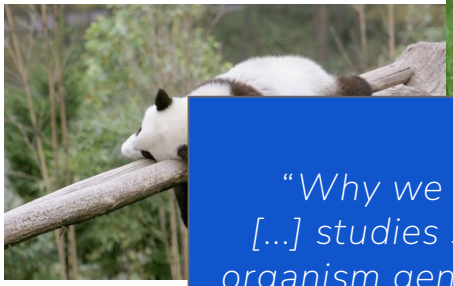
Daño en el ADN mitocondrial neuronal y sueño en *Drosophila melanogaster*

Biometría II — Trabajo final

Julián Cartoccio · Claudio Ezequiel Montaño · Clara Testa · Carla Concilio · Marina Propato Lots

Introducción

El sueño...









"Why we sleep remains one of the enduring unanswered questions in biology. [...] studies suggest an ancient origin for sleep and raise the possibility that model organism genetics may reveal the molecular mechanisms that guide sleep and wake."

Allada & Siegel 2008

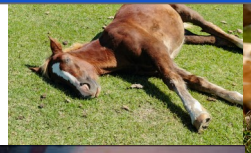


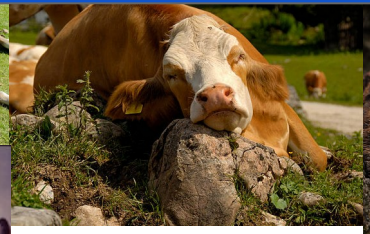
science explaining quantum physics

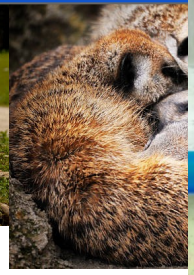




science explaining sleep

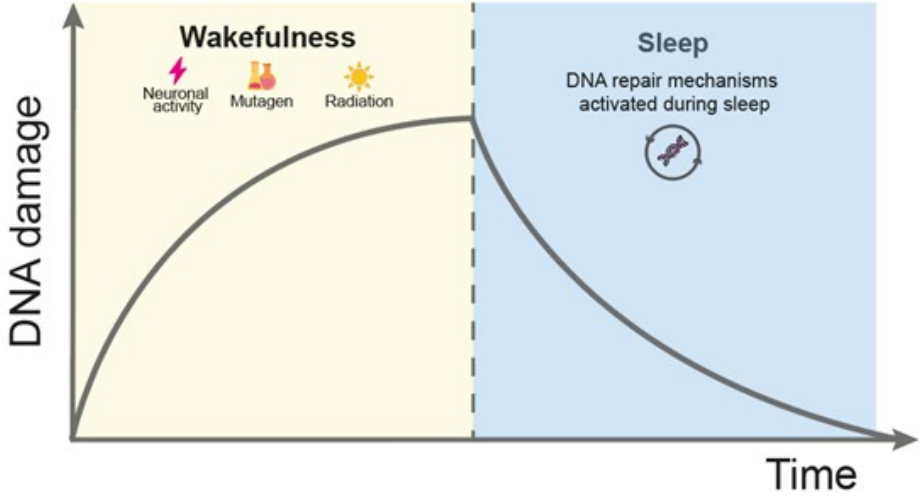








Nueva hipótesis



Neuronas

- No se regeneran (en gral.)
- Son células muy activas y producen grandes cantidades de ATP y en consecuencia, especies reactivas de oxígeno

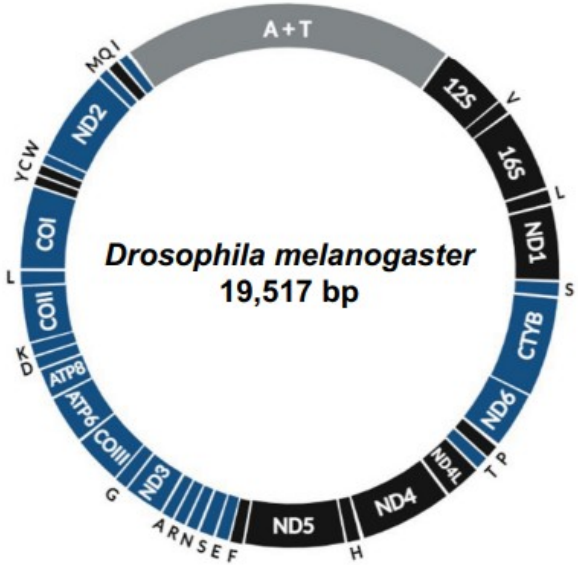
➔ Su ADN es muy susceptible al daño y debe ser cuidado mucho

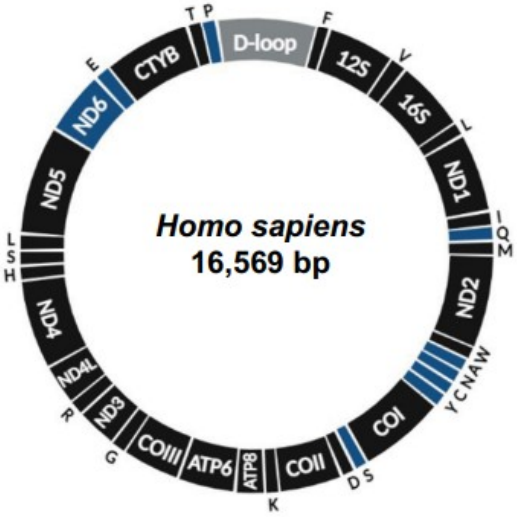
¿Ciclos de daño/reparación del ADN neuronal serán parte de la regulación del sueño?

Hay muchos más fun facts sobre esta teoría, por ejemplo: la melatonina, que sincroniza ciclos circadianos surge muy temprano en la vida, cuando los rayos del sol llegan con mayor fuerza a la tierra y causan daño oxidativo.

Y por qué las mitocondrias?

- Allí es dónde se generan especies reactivas de oxígeno
- Tienen ADN y puede ser reparado (de maneras distintas según tejido)





"In muscular and neuronal tissues, increased levels of damaged mtDNA molecules have been observed along with abundant four-way DNA junctions, indicating that recombination may be the main maintenance mechanism in these tissues."

Rodrigues et al. (2022) *Biosci Rep*

Las sLNvs (neuronas ventrolaterales pequeñas)

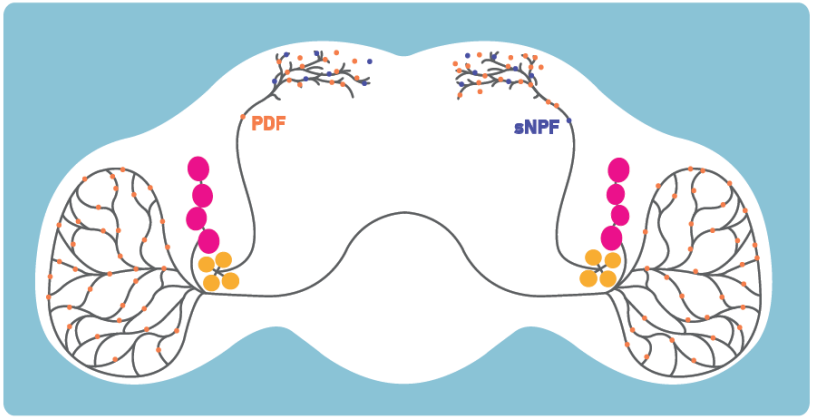


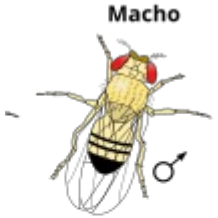
Figure 1. LNvs: Large ventral lateral neurons in pink and small ventral lateral neurons in orange with their identified neuropeptides outputs.

Las *vedettes* del control circadiano del sueño

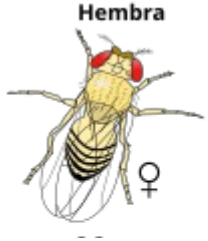
- Marcapasos
- Coordinan otras neuronas río abajo
- Expresan y liberan PDF y sNPF

Solo 8 neuronas!!

Sueño y sexo



- Los machos duermen más (siesta diurna larga).



- Las hembras apareadas duermen menos y son más variables.
- Resultados no publicados del laboratorio: las hembras presentan mayor aumento del sueño frente al daño en el ADN nuclear de neuronas.

Objetivos, hipótesis y predicciones

Objetivo

Evaluar si el daño en el ADN mitocondrial neuronal aumenta la fracción de sueño, evaluada como minutos de sueño en un día, en moscas *Drosophila melanogaster* hembras y machos.

Hipótesis de Investigación

El daño en el ADN mitocondrial de las neuronas s-LNvs actúa como una señal celular que incrementa el sueño de *Drosophila melanogaster*, y la magnitud de este efecto es mayor en hembras que en machos.

Predicciones

1. Aumento del sueño: la moscas que expresan la enzima de restricción Mito-XhoI, que causa daño en el ADN mitocondrial, en neuronas s-LNvs (R6G4\>MitoXhoI) tienen una fracción de sueño en 24 h mayor que la de los dos controles (R6G4\>+ y MitoXhoI\>+), que comparten con ellas el fondo genético.
2. Efecto del genotipo dependiente del sexo: el aumento del sueño de las moscas R6G4\>MitoXhoI respecto de los controles R6G4\>+ y MitoXhoI\>+ es mayor en las hembras que en los machos. Es decir, se espera que haya una interacción entre el genotipo y el sexo.

Metodología

Moscas transgénicas



1

cell-specific promoter

GAL4

x

2



UAS

gene of interest

3

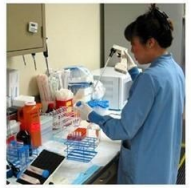
GAL4

UAS

gene of interest



What people think geneticists do

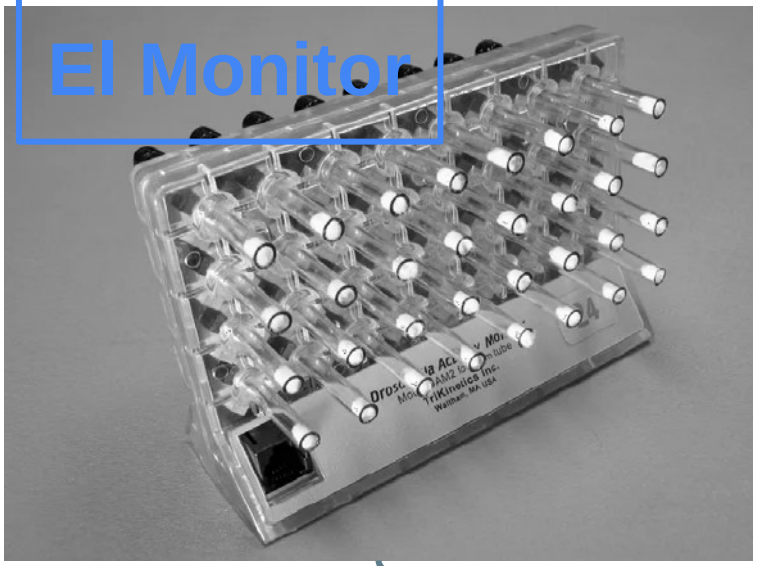


What we actually do

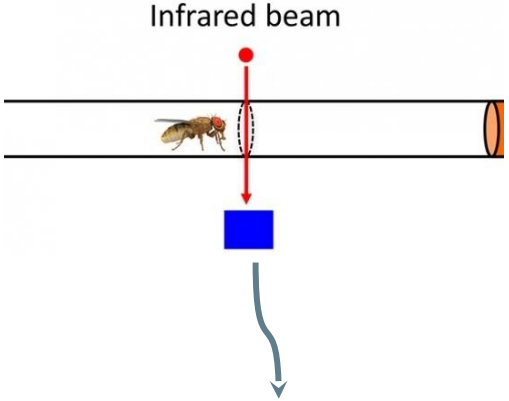


Drosophila Activity Monitor (DAM)

El Monitor



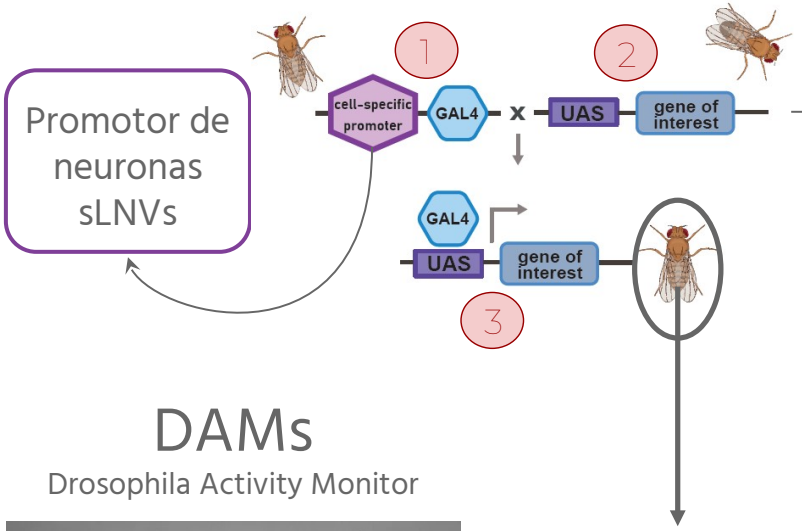
32 canales en los cuales se coloca una mosca en un tubo con comida y entrada de aire



Un haz de luz infrarroja y un detector en cada canal, registran los pasos de la mosca por ese sitio

El programa registra 1 vez por minuto para cada canal: # Veces que pasa la mosca por el

Diseño experimental completo





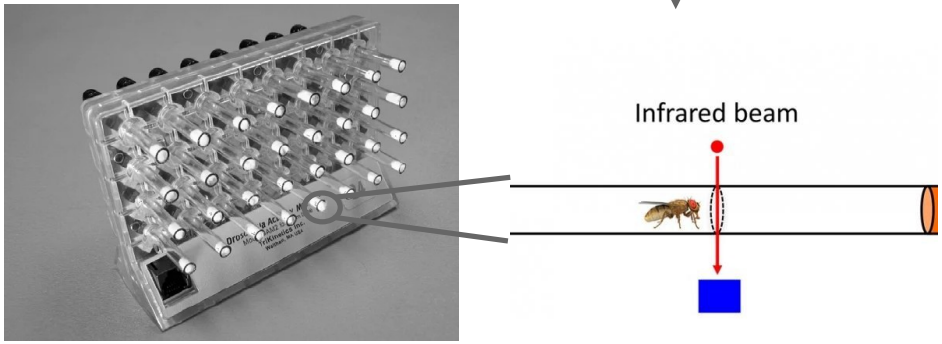
Mito-XhoI

Enzima de restricción que corta mtDNA

1. Genotipo parental Gal4 → grupo control
2. Genotipo parental UAS → grupo control
3. Genotipo que expresa **MitoXhoI** en **sLNvs** → grupo experimental

DAMs

Drosophila Activity Monitor



Inferencia de minutos de sueño en un día

Experimento se repite de manera independiente en 3 fechas distintas

max. 32 moscas del mismo tratamiento (genotipo x sexo) en cada monitor

Unidad experimental y variables

UE	Cada mosca *Drosophila melanogaster*				
VR	Fracción de sueño (en 24hs)	Cuantitativa, continua, (0,1)			Distribución beta
VE_1	Genotipo	Cualitativa	3 niveles	Efectos fijos	Comparación de medias
VE_2	Sexo	Cualitativa	2 niveles	Efectos fijos	
VE_3	Fecha	Cualitativa	3 niveles	Efectos aleatorios	Modelo mixto
VE_4	Monitor	Cualitativa	18 niveles	Efectos aleatorios	

➔ GLMM con distribución beta del componente aleatorio, una comparación de medias como predictor lineal y función de enlace

Modelo estadístico

Explicar qué es cada letrita

Componente lineal

$$\eta_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + F_k + M_{l(k)},$$

i: 1 a 3 (genotipo) j: 1 a 2 (sexo) k: 1 a 3 (fecha) l: 1 a 18 (monitor)

Componente aleatorio

$$y_{ijklr} \mid F_k, M_{l(k)} \sim \text{Beta}(\mu_{ijkl}, \phi_{ij}), \qquad \text{Var}(y_{ijklr} \mid F_k, M_{l(k)}) = \frac{\mu_{ijkl}\,(1-\mu_{ijkl})}{1+\phi_{ij}}.$$

r: 1 a 543 (mosca)

Función de enlace

$$\log\left(\frac{\mu_{ijkl}}{1-\mu_{ijkl}}\right) = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + F_k + M_{l(k)}, \qquad F_k \sim N(0, \sigma_F^2), \quad M_{l(k)} \sim N(0, \sigma_M^2).$$

Supuestos

- Fracción de sueño entre 0 y 1 sin tomar dichos valores
- Independencia de las observaciones, dados los efectos aleatorios
- Ajuste de la variable respuesta a una distribución beta, condicional a los efectos aleatorios, que cumpla la relación media-varianza propia de la misma.
- Normalidad de los efectos aleatorios

¿Qué otras decisiones tomamos?

1. El modelo con precisión constante presenta desvíos en el QQ-plot y en los outliers; Levene significativo por genotipo y por sexo.

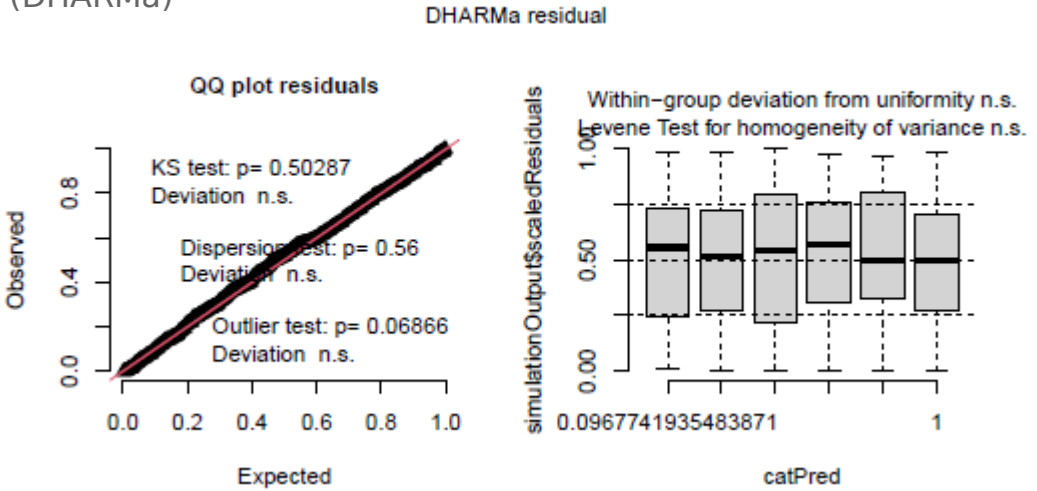
➔ Modelamos la precisión en función de la interacción genotipo * sexo.

1. Incluimos al monitor como factor aleatorio, dado que el agrupamiento físico de las moscas en la incubadora podría explicar parte de la variabilidad.

Resultados

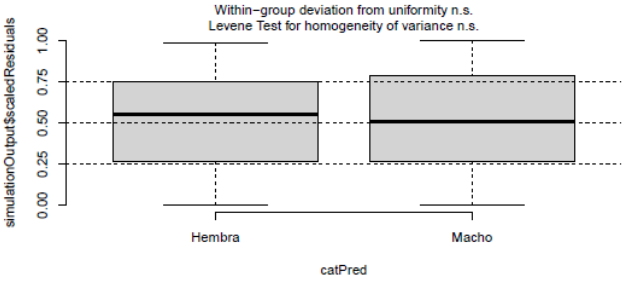
Evaluación de los supuestos del modelo

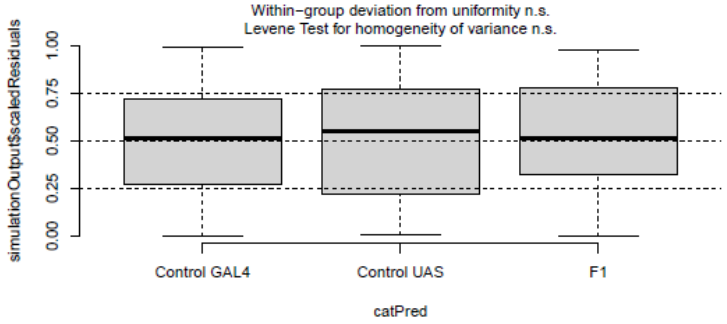
Diagnóstico de los supuestos del modelo mediante análisis de residuos simulados (DHARMa)



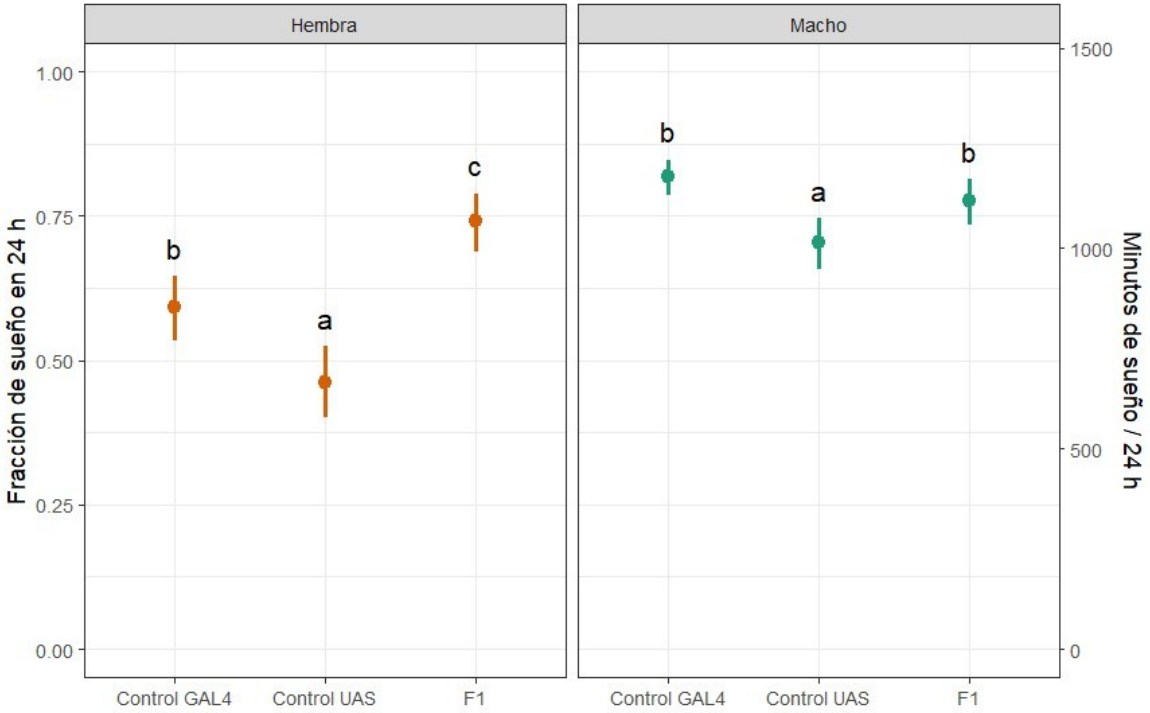
KS test: p=0.503
Dispersion test: p=0.56
Outlier test: p=0.069

"No existe evidencia para rechazar los supuestos de ajuste a una distribución beta"





Resultados



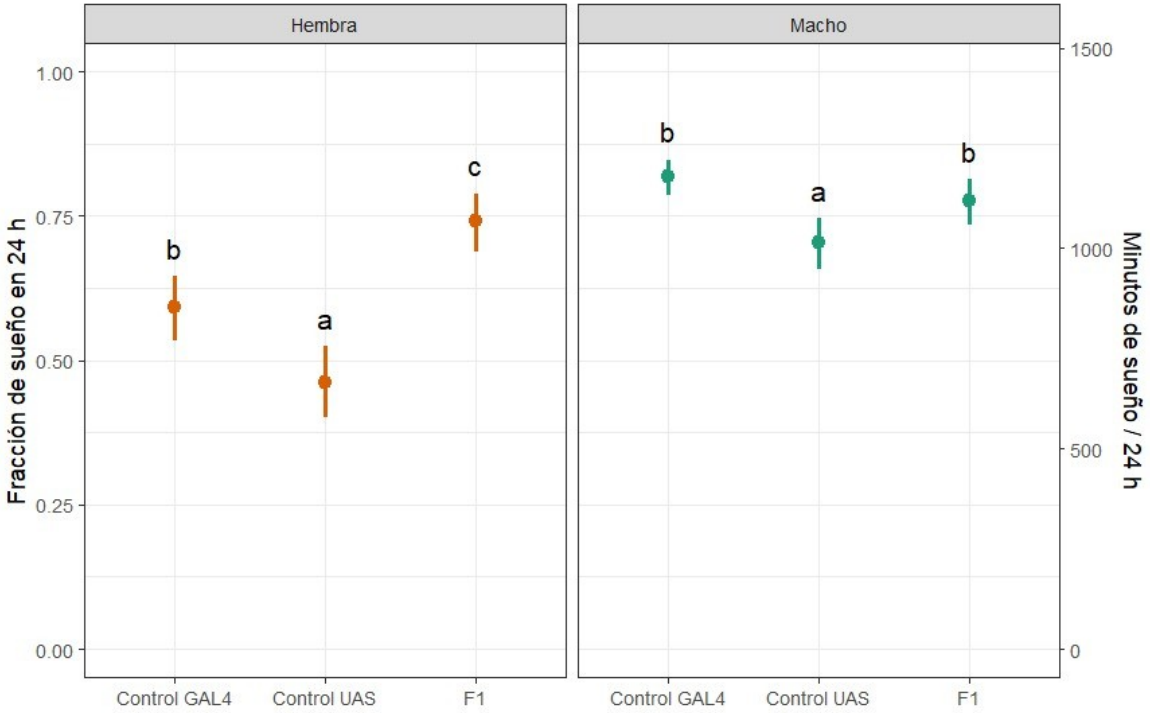
Fracción de sueño estimada por el modelo final (+/- IC 95%)

Dentro de cada sexo, letras distintas indican diferencias significactivas ($\alpha = 0.05$)

➔ En las hembras, los tres genotipos difieren significativamente entre sí, con la F1 presentando la mayor fracción de sueño.

El odds de sueño de la F1 fue 1,98 veces mayor que el del control GAL4 (98 % mayor) y 3,36 veces mayor que el del control UAS (236 % mayor), con $p < 0,001$ en ambos casos.

Resultados



Fracción de sueño estimada por el modelo final (+/- IC 95%)

Dentro de cada sexo, letras distintas indican diferencias significactivas ($\alpha = 0.05$)

➔ En los machos, en cambio, la F1 no difiere significativamente del control GAL4 ($p = 0.22$). Además, aunque los IC del control UAS y de la F1 se solapan, estos dos genotipos difieren significativamente ($p = 0.047$)

Discusión y conclusiones

Discusión

- ➔ La expresión de Mito-XhoI en las s-LNvs aumentó el sueño en las hembras → las hembras F1 durmieron más que las de ambos controles parentales.

- ➔ En los machos NO se observó este patrón → la F1 no difirió del control GAL4 y solo superó al control UAS.

- ➔ La interacción genotipo × sexo significativa respalda que el efecto depende del sexo.

Ambas predicciones se cumplen: el daño en el ADNmt aumentó el sueño, y lo hizo en las hembras, que era el sexo en el que se esperaba un efecto mayor.

Discusión

- ➔ Como no se midió directamente el daño en el ADNmt ni la función mitocondrial, no es posible distinguir si el efecto se debe al daño en sí, a la respuesta celular a ese daño o a una alteración de la producción de energía en las s-LNvs.

- ➔ Los dos controles difirieron entre sí en ambos sexos (el control UAS durmió menos que el GAL4) → Esto muestra que el fondo genético por sí solo modifica el sueño y justifica la exigencia de que la F1 difiera de ambos controles en el mismo sentido.

Discusión

- La ausencia de efecto en los machos puede explicarse, al menos en parte, por:

  1) efecto techo → duermen más que las hembras

  2) daño mitocondrial interactúe con mecanismos de regulación del sueño que difieren entre sexos, como la señalización de la hormona juvenil

  → Distinguir entre estas explicaciones requeriría, por ejemplo, repetir el experimento con hembras vírgenes, cuyo sueño diurno es similar al de los machos.

Limitaciones

- Solo 3 fechas. La varianza del efecto aleatorio de la fecha se estima con mucha incertidumbre y su normalidad no se puede evaluar.

- Se pierde estructura al resumir en 24 h. No se distingue entre día y noche ni entre episodios largos y fragmentados.

- Los odds ratios en la Beta son poco intuitivos, como marca la teórica: son cocientes de proporciones. Por eso conviene informar las diferencias en minutos por día.