

La intoxicación con cobre disminuye la sobrevida e induce alteraciones neurológicas en *Drosophila melanogaster*.

José Luis Arcaya, Carlos Mario Tejeda, Ubalguis Salazar, Ernesto José Silva, Karla Urdaneta y Krystal Varela.

Sección de Neuroquímica Clínica, Instituto de Investigaciones Clínicas Dr. Américo Negrette, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Enfermedad de Wilson, *Drosophila melanogaster*, actividad motora, dopamina.

Resumen. La enfermedad de Wilson, es un trastorno hereditario autosómico recesivo causado por mutaciones del gen de la trifosfatasa de adenosina (ATP7B). Dicha mutación ocasiona intoxicación con cobre, generando manifestaciones clínicas por los efectos tóxicos del metal, principalmente a nivel del hígado y el encéfalo. Recientemente se han desarrollado modelos genéticos de la enfermedad para su estudio clínico. Sin embargo, la utilidad de los mismos es limitada por el hecho de que en tales modelos no se observan manifestaciones neurológicas. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un modelo de la enfermedad de Wilson en *Drosophila melanogaster*. Inicialmente se evaluó el efecto de la suplementación con concentraciones de 31 μM y 47 μM de cobre en la sobrevida. Posteriormente se realizaron estudios de conducta para determinar si existían alteraciones en el desempeño motor asociadas al tratamiento con la dosis de 47 μM de cobre. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con cobre disminuye la viabilidad de la *Drosophila*. La disminución de la sobrevida estuvo asociada a un aumento y una disminución de los registros de actividad motora en las etapas tempranas y tardías de la intoxicación respectivamente. Por último, se evaluó el papel del sistema de neurotransmisión dopaminérgico sobre las alteraciones conductuales inducidas por el cobre. El tratamiento con el precursor de la dopamina, L-dopa, indujo un aumento de la actividad motora similar al inducido por el cobre. Por el contrario, el tratamiento con Flufenazina, un antagonista de los receptores dopaminérgicos D2, fue capaz de impedir las alteraciones conductuales en todas las edades evaluadas. Estos resultados sugieren que la *Drosophila melanogaster* podría ser empleada como modelo para el estudio de posibles intervenciones con potencial terapéutico en la enfermedad de Wilson.

Copper intoxication decreases lifespan and induces neurologic alterations in *Drosophila melanogaster*.

Invest Clin 2013; 54(1): 47 - 57

Keywords: Wilson disease, *Drosophila melanogaster*, Motor activity, dopamine.

Abstract. Wilson disease is a hereditary disorder caused by mutations of the ATP7B gene, which leads to intoxication with copper as a result of an unbalance of copper homeostasis. The clinical manifestations resulting from this intoxication are related to the affectation of liver and the encephalon in most cases. Several animal models are currently available for the study of the malady. However, in such models no neurological symptoms are observed, which limits their use for the study of pathogenic effects of this disease on the central nervous system. The aim of the present study was to evaluate if copper feeding could induce a disease state in *Drosophila melanogaster* to model Wilson disease. The effect of the feeding of copper at the doses of 31 μM and 47 μM on the survival was initially evaluated. Next, behavioral experiments were conducted to determine whether the motor performance was altered by the 47 μM concentration. The results suggest that copper treatment decreases the viability of the flies. In addition, the decrease of viability was associated to an increase and decrease of spontaneous motor activity at early and late stages of the intoxication, respectively. Finally, the role of the dopaminergic neurotransmission system on the observed motor alterations was evaluated. The dopamine precursor L-dopa increased motor activity. In contrast, D2 receptor antagonist, Fluphenazine, was able to block both the increase and decrease of motor activity scores induced by copper. These results suggest that *Drosophila melanogaster* could be used as a model organism for the study of possible interventions with potential neuroprotective effects in Wilson disease.

Recibido: 23-11-2012. Aceptado: 13-02-2013

INTRODUCCIÓN

El cobre es un metal esencial para la función de diversas reacciones enzimáticas, por lo cual desempeña un papel importante en procesos biológicos tales como la formación del tejido conectivo, la homeostasis del hierro y la protección contra la acción de radicales libres como el anión superóxido (1). La enfermedad de Wilson es un trastorno del metabolismo del cobre caracterizado por la acumulación del metal principalmente a del hígado y del Sistema Nervio-

so Central. La etiología de la enfermedad está dada por la mutaciones en el gen ATP7B, perteneciente a la sub-familia P1B de las ATPasas tipo P (2-4). La ATP7B es altamente expresada en el hígado, donde cumple un papel importante en la excreción del cobre cuando los niveles intracelulares del metal son elevados (5, 6). Además, estudios recientes han demostrado la expresión de esta proteína en el cerebro de *Drosophila melanogaster* (7, 8). Dicha mutación se hereda con carácter recesivo, y se manifiesta como un desbalance de la homeostasis

del cobre debido a la excreción disminuida del metal. La manifestación clínica más frecuentemente observada durante las etapas iniciales es la enfermedad hepática en un 40% de los pacientes, mientras que un 35% de los afectados muestran inicialmente síntomas neurológicos, mientras que un 10% presenta síntomas psiquiátricos. Por otra parte, los síntomas neurológicos predominan en las etapas intermedias y avanzadas (9, 10).

El compromiso neurológico en la enfermedad de Wilson se manifiesta como disartria, distonia, temblores (11), mientras que los síntomas psiquiátricos comprenden depresión, síndrome esquizofrénico y un cuadro de confusión mental (11, 9). Los modelos animales de esta enfermedad son imprescindibles para la implementación de nuevos enfoques terapéuticos innovadores tales como la terapia génica. Hasta ahora se han caracterizado varios modelos genéticos de la enfermedad en ratones (12, 13) y en ratas (14, 15). Sin embargo, estos modelos animales no presentan las manifestaciones neurológicas de la enfermedad (16), lo cual limita su utilidad. Por lo tanto se hace necesario el desarrollo de modelos de la enfermedad que presenten dichas manifestaciones con la finalidad de poder evaluar el impacto de intervenciones con potencial terapéutico sobre el progreso de esta entidad nosológica. La *Drosophila melanogaster* es ampliamente utilizada en varias áreas de la investigación biomédica. De particular interés son los modelos de enfermedad neurológica como Parkinson (17-20), Alzheimer (21, 22), Ataxia de Friederics (23), Huntington (24-28) y síndrome del X frágil (29) desarrollados durante los últimos años. Las ventajas del uso de la *Drosophila melanogaster* como herramienta de estudio de estas enfermedades radica en que este organismo posee un sistema nervioso más simple que el de los mamíferos. Sin embargo, es capaz de realizar conductas motoras

complejas como caminar, trepar, volar, lo cual permite evaluar el funcionamiento neurológico (30).

La dopamina es un neuromodulador en el sistema nervioso central de los mamíferos. Numerosos estudios han demostrado que en el cerebro de la *Drosophila* adulta existen seis pares de núcleos de células dopaminérgicas (31-33). Además, se ha demostrado que de manera semejante a los mamíferos, este sistema neurotransmisor desempeña un papel importante como modulador del comportamiento motor en la *Drosophila*. De hecho, las alteraciones motoras observadas en modelos de la enfermedad de Parkinson, han sido asociadas a la degeneración o disfunción de las células dopaminérgicas (34).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la intoxicación con cobre en la sobrevivencia y en la actividad motora espontánea de la *Drosophila melanogaster*, con la finalidad de determinar la posibilidad de su empleo como modelo animal de la enfermedad de Wilson. Se observó una disminución de la viabilidad asociada con alteraciones de la actividad motora. Además, el tratamiento con los fármacos dopaminérgicos sugieren que dicho sistema neurotransmisor está involucrado en las alteraciones conductuales observadas. Estos resultados sugieren que la *Drosophila melanogaster* podría ser empleada como modelo para el estudio del componente neurológico de la enfermedad de Wilson así como de posibles intervenciones con potencial terapéutico en dicha enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizó la cepa Oregón de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Se tomaron inicialmente moscas machos y hembras jóvenes durante las primeras 12 horas después de su eclosión de las pupas y

mantenidas con un ciclo de 12 horas luz 12 horas oscuridad. Los ceparios fueron generados y las moscas se mantuvieron en un medio estándar a base de harina de maíz como se ha descrito previamente (35). En breve: 0,3 gramos de agar-agar, 5 gramos de harina de maíz, 1,5 gramos de levadura, 5 mL de una solución saturada de azúcar morena, se mezclaban con 43,5 mL de agua destilada. Una vez homogenizada, la mezcla era calentada hasta alcanzar el punto de ebullición. Luego se le agregaba 0,065 gramos de metil parahidroxibenzoato en 1 mL de etanol al 100%. Los ceparios fueron generados colocando unos 10 mL del medio de cultivo en frascos de vidrio y cerrados con tapones de algodón. El grupo control fue alimentado con medio de cultivo estándar mientras que a cada grupo tratado se le suplementó con una concentración de Sulfato de cobre (Sigma, USA) en el medio de 31 μM , o 47 μM en los experimentos correspondientes a la elaboración de la curva dosis respuesta. El cobre era disuelto en el medio justo antes de dispensar dichos medios en los tubos de cultivo. Cada 3 días las moscas se colocaron en tubos que contenían medio de cultivo fresco.

Determinación de parámetros poblacionales

Luego de emerger de la pupa las moscas fueron mantenidas por un período de 12 a 24 horas, en su cepario de origen antes de ser colocadas en números de cinco por tubos de ensayo, los cuales contenían 2 mL de medio de cultivo. La sobrevivida era evaluada de simultáneamente en un grupo control y un grupo experimental cada 3 días en el momento de transferirlas al medio de cultivo fresco. La sobrevivida se definió como el porcentaje de animales que permanecían vivos cada día en que se realizaba la observación. Las moscas se consideraron muertas cuando no se observaba ningún movimiento voluntario al estimularlas mecánicamente.

Actividad motora espontánea

Se midió la actividad motora espontánea de moscas elegidas al azar y colocadas individualmente en viales que contenían medio de cultivo fresco. Se utilizaron unos 30 animales por grupo y se midió la actividad motora espontánea por 24 horas utilizando un monitor de actividad para *Drosophila* (DAM 2 Trikinetics) utilizando intervalos de medición de 5 minutos. Las moscas eran colocadas individualmente en tubos que contenían medio de cultivo estándar o suplementado con cobre y/u otros fármacos en un extremo, mientras que un tapón de algodón colocado en el extremo opuesto permitía el intercambio de gases. La concentración utilizada de los fármacos fue 200 μM para la flufenazina (Sigma, USA) y 1 mg/mL para la l-dopa (Sigma, USA). El tratamiento con dichos fármacos fue iniciado el día 1 de edad y mantenido durante todo el experimento. Los estudios de actividad motora fueron realizados en condiciones controladas con una temperatura ambiente de 25°C y 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los datos eran almacenados en una hoja de cálculo para su análisis y se determinaba la actividad promedio dividiendo el número total de movimientos entre el número de intervalos de 5 minutos (288) registrados durante las 24 horas de observación.

El análisis de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad software. Para la determinación de la diferencia significativa entre los grupos se utilizó la prueba *log rank test* basado en el chi cuadrado. Se realizaron análisis de varianza, seguidos de la prueba de Dunns para la comparación de los parámetros de longevidad entre los grupos. Se fijó la significancia estadística con una $p < 0,05$. Los datos de actividad motora representados en la Fig. 2 fueron analizados por medio de un ANOVA de medidas repetidas y los datos correspondientes al estudio del efecto de los fármacos dopaminérgicos empleando el ANOVA de dos vías.

RESULTADOS

En el presente estudio, el tratamiento con cobre a las dosis de 31 μM y 47 μM en el medio de cultivo disminuyó significativamente la viabilidad de las moscas (Fig. 1A). La comparación de las curvas de supervivencia (prueba de Mantel-Cox) de los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control arrojó diferencias significativas tanto del grupo tratado con 47 μM ($p < 0,0145$, Chi cuadrado 10,54) como del grupo tratado con 31 μM $\mu\text{g/mL}$ de cobre ($p < 0,0013$, Chi cuadrada 10,33). La mediana de la supervivencia fue de 42 días en el grupo control, mientras que los grupos tratados con 47 μM y 31 μM de cobre fue de 35 y 21 días respectivamente.

El análisis de varianza de una vía reveló diferencias significativas entre la supervivencia promedio de los grupos tratados con 47 μM y 31 μM de cobre ($29,43 \pm 1,47 \mu\text{M}$ y $25,99 \pm 1,66$ respectivamente) con respecto al grupo control ($37,20 \pm 1,39$ días). La diferencia entre ambos grupos tratados con cobre no alcanzó significancia estadística.

Efecto de la exposición al cobre sobre la vitalidad de la *Drosophila melanogaster*

Como se observa en la Fig. 2, el tratamiento con una dosis de 47 μM de cobre indujo una respuesta bifásica en los registros de actividad motora. Las moscas intoxicadas con cobre mostraron un incremento de la actividad motora en las etapas iniciales (día 2 y día 8: $p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente) de la intoxicación y una disminución en etapas posteriores (día 10 al día 20 $p < 0,05$ en todos los casos).

Los cambios en la actividad motora espontánea inducidos por cobre son mediados por el sistema de neurotransmisión dopaminérgico

Para determinar si las alteraciones motoras observadas en las moscas tratadas con

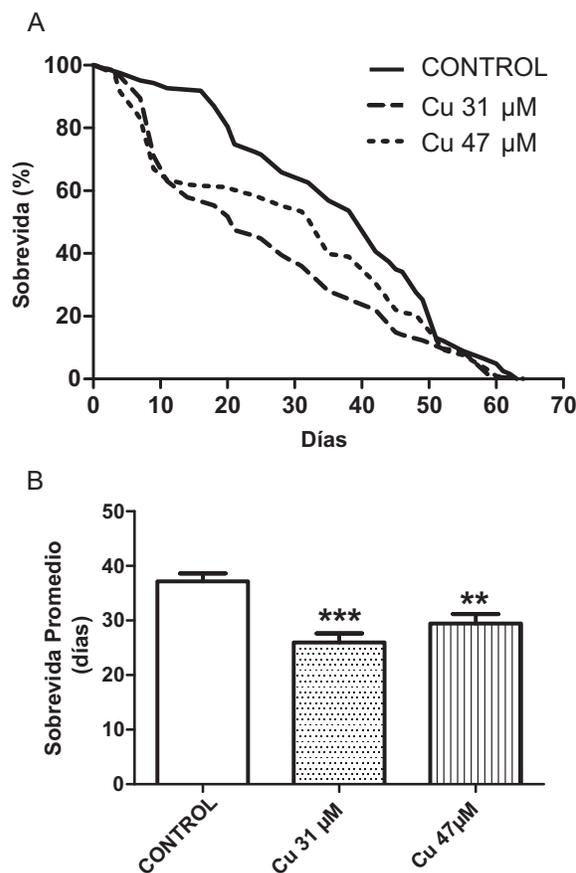


Fig. 1. Efecto del tratamiento con cobre en la supervivencia de *Drosophila melanogaster*. A) Curva de supervivencia de *Drosophila* alimentada con medio de cultivo estándar o suplementado con 31 μM o 47 μM de cobre. B) Efecto del tratamiento con cobre en la supervivencia promedio. *** ($p < 0,001$ Cu 31 μM vs el grupo control), ** ($p < 0,01$ Cu 47 μM vs el grupo control).

cobre eran mediados por cambios en la neurotransmisión dopaminérgica, se evaluó el desempeño motor de moscas intoxicadas con una dosis de 47 μM de cobre y tratadas con ligandos de los receptores dopaminérgicos. Se realizaron registros de la actividad motora los días 2, 8, 10, 14 y 20. Se observó un aumento significativo de la actividad motora en las moscas tratadas con cobre luego de 2 y 8 días de iniciado el tratamiento. El precursor de la dopamina, l-dopa, in-

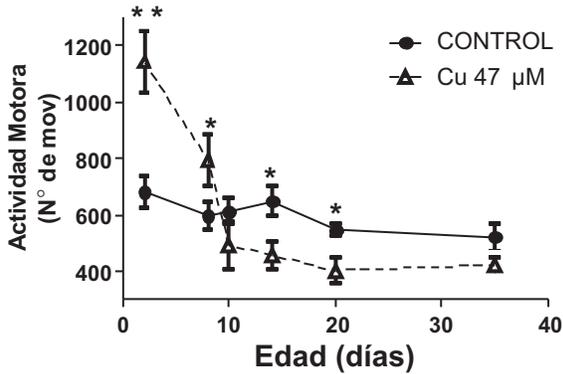


Fig. 2. Alteraciones motoras inducidas por el tratamiento con cobre en *Drosophila melanogaster*. ** p<0,001 con respecto al grupo control, * p< 0,05 con respecto al grupo control.

dujo un aumento significativo y de similar magnitud al aumento inducido por el cobre. Por otra parte, el antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos D2, flufenazina, impidió el aumento de la actividad motora inducido por el tratamiento con cobre y con l-dopa. A partir del día 10 de intoxicación con cobre se observó un cambio de fase en los registros de actividad motora, ya que el cobre comenzó a inducir una disminución progresiva de los registros de actividad, que alcanzó la significancia estadística los días 14 y 20. La l-dopa aumentó la actividad los días 10, 14 y 20. Por su parte, el

antagonista de los receptores D2 bloqueó el aumento de actividad inducido por la l-dopa los días 10 y 14, pero no el día 20.

DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos demostrado que la exposición a niveles elevados de cobre en el medio de cultivo de la *Drosophila melanogaster* fue capaz de inducir enfermedad en las moscas tratadas, ya que se observó una disminución significativa de la sobrevivencia. Hasta donde sabemos, este estudio es el primero que intenta generar un modelo de la enfermedad de Wilson en *Drosophila*. Estudios previos han demostrado la utilidad de este organismo en el desarrollo de modelos de enfermedades neurológicas (17-29). De especial interés es el estudio de Bonilla-Ramírez y col. (20), quienes intoxicaron las moscas con varias concentraciones de cobre de manera aguda y crónica. Nuestros resultados concuerdan con los resultados obtenidos por dichos autores. En su trabajo Bonilla-Ramírez y col demuestran que la intoxicación con cobre, hierro y manganeso es capaz de inducir mortalidad y una disminución del desempeño motor en la prueba de geotaxis. Además, dichos autores demuestran la reducción del número de

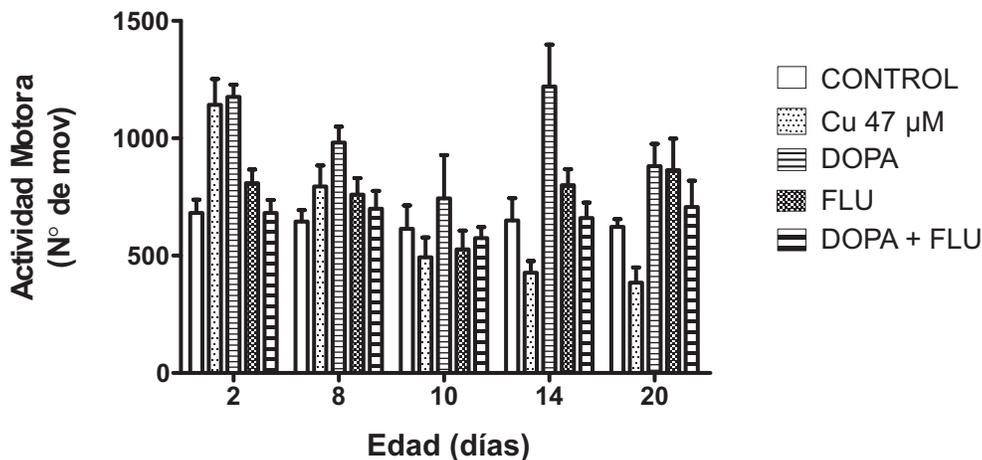


Fig. 3. Efecto del sistema dopaminérgico sobre las alteraciones motoras inducidas por el tratamiento con cobre en *Drosophila melanogaster*.

células dopaminérgicas en algunos núcleos del cerebro de las moscas intoxicadas. Es importante destacar que las dosis utilizadas por nosotros son aproximadamente diez veces menores que las dosis utilizadas por Bonilla-Ramírez y col. (20) en su esquema de tratamiento crónico, ya que dichos autores utilizaron concentraciones de 0,5 y 1 mM, mientras que nosotros utilizamos 31 μM y 47 μM .

Es nuestro estudio fue sorprendente el hecho de observar una mayor mortalidad con la menor dosis de cobre en las etapas intermedias de la intoxicación. Podemos especular al menos dos mecanismos que permitirían explicar esta observación. Primero, es posible que la concentración de 47 μM de cobre sea capaz de inducir mecanismos de defensa contra la toxicidad del metal que no son activados por la concentración de 31 μM . Uno de los mecanismos de defensa más importante contra la toxicidad por cobre y otros metales lo representan las metalotieninas. Las metalotieninas son proteínas de bajo peso molecular con la capacidad de fijar 9 iones de cobre cada molécula. En los mamíferos se ha demostrado que la expresión de estas proteínas es inducida en presencia de cantidades elevadas del metal, mediada por su unión a un elemento de respuesta en la región promotora de los genes de las metalotieninas. En *Drosophila melanogaster* se han identificado cuatro metalotieninas (36-38). Es posible que a una concentración de 47 μM el cobre sea capaz de inducir la expresión de las metalotieninas, mientras que la concentración de 31 μM no estimula la expresión de dichas proteínas. En este sentido, al aumentar la expresión de las metalotieninas, una menor cantidad de iones de cobre estaría libre para ocasionar daño celular a pesar de haber una mayor ingesta del metal. Consecuentemente, este menor daño celular se reflejaría en una menor letalidad de manera transitoria. Estudios previos han demostrado que las

metalotieninas tienen la capacidad de permitir la acumulación de grandes cantidades de cobre en el citosol. Sin embargo, se desconoce si esos depósitos del metal son intercambiables y si son activos. Más importante aún, dichos estudios indican que no existe una correlación directa entre la severidad de la enfermedad y las concentraciones de cobre en el tejido (39-41). Una observación interesante del estudio de Bonilla-Ramírez y col. (20) es el hecho de que dicho autores determinaron que la cantidad de cobre en la cabeza de las moscas intoxicadas aumentó 68 veces luego de 48 horas de tratamiento, pero disminuyó significativamente a los diez días. Este hallazgo sugiere la puesta en marcha de mecanismos compensatorios frente a la exposición al metal. En futuros estudios esperamos determinar, cuál es el efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de cobre sobre la expresión de estas proteínas, las cuales representan un mecanismo de defensa importante contra la toxicidad por metales en la *Drosophila* así como en los mamíferos. Se conoce que los metales pesados como el cobre tienen como uno de los blancos principales de su acción tóxica a las mitocondrias. Sin embargo, los mecanismos por medio de los cuales estos metales causan alteraciones mitocondriales no han sido esclarecidos. Varios estudios sugieren que las disfunciones mitocondrial y la generación de radicales libres desempeñan un papel importante en la citotoxicidad de metales como el cadmio, el mercurio y el cobre (42, 43). El estudio de la funcionalidad mitocondrial así como el estatus oxidativo durante la intoxicación con cobre es un aspecto importante a evaluar en próximos experimentos.

Además el mencionado tratamiento indujo alteraciones de la actividad motora espontánea. Estos resultados nos permiten proponer el uso de la *Drosophila melanogaster* como un posible modelo animal de la

enfermedad de Wilson. Son diversos los modelos de enfermedades neurológicas, cardiovasculares, inflamatorias, y cáncer desarrollados hasta ahora en la *Drosophila melanogaster*, como se discute en varias revisiones actuales de la literatura (44-46). Los modelos de enfermedad neurológica hacen uso generalmente, de los parámetros de longevidad y de la actividad motora como indicadores de enfermedad y del compromiso neurológico en los mismos.

En el presente estudio se observó una disminución de la sobrevivencia de las moscas tratadas con cobre. Esta observación sugiere que el modelo propuesto podría ser útil para el estudio de los eventos moleculares tempranos en desarrollo del proceso de enfermedad de Wilson y del ensayo de diferentes estrategias terapéuticas aprovechando de esta manera las ventajas que ofrece este organismo modelo.

La *Drosophila melanogaster* tiene varias ventajas como modelo animal para el estudio de enfermedades neurológicas. Una ventaja lo representa el poseer un sistema nervioso central más sencillo en comparación con organismos como los roedores. Su ciclo de vida corto permite el análisis de diversas intervenciones de manera rápida. Por otra parte, la disponibilidad en la *Drosophila* de pruebas conductuales tales como la actividad motora espontánea y la prueba de géotaxis permiten evaluar el funcionamiento neurológico. Es importante destacar en este sentido que de manera similar a los roedores y los humanos, la *Drosophila* posee un sistema de neurotransmisión dopaminérgico encargado del control de la función motora (33, 49, 50). Estudios realizados en modelos de la enfermedad de Parkinson han demostrado que la afectación de las células dopaminérgicas en el cerebro de la *Drosophila* está relacionada con alteraciones de la actividad motora espontánea y del desempeño en la prueba de géotaxis.

Por otra parte, nosotros nos propusimos evaluar el papel del sistema dopaminérgico en las alteraciones conductuales observadas. Es interesante el hallazgo de que el bloqueo del mencionado sistema neurotransmisor por medio del antagonista de los receptores dopaminérgicos D2, flufenazina, impidió las alteraciones conductuales tanto de las etapas tempranas de la intoxicación como las de etapas más avanzadas del modelo. La *Drosophila melanogaster* es un sistema modelo válido para el estudio de la neurobiología de la señalización dopaminérgica. Por ejemplo, otros autores han demostrado la similitud entre la *Drosophila* y los mamíferos en cuanto a la regulación por agonistas y antagonistas de los receptores D2 (51).

Es importante resaltar que el modelo propuesto es sin duda preliminar y se requieren estudios posteriores para una caracterización más completa del mismo. Experimentos posteriores deberán cuantificar la acumulación del metal en los tejidos de la mosca. Adicionalmente, es importante evaluar si en las condiciones propuestas ocurren alteraciones en los núcleos cerebrales involucrados en el comportamiento motor de la *Drosophila*. Finalmente, la identificación de los mecanismos celulares y moleculares responsables de la disminución de la longevidad y del desarrollo de las alteraciones motoras permitirá el ensayo de intervenciones con potencial neuroprotector en esta enfermedad.

REFERENCIAS

1. **Tapiero H, Townsend DM, Tew KD.** Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother* 2003; 57(9):386-398.
2. **Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW.** The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993; 5(4):327-337.

3. **Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, Brzustowicz LM, Cayanis E, Vitale E, Russo JJ.** Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet* 1993; 5(4):338-343.
4. **Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM.** The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993; 5(4):344-331.
5. **Lalioti V, Muruais G, Tsuchiya Y, Pulido D, Sandoval IV.** Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Front Biosci* 2009; 14:4878-4903.
6. **La Fontaine S, Mercier JF.** Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 2007; 463 (2): 149-167.
7. **Burke R, Commons E, Camakaris J.** Expression and localisation of the essential copper transporter DmATP7 in *Drosophila* neuronal and intestinal tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(9):1831-1860.
8. **Sellami A, Wegener C, Veenstra JA.** Functional significance of the copper transporter ATP7 in peptidergic neurons and endocrine cells in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 2012; 586(20): 3633-3638
9. **El-Youssef M.** Wilson disease. *Mayo Clin. Proc* 2003; 78:1126-1136.
10. **Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W.** Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut* 2007; 56: 115-120.
11. **Lorincz MT.** Neurologic Wilson disease. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1184:173-187.
12. **Theophilos MB, Cox DW, Mercier JF.** The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease. *Hum Mol Genet* 1996; 5 (10): 1619-1624.
13. **Buiakova XJ, Xu J, Lutsenko S, Zeitlin S, Das K, Das S, Ross BM, Mekios C, Scheinberg IH, Gilliam TC.** Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation. *Hum Mol Genet* 1999; 8 (9):1665-1671.
14. **Terada K, Sugiyama T.** The long-Evans Cinnamon rat: an animal model for Wilson's disease. *Pediatr Int* 1999; 41(4):414-418.
15. **Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeishi N, Kobayashi H, Kojima Y, Une Y, Uchino J.** Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. A model of Wilson's disease. *J Clin Invest* 1991; 87(5):1858-1861.
16. **Vonk WI, Wijmenga C, van de Sluis B.** Relevance of animal models for understanding mammalian copper homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(3): 840S-845S.
17. **Feany MB, Bender WW.** A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 2000; 404(6776): 394-3898.
18. **Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SH, Hay BA, Guo M.** *Drosophila* PINK1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with Parkin. *Nature* 2006; 441(7097): 1162-1166.
19. **Greene JC, Witworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck MJ.** Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* Parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(7): 4078-4083.
20. **Bonilla-Ramirez L, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C.** Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism. *Biometal* 2011; 24(6):1045-1057.
21. **Iijima K, Liu H, Chiang A, Hearn S, Konsolaki M, Zhong Y.** Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(17): 6623-6628.
22. **Chakraborty R, Vepuri V, Chakraborty R, Vepuri V, Mhatre SD, Paddock BE, Miller S, Michelson SJ, Delvadia R, Desai A, Vinokur M, Melicharek DJ, Utreja S, Khandelwal P, Ansaloni S, Goldstein LE, Moir RD, Lee JC, Tabb LP, Saunders AJ,**

- Marenda DR. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects. PLoS One 2011; e20799: 1-13.
23. Llorens N, Navarro JA, Martínez-Sebastián MJ, Baylies MK, Schneuwly S, Botella JA, Moltó MD. Causative role of oxidative stress in a *Drosophila* model of Friedreich ataxia. FASEB J 2007; 21(2):333-344.
 24. Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, McDonald ME, Zipursky SL. Polyglutamine-expanded human Huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. Neuron 1998; 21(3): 633-642.
 25. Lee WC, Yoshihara M, Litleton JT. Cytoplasmic aggregate traps polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(9):3224-3229.
 26. Agrawal N, Pallos J, Slepko N, Apostol BL, Bodai L, Chang LW, Chiang AS, Thompson LM, Marsh JL. Identification of combinatorial drug regimens for treatment of Huntington's disease using *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 3777-3781.
 27. Wolfgang WJ, Miller TW, Webster JM, Huston JS, Thompson LM, Marsh JL, Messer, A. Suppression of Huntington's disease pathology in *Drosophila* by human single-chain Fv antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:11563-11568.
 28. Nishimura Y, Yalgın C, Akimoto S, Doumanis J, Sasajima R, Nukina N, Miyakawa H, Moore AW, Morimoto T. Selection of behavior and motor coordination during larval locomotion is disrupted by nuclear polyglutamine inclusions in a new *Drosophila* Huntington's disease-like model. J Neurogenet 2010; 24(4):194-206.
 29. Dockendorff TC, Su HS, McBride SM, Yang Z, Choi CH, Siwicki KK, Sehgal A, Jongens TA. *Drosophila* lacking *dfmr1* activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest. Neuron 2002; 34(6): 973-984.
 30. Ambegaokar SS, Roy B, Jackson GR. Neurodegenerative models in *Drosophila*: polyglutamine disorders, Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis 2010; 40(1): 29-39.
 31. Budnik, V, White, K. Catecholamine-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: distribution and development. J Comp Neurol 1988; 268: 400-413.
 32. Nässel, DR, Elekes, K. Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. Cell Tissue Res 1992; 267:147-167.
 33. Mao Z, Davis RL. Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. Front Neural Circuits 2009; 3: 5. Epub 2009 Jul 1.
 34. White KE, Humphrey DM y Hirth F. The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. Front Neurosci 2010; 4:1-12.
 35. Bonilla E, Medina-Leendertz S, Díaz S. Extension of lifespan and stress resistance of *Drosophila melanogaster* by long-term supplementation with melatonin. Exp Gerontol 2002; 37:629-638.
 36. Lastowskiperry D, Otto E, Maroni G. Nucleotide sequence and expression of a *Drosophila* metallothionein. J Biol Chem 1985; 260:1527-1530.
 37. Mokdad R, Debec A, Wegnez M. Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 2658-2662.
 38. Egli D, Selvaraj A, Yepiskoposyan H, Zhang B, Hafen E, Georgiev O, Schaffner W. Knockout of 'metal-responsive transcription factor' MTF-1 in *Drosophila* by homologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis. EMBO J 2003; 22(1):100-108.
 39. Huster D, Finegold MJ, Morgan CT, Burkhead JL, Nixon R, Vanderwerf SM, Gilliam CT, Lutsenko S. Consequences of copper accumulation in the livers of the ATP7b^{-/-} (Wilson disease gene) knockout mice. Am J Pathol 2006; 168(2): 423-434.
 40. Huster D, Purnat TD, Burkhead JL, Ralle M, Fiehn O, Stuckert F, Olson NE,

- Teupser D, Lutsenko S.** High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease. *J Biol Chem* 2007; 282(11): 8343-8355.
41. **Pilloni L, Lecca S, Van Eyken P, Flore C, Demelia L, Pilleri G, Nurchi AM, Farci AM, Ambu R, Callea F, Faa G.** Value of histochemical stains for copper in the diagnosis of Wilson's disease. *Histopathology* 1998; 33(1):28-33.
42. **Belyaeva EA, Dymkowska D, Wiecekowi MR, Wojtezak L.** Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 231(1):34-42.
43. **Belyaeva EA, Korotkov SM, Saris NE.** In vitro modulation of heavy metal-induced rat liver mitochondria dysfunction: a comparison of copper and mercury with cadmium. *J Trace Elem Med Biol* 2011; 25 (Suppl) 1:S63-S73.
44. **Pandey UB, Nichols CD.** Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev* 2011; 63(2):411-436.
45. **Roeder T, Isermann K, Kallsen K, Uliczka K, Wagner C.** A *Drosophila* asthma model-what the fly tells us about inflammatory diseases of the lung. *Adv Exp Med Biol* 2012; 710:37-47.
46. **Rincon-Limas DE, Jensen K, Fernandez-Funez P.** *Drosophila* models of proteinopathies: the little fly that could. *Curr Pharm Des* 2012; 18(8):1108-1122.
47. **Qian L, Bodmer R.** Probing the polygenic basis of cardiomyopathies in *Drosophila*. *J Cell Mol Med* 2012; 16(5):972-977.
48. **Rudrapatna VA, Cagan RL, Das TK.** *Drosophila* cancer models. *Dev Dyn* 2012; 241(1):107-118.
49. **Yellman C, Tao H, He B, Hirsh J.** Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proc Nat. Acad Sci USA* 1997; 94(8):4131-4136.
50. **Monastirioti M.** Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc Res Tech* 1999; 45(2):106-121.
51. **Vickrey TL, Venton BJ.** *Drosophila* dopamine2-like receptors function as autoreceptors. *ACS Chem Neurosci* 2011; 2(12):723-729.