

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



Identificación de redes de genes que subyacen a la susceptibilidad de desarrollar fenotipos parkinsonianos en respuesta a la exposición a rotenona en *Drosophila melanogaster*.

NOEMI CANDIA GONZÁLEZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN GENÉTICA

Director de Tesis: Prof. Dr. Patricio Olguín A.
Co-Director de Tesis: Prof. Dr. Gonzalo Olivares H.

Abril 2020

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



Identificación de redes de genes que subyacen a la susceptibilidad de desarrollar fenotipos parkinsonianos en respuesta a la exposición a rotenona en *Drosophila melanogaster*.

NOEMI CANDIA GONZÁLEZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN GENÉTICA

Director de Tesis: Prof. Dr. Patricio Olguín A.
Co-Director de Tesis: Prof. Dr. Gonzalo Olivares H.

Abril 2020

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la(el) candidata(o)

Noemi Estela Candia González

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Abril de 2020

Prof. Dr. Patricio Olgún A.

Director de Tesis

Prof. Dr. Gonzalo Olivares H.

Co-Director de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Luis Castañeda

Prof. Dr. Cristian Araneda

Prof. Dr. Jorge Campusano

**Prof. Dr (a) Lucia Cifuentes
Presidente Comisión**

A todas las personas que me apoyaron,
que estuvieron siempre presente
y compartieron sus conocimientos.

Agradecimientos

Me van a faltar páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de este trabajo, sin embargo merecen reconocimiento especial todas las personas que me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado. En primer lugar, quiero agradecer a mi Director de Tesis, Patricio, por la oportunidad de realizar esta tesis en el laboratorio y que gracias a sus consejos y correcciones hoy puedo culminar este trabajo. A mi Co-Director, Gonzalo, por su gran paciencia, tiempo y por todas las lecciones y conocimiento entregado durante este periodo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Genética del desarrollo de *Drosophila*, los que aún están, los que culminaron sus trabajos de investigación y partieron, a Tiny que es un excelente compañero de trabajo y me entregó apoyo durante el último periodo de esta tesis. Un agradecimiento especial a Frank que fue un partner muy importante durante el desarrollo de este trabajo, me ayudó a comprender muchos conceptos y técnicas complicadas con las que trabajé en esta tesis, gracias por el apoyo, la calma, la paciencia infinita, las conversaciones de temas serios y no serios, por generar un ambiente laboral tan ameno y por contagiar esa energía especial que no todos tienen. Agradecer a Ivanna, Cristian Molina, Vale, Rodrigo y Clau que han formado parte del laboratorio durante este periodo y han contribuido en entregar conocimiento y resultados.

A todos los integrantes del segundo piso del Programa de Genética humana con los que compartí diariamente, en especial a Pato y a Edo con los que tenemos el mismo sentido del humor y apañaron a todas mis ideas y salidas extra-programáticas, gracias por el apoyo, por confiar en mí y soportar mis crisis de estrés en el peor momento. A Mara, Cris, Camilo, Evelyn,

Rocio, Lourdes y Caro que forman o formaron parte del laboratorio vecino y con los que compartí diariamente desde que comencé el Magíster.

Quiero agradecer a todos mis compañeros del Magíster en Genética con los que generamos una amistad durante estos dos años, fue una gran generación, aprendí algo de cada uno de ustedes y agradezco mucho el compañerismo y unión de curso que no había visto jamás.

Finalmente, un agradecimiento especial a Pablo por estar siempre, por ser el apoyo incondicional en mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas y sobretodo por la paciencia y motivación que me entregaste en los momentos de desesperación.

Índice de Contenidos

Resumen	1
Abstract	2
Introducción.....	3
Enfermedad de Parkinson: Características generales.....	3
Características clínicas.....	3
Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson.	4
Etiología de la Enfermedad de Parkinson	6
Formas monogénicas de la EP.....	7
Genes de riesgo en la EP.....	8
Enfermedad de Parkinson idiopático	10
Uso de Drosophila melanogaster en el estudio de la EP.....	14
Variabilidad genética en Drosophila melanogaster	17
Hipótesis.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos	19
Materiales y métodos	20
Stocks de Drosophila	20
Ensayos de locomoción.....	20
Análisis genéticos cuantitativos.....	21
Estudio de Asociación a lo ancho del Genoma (GWAS).....	22
Generación de gráficos Manhattan	24
Mapeo de genes y construcción de redes	24
Resultados	27

1.- Determinación de la contribución de la variación genética e interacción genotipo-ambiente (GxE) en los cambios del comportamiento locomotor en respuesta a la exposición a rotenona en el DGRP.	27
Las líneas DGRP muestran variación y sensibilidad diferencial en el comportamiento de escalada después de la exposición a rotenona.	27
La interacción genético-ambiental contribuye significativamente a la variación fenotípica en el comportamiento de escalada.	31
2.- Identificación de variantes alélicas asociadas a los efectos en el comportamiento locomotor en respuesta a la exposición a rotenona.	33
Asociación de Genoma completo del comportamiento locomotor en respuesta a la rotenona.	33
3.- Identificar genes y redes de genes de interacción proteína-proteína que subyacen a la interacción entre la exposición a rotenona y el genotipo	39
Identificación de genes candidatos y redes de interacción genética.	39
Análisis de Ontología génica para genes candidatos	43
Discusión	47
Conclusión	53
Bibliografía	54
Anexos	64

Índice de Figuras

Figura 1. Características anatomopatológicas de la Enfermedad de Parkinson.....	5
Figura 2. Mecanismo fisiopatológico de los principales agentes neurotóxicos empleados en modelos de parkinsonismo.....	12
Figura 3. La exposición a rotenona en <i>Drosophila melanogaster</i> induce déficit locomotores y pérdida de neuronas dopaminérgicas.....	16
Figura 4. Modelo de estudio para el análisis de las bases genéticas asociadas a la variación natural del comportamiento.....	18
Figura 5. Variación en el comportamiento de escalada en el DGRP	28
Figura 6. Histograma de sensibilidad en respuesta al ensayo de escalada.....	29
Figura 7. Gráfico de norma de reacción en 2 tratamientos.....	30
Figura 8. Gráfico cuantil-cuantil de SNPs.....	36
Figura 9. Gráfico Manhattan de todas las variantes genéticas identificadas en el estudio GWAS para el comportamiento locomotor en machos de 73 líneas.....	37
Figura 10. Red de 27 genes candidatos identificados en GWAS con significancia $P \leq 10^{-4}$	42
Figura 11. Red de genes ortólogos humanos	45
Figura 1S. 209 genes vinculados a los SNPs identificados en GWAS con significancia $P \leq 10^{-4}$	70
Figura 2S. Genes candidatos vinculados por los SNPs identificados asociados a la respuesta al tratamiento control con significancia $P \leq 10^{-4}$	71
Figura 3S. Genes candidatos vinculados por los SNPs identificados asociados a la respuesta al tratamiento con rotenona con significancia $P \leq 10^{-4}$	72

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Loci</i> genéticos implicados en la enfermedad de Parkinson.....	8
Tabla 2. Genes y loci humanos asociados a la enfermedad de Parkinson con genes homólogos en <i>Drosophila</i>	15
Tabla 3. Análisis de varianza del comportamiento de escalada en medio control y suplementado con rotenona.....	31
Tabla 4. Análisis ANOVA modelo reducido para cada tratamiento.....	32
Tabla 5. Variantes génicas asociadas a la respuesta diferencial entre ambos tratamientos y para cada tratamiento por separado que dan cuenta del fenotipo locomotor bajo un valor de consenso $P \leq 10^{-5}$	34
Tabla 6. Ontología génica perteneciente a la red generada a partir de los 27 genes candidatos.....	43
Tabla 7. Genes Ortólogos humanos y enfermedades /categorías relevantes asociados a ellos..	46
Tabla 1S. Valores de media y error estándar de las 73 líneas muestreadas	64
Tabla 2S. Valores de las diferencias del comportamiento entre los dos tratamientos de cada línea del DGRP respecto al promedio (Sensibilidad).....	66
Tabla 3S. Variantes candidatas y localización génica para la respuesta diferencial en ambos tratamientos.....	68
Tabla 4S. Genes asociados a los SNPs identificados en GWAS con significancia $P \leq 10^{-5}$	69

Lista de Abreviaturas

EP: Enfermedad de Parkinson

DGRP: *Drosophila* Genetic Reference Panel

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GWAS: Estudio de asociación a lo ancho del genoma

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotido Hidruro

SNPs: Polimorfismos de nucleótidos únicos

GxE: Interacción genético-ambiental

MAF: Frecuencia del alelo menor

ANOVA: Análisis de varianza

LMM: Modelo lineal mixto

QQ: Gráficos cuantil-cuantil

FDR: False Discovery Rate

GO: Ontología de genes

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia en el mundo, donde un 15% es de etiología genética heterogénea y un 85% es esporádica. La exposición a pesticidas como la rotenona es un conocido factor de riesgo ambiental para el desarrollo del tipo esporádico de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue identificar genes que subyacen a la susceptibilidad de desarrollar un fenotipo parkinsoniano asociado a la variación del comportamiento de escalada inducido por una exposición subletal de rotenona (250 μ M) en *Drosophila melanogaster* utilizando 73 líneas del Panel de Referencia Genético de *Drosophila* (DGRP). Diferentes cepas del DGRP presentan un comportamiento de escalada variable en respuesta a la rotenona. Los resultados muestran una contribución sustancial de la variación genética a la variación fenotípica con una heredabilidad en sentido amplio (H^2) de 0,2 y una contribución de la interacción entre el genotipo y el ambiente a la varianza fenotípica (i^2) de 0,04. Finalmente, a través del estudio de asociación a lo ancho del genoma (GWAS) mapeamos polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) y se identificaron los genes candidatos con los cuales se construyó una red de interacción proteína-proteína. Dentro de esta red, identificamos genes que forman parte de complejos de Ubiquitin ligasa (*Roc2*) y genes implicados en el tráfico vesicular y transporte de membrana (*Tret1-1* y *Tret1-2*). Esta red da cuenta de las vías moleculares candidatas de la repuesta diferencial de la escalada frente a la exposición a rotenona.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second neurodegenerative disease with the highest prevalence in the world, where 15% is of heterogeneous genetic etiology and 85% is sporadic. Exposure to pesticides like rotenone is a known environmental risk factor for the development of the sporadic type of the disease. The objective of this work was to identify genes that underlie the susceptibility of developing a parkinsonian phenotype associated with the climbing behavior variation induced by a sublethal rotenone exposure (250 μ M) in *Drosophila melanogaster* using 73 lines of the Genetic Reference Panel of *Drosophila* (DGRP). Different DGRP strains exhibit variable climbing behavior in response to rotenone. The results show a substantial contribution of genetic variation to phenotypic variation with a wide sense heritability (H^2) of 0.2 and a contribution of the interaction between the genotype and the environment to the phenotypic variance of 0.04. Finally, through the Genome Wide Association Study (GWAS) we identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) and candidate genes with which a protein-protein interaction network was constructed. Within this network, we identify genes that are part of Ubiquitin ligase complexes (*Roc2*) and genes involved in vesicular traffic and membrane transport (*Tret1-1* and *Tret1-2*). This network accounts for the candidate molecular pathways of the differential response of climbing versus rotenone exposure.

Introducción

Enfermedad de Parkinson: Características generales.

En 1817 el inglés James Parkinson definió por primera vez esta enfermedad como “parálisis agitante” y describió sus principales características clínicas, que más tarde pasarían a formar parte de los criterios diagnósticos del *United Kingdom Parkinson’s Disease Society Brain Bank*. Estas características fueron observadas en seis casos clínicos e incluían el temblor en reposo, bradicinesia y rigidez muscular [1] [2]. Años más tarde, Jean Martin Charcot propuso el término “enfermedad de Parkinson” para esta patología y completó la definición de los signos clínicos [3].

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia en el mundo después de la enfermedad de Alzheimer [4]. Es un trastorno neurodegenerativo de etiología genética heterogénea, con una tasa de incidencia mundial de 8 a 18 casos por cada 100.000 personas por año. Su prevalencia aumenta con la edad, a los 60 años es del 1% aumentando al 4% en personas de más de 80 años [5].

Características clínicas.

La EP se caracteriza clínicamente por la presencia de una variedad de síntomas motores como lentitud de movimientos, temblor de reposo, rigidez o inestabilidad postural y por ello ha sido clásicamente considerada y estudiada como un trastorno motor. Además de trastornos motores, hasta el 60% de los pacientes presentan manifestaciones no-motoras de la enfermedad que incluyen disfunción olfatoria, dificultades cognitivas, depresión, estreñimiento, sudor excesivo y trastornos del sueño, los que contribuyen a un descenso en la calidad de vida independientemente de las dificultades motoras [6]. Los síntomas no-motores preceden a los motores y pueden desarrollarse incluso 20 años antes de ser diagnosticado, lo cual es observable

en el 90% de los pacientes [7]. La heterogeneidad de la enfermedad en cuanto a sintomatología clínica, progresión, edad de inicio y respuesta a tratamientos, sugiere la existencia de distintos subtipos de la enfermedad [8].

Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson.

Para comprender la causa de la EP es indispensable entender la anatomopatología. La EP se caracteriza principalmente por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra*, provocando la degeneración de sus proyecciones que se dirigen al cuerpo estriado. El cuerpo estriado es la principal estructura de los ganglios basales y está compuesto por el núcleo caudado, el putamen, el globo pálido y el núcleo *accumbens*. La sustancia *nigra* adquiere su nombre por la presencia de neuronas pigmentadas por neuromelanina, está situada en el mesencéfalo y comprende dos porciones; una de ellas es la sustancia *nigra* reticulada, que contiene en su mayoría neuronas GABA (ácido gamma-aminobutírico), por lo tanto, inhibitorias; y su segunda porción se denomina sustancia *nigra* compacta, compuesta por neuronas dopaminérgicas que liberan sus neurotransmisores hacia el cuerpo estriado [9]. La dopamina, es una catecolamina sintetizada a partir de la tirosina y su descarga en el cuerpo estriado es crucial para incrementar la actividad de la corteza [10,11]. Cuando esta vía dopaminérgica degenera, disminuye progresivamente el nivel de dopamina en el cuerpo estriado [12], lo que altera el estado funcional de la corteza motora ocasionando cambios complejos en el circuito motor del cerebro [12,13].

Se estima que la dopamina estriatal está reducida entre el 70 al 90% cuando ocurren las manifestaciones clínicas y cerca de 60 a 70% de neuronas dopaminérgicas se han perdido cuando el primer síntoma aparece [14]. En este punto la sustancia *nigra* aparece pálida, perdiendo su pigmentación original (Figura 1A).

Otra característica de esta enfermedad es la presencia de gránulos de inclusión intracelulares llamados cuerpos de Lewy en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas supervivientes, los cuales están compuestos por agregados anormales de la proteína α -sinucleína [14,15](Figura 1B).

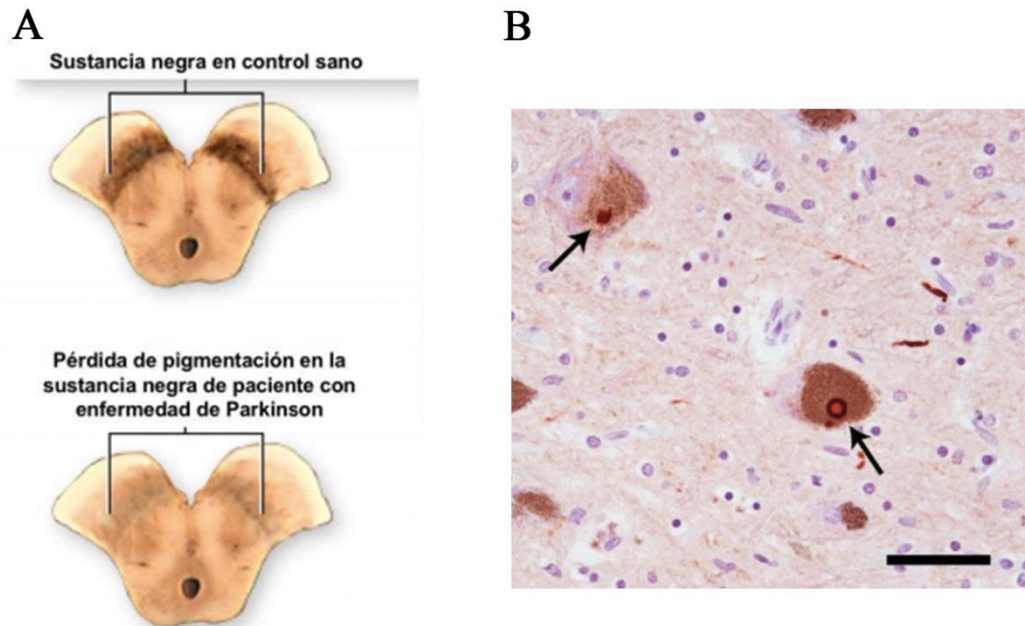


Figura 1: Características anatomopatológicas de la EP. A) Corte transversal del cerebro de una persona sana (arriba), y de un paciente con enfermedad de Parkinson (abajo). B) Flechas negras indican cuerpos de Lewy en sustancia *nigra* de un paciente con EP, teñido con un anticuerpo policlonal dirigido contra α -sinucleína. (Modificado de Enciclopedia Médica A.D.A.M., 2005 y Ingelsson M., 2016).

Se han postulado varias teorías posibles acerca de las vías celulares afectadas en la EP, como por ejemplo la apoptosis o muerte neuronal programada, teorías sobre el estrés oxidativo y alteraciones del funcionamiento mitocondrial, la citotoxicidad del calcio, separación de neurotransmisores, así como el reciclaje de vesículas sinápticas, entre otras [16,17,18]. Sin embargo, hasta ahora se desconocen los mecanismos precisos que desencadenan la degeneración neuronal en la sustancia *nigra* de los pacientes con la EP.

Etiología de la Enfermedad de Parkinson

La EP es de etiología multifactorial ya que intervienen factores genéticos y del medio ambiente [19], y es clasificada en EP familiar y esporádica [20]. De todos los casos de EP, el 15% presentan un patrón de herencia familiar [14] y el resto de los casos, en donde no se puede identificar una mutación o que no presenta un patrón de herencia específico, se consideran esporádicos o idiopáticos [21].

Las primeras teorías sobre la etiología de la EP se sustentaban en un origen genético. El componente genético se caracteriza porque mientras más precoz se produzca, es decir a menor edad de inicio hay una mayor probabilidad de haberse heredado. Los cuadros que comienzan antes de los 45 años se cree que tienen una alta probabilidad de ser heredables y el factor ambiental pasa a segundo plano [22].

A partir de los años 1990, los casos familiares de la EP comenzaron a estudiarse mediante técnicas de genética molecular, y se procedió a clonar los genes causales. La EP pasó a ser considerada una enfermedad genéticamente compleja, con casos poco comunes de patrón de herencia Mendeliana y con una gran mayoría de casos familiares sin patrón de herencia claro, probablemente poligénicos o multifactoriales [23].

Algunos estudios indican que el riesgo de desarrollo de la enfermedad se debe a causas genéticas junto a factores ambientales [24].

Formas monogénicas de la EP

Aunque la mayoría de los casos de EP son esporádicos, existen alteraciones de genes puntuales que han sido asociadas con la patogenia de la enfermedad. Se han identificado alrededor de 10 *loci* asociados a la EP con patrón de herencia autosómica dominante o recesiva (Tabla 1). Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de los casos de EP son formas monogénicas causadas por una única mutación, con penetrancia variable. Se estima que tan solo el 30% de los casos monogénicos familiares y sobre el 3-5% de los casos complejos esporádicos pueden explicarse por este tipo de mutaciones [25].

Hay algunos loci que han sido asociados como candidatos de las formas familiares de la EP, pero los genes responsables aún no han sido identificados (*PARK10*, *PARK12*, *PARK13*). En otros casos, la significancia clínica de ciertos loci no ha sido demostrada (*PARK3*, *PARK10*, *PARK11*, *PARK13*).

Tabla 1: Loci genéticos implicados en la enfermedad de Parkinson

Locus	Gen	Herencia	Características y función
PARK1, 4q21	<i>SNCA</i>	AD	Primer gen identificado. Proteína que interviene en la liberación de vesículas presinápticas[26]. Mutaciones en este gen están implicadas en la formación de los cuerpos de Lewy [27,28]
PARK2, 6q25	<i>PRKN</i>	AR	Causa más frecuente de EP juvenil, progresión lenta. Función Ubiquitina E3 ligasa, mantenimiento y reparación del ADN mitocondrial [29,30]
PARK3, 2p13	<i>SPR</i>	AD	Función desconocida
PARK4, 4q21	<i>SNCA</i>	AD	Duplicación o triplicación del gen <i>SNCA</i> . Progresión rápida [31]
PARK5, 4p14	<i>UCHL1</i>	AD	Ubiquitina hidrolasa C-terminal. Se han reportado 2 casos con esta mutación [32]
PARK6, 1p36	<i>PINK1</i>	AR	Segunda causa de EP juvenil, progresión lenta. Cinasas mitocondrial que protege contra la disfunción mitocondrial. Implicada en procesos de neuroprotección [33]
PARK7, 1p36	<i>DJ-1</i>	AR	EP juvenil, progresión lenta. Proteína mitocondrial antioxidante, forma complejos de ubiquitinación junto a <i>Parkina</i> y <i>PINK1</i> , cuya función es degradar los sustratos de Parkina mal plegados. Implicada en procesos de neuroprotección [34,35]
PARK8, 12q12	<i>LRRK2</i>	AD	EP de inicio tardío. Causa más frecuente de EP dominante. Dardarina tiene un dominio con actividad tirosina quinasa que participa en cascadas de señalización con funciones en la dinámica del citoesqueleto [36]
PARK9, 1p36	<i>ATP13A2</i>	AR	EP de inicio temprano, con demencia y espasticidad. Responsable de una forma atípica de parkinsonismo (Enfermedad de Kufor-Rakeb) [37]. Implicada en una pérdida de la función lisosomal y agregación proteica anormal [38]
PARK10, 1p32	¿?	¿?	Función desconocida
PARK11, 2q37	<i>GIGYF2</i>	AD	Función desconocida
PARK12, Xq21	¿?	¿?	Función desconocida
PARK13, 2p12	<i>HTRA2</i>	¿?	Función desconocida
PARK14, 22q13	<i>PLA2G6</i>	AR	Participa en vías de degradación ubiquitina-proteosoma [39]
PARK15, 22q12	<i>FBX07</i>	AR	EP con demencia y espasticidad [40]

AD: Autosómico Dominante, AR: Autosómico Recesivo, ¿?: Controversial o no identificado.

Modificada de Xiromerisiou G. et al. 2010.

Genes de riesgo en la EP

Actualmente, se realizan estudios de asociación entre “genes candidatos” y el riesgo de desarrollar la EP. A partir de esta información ha sido posible identificar polimorfismos de genes candidatos que podrían entregar susceptibilidad para desarrollar la enfermedad al interactuar con determinados factores ambientales [41].

Muchos de los genes de riesgo identificados en grandes estudios de asociación a lo ancho del genoma (GWAS) aparecen también en las formas monogénicas de la enfermedad, por lo que

se piensa que los mismos mecanismos moleculares están involucrados en la forma familiar y esporádica de la EP [42]. A través de numerosos estudios se ha confirmado que el gen *SNCA* contiene variaciones en regiones no-codificantes que contribuyen al riesgo de desarrollo de la EP [43]. Además, en otros estudios se han detectado polimorfismos en el gen *LRRK2*, cuya presencia implica el doble de riesgo de parecer la EP [44]. También se ha observado la asociación entre variaciones del gen *MAPT* con el desarrollo de la EP, encontrando una asociación entre variaciones en el haplotipo H1 de *MAPT* con el riesgo de desarrollo de la EP [45, 46, 47]. Este gen codifica para la proteína Tau que es el mayor componente de los depósitos de neurofibrillas características de la enfermedad de Alzheimer [48]. Ambas enfermedades se caracterizan por presentar muerte neuronal y depósito de proteínas (ya sea β -amiloide o α -sinucleína) y algunos estudios han propuesto el gen *ApoE* en la susceptibilidad a la EP. El alelo epsilon 4 de la *ApoE* es un gen de susceptibilidad para la enfermedad de Alzheimer y se ha considerado como el principal factor de riesgo en las enfermedades neurodegenerativas como la EP [49].

Los genes candidatos de riesgo a desarrollar la EP se han seleccionado con base al conocimiento actual de la fisiopatología de la enfermedad e incluyen principalmente genes involucrados en la síntesis, transporte y degradación de la dopamina (ej.: *DAT*, *DRD2*, *COMT*, *MAOB*), detoxificación de xenobióticos en las neuronas dopaminérgicas (ej.: *CYP2D6*, *NAT2*, *ADH*), en el metabolismo mitocondrial (ej.: *NOS*, *SOD2*), y también genes que codifican algunos factores de transcripción o neurotróficos esenciales involucrados en el desarrollo del sistema dopaminérgico en el mesencéfalo [49,50]. Hasta la fecha se han identificado alrededor de 90 *loci* asociados a un mayor riesgo de desarrollar la EP. Sin embargo, estos genes candidatos

no son causales de la enfermedad por si solos, es necesaria la exposición a otros factores ambientales para desarrollarla [49, 51, 52]

Enfermedad de Parkinson idiopático

El diagnóstico de EP idiopático generalmente se refiere al parkinsonismo no-heredable de inicio tardío, con pérdida neuronal, gliosis astrocítica y formación de inclusiones distintivas en el tronco encefálico y presencia de cuerpos de Lewy.

Numerosos estudios epidemiológicos han relacionado diversos factores ambientales con un mayor o menor riesgo de padecer EP [53]. Hay autores que citan como factor de predisposición al desarrollo de la EP idiopático el hecho de vivir en un medio rural [54], principalmente la sospecha recae cuando han estado expuestos a beber agua de pozo o han trabajado con metales en minería o soldadura [55]. También se cree que existen factores protectores para no desarrollar la enfermedad, entre los más difundidos están el consumo de café, el uso crónico de antiinflamatorios y el tabaquismo, pero no se explica el mecanismo por medio del cual se produce el efecto beneficioso [56,57].

Un ejemplo que sustenta la existencia de factores ambientales en la etiología de la EP es el caso que fue descrito por primera vez en 1983 cuando la administración intravenosa de MPTP (1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina), un compuesto secundario que se forma a partir de la síntesis de heroína sintética y estructuralmente similar al herbicida paraquat, dio lugar a un síndrome parkinsoniano en adictos a drogas [59,60].

Poblaciones humanas que han estado expuestas a neurotóxicos, como es el caso de la rotenona o el paraquat, presentan un mayor porcentaje de síntomas parkinsonianos [58]. La asociación entre exposición a pesticidas y mayor riesgo de EP está demostrada y no parece ser explicada sólo por azar. Se sabe que estas sustancias inducen la degeneración de las neuronas

dopaminérgicas y por ello se usan para generar modelos experimentales animales y celulares de la EP [58].

La rotenona es un pesticida natural derivado de raíces de plantas tropicales como *Derris* y *Lonchocarpus*, el cual se utilizaba hasta hace un par de décadas en todo el mundo como plaguicida e insecticida natural [61]. Debido a su alta liposolubilidad, la rotenona puede cruzar la barrera hematoencefálica rápidamente, acumulándose en organelos subcelulares como la mitocondria, afectando la fosforilación oxidativa [62]. El daño oxidativo causado por la rotenona ocurre mediante la inhibición de la función de la cadena de transporte de electrones al ser un inhibidor específico de NADH deshidrogenasa (complejo I) (Figura 2) [63].

Se han desarrollado modelos animales que reproducen algunas características neuroquímicas, histopatológicas y conductuales de la EP al ser expuestos a rotenona [64], aunque cabe destacar que algunos autores han puesto en duda la neurotoxicidad específica de la rotenona cuando es administrada de forma sistémica. Estudios han demostrado que la rotenona genera la despolimerización de microtúbulos en neuronas dopaminérgicas [66,67,68]. La función de los microtúbulos es necesaria para el transporte y la liberación vesicular. La acumulación de vesículas en el soma inducida por la rotenona conduce a un aumento del estrés oxidativo lo cual contribuye significativamente a la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas [69]. En 2005, Dukes y colaboradores descubrieron que la rotenona daña selectivamente a las neuronas dopaminérgicas en ratones, ratas y moscas [70, 71, 72], lo cual se atribuye al estrés oxidativo resultante de la generación de radicales libres como el superóxido, con la consecuente inhibición del complejo I [63].

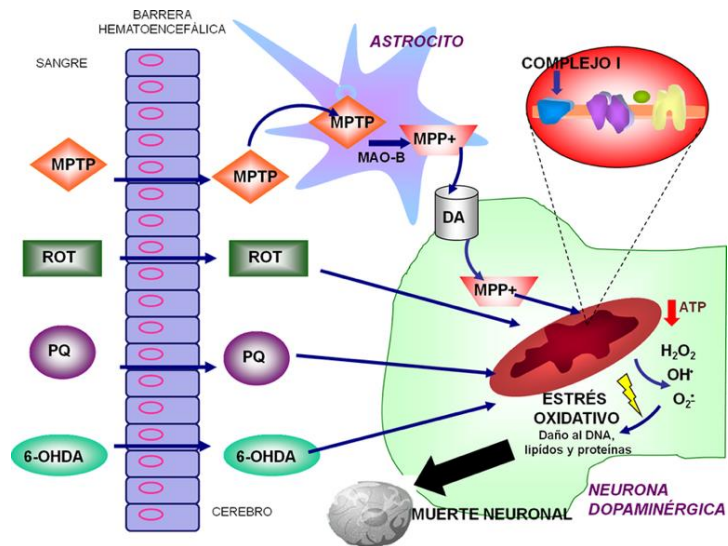


Figura 2: Mecanismo fisiopatológico de los principales agentes neurotóxicos empleados en modelos de parkinsonismo. Los agentes tóxicos descritos 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina (MPTP), Rotenona (ROT), Paraquat (PQ) y 6-hidroxidopamina (6-OHDA) atraviesan la barrera hematoencefálica. El MPTP ingresa al astrocito donde es metabolizado y luego liberado al espacio presináptico como MPP+ para entrar a la neurona dopaminérgica a través del transportador de dopamina (DA) y dirigirse directamente a la mitocondria. La ROT, PQ y 6-OHDA atraviesan la membrana de las neuronas y también se dirigen a la mitocondria. Todos estos agentes neurotóxicos actúan inhibiendo el complejo I y de esta manera bloquean la cadena transportadora de electrones, lo cual aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno, disminuye el potencial redox y la síntesis de ATP. (Extraído de Alarcon A. y cols., 2010) [65].

Cabe destacar que en humanos la exposición a rotenona y otros pesticidas por si solos no son suficientes para explicar la EP; dicho de otro modo, la aparición de síntomas parkinsonianos depende de otros factores, como la presencia de variantes genéticas [73]. La interacción de factores ambientales con ciertas variantes genéticas pueden contribuir a la patogénesis de la EP, modificar la penetrancia o determinar la edad de inicio [74].

Se ha llevado a cabo un esfuerzo mundial para identificar nuevas variantes de riesgo asociadas a la EP idiopática por medio de estudios de GWAS sobre casos y controles, en el cual las frecuencias alélicas de los individuos con la enfermedad de interés son comparadas con la del grupo control (sin la enfermedad). Una vez que se ha identificado y cuantificado un fenotipo dentro de una población, el GWAS revela qué variantes, principalmente polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) están asociadas a las variaciones fenotípicas. Sin embargo, cambios de unos pocos nucleótidos, como pequeñas inserciones y deleciones (*indels*) también pueden ser responsables de la variación fenotípica detectada. Los SNPs son típicamente usados como marcadores de una región genómica, ya que por sí mismos no proporcionan información sobre genes específicos; simplemente indican una localización cromosómica que es probable que esté estrechamente asociada con un fenotipo dado. Los SNPs son la forma de variación genética más abundante en el genoma y algunos pueden tener consecuencias funcionales, causando cambios de aminoácidos, cambios en la estabilidad del transcrito de ARNm, o cambios en la afinidad de unión de factores de transcripción [75]. A través de GWAS se han vinculado una serie de regiones genéticas con la susceptibilidad a desarrollar EP [76,77,78,79].

En este trabajo proponemos descubrir genes que subyacen a la susceptibilidad de desarrollar un fenotipo tipo parkinsoniano que esté asociado a la variación del comportamiento de escalada en respuesta a la exposición a rotenona a través de estudios de asociación a lo ancho del genoma en *Drosophila melanogaster*.

Uso de *Drosophila melanogaster* en el estudio de la EP.

El uso de modelos animales para estudiar la EP ha sido clave para evaluar la causalidad de los factores de riesgo [80,81]. Los modelos en *Drosophila* han sido ampliamente validados, además el 75% de los genes relacionados con enfermedades en humanos tienen ortólogos funcionales en la mosca, convirtiéndose en un excelente organismo modelo para estudiar factores ambientales y genéticos y brindar información sobre las vías relevantes para la patogénesis de la EP, facilitando también el desarrollo de estrategias terapéuticas [70]. Además, *Drosophila* ofrece muchas ventajas, como por ejemplo, la reducción del tiempo en la obtención de resultados debido al corto ciclo de vida de la mosca, el gran número de prole, la disponibilidad de técnicas y herramientas para la manipulación genética y el conocimiento detallado de la anatomía y fenotipo de esta [82].

La mayoría de los genes familiares o esporádicos informados hasta ahora asociados con el parkinsonismo en humanos están presentes en *Drosophila* como genes homólogos (Tabla 2). Dos genes son homólogos cuando su secuencia de ADN deriva de un origen común, y pueden tener o no la misma función. La alteración funcional de los genes homólogos causantes de EP, como *PARKIN* y *PINK1* en *Drosophila*, provocan defectos motores progresivos similares a los observados en pacientes con la enfermedad [83,84].

En las últimas décadas se han llevado a cabo estudios de interacción entre toxinas ambientales y genes causales de la EP usando el modelo de *Drosophila* y ha demostrado ser de gran valor contribuyendo a comprender el mecanismo subyacente a la patogénesis de la EP [89, 113]. La exposición de moscas adultas a pesticidas, incluyendo la rotenona también provocan defectos motores [85]. Un estudio demostró que los efectos neurodegenerativos y de comportamiento aumentaron con la dosis de rotenona durante 7 días de exposición en

Drosophila (Figura 3). Este estudio proporcionó un modelo animal genéticamente manejable para analizar los mecanismos moleculares que relacionan el estrés oxidativo con la muerte de las neuronas dopaminérgicas [84]. Sin embargo, no se han realizado estudios dirigidos a descubrir las bases genéticas de los defectos en la locomoción observados en la EP idiopática causada por la exposición a pesticidas en *Drosophila melanogaster*.

Tabla 2: Genes y *loci* humanos asociados a la Enfermedad de Parkinson con genes homólogos en *Drosophila*

Locus	Gen	Herencia	Gen homólogo <i>Drosophila</i>
PARK2, 6q25	<i>PRKN</i>	AR	<i>park</i>
PARK5, 4p14	<i>UCHL1</i>	AD	<i>Uch</i>
PARK6, 1p36	<i>PINK1</i>	AR	<i>Pink1</i>
PARK7, 1p36	<i>DJ1</i>	AR	<i>DJ-1alpha</i>
PARK8, 12q12	<i>LRRK2</i>	AD	<i>Lrrk</i>
PARK11, 2q37	<i>GIGYF</i>	AD	<i>Gyf</i>
PARK13, 2p12	<i>HTRA2</i>	¿?	<i>HtrA2</i>
PARK15, 22q12	<i>FBX07</i>	AR	<i>ntc</i>
PARK16	<i>RAB32</i>	¿?	<i>Rab32</i>
PARK17	<i>VPS35</i>	AD	<i>vps35</i>
PARK20	<i>SYNJ1</i>	¿?	<i>Synj</i>
PARK22	<i>CHCHD2</i>	¿?	<i>Chchd2</i>

AD: Autosómico Dominante, AR: Autosómico Recesivo, ¿?: Controversial o no identificado.

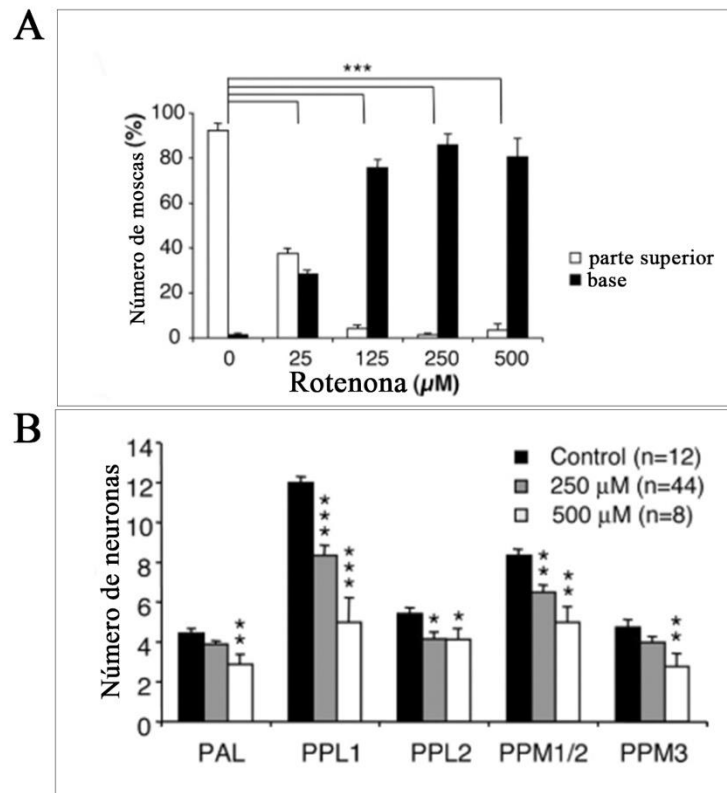


Figura 3: La exposición a rotenona en *Drosophila melanogaster* induce déficit locomotores y pérdida de neuronas dopaminérgicas. A) Ensayo de escalada de moscas adultas expuestas a diferentes concentraciones de rotenona. Barras blancas indican el porcentaje de moscas que escalaron a la parte superior de la columna y las barras negras indican el porcentaje de moscas que permanecieron en la base de la columna después de 1 minuto. B) Cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas en distintos grupos de cerebro control (barras negras) y en cerebros de moscas expuestas a diferentes concentraciones de rotenona (barras grises y blancas). (Modificado de Coulom H., 2004)[84]

Variabilidad genética en *Drosophila melanogaster*

Hasta la fecha, no hay claridad de cómo la variación genotípica influye en el inicio y la progresión de EP esporádica inducida por la exposición a pesticidas.

El uso de recursos de variación genética, como el *Drosophila* Genetic Reference Panel (DGRP), un conjunto de cepas de fondo genéticamente diversos cuyos genomas están completamente secuenciados [86,87], se ha utilizado con éxito para identificar modificadores genéticos en una serie de enfermedades, infecciones y modelos de estrés celular [88,89,90,91,92]. Estudios han utilizado el DGRP para demostrar cómo se puede usar la variación genética natural como una herramienta poderosa para identificar genes que modifican los fenotipos relacionados con la EP [93]. El DGRP es una colección de 205 líneas isogénicas y está completamente secuenciado [86,87]. Todos los SNPs, junto a otras variantes consideradas generalmente como “no-SNPs” (*indels*, duplicaciones en tándem y variantes complejas) y las inversiones cromosómicas se han mapeado, ya que estos cambios también pueden ser responsables de la variación fenotípica. [87]. Dentro de cada línea, hay una variación genética mínima, y entre líneas, la variación genética está bien conservada y representa la variación encontrada en la población original [87]. Así, estudios de asociación del genoma pueden vincular la variación genética del DGRP con la variación fenotípica en condiciones normales y patológicas, lo que llevaría a la identificación de genes que subyacen a la gravedad de la enfermedad [94,95]. Se han realizado estudios de análisis de las bases genéticas asociadas a la variación natural del comportamiento (Figura 4), para encontrar redes génicas asociadas con la resistencia al estrés oxidativo, tolerancia a tóxicos, genes asociados al consumo de etanol, comportamientos complejos, modificadores genéticos candidatos de enfermedades como retinitis pigmentosa, diabetes, etc. [95,96,97].

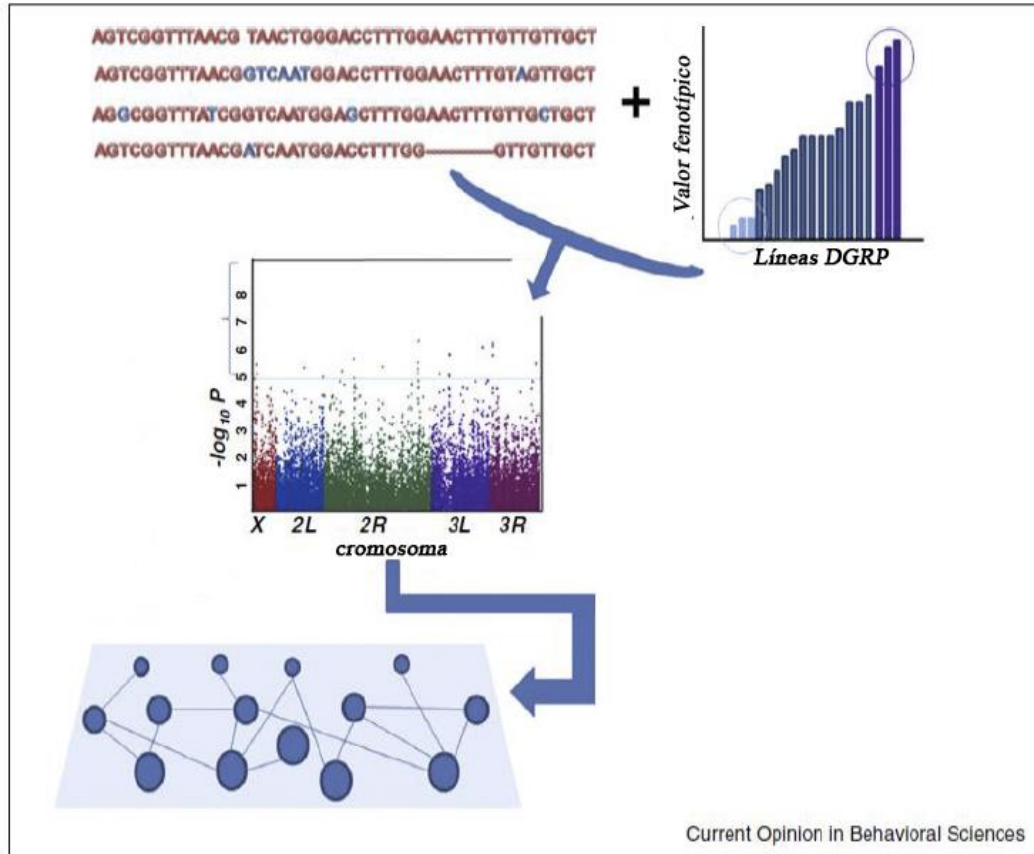


Figura 4: Modelo de estudio para el análisis de las bases genéticas asociadas a la variación natural del comportamiento. Las letras rojas corresponden a la secuencia de ADN de líneas del DGRP las cuales pueden asociarse a la variación fenotípica (histograma). Posteriormente la asociación de SNPs a la variación fenotípica permite identificar genes candidatos, con los cuales es posible formar redes de interacción y posteriormente ser validados para conocer su efecto en la variación fenotípica. (Modificado de Anholt et al., 2015) [95].

Hipótesis

Los cambios en la locomoción inducidos por la exposición a la rotenona están asociados a genes específicos identificados a través del estudio de la variación genética de *Drosophila melanogaster*.

Objetivo general

Identificar genes que subyacen a los cambios en la locomoción en respuesta a la exposición a rotenona en *Drosophila melanogaster*

Objetivos específicos

- 1.- Determinar la contribución de la variación genética e interacción genotipo-ambiente (GxE) en los cambios del comportamiento locomotor en respuesta a la exposición a rotenona en el DGRP.
- 2.- Identificar variantes alélicas asociadas a los efectos en el comportamiento locomotor en respuesta a la exposición a rotenona.
- 3.- Identificar genes y redes de interacción proteína-proteína que subyacen a la interacción entre la exposición a rotenona y el genotipo.

Materiales y métodos

Stocks de *Drosophila*

Utilizamos 73 líneas (Tabla 1S) del panel de referencia genética de *Drosophila* (DGRP) y la cepa isogénica *w[1118]* como control, obtenidas desde Bloomington *Drosophila* Stock Center (<https://bdsc.indiana.edu/>) para analizar los fenotipos motores. El DGRP fue generado a partir de descendientes (20 generaciones) de hembras fecundadas capturadas en el medio silvestre de Raleigh, Carolina del Norte [86,87]. Las moscas se crecieron bajo un cultivo estándar (levadura de cerveza Vida Plus 100 gr/L, azúcar Damablanca 50 gr/L y agar agar TCL 12 gr/L, 25 °C de temperatura, 60% de humedad relativa) y condiciones de iluminación (ciclo de luz-oscuridad de 12 horas). Cada línea fue mantenida de manera independiente en la comida estándar. Posterior a la eclosión se seleccionaron los machos para mantenerlos durante 7 días en comida estándar con rotenona 250 µM (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Alemania) diluida en DMSO al 0.5% (Winkler, BM-0660) y su respectivo control correspondiente a comida estándar con DMSO al 0.5% (25 machos en comida estándar con rotenona y 25 machos en comida estándar control).

Ensayos de locomoción

Luego de los 7 días de exposición a la alimentación suplementada con tratamiento control y con rotenona, recolectamos 10 machos por condición bajo anestesia breve para ser transferidos a 2 tubos plásticos vacíos de 9 cm de largo, con fondo plano y sellados en el centro con cinta adhesiva. Las moscas pasaron por un período de recuperación de 30 minutos para ser sometidas posteriormente a una suave perturbación mecánica para ser llevadas al fondo del tubo a través de 4 golpes en un intervalo de 1 segundo para iniciar la escalada. La posición de cada mosca fue capturada en una imagen digital obtenida 5 segundos después de la iniciación de la

escalada con una cámara fija a una distancia de 30 cm de los tubos. Para determinar el puntaje de escalada, cada tubo se dividió en 18 segmentos de 1 cm cada uno. Las puntuaciones variaron de 0 al 9 otorgando un valor cada 2 cms de distancia y cada mosca recibió una puntuación de acuerdo al lugar alcanzado durante el período de ensayo. Un valor de 0 es la posición más baja del tubo y un valor de 9 indica la posición más alta del tubo.

Se evaluó la locomoción inducida por sobresalto para 10 machos por línea y tratamiento y se realizaron 5 réplicas por experimento. El número de experimentos fue de 3, lo que da como resultado final mediciones de escalada de 30 moscas por línea y tratamiento. Los ensayos de escalada se realizaron a una temperatura de 25°C [98]

Análisis genéticos cuantitativos

El análisis factorial de varianza de modelo mixto (ANOVA) para dividir la varianza en la actividad locomotora entre las líneas isogénicas se calculó de la siguiente manera:

$$Y = \mu + \text{Línea} + \text{Tratamiento} + (\text{Línea} \times \text{Tratamiento}) + \varepsilon$$

Donde Y es el parámetro de locomoción, μ es la media general, *Línea* es el efecto aleatorio de la línea (DGRP), *Tratamiento* es el efecto fijo del tratamiento (control o rotenona) y ε es la variación dentro de la línea. Para estos ensayos fue posible realizar un análisis reducido para (i) control y (ii) rotenona utilizando ANOVA de modelo mixto para determinar la variación de la escalada entre las líneas en cada tratamiento:

$$Y = \mu + \text{Línea} + \varepsilon$$

Los ANOVA fueron realizados usando el programa SAS, con la función PROC mixed y PROC GLM.

Las varianzas genotípicas total entre líneas (σ_G^2), ambientales (σ_E^2) y fenotípicas (σ_P^2) se estimaron como $\sigma_G^2 = \sigma_L^2 + \sigma_{L \times E}^2$; $\sigma_E^2 = \sigma_D^2$ y $\sigma_P^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$, donde σ_L^2 , $\sigma_{L \times E}^2$, y σ_D^2 son

la varianza entre líneas, línea x tratamiento y componentes de la varianza dentro de la línea. Se calculó la heredabilidad de sentido amplio (H^2) mediante $H^2 = \sigma_G^2 / \sigma_P^2$ que corresponde a la fracción de la varianza de un fenotipo dentro de una población que es debido a la variación genética [99].

La interacción genotipo x ambiente (GxE), se refiere a la respuesta diferencial de los genotipos evaluados en diferentes condiciones ambientales [100]. Es así como el amplio rango de ambientes puede provocar respuestas diferenciales del comportamiento de los genotipos en los diferentes ambientes como resultado de la GxE [100]. Para determinar la contribución de la interacción genotipo-ambiente (GxE) a la varianza fenotípica lo hicimos mediante el cálculo del índice de interacción (GxE) $i^2 = \sigma_{LxE}^2 / \sigma_P^2$.

Estudio de Asociación a los ancho del Genoma (GWAS)

Se desarrolló un análisis GWAS cargando un archivo con los promedios de fenotipo de las 73 líneas DGRP muestreadas en la web DGRP2 (<http://dgrp2.gnets.ncsu.edu>). Todos los análisis genómicos se basaron en la separación de los SNPs bialélicos mediante el proceso de filtrado estándar: la frecuencia del alelo menor (MAF) tiene que ser mayor o igual a 0.05, es decir, estar presente en al menos 4 de las 73 líneas. Este filtrado dio como resultado 1.901.174 SNPs distribuidos en los seis brazos cromosómicos (2R, 2L, 3R, 3L, 4 y X). Los análisis de asociación se realizaron en dos etapas. En la primera etapa, las medias fenotípicas de cada línea se corrigieron para : i) los efectos de estado infeccioso por *Wolbachia sp.* y ii) el efecto de las inversiones cromosómicas de mayor longitud (*In(2L)t*, *In(2R)NS*, *In(3R)P*, *In(3R)K* e *In(3R)Mo*). En la segunda etapa, las medias fenotípicas corregidas se asociaron a los polimorfismos según el siguiente modelo lineal mixto (LMM) :

$$Y = \mathbf{X}b + \mathbf{Z}u + e$$

donde Y es el valor fenotípico ajustado de la línea, \mathbf{X} representa la matriz de diseño para el efecto SNP fijo b , \mathbf{Z} es la matriz de incidencia para el efecto poligénico aleatorio u , y e es el efecto residual. Como las enfermedades complejas no surgen de una sola causa genética, sino de una combinación de factores genéticos y ambientales (es decir, son poligénicas), se incorpora la matriz de incidencia que relaciona cada medida con cada individuo del cual se obtuvo considerando los efectos poligénicos como desvíos aleatorios por relaciones en el genoma. El análisis de asociación se realiza implementando el algoritmo Fast-LMM [101]. Como resultado de los análisis se obtiene un valor de probabilidad para cada polimorfismo incluido en la prueba. Este análisis permitió otorgar a cada SNP un grado de significancia determinado según su efecto sobre la variación del fenotipo presentado como un $-\log_{10}(\text{valor } P)$

Debido a la cantidad de hipótesis de asociación que se ponen a prueba en cada GWAS, los resultados pueden presentar un elevado porcentaje de polimorfismos estadísticamente significativos pero que en realidad no participan en la expresión fenotípica del carácter (falsos positivos).

El análisis se centró en las variantes asociadas a la diferencia de los promedios de los valores fenotípicos entre los dos tratamientos (control y rotenona), variantes asociadas a la variación de la escalada solo con rotenona y a las variantes responsables de este comportamiento locomotor solo en la condición control. Luego obtuvimos los resultados completos de la asociación, las anotaciones de las asociaciones principales y los diagramas de diagnóstico, como por ejemplo los gráficos cuantil-cuantil (QQ) que corresponde a un gráfico que muestra el valor P de asociación observado para todos los SNPs en el eje y versus la distribución uniforme esperada de los valores P bajo la hipótesis nula de no asociación en el eje x . Los SNPs fuertemente asociados se desvían de la diagonal en el extremo superior derecho de la gráfica.

Con estos resultados de asociación fue posible identificar qué regiones del genoma (reguladoras o codificantes) están asociadas a los cambios de locomoción en respuesta al tratamiento con rotenona.

Generación de gráficos Manhattan

Con los resultados completos de asociación entregados por el GWAS fue posible construir los gráficos Manhattan utilizando el paquete *qqman* en el Software R [102] Este gráfico ilustra en el eje x la ubicación de las variantes en los brazos de los cromosomas delineados por símbolos negros y grises alternados, *versus* el valor del estadístico de asociación $-\log_{10}$ (valor P) de cada variante en el eje y . Se realizó un filtro para seleccionar los SNP que se asocien significativamente $-\log_{10}$ (valor P) \geq a 5.

Mapeo de genes y construcción de redes

A través del uso del Software R fue posible manipular la lista de SNPs que fueron asociados en GWAS y vincularlo con la información de la base de datos de Flybase descargando desde la web DGRP2 la versión 5.57 de Flybase [103] que contiene la ubicación de todos los SNP en el genoma. El FBgn corresponde a la simbología otorgada a cada gen en la base de datos Flybase. Cada SNP se consideran en un gen si se encuentran en o dentro de 1 kb río arriba o abajo de ese gen.

Con los genes candidatos, es posible identificar las vías o mecanismos celulares que dan cuenta del fenotipo de escalada, lo cual fue posible realizar a través de la generación de redes de interacción proteína-proteína usando la herramienta web STRING versión 10 (<http://string-db.org/>) [119]. STRING es una base de datos de interacciones de proteínas conocidas y predichas. Las interacciones incluyen asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales)

derivadas del contexto genómico, experimentos, coexpresión y conocimiento previo (revisión de literatura) [104]. Para generar las redes de genes, se cargó la lista de los genes candidatos en STRING y automáticamente realizó una asociación funcional significativa entre las proteínas codificadas por los genes. Estas interacciones son derivadas de múltiples fuentes: (i) interacciones experimentales conocidas que son importadas desde fuentes primarias, (ii) interacciones por asociación a vías que son analizadas desde fuentes filtradas, (iii) interacciones que son predichas *de novo* por algoritmos usando la información genómica como también por análisis de co-expresión y (iv) interacciones observadas en un organismo que son sistemáticamente transferidas a otros organismos, a través de relaciones ontológicas pre-computarizadas.

Además, fue posible analizar las Ontologías génicas (GO) de todas las categorías: Proceso biológico, componente celular y función molecular. Este análisis determinó cuáles términos de ontología génica están más comúnmente asociados con la lista de genes candidatos cuando se comparó con el resto del genoma. Además, este análisis utilizó la información conocida acerca de la función de cada gen para ver si hay alguna tendencia estadística en los tipos de funciones de los genes que muestren cambios en el fenotipo. El valor P entregado corresponde a la probabilidad que el enriquecimiento observado sea significativamente diferente a la hipótesis nula de no enriquecimiento.

De los resultados obtenidos, seleccionamos aquellos términos de GO con un valor de FDR (*false discovery rate*) \leq a 0,05. FDR se define como la probabilidad de que una hipótesis nula sea cierta habiendo sido rechazada por el test estadístico. El objetivo de controlar el FDR es establecer un límite de significancia de manera que, de entre todos los test considerados como significativos, la proporción de hipótesis nulas verdaderas (falsos positivos) no supere un determinado valor.

Los genes en las redes se representan como nodos, mientras que las uniones entre los nodos representan interacciones significativas entre ellos. El color de los nodos representa la función biológica de los genes donde cada función es representada por un color diferente.

Resultados

1.- Determinación de la contribución de la variación genética e interacción genotipo-ambiente (GxE) en los cambios del comportamiento locomotor en respuesta a la exposición a rotenona en el DGRP.

Las líneas DGRP muestran variación y sensibilidad diferencial en el comportamiento de escalada después de la exposición a rotenona.

Se cuantificó el comportamiento locomotor en 73 líneas del DGRP y un control *w1118* en machos expuestos a tratamiento control (DMSO) y tratamiento con rotenona durante 7 días (Tabla 1S). Al término del tratamiento, las moscas fueron sometidas al ensayo de escalada para evaluar la locomoción y asignar un puntaje a cada mosca dependiendo del lugar alcanzado en el tubo. Se encontró que existe una amplia variación fenotípica dependiente del genotipo para el comportamiento locomotor en ambos tratamientos y se observó la variación natural de la población en el comportamiento locomotor para machos (Figura 5). Cada línea muestra un cambio fenotípico distinto entre los dos tratamientos, algunas líneas escalan más, otras escalan menos o mantienen su fenotipo al ser sometidas al tratamiento con rotenona. Además, en los gráficos de sensibilidad (Figura 6) es posible observar las diferencias del comportamiento locomotor entre los dos tratamientos en cada línea del DGRP respecto al promedio de la población (Sensibilidad: $\frac{\bar{X} \text{ Control Línea } i - \bar{X} \text{ Rotenona Línea } i}{\bar{X} \text{ Control Población} - \bar{X} \text{ Rotenona Población}}$) (Tabla 2S) [89]. Esto sugiere que existe una interacción entre el genotipo y el ambiente (GxE) para el comportamiento locomotor, o de manera equivalente, variación en la sensibilidad entre las líneas. Junto con esto, las líneas del DGRP se encuentran ordenadas de manera ascendente respecto a los valores

fenotípicos obtenidos en el tratamiento control (Figura 5). Esta respuesta diferencial es visualmente observable en los gráficos de norma de reacción (Figura 7) cuando el genotipo afecta el paralelismo entre las normas de reacción. Con estos resultados esperamos poder mapear las variantes genéticas asociadas con la respuesta de escalada diferencial entre el control y el tratamiento con rotenona.

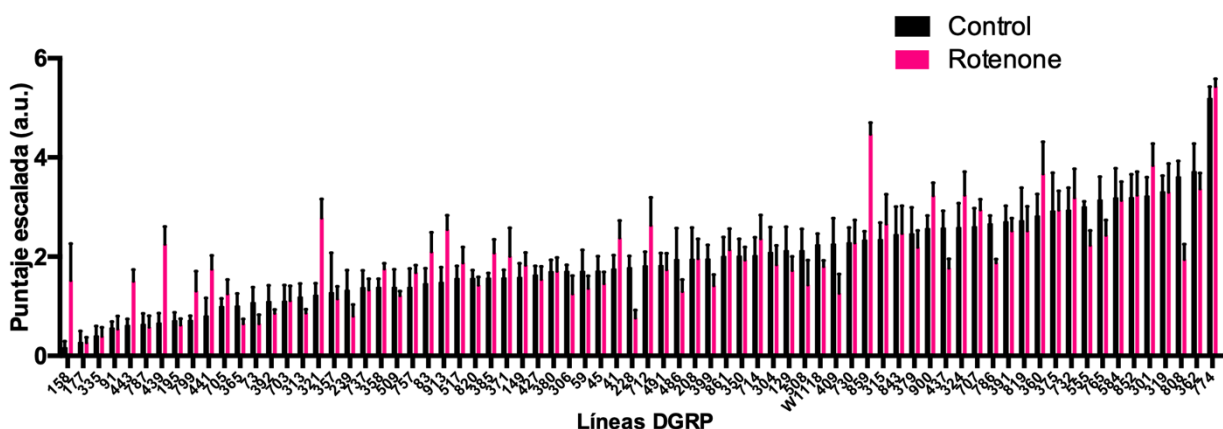


Figura 5: Variación en el comportamiento de escalada en el DGRP. Histogramas de promedios y error estándar de ensayos de escalada de moscas macho de 73 líneas de DGRP a los 7 días de edad. Se observa la variabilidad fenotípica dependiente del genotipo de las 73 líneas del DGRP en tratamiento control cuyos valores se encuentran ordenados de manera ascendente respecto al puntaje de escalada (barras negras). A los valores de fenotipo en tratamiento control se agregan los valores de cada línea en tratamiento con rotenona (barras rojas). Tiempo de ascensión 5 segundos. Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes (N=3) y 5 réplicas por experimento.

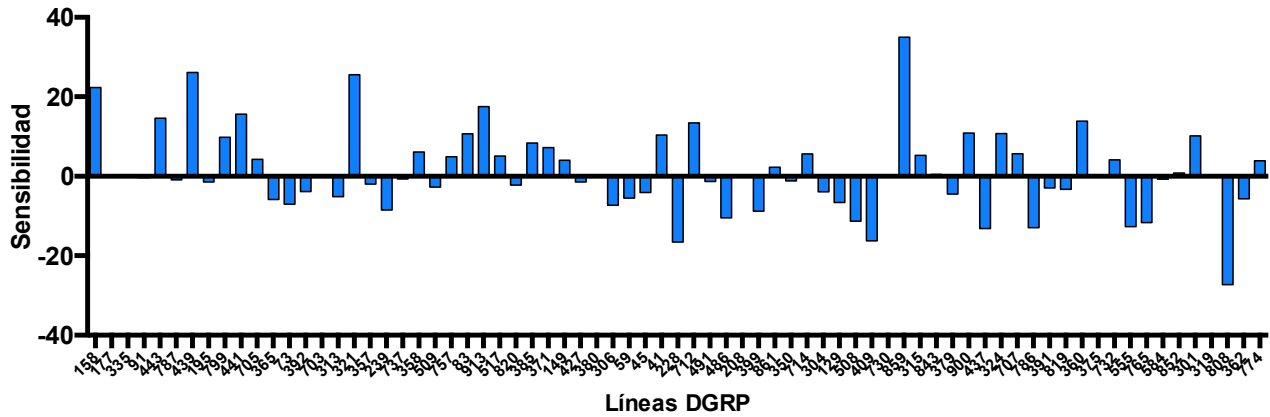


Figura 6: Histograma de sensibilidad en respuesta al ensayo de escalada. Gráfico de sensibilidad que muestra la variación a la exposición al tratamiento en las 73 líneas del DGRP. Las barras representan la diferencia en cada línea entre la condición control y la condición de tratamiento con rotenona dividido por la diferencia entre el promedio de todas las líneas en la condición control, menos el promedio de las todas las líneas en la condición de tratamiento con rotenona. Las barras se encuentran ordenadas de acuerdo al orden ascendente de la figura anterior, donde las barras encontradas bajo el eje 0 corresponden a las líneas que presentan mayor escalada en el tratamiento control y las barras ubicadas sobre el eje 0 corresponde a las líneas que aumentan la escalada en tratamiento con rotenona.

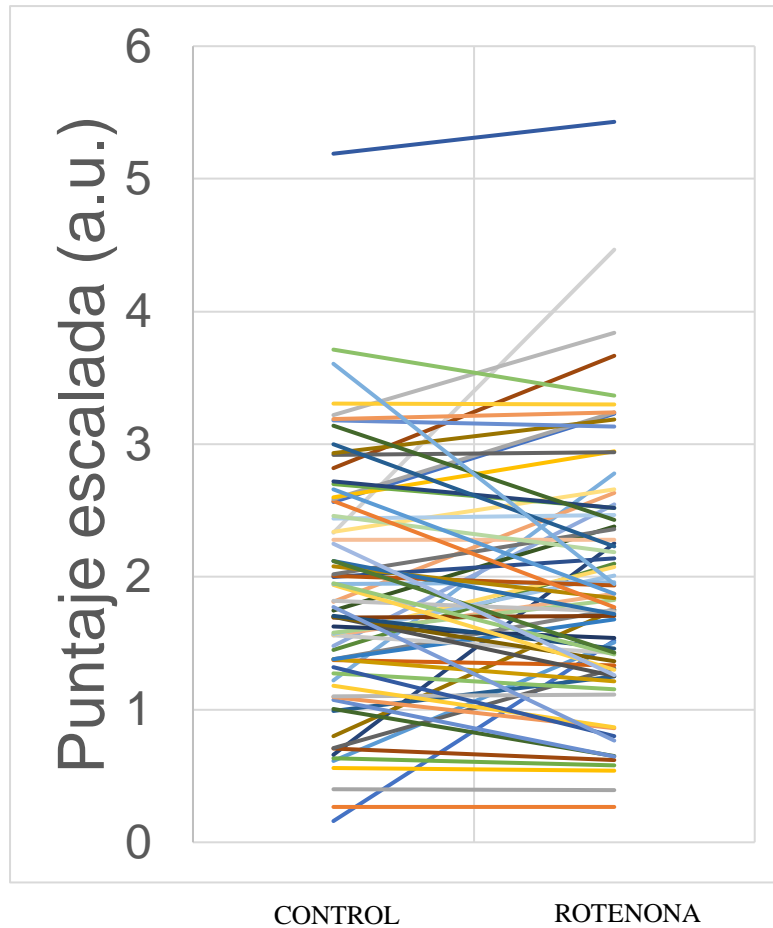


Figura 7: Gráfico de norma de reacción en 2 tratamientos. Este gráfico muestra la variación en la actividad locomotora de escalada entre 73 líneas de DGRP tratadas con comida control y rotenona. Eje Y representa los valores de las medias obtenidas en los ensayos de escalada en cada condición. Cada línea de color graficada corresponde a una línea del DGRP.

La interacción genético-ambiental contribuye significativamente a la variación fenotípica en el comportamiento de escalada.

En el análisis ANOVA es posible determinar si las variaciones genotípicas, ambientales o la interacción de ambas ejercen un efecto sobre la variación de la escalada utilizando un modelo mixto de efectos aleatorios y fijos.

Según el nivel de significancia que obtuvimos en la tabla se determinó que la variación genotípica (Líneas *L*) tiene un efecto significativo sobre la variación fenotípica (***) $p < 0.001$ (Tabla 3), lo cual ocurre también con el ambiente ya que se observa que el efecto del tratamiento (Tratamiento, *T*) es significativo sobre la variación fenotípica ($p = 0.0117$). Además, la interacción entre el genotipo y el ambiente (Línea x Tratamiento, *LxT*) también tiene un efecto significativo sobre la variación fenotípica (***) $p < 0.001$, reflejando que diferentes genotipos responden distinto a la exposición a rotenona. Este resultado confirma lo observado en el análisis de sensibilidad y en la norma de reacción.

Tabla 3: Análisis de varianza del comportamiento de escalada en medio control y suplementado con rotenona.

Análisis	Fuente	df	MS	F	P	σ^2	SE
Modelo Completo	<i>L</i>	72	241.33182	69.16	<.0001	0.7032	0.1348
	<i>T</i>	1	22.17966	6.36	0.0117	Fixed	Fixed
	<i>LxT</i>	72	27.14716	7.78	<.0001	0.1737	0.03358
	<i>Error</i>	19854	3.48926	-	-	3.4892	0.03502

df: grados de libertad; *MS*: Media de cuadrados; *F*: estadístico F; *P*: valor P; σ^2 : componente de varianza.

La heredabilidad en sentido amplio (H^2) para la escalada fue de $H^2 = 0,2$. Este valor corresponde a la fracción de la varianza fenotípica de la población que está dada por la varianza genotípica. El coeficiente de interacción genotipo x ambiente (i^2) fue de $i^2 = 0,04$. Este valor

representa la contribución de la interacción del genotipo con el tratamiento ($L \times T$) en la varianza fenotípica.

A su vez, el análisis de ANOVA de modelo reducido (Tabla 4), en que cada ambiente se evaluó de manera independiente, muestra que la variación genética tiene efectos significativos sobre variación del fenotipo en ambas condiciones. Los valores de heredabilidad calculados fueron de $H^2=0.19$ para el tratamiento control y $H^2=0.21$ para el tratamiento con rotenona.

Tabla 4: Análisis ANOVA modelo reducido para cada tratamiento.

Análisis	Fuente	df	MS	F	P	σ^2	SE	H^2
Modelo reducido (Control)	L	72	122.398	35.251	<.0001	0.8224	0.1414	0.1914963
	Error	9927	3.472	-	-	3.4722	0.04928	
<hr/>								
Análisis	Fuente	df	MS	F	P	σ^2	SE	H^2
Modelo reducido (Rotenona)	L	72	146.081	41.662	<.0001	0.9334	0.1595	0.21023943
	Error	9927	3.506	-	-	3.5063	0.04977	

df : grados de libertad; MS : Media de cuadrados; F : estadístico F; P : valor P; σ^2 : componente de varianza.

2.- Identificación de variantes alélicas asociadas a los efectos en el comportamiento locomotor en respuesta a la exposición a rotenona.

Asociación de Genoma completo del comportamiento locomotor en respuesta a la rotenona

Para identificar las variantes que subyacen a la susceptibilidad de desarrollar un fenotipo tipo parkinsoniano que esté asociado a la variación del comportamiento de escalada, realizamos un estudio de asociación a lo ancho del genoma (GWAS), donde identificamos 79 variantes genéticas o polimorfismos de nucleótido único (SNPs) asociados a la respuesta diferencial entre el genotipo y ambos ambientes con significancia $P \leq 10^{-5}$ en las líneas del DGRP muestreadas (Figura 9A) (Tabla 5). Es importante destacar que se consideró este nivel de significancia porque es el valor de corte consenso usado en los estudios de asociación realizados con el DGRP basado en los resultados obtenidos de los gráficos cuantil-cuantil (Figura 8) [89,90,91,92,95,96,97]. Además, se identificaron las variantes que dan cuenta del fenotipo frente al tratamiento control (Figura 9B) y frente al tratamiento con rotenona (Figura 9C), identificando 85 SNPs y 72 SNPs, respectivamente (Tabla 5). Identificamos 1 SNP común que da cuenta del fenotipo locomotor en tratamiento control y en tratamiento con rotenona (2L_13987338_SNP). Además, no hubo polimorfismos comunes entre las variantes identificadas en las respuestas diferenciales en comparación con las variantes identificadas en ambos tratamientos.. Los SNP identificados corresponden a todas las variantes genéticas que podrían llegar a explicar los fenotipos resultantes, las cuales son representadas mediante los gráficos Manhattan con variantes en los brazos del cromosoma delineados por símbolos negros y grises alternados, en el cual se puede identificar particularmente la cantidad que son relevantes y que tienen un valor significativamente $-\log_{10}(\text{valor } P) \geq 5$. (Figura 9).

Tabla 5: Variantes génicas asociadas a la respuesta diferencial entre ambos tratamientos (Interacción) y para cada tratamiento por separado que dan cuenta del fenotipo locomotor bajo un valor de consenso $P \leq 10^{-5}$. En rosado se indica el SNP común identificado en ambos tratamientos.

INTERACCIÓN	CONTROL	ROTONONA
2L_10659319_SNP	2L_10458540_SNP	2L_10040073_SNP
2L_10660353_SNP	2L_10458750_SNP	2L_10040091_INS
2L_12094535_SNP	2L_11082219_SNP	2L_10040133_SNP
2L_12094556_SNP	2L_11300103_SNP	2L_11409098_SNP
2L_20933993_SNP	2L_11969981_SNP	2L_11409122_SNP
2L_20946148_SNP	2L_11969989_SNP	2L_11409123_SNP
2L_2232251_SNP	2L_12125013_SNP	2L_11409131_SNP
2L_5966638_SNP	2L_12535416_SNP	2L_11409136_SNP
2L_6313168_SNP	2L_13987338_SNP	2L_11409139_SNP
2L_6313173_DEL	2L_3403154_SNP	2L_11409196_SNP
2L_669369_SNP	2L_9869862_SNP	2L_11409863_SNP
2L_669374_SNP	2R_11321956_SNP	2L_13339962_SNP
2L_669387_SNP	2R_11490037_SNP	2L_13987338_SNP
2L_669392_SNP	2R_12090757_SNP	2L_14091865_SNP
2L_669407_SNP	2R_12090765_DEL	2L_14410579_SNP
2L_669426_SNP	2R_16961872_SNP	2L_14421897_SNP
2L_6983156_SNP	2R_16961892_INS	2L_1979069_SNP
2L_6999115_SNP	2R_16961901_SNP	2L_4812508_SNP
2L_7317929_SNP	2R_16961919_SNP	2L_6824626_SNP
2L_7328369_SNP	2R_16961936_SNP	2R_12793120_SNP
2L_7341261_INS	2R_16961937_SNP	2R_12793201_SNP
2L_7341414_SNP	2R_16961958_DEL	2R_13152475_SNP
2R_12091228_DEL	2R_16961976_SNP	2R_14094490_SNP
2R_14513962_SNP	2R_16961994_SNP	2R_14095029_SNP
2R_15722984_SNP	2R_16962004_SNP	2R_14095385_SNP
2R_17734011_DEL	2R_16962020_SNP	2R_16962014_SNP
2R_18450972_SNP	2R_16962026_SNP	2R_16963858_SNP
2R_18600241_DEL	2R_16962058_SNP	3L_10629966_SNP
2R_4909807_SNP	2R_18479778_SNP	3L_10813521_SNP
2R_4911647_SNP	2R_19106566_SNP	3L_10813802_SNP
2R_4912926_SNP	2R_20403002_INS	3L_10816767_SNP
2R_4915861_DEL	2R_2055641_SNP	3L_11595351_SNP
2R_4916068_SNP	2R_20879915_SNP	3L_11595886_SNP
2R_4916902_SNP	3L_11354851_SNP	3L_14072226_SNP
2R_4916996_SNP	3L_11364641_SNP	3L_1614107_SNP
2R_4917211_SNP	3L_12192912_SNP	3L_1615870_SNP
2R_4919790_DEL	3L_12196958_SNP	3L_1615984_SNP
2R_4920104_SNP	3L_12197094_SNP	3L_1617629_SNP
2R_4921761_SNP	3L_12286234_SNP	3L_1862446_SNP
2R_4922509_SNP	3L_12287235_SNP	3L_2496973_SNP

2R_4922796_SNP	3L_12287253_SNP	3L_3599106_SNP
2R_4922806_SNP	3L_12288183_SNP	3L_7451887_SNP
2R_6574785_SNP	3L_12288793_SNP	3L_9132740_SNP
2R_7556472_SNP	3L_13350333_DEL	3L_9251694_SNP
3L_10931968_SNP	3L_13354972_SNP	3R_11861897_SNP
3L_13698769_SNP	3L_13355065_SNP	3R_11879683_SNP
3L_1483048_SNP	3L_14553051_SNP	3R_11889838_SNP
3L_15225642_SNP	3L_2392528_SNP	3R_11894126_SNP
3L_15225651_SNP	3L_4423033_SNP	3R_16046496_SNP
3L_15225656_SNP	3L_4897616_SNP	3R_21182490_SNP
3L_15225713_SNP	3L_5142510_SNP	3R_22544567_SNP
3L_15274855_SNP	3L_6008789_SNP	3R_23324433_SNP
3L_17734123_SNP	3L_7220190_SNP	3R_23976395_DEL
3L_17735387_SNP	3L_7452100_SNP	3R_25378227_SNP
3L_17737399_SNP	3L_7825389_SNP	3R_25909032_SNP
3L_17749166_SNP	3L_7825426_SNP	3R_25909149_SNP
3L_2390213_SNP	3L_7826603_SNP	3R_25909169_SNP
3L_2390243_SNP	3L_7826669_SNP	3R_25909378_SNP
3L_2832939_SNP	3L_968427_SNP	3R_27054717_SNP
3L_5044884_SNP	3R_15035474_SNP	3R_6315212_SNP
3L_7326633_DEL	3R_21342360_SNP	3R_8780595_SNP
3L_8092877_SNP	3R_22768254_SNP	3R_9920605_SNP
3L_8093072_SNP	3R_23944902_SNP	4_764743_SNP
3R_11802097_SNP	3R_24659905_SNP	X_11171427_SNP
3R_14815960_SNP	3R_24659906_SNP	X_11171442_SNP
3R_16016524_SNP	3R_24659923_SNP	X_11844821_SNP
3R_19165840_SNP	3R_26670073_SNP	X_11846739_SNP
3R_23581798_SNP	3R_26780582_SNP	X_5022545_SNP
X_10031664_SNP	3R_26780583_SNP	X_5219439_SNP
X_14763010_SNP	3R_6544730_SNP	X_6003181_SNP
X_14763042_SNP	X_10575044_SNP	X_6003215_SNP
X_14763046_SNP	X_14702783_SNP	X_6003224_SNP
X_14763108_SNP	X_22171910_SNP	
X_14763117_SNP	X_2590301_SNP	
X_19136135_SNP	X_4681399_SNP	
X_2617277_SNP	X_4682888_SNP	
X_4350251_SNP	X_5605945_SNP	
X_4350318_SNP	X_5605948_INS	
X_5517707_SNP	X_5605954_SNP	
	X_5605958_SNP	
	X_5605963_SNP	
	X_6005123_DEL	
	X_6453389_SNP	
	X_9423293_SNP	
	X_9423330_SNP	

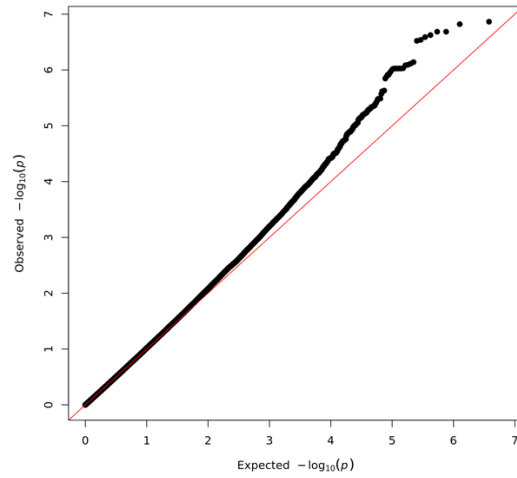


Figura 8. Gráfico cuantil-cuantil de SNPs. Este gráfico permite observar cuan cerca está la distribución de los datos respecto a la distribución uniforme. Muestra la relación entre las distribuciones de valores P observada y esperada para este análisis.

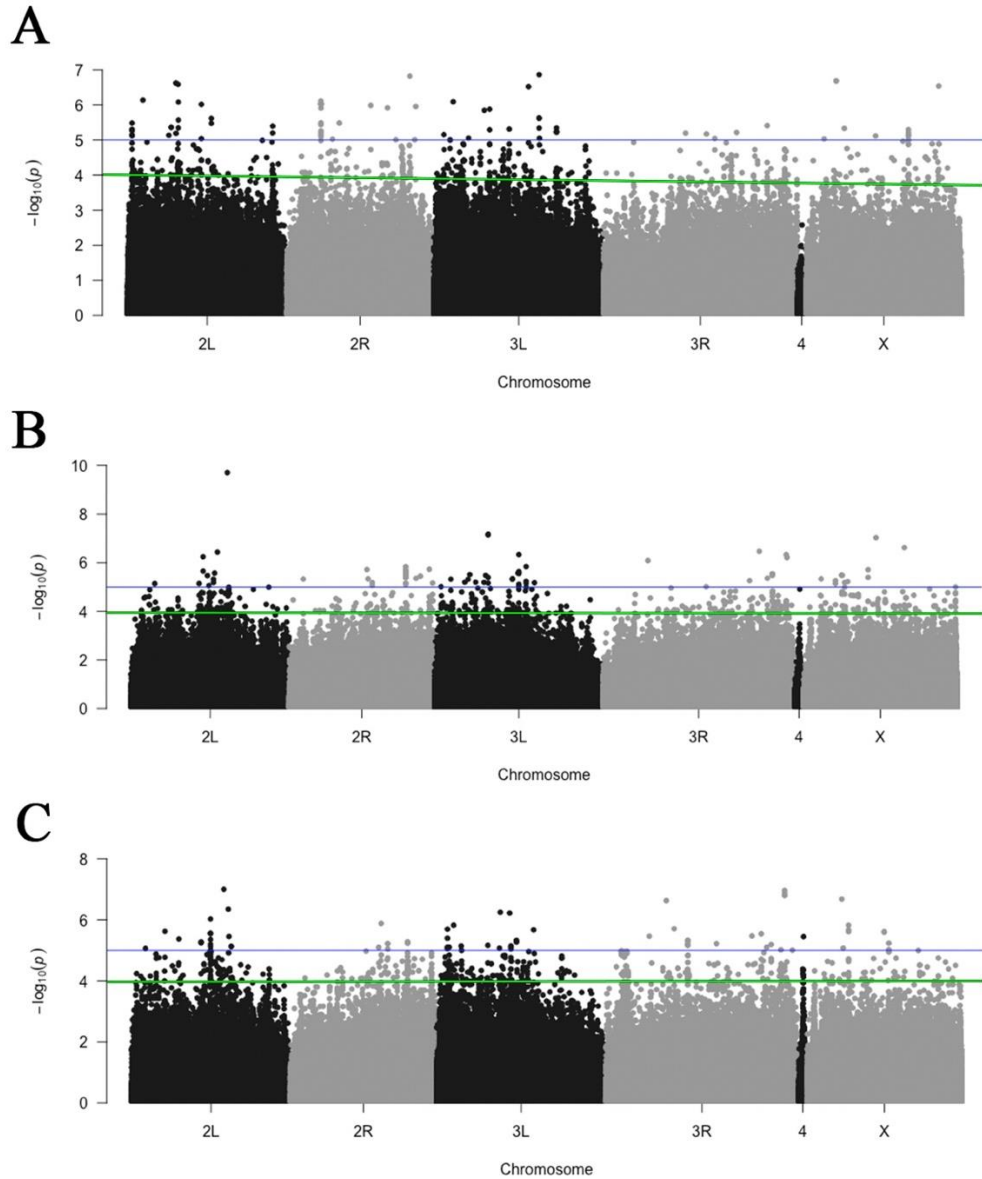


Figura 9: Gráficos Manhattan de todas las variantes genéticas identificadas en el estudio GWAS para comportamiento locomotor en machos de 73 líneas. A) Variantes genéticas asociadas con las respuestas locomotoras diferenciales entre el control y el tratamiento con rotenona B) Variantes asociadas a la respuesta fenotípica en tratamiento control C) Variantes asociadas a la respuesta fenotípica en tratamiento con rotenona. La línea azul horizontal indica el umbral $P \leq 10^{-5}$ por sobre el que se observan los SNPs con mayor significancia. La línea verde horizontal indica el umbral $P \leq 10^{-4}$.

La mayoría de los SNPs identificados se relacionaron a genes candidatos, por lo tanto, quisimos calcular el porcentaje de localización del total de los SNPs candidatos en relación a los genes. De los SNP candidatos que darían cuenta de la respuesta diferencial entre ambos ambientes, 73% corresponden a variantes intrónicas, 3.3% variantes localizadas en las región 5'UTR, 3.3% variantes localizadas en la región 3'UTR, 5% de variantes sinónimas, 2% de variantes no-sinónimas, 4% de las variantes estarían localizadas río abajo del transcrito y 1% río arriba del transcrito (Tabla 3S). Por lo tanto, un alto porcentaje de las variantes podrían estar involucradas en la regulación de la expresión génica o bien generar cambios en el procesamiento alternativo del ARNm.

Dado que el número de genes candidatos identificados utilizando como consenso el umbral $P \leq 10^{-5}$ no permite formar redes de interacción enriquecidas (ver resultados objetivo 3), cambiamos el umbral a $P \leq 10^{-4}$ (Figura 9, línea verde), ya que el gráfico cuantil-cuantil mostró desviaciones de los valores esperados y observados a partir de este nivel de significancia (Figura 8), por lo tanto quisimos probar si a este nivel de significancia es posible obtener redes de interacción enriquecidas. Identificamos 403 variantes génicas asociadas a la respuesta diferencial, 509 variantes que dan cuenta de la variación de la escalada en el tratamiento control y 309 variantes que dan cuenta de esta variación en moscas expuestas a rotenona (datos no mostrados). A pesar de obtener un alto número de variantes, existe una alta probabilidad de encontrar un alto porcentaje de falsos positivos. De los SNP candidatos que darían cuenta de la respuesta diferencial entre ambos ambientes; 48,6% corresponden a variantes intrónicas; 1,2% a variantes exónicas, 1% variantes localizadas en las región 5'UTR, 2,73% variantes localizadas en la región 3'UTR, 6,45% de variantes sinónimas, 27,3% de variantes no-sinónimas, 5,96% de las variantes estarían localizadas río abajo del transcrito y 2,73% río arriba del transcrito.

3.- Identificar genes y redes de genes de interacción proteína-proteína que subyacen a la interacción entre la exposición a rotenona y el genotipo

Identificación de genes candidatos y redes de interacción genética.

Para obtener los genes candidatos, vinculamos los resultados de asociación entregados por el análisis GWAS con la información de la base de datos de Flybase descargando desde la web DGRP2 la versión 5.57 de Flybase [103]. A través del uso del Software R manipulamos la lista de variantes génicas que fueron asociados en el GWAS y posteriormente lo vinculamos al FBgn.

En un umbral de significancia de $P \leq 10^{-5}$ encontramos 79 SNPs que fueron vinculados a 49 genes que estarían asociados a la variación en la respuesta diferencial en ambos tratamientos, 85 SNPs vinculados a 46 genes que estarían asociados con la respuesta al tratamiento control y 72 SNPs vinculados a 43 genes que estarían asociados con la susceptibilidad al tratamiento con rotenona (Tabla 4S).

Asumiendo que los genes candidatos identificados codifican para proteínas que entre ellas forman parte de vías metabólicas comunes que darían cuenta del fenotipo, realizamos un análisis más detallado con el propósito de ubicar estos genes en redes interconectadas. La generación de estas redes de interacción permite identificar genes candidatos que formarían parte de las vías metabólicas comunes y los genes candidatos que no forman parte de ninguna red. Como cada variante puede ser asignada a más de un gen candidato y la probabilidad de que estas variantes afecten la función de más de un gen es muy baja, descartamos todos los nodos que no forman parte de una red considerando que estos genes podrían ser falsos positivos. Con la lista de genes candidatos identificados no fue posible inferir una red de interacción proteína-proteína que pudieran contener *clusters* de genes asociados a la variación en la respuesta

diferencial en ambos tratamientos y para cada tratamiento por separado. Para la confección de las redes de interacción en STRING es importante considerar el *puntaje de interacción mínimo requerido* que establece un umbral en el puntaje de confianza, de modo que solo la interacción por encima de este puntaje se incluye en la red. El puntaje de confianza indica la probabilidad aproximada de que exista una interacción entre dos proteínas en el mismo mapa metabólico en la base de datos KEGG. Una puntuación baja (0.150 y 0.400) significa más interacción, pero también más falsos positivos. El puntaje de confianza utilizado para la formación de redes fue de 0.700 que corresponde a un nivel de confianza alto. También, al seleccionar las fuentes de interacción activa, seleccionamos solo evidencias en experimentos y bases de datos. Las significancias entregadas para el nivel de enriquecimiento de interacción proteína-proteína (PPI) fue de $P=0.191$ para los genes asociados a la respuesta diferencial de la interacción entre ambos ambientes, $P=1$ para los genes asociados con la respuesta al tratamiento control y $P=1$ para los genes asociados con la susceptibilidad a la rotenona. Un valor pequeño de enriquecimiento PPI indica que los nodos no son aleatorios y que el número de aristas observado es significativo, por lo tanto, las redes correspondiente a los genes identificados a partir de un umbral de $P \leq 10^{-5}$ presentarían nodos aleatorios con valores de PPI no significativos.

Identificamos 4 genes comunes asociados a la variación en la respuesta diferencial y que también se encuentran asociados a la variación fenotípica en tratamiento control (*shrak*, *dnr1*, *mrj* y *CG13800*), 1 gen asociado a la respuesta diferencial de la interacción y que también se encuentra asociado a la susceptibilidad al tratamiento con rotenona (*CG13800*) y 5 genes asociados a la respuesta fenotípica en tratamiento control y que también ejercerían efecto sobre la susceptibilidad a la rotenona (*Treh*, *rk*, *CG13800*, *ppk26* y *Ca-alphaIT*). Además, el gen *CG13800* fue común para las 3 condiciones analizadas.

A partir de los datos entregados utilizando el umbral de significancia $P \leq 10^{-4}$ identificamos 403 SNPs que fueron vinculados a 209 genes que podrían estar asociados a la respuesta diferencial de la interacción de ambos tratamientos (Figura 1S), 509 SNPs vinculados a 285 genes asociados a la respuesta fenotípica frente al tratamiento control (Figura 2S) y 557 SNPs vinculados a 309 genes asociados a la susceptibilidad al tratamiento con rotenona (Figura 3S). Nos preguntamos en qué medida estos 209 genes asociados con la variación en el comportamiento de escalada en la respuesta diferencial de la interacción de ambos tratamientos, participan en redes de interacción. Al configurar los parámetros de esta red, STRING nos entregó una red compuesta por 27 proteínas codificadas por genes candidatos que interactúan (Figura 10). La configuración de los parámetros consistió en seleccionar como puntaje mínimo de interacción un umbral de alta confianza (0.700) y eliminamos todos los nodos desconectados, descartando todas las proteínas que no forman interacciones. Además, mantuvimos como fuentes de interacción activa solo evidencias en experimentos y bases de datos. La red de estos 27 genes candidatos entregó un nivel de enriquecimiento de interacción proteína-proteína significativo (PPI=0.000878). Cabe destacar que en esta red ningún SNP mapea a más de un gen candidato.

Dentro de las redes de genes identificadas en la Figura 10, se encontró una red de genes que forman parte de complejos de ubiquitina ligasa (*Roc2*, *dnr1*, *CG10916*, *CG8188* y *CG6678*) y otra red de genes relacionados con la producción de haces de microtúbulos y transportadores transmembrana (*shi*, *Tret 1-1*, *Tret1-2*, *CG7565*, *CG9270* y *Cip4*), entre los cuales se encuentran los transportadores de Trehalosa. Se sabe que la trehalosa se ha utilizado como neuroprotector en modelos de animales de diversas enfermedades neurodegenerativas como el EP y Huntington [105,106].

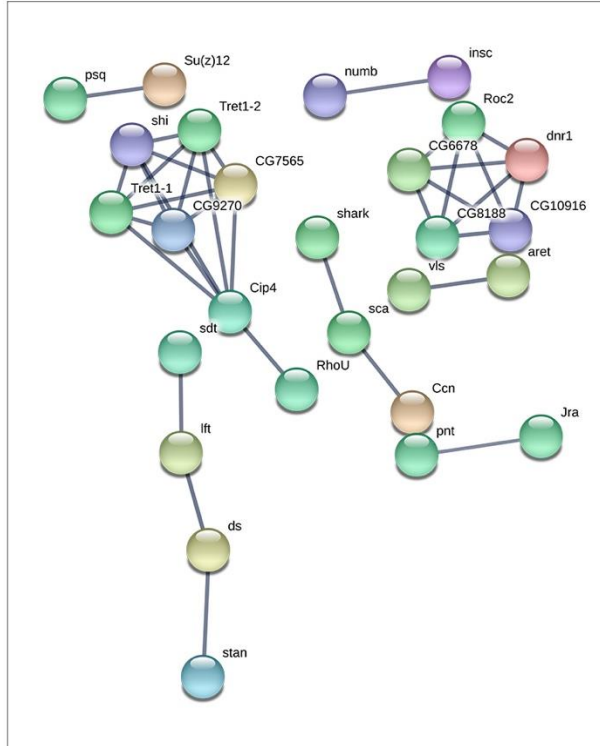


Figura 10: Red de 27 genes candidatos identificados en GWAS con significancia $P \leq 10^{-4}$. Esta red fue confeccionada a partir de los 209 genes candidatos iniciales cuyos parámetros por defecto fueron configurados de tal manera que se mantuvieran las interacciones con mayor nivel de confianza y se eliminaran los nodos desconectados.

Análisis de Ontología génica para genes candidatos

Con el objetivo de determinar qué procesos pueden resultar afectados por los genes candidatos y de qué forma su variabilidad pueden afectar el fenotipo de escalada, realizamos análisis de Ontología génica para los genes candidatos. STRING realiza el análisis de Ontología contra el genoma completo de *Drosophila*, con la hipótesis nula de que los distintos procesos biológicos están representados en la lista de genes provista en la misma proporción que en el genoma completo. Un rechazo a esta hipótesis nula implica que al menos un proceso biológico está sobre o sub-representado en la lista de genes respecto al genoma con un $p < 0.05$ (por defecto, este software aplica la corrección de Bonferroni).

El análisis de ontología génica de los 27 genes candidatos identificados a un umbral de significancia de $P \leq 10^{-4}$ mostró un enriquecimiento significativo con respecto al genoma para diferentes categorías de ontología génica: procesos de desarrollo, diferenciación celular, desarrollo de sistema nervioso, diferenciación neuronal, neurogénesis y locomoción (Tabla 6).

Tabla 6: Ontologías génicas pertenecientes a la red generada a partir de los 27 genes candidatos.

Ontología genica ID	Proceso biologico (GO)	Nº de genes	FDR
GO: 0048869	Proceso de desarrollo celular	15	1.13E-06
GO: 0030154	Diferenciación celular	15	1.13E-06
GO: 0007399	Desarrollo del sistema nervioso	10	1.13E-06
GO: 0030182	Diferenciación neuronal	7	1.19E-05
GO: 0048699	Generación de neuronas	9	2.24E-05
GO: 0022008	Neurogénesis	10	2.24E-05
GO: 0048666	Desarrollo neuronal	3	3.00E-04
GO: 0040011	Locomoción	5	1.60E-03
GO: 0061564	Desarrollo axonal	1	4.20E-03

Ortólogos humanos de genes asociados a la variación del fenotipo de escalada

Utilizando la herramienta de predicción integral de ortólogos DIOPT (flyrnai.org/diopt-dist) determinamos que los 27 genes candidatos presentan ortólogos en humano, con estos generamos una red de interacción proteína-proteína para comparar los cluster generados en humanos con los cluster que generó la red en *Drosophila*. A partir de la red entregada por STRING, configuramos los parámetros seleccionando como puntaje mínimo de interacción un umbral de alta confianza (0.700) y eliminamos todos los nodos desconectados, descartando todas las proteínas que no forman interacciones. Observamos que esta red también reveló 2 *cluster*, uno asociado con componentes del complejo ubiquin-ligasa (*TRAIP*, *UBE2S*, *MYLIP* y *RNF7*) y otro *cluster* asociado a transportadores de membrana (*TRIP10*, *DNMI*, *SLC2A8*) (Figura 11). Además, a través de DIOPT es posible utilizar otra herramienta de consulta de enfermedades para determinar en que categorías y enfermedades genéticas se encuentran los genes identificados. Este análisis reveló que estos genes están implicados en categorías relacionadas con la EP, Alzheimer, conectividad cerebral, calidad de sueño, sicosis y desordenes psiquiátricos, muchos de los cuales son síntomas o prodromos de la EP lo que sugiere mecanismos conservados evolutivamente (Tabla 7).

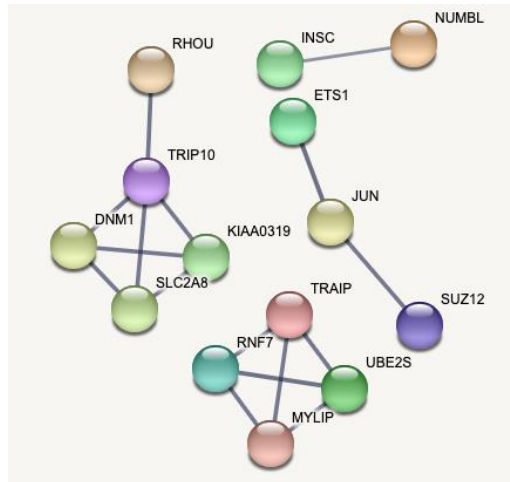


Figura 11: Red de genes ortólogos humanos de genes candidatos de *Drosophila* con interacción de alta confianza (PPI=6.81e-06)

Tabla 7: Genes Ortólogos humanos y enfermedades /categorías relevantes asociados a ellos

Gen <i>Drosophila</i>	Gen Humano	Enfermedad/Categoría	Fuente
<i>shi</i>	<i>MX2</i>	Enfermedad de Parkinson y Patología Cuerpos de Lewy	GWAS
<i>CG8188</i>	<i>UBE2A</i>	Conectividad cerebral	GWAS
<i>Cip4</i>	<i>SH3YL1</i>	Fenotipos de sueño nocturno	GWAS
<i>Tret1-1</i>	<i>SLC2A8</i>	Niveles de metabolitos (HVA)	GWAS
<i>Tret1-1</i>	<i>SLC2A13</i>	Fenotipos de sueño diurno	GWAS
<i>Tret1-1</i>	<i>SLC2A13</i>	Enfermedad de Parkinson	GWAS
<i>Tret1-1</i>	<i>SLC2A13</i>	Calidad de sueño	GWAS
<i>Tret1-1</i>	<i>SLC2A9</i>	Sicosis y Enfermedad de Alzheimer	GWAS
<i>Tret1-1</i>	<i>SLC2A2</i>	Fenotipos de sueño nocturno	GWAS
<i>Tret1-1</i>	<i>SLC2A12</i>	Fenotipos de sueño nocturno	GWAS
<i>Tret1-2</i>	<i>SLC2A8</i>	Niveles de metabolitos (HVA)	GWAS
<i>Tret1-2</i>	<i>SLC2A2</i>	Fenotipos de sueño nocturno	GWAS
<i>Tret1-2</i>	<i>SLC2A12</i>	Fenotipos de sueño nocturno	GWAS
<i>Tret1-2</i>	<i>SLC2A13</i>	Fenotipos de sueño diurno	GWAS
<i>Tret1-2</i>	<i>SLC2A13</i>	Enfermedad de Parkinson	GWAS
<i>Tret1-2</i>	<i>SLC2A13</i>	Calidad de sueño	GWAS
<i>Tret1-2</i>	<i>SLC2A9</i>	Sicosis y Enfermedad de Alzheimer	GWAS
<i>stan</i>	<i>FAT4</i>	Trastorno bipolar o trastorno depresivo mayor (combinados)	GWAS
<i>stan</i>	<i>FAT1</i>	Enfermedad de Alzheimer y edad de inicio	GWAS
<i>sdt</i>	<i>MPP7</i>	Sicosis y Enfermedad de Alzheimer	GWAS
<i>sdt</i>	<i>CARD11</i>	Fenotipos de sueño diurno	GWAS
<i>sdt</i>	<i>DLG2</i>	Enfermedad de Parkinson	GWAS
<i>Rcc1</i>	<i>RCC1</i>	Fenotipos de sueño nocturno	GWAS
<i>CG6678</i>	<i>RCC1</i>	Fenotipos de sueño nocturno	GWAS
<i>pnt</i>	<i>ETS1</i>	Episodios depresivos y maníacos en el trastorno bipolar	GWAS
<i>pnt</i>	<i>ETS1</i>	Episodios depresivos en trastorno bipolar	GWAS
<i>pnt</i>	<i>ERG</i>	Niveles de metabolitos (HVA)	GWAS
<i>ds</i>	<i>DCHS2</i>	Enfermedad de Alzheimer y edad de inicio	GWAS
<i>ds</i>	<i>FAT4</i>	Trastorno bipolar o trastorno depresivo mayor (combinados)	GWAS
<i>ds</i>	<i>FAT1</i>	Enfermedad de Alzheimer y edad de inicio	GWAS
<i>bru1</i>	<i>CELF2</i>	Enfermedad de Alzheimer (inicio tardío)	GWAS
<i>bru1</i>	<i>CELF1</i>	Enfermedad de Alzheimer (inicio tardío)	GWAS
<i>bru1</i>	<i>CELF4</i>	Duración sueño	GWAS
<i>dnr1</i>	<i>MYLIP</i>	Trastorno depresivo mayor	GWAS
<i>RhoU</i>	<i>CDC42</i>	Fenotipos de sueño diurno	GWAS
<i>RhoU</i>	<i>RND1</i>	Desorden bipolar	GWAS
<i>Shark</i>	<i>ITK</i>	Fenotipos de sueño diurno	GWAS
<i>Ccn</i>	<i>BMPER</i>	Enfermedad de Alzheimer	GWAS
<i>kay</i>	<i>CREB5</i>	Ansiedad en trastorno depresivo mayor	GWAS
<i>kay</i>	<i>SDR9C7</i>	Enfermedad de Alzheimer (tiempo de supervivencia)	GWAS
<i>Jra</i>	<i>JUN</i>	Fenotipos de sueño nocturno	GWAS

Discusión

Nuestros resultados muestran que es posible utilizar la variación natural del DGRP para identificar las redes de proteínas asociadas con la susceptibilidad de desarrollar fenotipos locomotores tipo parkinsonianos inducidos por rotenona. Esta es una herramienta excelente para evaluar la magnitud de cualquier genotipo con la variación del entorno y su base genética, ya que muchos individuos genéticamente idénticos de cada línea pueden evaluarse en muchos ambientes controlados.

Los resultados muestran que existe una gran variación natural para el comportamiento de escalada en esta población, concordando con resultados entregados anteriormente en otra investigación [89]. Lo relevante de este trabajo, es que demostró que cuando esto se desarrolla en dos ambientes diferentes, las moscas adultas muestran una respuesta diferencial en el comportamiento de escalada, por lo que algunas líneas fueron muy sensibles y otras presentaron un mejor rendimiento cuando fueron expuestas al tratamiento con rotenona, evidenciando una fuerte interacción genético-ambiental.

La estimación de los componentes que aportan la variabilidad al fenotipo mediante el estudio de los componentes de la varianza nos permitió estimar la contribución de los factores genéticos, ambientales y de la interacción genético-ambiental en la variación del fenotipo. En el ANOVA encontramos que la variación genotípica (Líneas *L*) tiene un efecto significativo sobre la variación fenotípica, lo cual era esperable. Respecto a la contribución del ambiente sobre la variación fenotípica entregado por el ANOVA, es posible que el efecto del tratamiento presente un nivel de significancia menor por la baja concentración de rotenona utilizada en el tratamiento. La concentración de 250 μ M de rotenona está estandarizada en este modelo [84] y aumentar la concentración del neurotóxico puede generar la muerte de los individuos u otros efectos tóxicos

sin conseguir el efecto buscado de inducir el fenotipo locomotor para mapear los genes candidatos que dan cuenta de la interacción. Asimismo, la interacción línea por tratamiento ($L \times T$) significativa indica que las líneas estarían respondiendo de manera diferente al tratamiento, es decir, que existe una variación en la sensibilidad entre las líneas, lo cual confirma la interacción genético-ambiental observada en el gráfico de norma de reacción. Obtener una heredabilidad en sentido amplio de 0.2 nos indica que el 20% de la varianza fenotípica es explicada por la varianza genotípica. Los valores de heredabilidad se encuentran en el rango de 0 a 1, por ende, una heredabilidad cercana a 0 se considera una restricción evolutiva, ya que hay una falta de variabilidad que permita una adaptación a nuevas condiciones ambientales. El resultado del índice de interacción genotipo x ambiente ($G \times E$) ($i^2 = 0,04$) representa la fracción de interacción $G \times E$ que tiene efecto sobre la variación fenotípica, es decir, que el 4% de la varianza fenotípica es explicada por la interacción $G \times E$.

El gráfico cuantil-cuantil para el análisis de GWAS realizado mostró la relación entre las distribuciones de valores P observada y esperada para este análisis. Fue posible observar una ligera desviación correspondiente a un exceso de valores P significativos. Esta desviación se mantiene dentro de los rangos normales para este tipo de análisis, por lo cual se considera que el ajuste es bueno y los resultados podrían ser confiables. Nuestro GWAS a un valor P nominal $\leq 10^{-5}$ identificó genes candidatos que codifican para proteínas que no forman parte de redes significativas de interacción, por lo tanto con estos resultados es complicado inferir procesos moleculares o celulares que den cuenta del fenotipo locomotor.

A través de los resultados entregados por la identificación de genes candidatos a un valor nominal de $P \leq 10^{-4}$ fue posible inferir redes que permiten comprender cómo la variación en estas vías metabólicas que regulan el tráfico vesicular o la ubiquitinación podrían influir en el comportamiento motor en respuesta a la rotenona. Fue posible identificar dos redes de genes

que participarían cada una en cascadas de señalización similares, lo cual sería vital para una eficiente coordinación de las funciones biológicas que llevan a cabo. Uno de los grupos de genes identificados codifican proteínas que forman parte de complejos ubiquitin ligasa. Esto nos entrega información convincente ya que es conocido que el gen *Parkin* es un componente de un complejo de ubiquitina ligasa multiproteína E3 que media el direccionamiento de proteínas para la degradación proteasómica [29,30]. Variaciones en la función de estos genes del sistema ubiquitina-proteosoma podrían alterar muchas funciones celulares que desencadenan la correcta degradación proteica, lo cual conllevaría a la acumulación de proteínas disfuncionales que podrían estar alterando la homeostasis de dopamina y por ende aumentando el estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas.

Formando parte de la otra red se encuentran los genes candidatos *Tret1-1* y *Tret1-2* que corresponden a Transportadores de Trehalosa, cuyo disacárido ha sido considerado como un neuroprotector en modelos de animales de diversas enfermedades neurodegenerativas como la EP y Huntington [106]. Se sabe que la trehalosa protege las neuronas al inducir la autofagia, eliminando así los agregados de α -sinucleína [105]. Además, en esta red se encuentra el gen *shi* que codifica una dinamina, una GTPasa esencial para el reciclaje de vesículas sinápticas. El ortólogo de este gen en humanos es *Dnm1* y se sabe que juega un papel importante en la regulación de la endocitosis mediada por clatrina. Estudios han identificado a *Dnm1* como una supuesta proteína que interactúa con LRRK2 [107]. *Cip4* resultó ser el gen candidato más conectado de esta red. Este gen codifica para la proteína 4 que interactúa con Cdc42, contiene un dominio C-terminal que interactúa con dinamina. Se sabe que *Cip4* actúa positivamente en la vía postsináptica para frenar el crecimiento sináptico [108]. Otros hallazgos han caracterizado que esta proteína este probablemente involucrada en la patogénesis de la enfermedad de

Huntington a través de una acumulación y toxicidad generadas en las neuronas estriatales [109]. Otro gen candidato encontrado a partir de esta asociación pero que no forma parte de ninguna de las dos redes, es el gen *ds* que es una proteína asociada a cadherina y tiene un rol importante en la polaridad celular planar y crecimiento [110]. Este proceso es crucial para el correcto desarrollo del sistema nervioso y su función, asociado principalmente a la migración neuronal, crecimiento dendrítico y guía axonal [111], por lo tanto, tendría sentido que una variación en la función de este gen durante el desarrollo tenga efectos importantes en el comportamiento locomotor.

Respecto a los resultados de ontología génica, las categorías más significativas dan cuenta de procesos importantes que pueden estar relacionados directamente con el fenotipo. La identificación de genes implicados en procesos de desarrollo de sistema nervioso, diferenciación neuronal, neurogénesis y locomoción es clave para poder entender las vías o cascadas de señalización de la que los genes candidatos formarían parte y como estos afectarían los distintos procesos biológicos. A pesar de identificar procesos que se podrían relacionar con fenotipos tipos parkinsonianos, las categorías identificadas son pocas.

Al vincular nuestros resultados de genes candidatos en *Drosophila* con los ortólogos humanos, nos muestra que los estudios usando el modelo genético de *Drosophila melanogaster* pueden guiar la futura investigación traslacional sobre enfermedades humanas asociadas con la exposición a neurotóxicos.

Es necesario aclarar que, debido a la cantidad de hipótesis de asociación que se ponen a prueba en cada GWAS, los resultados pueden presentar un elevado número de variantes estadísticamente significativas pero que en realidad no participan en la expresión fenotípica del carácter (falsos positivos). A pesar de que existen varias metodologías de corrección para detectar el enriquecimiento de falsos positivos, no hay consenso sobre cual usar, ya que su

número es dependiente tanto del tipo de datos como de la metodología de asociación utilizada. El método más utilizado es la corrección de Bonferroni por pruebas múltiples, en la cual se recalcula el valor crítico de significación (P) teniendo en cuenta el número total de hipótesis que se ponen a prueba. De esta manera, en nuestro análisis el valor de corte de acuerdo con la corrección de Bonferroni debería ser de $P \leq 2.6 \times 10^{-8}$, por lo tanto, el valor P que utilizamos no cumple con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples [112]. Solo se podrían detectar variantes con efectos muy grandes a este nivel de significancia si quizás aumentáramos la cantidad de individuos muestreados. Cabe destacar, que el valor de corte consenso usado en la mayoría de estudios de asociación realizados con el DGRP es menor o igual a 10^{-5} .

Para solucionar este problema, buscamos evidencia de una señal estadística al examinar el gráfico cuantil-cuantil que muestra una desviación de la expectativa aleatoria por debajo de $P \leq 10^{-4}$. Otra metodología sería controlar la cantidad de falsos positivos usando la tasa de descubrimientos falsos o FDR. En la bibliografía se considera aceptable para los análisis de asociación que los P valores de corte tengan una FDR entre 0.01 y 0.1, es decir, que contemplen entre 1% y 10% de falsos positivos.

En esta tesis se utilizó un umbral de significancia de $P \leq 10^{-4}$ junto con la eliminación de los nodos no conectados dentro de las redes de interacción proteína-proteína para así eliminar los genes candidatos que probablemente son falsos positivos. Usando estos criterios se identificaron genes y vías metabólicas candidatas modificadoras del fenotipo tipo parkinsoniano.

Para corroborar si estos genes identificados en el análisis de GWAS realmente tienen efecto sobre la variación fenotípica, es necesario realizar validación funcional a través de experimentos de pérdida o ganancia de función de los genes candidatos y evaluar el fenotipo.

Dentro de las proyecciones futuras, espero poder aumentar la cantidad de individuos muestreados a 205 líneas para poder identificar las variantes raras o de pequeño efecto que solo pueden identificarse utilizando un número grande de líneas. Estos resultados entregarán una red más robusta y enriquecida en términos de Ontología génica y que además se esperaría que estén relacionado a los fenotipos adaptativos del estrés oxidativo. De obtenerse este resultado, aumentaría el grado de certeza sobre las funciones de estos genes en la variabilidad del comportamiento locomotor.

Aprender sobre los modificadores genéticos de la EP idiopática e identificar nuevas vías involucradas en la progresión de cada subtipo de la enfermedad con la posible identificación de nuevas dianas terapéuticas es un gran paso para determinar posibles tratamientos personalizados para cada paciente ya que los tratamientos conocidos muestran distintas respuestas, tanto en términos de eficacia como de efectos secundarios.

Conclusión

Nuestros resultados demuestran que existe una gran variación fenotípica en respuesta a la exposición a rotenona y que la contribución de la interacción entre el genoma y el ambiente es relevante.

Logramos identificar SNPs y mapear genes que subyacen a la variación del fenotipo de escalada en respuesta a la exposición a rotenona.

Identificamos una red de genes de interacción proteína-proteína a partir de los genes candidatos y asociamos estos resultados con sus respectivos ortólogos humanos. Dada la conservación de los procesos biológicos fundamentales y función del sistema nervioso entre moscas y humanos, hipotetizamos que el papel de estas redes en la progresión de la EP están conservadas en nuestra especie. Así, utilizando resultados obtenidos a partir de estas investigaciones, se podría contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas para tratar la EP.

La identificación de estas vías podrían dar cuenta de la variación de los fenotipos tipo parkinsonianos en respuesta a la exposición de neurotóxicos, confirmando el gran valor que tiene *Drosophila melanogaster* como modelo de investigación para dilucidar mecanismos genéticos y moleculares que subyacen a la variación del comportamiento en respuesta a factores ambientales.

Bibliografía

- 1 Parkinson J (1817). An essay on the shaking palsy. London: Writting-ham and Rowland Sherwood, Neely and Jones.
- 2 Gibb WR, Lees AJ. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 51: 745-52.
- 3 Christopher G. Goetz. (2011). The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapie. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1(1): a008862.
- 4 Willis, A. W. (2013). Parkinson disease in the elderly adult. *Mo.Med.*, 110, 406-410.
- 5 De Lau, L.M., and Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5, 525-535.
- 6 L.V. Kalia, A.E. Lang. (2015). Parkinson's disease *Lancet*, 386 (9996), 896-912
- 7 Ingrid Estrada-Bellmann, Martínez Rodríguez HR. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Parkinson. 25. 8:16–22.
- 8 Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, et al. (2017) Past, present, and future of Parkinson's disease: a special essay on the 200th anniversary of the shaking palsy. *Mov Disord*. 32: 1264-1310.
- 9 Boeree CG. (2007). Los ganglios basales. *Psicología Online*.
- 10 Standaert DG, Young AB. . *Bases Farmacológicas de la Terapéutica de Goodman y Gillman* (1996). 9na Edición, Vol. 1. 542-549.
- 11 Adams and Vectors *Neurology McGraw-Hill's* (2007). The striatopallidonigral system (basal ganglia).
- 12 Peñas Domingo, Esther (2014). *El Libro Blanco del Parkinson en España*. España: el Real Patronato sobre Discapacidad (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad)
- 13 Raak H., Del T.K., Rub U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N. and Braak E.(2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*; 24 (2): 197-211.
- 14 Mackenzie I (2001). The pathology of Parkinson's disease. *BC Med J*. 43: 142-147.
- 15 Yarnall A, Archibald Neil, Burn D. (2012). Parkinson's disease. *Mov Disord*. 40: 529-535.

- 16 Ziv I, Melamed E, Nardi N, Luria D, Achiron A, Offen D, Barzilai A.(1994). Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons--a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* Mar 28;170(1):136-40.
- 17 Fariello RG.(1988). Experimental support for the implication of oxidative stress in the genesis of parkinsonian syndromes. *Funct Neurol.* Oct-Dec;3(4):407-12.
- 18 Götz M.E., Freyberger A., Riederer P. (1990). Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.*;29:241-9.
- 19 Wirdefeldt K, Adami H, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J.(2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.* 26(S1):1-58.
- 20 Marras C., Tanner C. (2003). Parkinson's disease: genetic epidemiology & overview. En: Pulst S (ed.). *Genetics of Movement Disorders.* Academic Press, Londres.
- 21 Pankratz N., Foroud T. (2007). Genetics of Parkinson disease. *Genet Med.* 9, 801-811.
- 22 Schapira A. (2011). Aetiopathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurology.* 258(S2):307-310.
- 23 Gosal D., Ross O.A., Toft M. (2006). Parkinson's disease: the genetics of a heterogeneous disorder. *Eur J Neurol.* Jun;13(6):616-27.
- 24 Hamza T.H., Payami H. (2010). The heritability of risk and age at onset of Parkinson disease after accounting for known genetic risk factors. *J Hum Genet.*;55:241–243.
- 25 Kumar KR, Djarmati-Westenberger A, Grunewald A. (2011). Genetics of Parkinson's disease. *Semin. Neurol.* 31: 433-440.
- 26 Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. (2003) α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science.* 302:841.
- 27 Duda J.E., Giasson B.I., Mabon M.E., Lee V.M., Trojanowski J.Q. (2002). Novel antibodies to synuclein show abundant striatal pathology in Lewy body diseases. *Ann Neurol.*;52, 205-10.
- 28 Caughey B., and Lansbury P.T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26:267-98. 2003, 267-298.
- 29 Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ. (2008) The PINK1/parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Nat Acad USA.* 105:1638-43.

- 30 Rothfuss O, Fischer H, Hasegawa T, et al. (2009). Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Hum Molec Genet.* 18:3832-50.
- 31 Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. (2003) α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*; 302:841.
- 32 Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey G, et al.(1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 395: 451-452.
- 33 Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Hattori N.(2011). Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci.*32(10):573-80.
- 34 Xiong H, Wang D, Chen L, et al. (2009). Parkin, PINK1, and DJ-1 forma ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest.* 119(3):650-60.
- 35 Cookson MR. (2010). DJ-1, PINK1, and their effects on mitochondrial pathways. *Mov Disord.* 25(Suppl 1):S44-8.
- 36 Hardy J.(2010). Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron.* 68(2):2016.
- 37 Eiberg H, Hansen L, Korbo L, Nielsen IM, Svenstrup K, Bech S, et al. (2012). Novel mutation in ATP13A2 widens the spectrum of Kufor-Rakeb syndrome (PARK9). *Clin Genet.* 82: 256-63.
- 38 Park JS, Blair NF, Sue CM.(2015). The role of ATP13A2 in Parkinson's disease: Clinical phenotypes and molecular mechanisms. *Mov Disord.* 30: 770-9.
- 39 Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, et al. (2009). Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol.* 65(1):19-23.
- 40 Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L, et al. (2009). FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology.* 72(3):240-5.
- 41 Vidrio Morgado H., Alonso Vilatela M.E., López López M. (2007). Factores genéticos involucrados en la susceptibilidad para desarrollar enfermedad de Parkinson., *Salud Mental* 30, 16-24
- 42 Parikshak NN, Gandal MJ, Geschwind DH. (2015). Systems biology and gene networks in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Genet.* 16: 441- 458.
- 43 Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R, et al. (2006). Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA.* 296: 661-670.

- 44 Chang D, Nalls MA, Hallgrímsdóttir IB, Hunkapiller J, van der Brug M, Cai F, et al. (2017). A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nat Genet.* 49: 1511-1516.
- 45 Fung HC, Xiomerisiou G, Gibbs JR, Wu YR, Eerola J, Gourbali V, et al.(2006). Association of tau haplotype-tagging polymorphisms with Parkinson's disease in diverse ethnic Parkinson's disease cohorts. *Neurodegener Dis.* 3: 327-333.
- 46 Kwok JB, Teber ET, Loy C, Hallupp M, Nicholson G, Mellick GD, et al.(2004). Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 55: 329-334.
- 47 Skipper L, Wilkes K, Toft M, Baker M, Lincoln S, Hulihan M, et al.(2004). Linkage disequilibrium and association of MAPT H1 in Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 75: 669-677.
- 48 Fung HC, Xiomerisiou G, Gibbs JR, Wu YR, Eerola J, Gourbali V, et al. (2006) Association of tau haplotype-tagging polymorphisms with Parkinson's disease in diverse ethnic Parkinson's disease cohorts. *Neurodegener Dis.* 3: 327-333.
- 49 Gilgun-Sherki Y, Djaldetti R, Melamed E, Offen D.(2004). Polymorphism in candidate genes: implications for the risk and treatment of idiopathic Parkinson's disease. *Pharmacogenomics J.* 4(5):291–306.
- 50 Tan Ek (2000). Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease. *Neurology*, 55:533-8.
- 51 Siitonen A., Nalls M.A., Hernandez D., Gibbs J.R., Ding J., Ylikotila P., Edsall C., Singleton A., Majamaa K. (2017). Genetics of early-onset Parkinson's disease in Finland: exome sequencing and genome-wide association study. *Neurobiol. Aging*, 53, p. 195.e7, 195.e10.
- 52 Jansen I.E., Ye H., Heetveld S., Lechler M.C., Michels H., Seinstra R.I., Lubbe S.J., Drouet V., Lesage S., Majounie E., Gibbs J.R., Nalls M.A., Ryten M., Botia J.A., Vandrovcova J., Simon-Sanchez J., Castillo-Lizardo M., Rizzu P., Blauwendraat C., Chouhan A.K., Li Y., Yogi P., Amin N., van Duijn C.M., Morris H.R., Brice A., Singleton A.B., David D.C., Nollen E.A., Jain S., Shulman J.M., Heutink P. (2017). Discovery and functional prioritization of Parkinson's disease candidate genes from large-scale whole exome sequencing. *Genome Biol.*, 18, p. 22

- 53 Campdelacreu J. (2014). Parkinson disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurologia*. Nov-Dec;29(9):541-9
- 54 Tanner CM.(1992). Occupational and environmental causes of parkinsonism. *Occup Med*. Jul-Sep;7(3):503-13.
- 55 Francke Venegas, P. (2009). Manual Enfermedad de Parkinson para Profesionales sin Especialistas, Pacientes y Familiares. : Unidad de Trastornos del movimiento.
- 56 Huang Z, Fuente-Fernández R, Stoessl A. (2003). Etiology of Parkinson's Disease. *Can J Neurol Sci*.30(S1):S10-S18.
- 57 Massano J., Bhatia K. (2012). Clinical Approach to Parkinson's Disease: Features, Diagnosis, and Principles of Management. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2(6):a008870-a008870.
- 58 Pezzoli G., Cereda E. (2013). Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson's disease. *Neurology*. 80 (22): 2035-41.
- 59 Przedborski S., Jackson-Lewis V. (1998). Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord*;13 (Suppl. 1):35-8.
- 60 Werneck ALDS., Alvarenga H. (1999). Genetics, drugs and environmental factors in Parkinson's disease: a case-control study. *Arq Neuropsiquiatr*. 57(2B):347-55.
- 61 Isman, M. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol*. 51: 45-66.
- 62 Rattan, R. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* 29: 913-920.
- 63 Uversky, V. N. (2004). Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 225-241.
- 64 Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G., GarciaOsuna M., Panov A.V., Greenamyre J.T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301–1306
- 65 Alarcón Aguilar A., Santamaría del Ángel A., Königsberg Fainstein M. (2010). Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica*, vol. 29, núm. 3, septiembre, pp. 92-100

- 66 Ren Y., Liu W., Jiang H., Jiang Q., Feng J. (2005). Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. *J. Biol. Chem.* 280:34105–34112 10.1074
- 67 Feng J. (2006). Microtubule: a common target for parkin and Parkinson's disease toxins. *Neuroscientist.* 12:469–476.
- 68 Ogburn K.D., Figueiredo-Pereira M.E. (2006). Cytoskeleton/endoplasmic reticulum collapse induced by prostaglandin J2 parallels centrosomal deposition of ubiquitinated protein aggregates. *J. Biol. Chem.* 281:23274–23284.
- 69 Hastings T.G., Lewis D.A., Zigmond M.J. (1996). Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1956–1961.
- 70 Aryal B., Lee Y. (2018). Disease model organism for Parkinson Disease: *Drosophila melanogaster*. *BMB Reports* 4331.
- 71 Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., Knels, L., Pursche, S., Jung, R., Jackson, S., Gille, G., Spillantini, M.G., Reichmann, H., et al. (2010). Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One* 5, e8762.
- 72 Cannon, J.R., Tapias, V., Na, H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E., and Greenamyre, J.T. (2009). A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 34, 279-290.
- 73 Zschiedrich K, König IR, Brüggemann N, Kock N, Kasten M, Leenders KL, et al. (2009) MDR1 variants and risk of Parkinson disease. Association with pesticide exposure, *J Neurol.* 256(1):115-20.
- 74 132 Tanner C.M., Ottman R., Goldman S.M., Ellenberg J., Chan P., Mayeux R., et al. (1999) Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA*; 281:341–6.
- 75 Bush, W. S., & Moore, J. H. (2012). Genome-wide association studies. *PLoS computational biology*, 8(12), e1002822.
- 76 Pihlstrøm L, Axelsson G, Bjørnarå KA, Dizdar N, Fardell C, Forsgren L, Holmberg B, Larsen JP, Linder J, Nissbrandt H, Tysnes OB, Ohman E, Dietrichs E, Toft M. (2013). Supportive evidence for 11 loci from genome-wide association studies in Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 34, 1708.e7–13.

- 77 Do CB, Tung JY, Dorfman E, Kiefer AK, Drabant EM, Francke U, Mountain JL, Goldman SM, Tanner CM, Langston JW, Wojcicki A, Eriksson N. (2011). Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease. *PLoS Genet.* 7, e1002141.
- 78 International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC) & Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2) (2011). A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease. *PLoS Genet.* 7, e1002142.
- 79 Chang D., Nalls M.A., Hallgrímsson I.B., Hunkapiller J., Van der Brug M., Cai F.; International Parkinson's Disease Genomics Consortium; 23 and Me Research Team, Kerchner G.A., Ayalon G., Bingol B., Sheng M., Hinds D., Behrens T.W., Singleton A.B., Bhangale T.R., Graham R.R. (2007). A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nat Genet.* 49(10):1511-1516. doi: 10.1038/ng.3955. Epub 2017 Sep 11.
- 80 Dodson M.W., and Guo M. (2007). Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 17, 331-337.
- 81 Whitworth A.J. (2011). *Drosophila* models of Parkinson's disease. *Adv Genet* 73, 1-50.
- 82 Rubin G. M., Yandell M. D., Wortman, J. R., Gabor G. L., Nelson C. R., et al. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287(5461), 2204- 2215.
- 83 Dinis-Oliveira, R.J., Duarte, J.A., Sanchez-Navarro, A., Remiao, F., Bastos, M.L., and Carvalho, F. (2008). Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Crit Rev Toxicol* 38, 13-71.
- 84 Coulom, H., and Birman, S. (2004). Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 24, 10993-10998.
- 85 Caroline M. Tanner, Freya Kamel, G. Webster Ross, Jane A. Hoppin, Samuel M. Goldman, Monica Korell, Connie Marras, Grace S. Bhudhikanok, Meike Kasten, Anabel R. Chade, Kathleen Comyns, Marie Barber Richards, Cheryl Meng, Benjamin Priestley, Hubert H. Fernandez, Franca Cambi, David M. Umbach, Aaron Blair, Dale P. Sandler, and J. William Langston. (2011) Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environ Health Perspect.* 2011 Jun; 119(6): 866–872.

- 86 Mackay T.F., Richards S., Stone E.A., Barbadilla A., Ayroles J.F., Zhu D., Casillas S., Han Y., Magwire M.M., Cridland J.M., et al. (2012). The *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel. *Nature* 482, 173-178.
- 87 Huang W., Massouras A., Inoue Y., Peiffer J., Ramia M., Tarone A.M., Turlapati L., Zichner T., Zhu D., Lyman R.F., et al. (2014). Natural variation in genome architecture among 205 *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel lines. *Genome Res* 24, 1193-1208.
- 88 Carbone M. A., J. F. Ayroles, A. Yamamoto, T. V. Morozova, S. A. West et al. (2009). Overexpression of myocilin in the *Drosophila* eye activates the unfolded protein response: implications for glaucoma. *PLoS One* 4: e4216.
- 89 Jordan K. W., Craver K.L., Magwire M.M., Cubilla C.E., Mackay T.F., Anholt R.R. (2012). Genome-wide association for sensitivity to chronic oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 7: e38722.
- 90 Chow, C. Y., M. F. Wolfner and Clark A.G. (2013) Using natural variation in *Drosophila* to discover previously unknown endoplasmic reticulum stress genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 9013-9018.
- 91 He, B. Z., Ludwig M. Z., Dickerson D. A., Barse L., Arun B., Vilhjálmsón B.J., Jiang P., Park S.Y., Tamarina N.A., Selleck S.B., Wittkopp P.J., Bell G.I., Kreitman M. (2014). Effect of genetic variation in a *Drosophila* model of diabetes-associated misfolded human proinsulin. *Genetics* 196: 557-567.
- 92 Chow C. Y., Kelsey K. J., Wolfner M. F. and Clark A. G. (2016). Candidate genetic modifiers of retinitis pigmentosa identified by exploiting natural variation in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 25: 651-659.
- 93 Lavoy S., Chittoor-Vinod V.G., Chow C.Y., Martin I. (2018). Genetic Modifiers of Neurodegeneration in a *Drosophila* Model of Parkinson's Disease. *Genetics*. 209(4):1345-1356.
- 94 Chow C.Y. and Reiter L.T. (2017). Etiology of Human Genetic Disease on the Fly. *Trends Genet* 33, 391-398.
- 95 Anholt, R. R., & Mackay, T. F. (2015). Dissecting the genetic architecture of behavior in *Drosophila melanogaster*. *Current opinion in Behavioral Sciences*, 2, 1-7.

- 96 Fochler, S., Morozova, T. V., Davis, M. R., Gearhart, A. W., Huang, W., Mackay, T. F. C., & Anholt, R. R. H. (2017). Genetics of alcohol consumption in *Drosophila melanogaster*. *Genes, Brain and Behavior*, *16*(7), 675-685.
- 97 Montgomery, S. L., Vorojeikina, D., Huang, W., Mackay, T. F., Anholt, R. R., & Rand, M. D. (2014). Genome-wide association analysis of tolerance to methylmercury toxicity in *Drosophila* implicates myogenic and neuromuscular developmental pathways. *PLoS One*, *9*(10), e110375.
- 98 Gargano JW, Martin I, Bhandari P, Grotewiel MS. (2005). Rapid interactive negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp Gerontol*. *40*:386-395.
- 99 Falconer D.S., Mackay T.F.C. (1996). Introduction to quantitative genetics. Fourth. Addison Wesley Longman; Harlow, Essex, UK.
- 100 Tonk, F.A., Ilker E. and Tosun M. (2011). Evaluation of genotype x environment interactions in maize hybrids using GGE biplot analysis. *Crop Breed. Appl. Biotechnol*. *11*:1-9.
- 101 Lippert C., Listgarten J., Liu Y., Kadie C.M., Davidson R.I., Heckerman D. (2011) FaST linear mixed models for genome-wide association studies. *Nat Methods*; *8*(10):833–5.
- 102 R Core Team. 2017. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.r-project.org/>.
- 103 McQuilton P., St Pierre S.E., Thurmond J., FlyBase Consortium (2012). FlyBase 101—the basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acids Res* *40* Database issue D706 D714.
- 104 Franceschini A., Szklarczyk D., Frankild S., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Lin J., Minguez P., Bork P., von Mering C., Jensen L.J. (2013) STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. *41*(Database issue):D808-15.
- 105 Sarkar S., Chigurupati S., Raymick J., Mann D., Bowyer J.F., Schmitt T., Beger R.D., Hanig J.P., Schmued L.C., Paule M.G. (2014) Neuroprotective effect of the chemical chaperone, trehalose in a chronic MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *Neurotoxicología* *44* , 250-262.
- 106 Rodriguez-Navarro J.A., Rodríguez L., Casarejos M.J., Solano R.M., Gómez A., Perucho J., Cuervo A.M., García de Yébenes J. and Mena M.A. (2010) Trehalose

- ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol. Dis.* 39 , 423–438.
- 107 Stafa K, Tsika E, Moser R, Musso A, Glauser L, Jones A, Biskup S, Xiong Y, Bandopadhyay R, Dawson VL, Dawson TM, Moore DJ.(2014). Functional interaction of Parkinson's disease-associated LRRK2 with members of the dynamin GTPase superfamily. *Hum Mol Genet.* Apr 15;23(8):2055-77
- 108 Koduru S, Kumar L, Massaad MJ, Ramesh N, Le Bras S, Ozcan E, Oyoshi MK, Kaku M, Fujiwara Y, Kremer L, King S, Fuhlbrigge R, Rodig S, Sage P, Carman C, Alcaide P, Luscinskas FW, Geha RS. (2010). Cdc42 interacting protein 4 (CIP4) is essential for integrin-dependent T-cell trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(37):16252-6.
- 109 Holbert S, Dedeoglu A, Humbert S, Saudou F, Ferrante RJ, Néri C.(2003). Cdc42-interacting protein 4 binds to huntingtin: neuropathologic and biological evidence for a role in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(5):2712-7
- 110 Revilla-Yates, E., Varas, L., Sierra, J., & Rodriguez, I. (2015). Transcriptional analysis of the dachsous gene uncovers novel isoforms expressed during development in *Drosophila*. *FEBS letters*, 589(23), 3595-3603.
- 111 Tissir, F., & Goffinet, A. M. (2013). Shaping the nervous system: role of the core planar cell polarity genes. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(8), 525.
- 112 J. M. Bland and D. G. Altman. (1995). Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ (Clinical research ed.)*, 310(6973):170. ISSN 0959-8138.
- 113 Maitra U., Scaglione MN, Chtarbanova S, O'Donnell JM. (2019). Innate immune responses to paraquat exposure in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Sci Rep.* Sep 3;9(1):12714.

Anexos

Tabla 1S: Valores de media y error estándar de las 73 líneas muestreadas en los dos tratamientos.

DGRP	n	CONTROL		ROTENONA	
		Media	Desviación estandar	Media	Desviación estandar
DGRP-129	5	2.12	0.4816638	1.72	0.2841654
DGRP-149	5	1.58	0.2834314	1.8266667	0.2575526
DGRP-158	5	0.16	0.1341641	1.52	0.7395945
DGRP-177	5	0.2666667	0.2333333	0.2666667	0.1080123
DGRP-195	5	0.7066667	0.1689839	0.62	0.1260512
DGRP-208	5	1.9466667	0.6401389	1.96	0.3946869
DGRP-228	5	1.7733333	0.2408319	0.7666667	0.1563472
DGRP-239	5	1.32	0.4086563	0.8	0.2345208
DGRP-301	5	3.22	0.3819541	3.84	0.4386849
DGRP-304	5	2.08	0.5155095	1.84	0.3847077
DGRP-306	5	1.7	0.1312335	1.2533333	0.3610171
DGRP-313	5	1.18	0.2774887	0.8666667	0.0745356
DGRP-315	5	2.34	0.3435113	2.66	0.594138
DGRP-319	5	3.3066667	0.3260879	3.3	0.5759051
DGRP-321	5	1.22	0.2413504	2.78	0.3801316
DGRP-324	5	2.5866667	0.49137	3.24	0.4734038
DGRP-335	5	0.4	0.1986062	0.3933333	0.1831818
DGRP-350	5	2.008	0.3485972	1.936	0.256671
DGRP-357	5	1.2733333	0.8015263	1.1533333	0.2456284
DGRP-358	5	1.38	0.1725624	1.7533333	0.1095445
DGRP-360	5	2.82	0.4413364	3.6666667	0.6476453
DGRP-362	5	3.7133333	0.5649975	3.3666667	0.3188521
DGRP-365	5	1.005	0.252116	0.65	0.0935414
DGRP-371	5	1.57	0.1604681	2.01	0.5672301
DGRP-375	5	2.92	0.7726578	2.94	0.3847077
DGRP-379	5	2.46	0.5309321	2.1866667	0.3412396
DGRP-380	5	1.6933334	0.2385139	1.7066667	0.2752777
DGRP-385	5	1.565	0.1039832	2.075	0.2727178
DGRP-391	5	2.7	0.324037	2.52	0.2545148
DGRP-392	5	1.095	0.3266305	0.86	0.074162
DGRP-399	5	1.952	0.280927	1.416	0.221991
DGRP-409	5	2.25	0.5232112	1.26	0.389551
DGRP-41	5	1.7466666	0.2844097	2.38	0.3460893
DGRP-427	5	1.6266667	0.1861899	1.54	0.2597007
DGRP-437	5	2.572	0.3523067	1.772	0.1836301

DGRP-439	5	0.66	0.2019351	2.2533333	0.3516627
DGRP-441	5	0.8	0.3691206	1.75	0.276134
DGRP-443	5	0.6133333	0.1324974	1.5066667	0.2302173
DGRP-45	5	1.7066667	0.3012935	1.46	0.2302173
DGRP-486	5	1.94	0.6338375	1.3	0.2371708
DGRP-491	5	1.82	0.2514955	1.74	0.3248076
DGRP-508	5	2.12	0.4367494	1.43	0.4969909
DGRP-509	5	1.38	0.3656045	1.2133333	0.0900617
DGRP-517	5	1.56	0.2542964	1.8733333	0.3174552
DGRP-555	5	3	0.1118034	2.23	0.297069
DGRP-584	5	3.18	0.5984239	3.1333333	0.3756476
DGRP-59	5	1.7	0.4340939	1.365	0.2459675
DGRP-703	5	1.1	0.325747	1.1133333	0.2977695
DGRP-705	5	0.99	0.1635543	1.25	0.2872281
DGRP-707	5	2.6	0.3756476	2.9466667	0.2076322
DGRP-712	5	1.8133333	0.2863564	2.6333333	0.5597618
DGRP-714	5	2.02	0.3701351	2.36	0.4774935
DGRP-73	5	1.0733333	0.308581	0.6466667	0.1804316
DGRP-730	5	2.28	0.303315	2.28	0.4604346
DGRP-732	5	2.9333333	0.4570437	3.1866667	0.5852824
DGRP-737	5	1.3733333	0.3507135	1.3333333	0.2211083
DGRP-757	5	1.38	0.3768289	1.68	0.148324
DGRP-765	5	3.14	0.4722288	2.43	0.309435
DGRP-774	5	5.19	0.2369072	5.43	0.1565248
DGRP-786	5	2.66	0.167332	1.8733333	0.0760117
DGRP-787	5	0.6333333	0.2198484	0.58	0.2255856
DGRP-799	5	0.71	0.0961769	1.31	0.3974921
DGRP-808	5	3.6066667	0.3226625	1.9466667	0.3023978
DGRP-819	5	2.72	0.6685806	2.52	0.493063
DGRP-820	5	1.56	0.1656637	1.4266667	0.1656636
DGRP-83	5	1.45	0.3162278	2.1	0.3889087
DGRP-843	5	2.44	0.5653907	2.4666667	0.5562773
DGRP-852	5	3.19	0.4682414	3.24	0.4722288
DGRP-859	5	2.3333333	0.1748015	4.4666667	0.2357023
DGRP-861	5	2	0.3952847	2.14	0.4219005
DGRP-900	5	2.565	0.2613666	3.23	0.2594465
DGRP-91	5	0.56	0.1294218	0.54	0.2631539
DGRP-913	5	1.48	0.30786	2.5466667	0.28829

Tabla 2S: Valores de las diferencias del comportamiento entre los dos tratamientos de cada línea del DGRP respecto al promedio (Sensibilidad).

DGRP	Sensibilidad
DGRP-158	22.32366945
DGRP-177	0
DGRP-335	-0.109430299
DGRP-91	-0.328289257
DGRP-443	14.66358789
DGRP-787	-0.875437471
DGRP-439	26.15371023
DGRP-195	-1.422587326
DGRP-799	9.848677699
DGRP-441	15.59373969
DGRP-705	4.267760336
DGRP-365	-5.827134305
DGRP-73	-7.003503047
DGRP-392	-3.857398765
DGRP-703	0.218858957
DGRP-313	-5.143197807
DGRP-321	25.60656202
DGRP-357	-1.96973554
DGRP-239	-8.535520672
DGRP-737	-0.656578513
DGRP-358	6.128065576
DGRP-509	-2.735744352
DGRP-757	4.924338849
DGRP-83	10.66940084
DGRP-913	17.5087609
DGRP-517	5.143197807
DGRP-820	-2.188594497
DGRP-385	8.371376044
DGRP-371	7.222363646
DGRP-149	4.048901379
DGRP-427	-1.422587326
DGRP-380	0.218858957
DGRP-306	-7.331793945
DGRP-59	-5.498845048
DGRP-45	-4.048901379
DGRP-41	10.39582755

DGRP	Sensibilidad
DGRP-228	-16.52389149
DGRP-712	13.45985952
DGRP-491	-1.313157026
DGRP-486	-10.50525621
DGRP-208	0.218858957
DGRP-399	-8.798152077
DGRP-861	2.298024796
DGRP-350	-1.181841324
DGRP-714	5.580917363
DGRP-304	-3.939471079
DGRP-129	-6.565785132
DGRP-508	-11.32597935
DGRP-409	-16.2503182
DGRP-730	0
DGRP-859	35.0175218
DGRP-315	5.252628106
DGRP-843	0.437719556
DGRP-379	-4.486619293
DGRP-900	10.91561778
DGRP-437	-13.13157026
DGRP-324	10.72411517
DGRP-707	5.690347662
DGRP-786	-12.91271131
DGRP-391	-2.95460331
DGRP-819	-3.282892566
DGRP-360	13.89757908
DGRP-375	0.328289257
DGRP-732	4.158331678
DGRP-555	-12.63913638
DGRP-765	-11.65426861
DGRP-584	-0.766008813
DGRP-852	0.820723142
DGRP-301	10.17696696
DGRP-319	-0.109430299
DGRP-808	-27.2480083
DGRP-362	-5.69034602
DGRP-774	3.939471079

Tabla 3S: Variantes candidatas y localización genica para la respuesta diferencial en ambos tratamientos (valor consenso $P \leq 10^{-5}$)

SNP	Gen	Localización
2L_10659319_SNP	CG45690	RÍO ABAJO
2L_10660353_SNP		
2L_12094535_SNP	Pex19	INTRON
2L_12094556_SNP	Pex19	SINÓNIMO
2L_20933993_SNP	CG9270	5' UTR
2L_20946148_SNP	CR44606	RÍO ABAJO
2L_2232251_SNP	Sec24CD	INTRON
2L_5966638_SNP	CG13992	SINÓNIMO
2L_6313168_SNP	Ddr	INTRON
2L_6313173_DEL	Ddr	INTRON
2L_669369_SNP	ds	INTRON
2L_669374_SNP	ds	INTRON
2L_669387_SNP	ds	INTRON
2L_669392_SNP	ds	INTRON
2L_669407_SNP	ds	INTRON
2L_669426_SNP	ds	INTRON
2L_6983156_SNP	uif	SINÓNIMO
2L_6999115_SNP	uif	INTRON
2L_7317929_SNP		
2L_7328369_SNP	CR45304	RÍO ABAJO
2L_7341261_INS	Wnt6	INTRON
2L_7341414_SNP	Wnt6	INTRON
2R_12091228_DEL	mrj	3' UTR
2R_14513962_SNP	Sec6	SINÓNIMO
2R_15722984_SNP		
2R_17734011_DEL		
2R_18450972_SNP	dnr1	RÍO ABAJO
2R_18600241_DEL	CG30268	5' UTR
2R_4909807_SNP	CG8170	NO SINÓNIMO
2R_4911647_SNP	CG8170	INTRON
2R_4912926_SNP	CG8170	INTRON
2R_4915861_DEL	CG8170	INTRON
2R_4916068_SNP	CG8170	INTRON
2R_4916902_SNP	CG8170	INTRON
2R_4916996_SNP	CG8170	INTRON
2R_4917211_SNP	CG8170	INTRON
2R_4919790_DEL		
2R_4920104_SNP		
2R_4921761_SNP		
2R_4922509_SNP		
2R_4922796_SNP		
2R_4922806_SNP		
2R_6574785_SNP	stan	INTRON
2R_7556472_SNP	Roc2	INTRON
3L_10931968_SNP		
3L_13698769_SNP	bru-3	INTRON
3L_1483048_SNP	stet	INTRON
3L_15225642_SNP		
3L_15225651_SNP		
3L_15225656_SNP		
3L_15225713_SNP		
3L_15274855_SNP		
3L_17734123_SNP	Ccn	INTRON
3L_17735387_SNP	CG7460	3' UTR
3L_17737399_SNP	Ccn	INTRON
3L_17749166_SNP	Adgf-A	INTRON
3L_2390213_SNP	CG32299	INTRON
3L_2390243_SNP	CG32298	INTRON
3L_2832939_SNP	CG43444	INTRON
3L_5044884_SNP	Con	INTRON
3L_7326633_DEL	CG43781	RÍO ABAJO
3L_8092877_SNP	Ect4	INTRON
3L_8093072_SNP	Ect4	INTRON
3R_11802097_SNP	Hel89B	INTRON
3R_14815960_SNP	gukh	INTRON
3R_16016524_SNP		
3R_19165840_SNP	pnt	INTRON
3R_23581798_SNP		
X_10031664_SNP	CR44894	INTRON
X_14763010_SNP	Flo2	INTRON
X_14763042_SNP	CG9518	INTRON
X_14763046_SNP	CG9518	INTRON
X_14763108_SNP	CG9518	INTRON
X_14763117_SNP	CG9518	INTRON
X_19136135_SNP	CG14196	RÍO ARRIBA
X_2617277_SNP	fs_1_Yb	SINÓNIMO
X_4350251_SNP	bi	INTRON
X_4350318_SNP	CR32773	INTRON
X_5517707_SNP	I_1_G0045	NO SINÓNIMO

Tabla 4S : Genes asociados a los SNPs identificados en GWAS con significancia $P \leq 10^{-5}$. En rosado se indican los genes candidatos comunes asociados a la respuesta diferencial en ambos ambientes y para cada tratamiento por separado.

INTERACCIÓN	CONTROL	ROTENONA
fs(1)Yb	CG2658	CG15465
CG32773	CG33080	Mcm3
l(1)G0045	CG32700	Treh
CG11362	X11Lbeta	CG33791
dnr1	Treh	ABC7
stet	dnr1	CG33230
CG13800	Letm1	CG13926
CG9518	zip	CG12105
CG14196	CG13800	HBS1
Ccn	CG15020	R
CG7460	CG13705	CG13800
Adgf-A	rut	Eip63E
Msi	Lk	btI
CG6034	Nplp2	CG15629
mus312	CG11529	CG15356
ds	CG5626	sens-2
CG13992	Adk1	rk
Ddr	CG6163	grsm
Pex19	Pdp1	pnr
CG6712	PVRAP	Mhcl
Sec6	Aats-ala-m	CG10185
shark	Gen	CG5484
Tret1-1	rsn	sima
Roc2	LM408	CG12054
CG8170	AstC	CG30114
pnt	CG17211	Fur1
RhoU	rk	CG18170
gukh	Apc	CG7368
CG30268	shark	CG34354
CG30275	sda	Ca-alpha1T
CG42307	Ca-alpha1T	CCHa1
CG32298	bun	rg
CG32299	lr60b	da5
Hel89B	CG34039	bt
stan	CG4328	Nlg4
Wnt6	CG34417	CG42683
CG42787	EcR	msps
Ect4	CG43729	mbl
CG9270	ppk26	cac
uif	mrj	nwk
bi	Glut1	GluRIB
Con	msi	ppk26
Sec24CD		E(z)
Flo2		
bru-3		
CG43780		
CG43781		
mrj		
Tet		

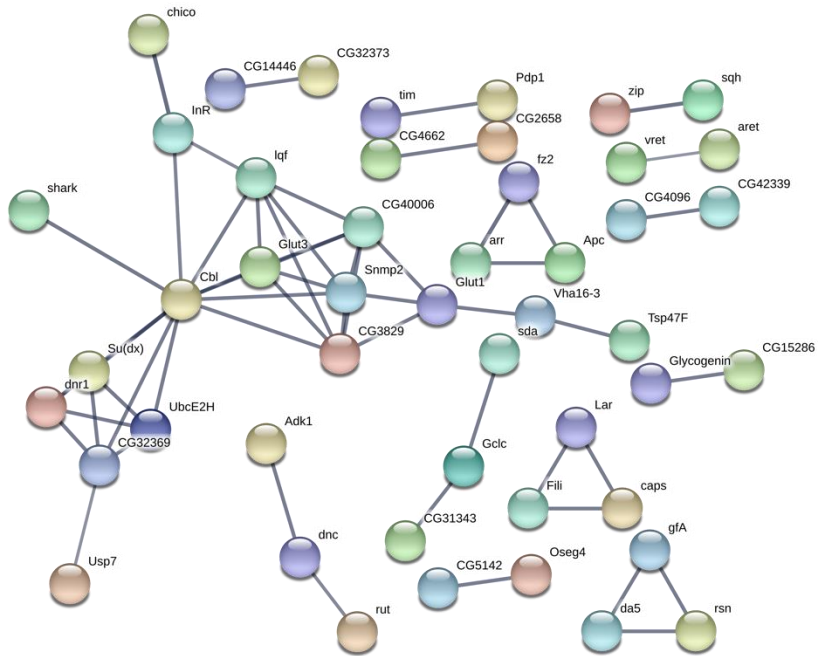


Figura 2S: Genes candidatos vinculados por los SNPs identificados asociados a la respuesta al tratamiento control con significancia $P \leq 10^{-4}$. A partir de los 285 genes candidatos vinculados desde los 509 SNPs, se eliminaron los nodos no conectados entregando una red final de 33 genes candidatos con una red enriquecida (PPI= 0.000162)

