in diameter that have a circadian basis. *J. Neurosci.* 15:407-418.

Pyza E, Meinertzhagen IA. 1998. Neurotransmitters alter the numbers of synapses and organelles in photoreceptor terminals in the lamina of the housefly, *Musca domestica*. *J. Comp. Physiol.* 183:719-727.

Pyza E, Meinertzhagen IA. 1999. Daily rhythmic changes of cell size and shape in the first optic neuropile in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* 40:77-88.

Rosignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. 2004. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 64: 985-993.

Ruiz S, Ferreiro MJ, Casanova G, Olivera A, Cantera R. 2010. Synaptic vesicles in motor synapses change size and distribution during the day. *Synapse* 64:14-19.

Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC. 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93:805-14.

Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. 1994. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* 263:1603-6.

Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon VV, Larson M y Wisman E. 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 113-123.

Schwartz WJ. 1991. SCN metabolic activity in vivo. In: Klein DC, Moore RY, Reppert SM, editors. *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. New York: Oxford University Press. p 144–156.

Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G. 2000. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:1834-1837.

Shepherd GMG, Harris KM. 1998. Three-dimensional structure and composition of CA3-CA1 axons in rat hippocampal slices: Implications for presynaptic connectivity and compartmentalization. *The Journal of Neuroscience* 18: 8300-8310.

Smirnova E, Griparic L, Shurland D-L, van der Blik AM. 2001. Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12:2245–56.

Verstreken P, Ly C V, Venken K JT, Koh T-W, Zhou Y, Bellen H J. 2005. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions *Neuron* 47: 365-378.

Wang X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 68: 2922-2933.

Wang, X, Schwarz, TL., 2009. The mechanism of Ca²⁺-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 136: 163-174.

Yoneda M, Miyatake T, Attardi G. 1994. Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2699-2712.

Youle R J, van der Bliek A M. 2012. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science Review* 337: 1062-1065.

Anexo

Materiales y equipos utilizados

Materiales de mesada

Tubos de plástico de 64 por 25 mm, con comida para moscas y tapones de algodón

Portaobjetos de vidrio de 26x76mm

Cubreobjetos de vidrio 22x22 mm

Pincetas de acero inoxidable número 4 y 5

Agujas hipodérmicas de 0,5mm x 16 mm

Tubos eppendorf de 1.5 ml

Placas de Petri de 50 mm de diámetro

Pipetas automáticas de 20 μ L, 200 μ L y 1000 μ L, con puntas descartables

Papel de aluminio

Equipamiento

Lupa estereoscópico de disección y fibra óptica Fiber Optic-Heim LQ 1100 Shaker TS-2000A

VDRL Shaker Vortex Vortex-Genie 2

Heladera

Microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX81 con cámara digital Olympus DP71

Microscopio confocal Olympus Fluoview FV300

Computador con los programas Adobe Photoshop CS3, Imaje J y Statistica 9 instalados

Aparato de anestesia Inject+Matic Sleeper

Incubadora Termaks, configurada a 25°C, período de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad

Soluciones

Buffer Fosfato salino (PBS), pH 7,2 - 7,4 0,1 M

Para preparar la solución madre de PBS 10 x, se disolvieron las siguientes sales en una botella con un volumen pequeño de agua destilada y luego se enrasó a 1000 mL con agua destilada

-18,6 mM NaH₂PO₄ (2,56 g NaH₂PO₄.H₂O)

-84,1 mM Na₂HPO₄ (11,9 g Na₂HPO₄)

-750 mM NaCl (102,2 g NaCl)

PBST 0,1% (PBS con detergente)

Se preparó una solución 0,1% de Tritón X-100 en PBS 1X PBSTA 0,1% (PBST con albúmina)

Se preparó una solución 0,1% de albúmina de suero bovino en PBST 0,1%

Paraformaldehido 4% (PFA)

-Se disolvieron 2 g de paraformaldehido en 50 mL de PBS 1x

-Se calentó y mezcló en plancha caliente, manteniendo la temperatura debajo de 60°C

-Luego de unos minutos de agitación y calentamiento, y si la solución lo aclaraba, se agregaron unas gotas de NaOH 1N. -Con la solución transparente, se ajustó pH a 7,2 - 7,4 con HCl.

Glicerol 50% u 80%

-Se hizo una solución de 50% u 80% de glicerol en PBS 1x

Comida para moscas

Para preparar un litro se utilizaron:

1 L de agua

80 g de Agar

50 g de levadura

90 g de harina de maíz

100 g de glucosa

3 mL de ácido propiónico

7 mL de Nipagina (preparada en solución, 10 g de nipagina en 70mL de alcohol 95% y 30 mL de agua destilada)

-Se colocaron 750 mL de agua fría en una olla y se agregó la levadura. Se cocinó a fuego fuerte, revolviendo hasta alcanzar el primer hervor

-Por otro lado, se agregó el harina de maíz a 250 mL de agua y la mezcla se agregó a la olla una vez ésta había hervido, y se continuó revolviendo hasta que se alcanzaba el hervor nuevamente

-Se bajó el fuego y se agregó la glucosa, siempre revolviendo

-Se apagó el fuego y se esperó a que la temperatura de la preparación fuese de 60°C. Se agregó el ácido propiónico con la nipagina (mezcla de agentes antibióticos y antifúngicos)

-Por último, se dosifican los tubos