



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO BASADO EN PCR
CUANTITATIVO PARA DETERMINAR LA PERDIDA DE
NEURONAS DOPAMINÉRGICAS EN *DROSOPHILA*
MELANOGASTER

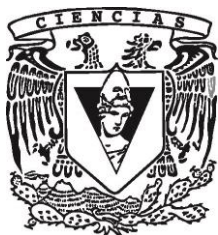
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LUIS ANGEL CARVAJAL OLIVEROS



Director de tesis: Dr. Enrique Alejandro Reynaud
Garza.

Ciudad Universitaria, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1.- DATOS DEL ALUMNO

CARVAJAL
OLIVEROS
LUIS ANGEL
5519233943
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA
306001509

2.- DATOS DE TUTOR

Dr.
ENRIQUE
ALEJANDRO
REYNAUD
GARZA

3.- DATOS DEL SINODAL 1

Dra.
PATRICIA
RAMOS
MORALES

4.- DATOS DEL SINODAL 2

Dra.
LEONOR
PÉREZ
MARTÍNEZ

5.- DATOS DEL SINODAL 3

M. en IBB.
GUSTAVO
JESÚS
ORTEGA
LULE

6.- DATOS DEL SINODAL 4

M. en C.
YANELI
TRUJILLO
VARELA

7.- DATOS DE TRABAJO ESCRITO

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO BASADO EN PCR CUANTITATIVO PARA DETERMINAR LA PERDIDA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

71 pp.

*“Lo bonito de aprender algo, es que
nadie te lo puede arrebatarse”.*

Palabras de Blanca Estela Oliveros Navarro, mi madre.

*“No huyo de un reto porque tenga miedo; al contrario,
corro hacia el reto, porque la única forma de escapar al
miedo es arrollarlo con tus pies... Trabajar duro me ha facilitado
las cosas, ese es mi secreto, la razón por la que gano”.*

Nadia Comăneeci, exgimnasta rumana.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecer antes que nada, a la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de esta gran institución, a la Facultad de Ciencias, por haberme brindado la posibilidad de desarrollarme como estudiante y futuro profesional, a todos mis profesores, por guiarme en el proceso y por hacer sólidas las bases que como futuro biólogo debo tener, y al Instituto de Biotecnología, por aceptarme como un miembro más de tan magnífica comunidad.

Al Dr. José Luis Puente García, investigador del IBt y titular del taller "*La biología a partir de las biomoléculas; nuevos paradigmas y aplicaciones*", así como también a todos los investigadores involucrados en él.

A los miembros del jurado, por permitirse el tiempo necesario para la revisión de esta tesis.

Al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada, en especial, al M. en C. Andrés Saralegui Amaro, por su ayuda en el manejo del microscopio confocal y toma de fotografías.

A la Unidad de síntesis y secuenciación de DNA del IBt, lugar donde se sintetizaron los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

A mi tutor, Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza, por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Veronica Narvaez Padilla por compartir conmigo su conocimiento acerca de los qPCRs y seguir aprendiendo juntos.

Al M. en C. René Hernández Vargas supervisor técnico de este trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio del Dr. Enrique Reynaud, así como del laboratorio del Dr. Mario Zurita.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A mi familia:

A mi madre, la persona que siempre ha estado conmigo, mi ejemplo de nunca rendirse ante nada, de que todo en la vida con perseverancia y voluntad se puede lograr, le agradezco el haberme dado la vida, el negarse ella misma las cosas para que a sus hijos nunca les faltara nada, sin ti nada de esto hubiera sido posible, jamás te acabaré de pagar todo lo que me has dado, pero ante todo te agradezco el haber soportado mi enojo y mi mal carácter, siempre estuviste ahí a pesar de mis malas contestaciones y desplantes, gracias a ti lo logré.

A mi padre, persona de pocas palabras, pero que cuando las utiliza siempre tiene comentarios acertados y llenos de razón, gracias por creer siempre en mí, por siempre alentarme a dar lo mejor de mí mismo, por nunca dejar que me rindiese en el camino gracias por hacerme creer que puedo ser mejor de lo que soy, te agradezco la confianza que siempre depositaste en mí.

A mi hermano, gracias por siempre preocuparte por mí aunque no lo demuestres directamente, por esos consejos que aunque a veces no son de mi agrado suelen ser los mejores, porque siempre has creído en mis capacidades, gracias por ser mi hermano.

A mi abuela Leonor, que nunca me ha dejado de ver como su “nietecito”, que a pesar de la distancia siempre está al pendiente de mí, porque desde pequeño siempre supo que yo podría llegar a ser alguien importante y nunca se ha cansado de decírmelo.

A Angélica Salazar y Jair Fragoso, mi prima postiza y mi confidente, mis mejores malos ejemplos, mis némesis, ha sido un placer el compartir todo este proceso con ustedes, a pesar de la distancia hemos permanecido juntos, gracias por su amistad y porque a pesar de conocerme a fondo decidieron seguir conmigo, no son amigos, ustedes son parte de mi familia.

A todos los amo, gracias por estar todo este camino a mi lado...

A mis amigos:

A Jorge Ochoa, *Coquin*, ya se han agotado las palabras para decirte lo importante que eres para mí, agradezco el haber conocido a alguien como tú, doy gracias a la vida por permitirme encontrarte en el camino, cada palabra, cada risa, cada pelea que he compartido contigo me han enseñado lecciones valiosas. Gracias por el tiempo en el cual nunca me dejaste solo, por la confianza que me brindaste, para mí tendrás un lugar importante en mi vida, nunca olvides que siempre tendrás un lugar al cual regresar, tú sabes todo lo que significas para mí y espero algún día te des cuenta de ello.

A Benjamín Hernández, fuiste la persona que más sufrió al soportarme durante el desarrollo de mi tesis, soportaste mis enojos, tristezas, mi estrés, desesperación, pero también mis alegrías, siempre estuviste a mi lado motivándome y creyendo en mí, agradezco tu compañía, por preocuparte por mí, eres un gran amigo, hemos pasado también malos momentos pero sabes que ante todo siempre te ofreceré mi amistad y sé que cuento con la tuya.

A Karla Meza, Laura Jiménez, Paola Vargas y Elisa Medrano siempre haciéndome ver el lado divertido de las cosas, permitiéndome alejarme un poco del trabajo, siempre echando el chisme.

A Julio Orozco, mi chocolatero favorito, Karen Mendoza, mi hermana pollo ruda, e Iliana Alcalá, la ñoña del grupo, gracias por ser mis amigos, por sufrir junto conmigo el camino a ser un biólogo, por compartir conmigo lo difícil pero fabulosa que puede llegar a ser esta hermosa carrera.

A Erick Pérez y Jorge Landgrave, siempre molestándome, fue un placer compartir poco más de un año con ustedes, con sus locuras, les agradezco el que nunca me dejaron rendir, el que siempre se preocuparon por mí, dándome un abrazo o un golpe cuando lo necesite, les deseo mucha suerte en el camino por venir.

A Luis Chávez, mucho nos hemos distanciado, gracias por el tiempo que estuviste a mi lado, nunca te olvidaré, las circunstancias decidieron que no siguiéramos juntos, pero nunca dejarás de ser parte importante de mi vida.

A Omar Regalado, un fabuloso amigo que tuve la oportunidad de conocer, gracias por la confianza depositada en mí y por escuchar mis penas, algún día seguiré tus consejos, a Daniela Domínguez, por los chismes de madrugada, Andrés Mejía, mi ñoño favorito, Adriana Naranjo, mi amiga loca de secundaria, Angélica Pedroza, mi madre postiza y Cecilia Rojas, “Chikirriyo”, mi hermana ardilla, y a todos los demás que por falta de espacio no mencione, pero que no dejan de ser importantes.

A Carmen Muñoz, René Hernández, Iván Fernández, Iván Sánchez “Tepoz” y Fernando Rosales, gracias por siempre apoyarme en el laboratorio, por sus regaños y consejos que siempre fueron de mucha ayuda.

Por último, a todos lo que no creyeron en mí también les agradezco, porque gracias a ustedes me motive y lo logré, y les puedo decir ahora, “aquí está el fruto de todo mi trabajo, en el cual nunca creyeron”.

GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE.

| | |
|--|----|
| Abreviaturas..... | 8 |
| Índice de figuras..... | 9 |
| I. Resumen..... | 10 |
| II. Abstract..... | 12 |
| III. Introducción..... | 13 |
| III.I La Enfermedad de Parkinson..... | 14 |
| III.II Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson..... | 16 |
| III.III Causas de la Enfermedad de Parkinson..... | 20 |
| III.IV Cuerpos de Lewy..... | 22 |
| III.V α -Sinucleína..... | 24 |
| III.VI Sinfilina y su interacción con α -sin..... | 27 |
| III.VII Tirosina hidroxilasa..... | 27 |
| III.VIII. Drosophila melanogaster como modelo de la Enfermedad de Parkinson..... | 28 |
| IV. Antecedentes..... | 31 |
| V. Justificación..... | 32 |
| VI. Hipótesis..... | 33 |
| VII. Objetivos..... | 33 |
| VIII. Materiales y métodos..... | 34 |
| IX. Resultados..... | 39 |
| X. Discusión..... | 49 |
| XI. Conclusiones..... | 53 |
| XII. Perspectivas..... | 54 |
| XIII. Referencias..... | 55 |
| XIV. Referencias electrónicas..... | 60 |
| XV. Anexos..... | 61 |

Abreviaturas.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
EP: Enfermedad de Parkinson.
SNC: Sistema Nervioso Central.
EA: Enfermedad de Alzheimer.
SSA: Secretaría de Salud.
L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina.
DA: Dopamina.
UPS: Sistema de Ubiquitinación del Proteosoma.
PARK: Parkina.
UCHL1: Ubiquin carboxil-terminal hidrolasa L1
MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1.2.3.4-tetrahydropyridine
SRO: Sustancias Reactivas de Oxígeno.
CL: Cuerpos de Lewy.
6-OHDA: 6-hidroxidopamina.
SNCAIP: Synuclein Interacting Protein.
 α -Sin: α -Sinucleína.
Synf. Sinfilina.
TH: Tirosina Hidroxilasa.
DTH: Drosophila Tyrosine Hidroxilase.
UAS: Upstream Activating Sequence.
cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementario.
RNA: Ácido Ribonucleico.
DNA: Ácido Desoxirribonucleico.
BABB: Alcohol Bencílico/Bencíl Benzoato.
SeeDB: See Deep Brain.
GFP: Proteína Verde Fluorescente.
CFP: Proteína Cian Fluorescente.
RFP: Proteína Rojo Fluorescente.

Lista de figuras.

Fig. 1. Prevalencia de la enfermedad de Parkinson en algunas regiones principales del mundo.

Fig. 2. Incidencia de la EP en algunas principales regiones del mundo.

Fig. 3. Síntesis de Dopamina.

Fig. 4. Supervivencia de moscas alimentadas con curcumina.

Fig. 5. Genes y Parkinson.

Fig. 6. Cuerpos de Lewy.

Fig. 7. α -Sinucleína.

Fig. 8. Conformaciones de la proteína α -Sin y algunas de sus modificaciones relacionadas con la EP.

Fig. 9. Comparación de cerebros de moscas de 30 días de edad.

Fig. 10. Tirosina Hidroxilasa de *Drosophila melanogaster*.

Fig. 11. Neuronas dopaminérgicas y supervivencia en moscas.

Fig. 12. Moscas experimentales.

Fig. 13. Moscas tratadas con peróxido de hidrogeno.

Fig. 14. Moscas tratadas con los diferentes métodos de transparentación.

Fig. 15. Ganglio torácico abdominal.

Fig. 16. Autofluorescencia de la cutícula.

Fig. 17. Cerebros de las diferentes líneas transgénicas.

Fig. 18. Muerte neuronal en las diferentes líneas.

Fig. 19. La interacción de α -Sin con Synf, protege de la toxicidad dada por Synf.

Fig. 20. Expresión del gen *DTH*.

Fig. 21. Expresión del gen *SNCA*.

Fig. 22. Expresión del gen *SNCAIP*.

Fig. 23. Músculos de la proboscis en *D. melanogaster*.

Tabla 1. Principales genes asociados con la Enfermedad de Parkinson.

I. RESUMEN.

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente a nivel mundial, tan solo por detrás de la enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad progresiva se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra pars compacta* y por la formación de inclusiones proteicas llamadas cuerpos de Lewy.

En los cuerpos de Lewy se ha identificado la presencia de α -Sinucleína, la cual es capaz de interactuar consigo misma formando oligómeros y agregados amiloides, además se ha demostrado que existen alelos dominantes de este gen que causan la enfermedad de Parkinson, siendo así uno de los principales factores involucrados en la patogénesis de la enfermedad.

Sinfilina es otra proteína que interacciona directamente con α -Sinucleína, que se enriquece en los cuerpos de Lewy y que también está involucrada en el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, se demostró en modelos animales que cuando la α -Sinucleína o la Sinfilina se expresan independientemente son neurotóxicas y promueven la muerte de neuronas dopaminérgicas mientras que su coexpresión inhibe su neurotoxicidad y aparentemente induce la agregación de α -sinucleína en los cuerpos de Lewy, lo que parece impedir la formación de oligómeros tóxicos.

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, se ha utilizado como modelo de estudio de la enfermedad de Parkinson utilizando al sistema *GAL4/UAS*, con el cual es posible expresar de manera específica en las neuronas dopaminérgicas de *D. melanogaster* los genes humanos *SNCA* y *SNCAIP* que codifican para α -Sinucleína y Sinfilina, respectivamente.

Para determinar el ritmo de pérdida de neuronas dopaminérgicas causada por la neurotoxicidad de *SNCA* y *SNCAIP* y la supresión de este fenotipo cuando se co-expresan en las neuronas, se determinaron los niveles de expresión de ambos genes utilizando reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real muestreando distintos puntos en una curva de envejecimiento de moscas adultas, esto se correlacionó con la cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas marcadas con proteína verde fluorescente y con la expresión del gen de la Tirosina Hidroxilasa, que es un marcador específico de este tipo neuronal.

Simultáneamente, se intentó estandarizar un método de transparentación de la cutícula para observar células dopaminérgicas utilizando técnicas de microscopía con varios protocolos utilizados en tejidos de ratón, esto hubiera evitado la necesidad de disectar el sistema nervioso central de las moscas; si bien la transparentación de la cutícula con estos métodos fue un éxito, la fluorescencia de la proteína verde fluorescente no sobrevive a este tratamiento.

Este trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, dentro del departamento de Genética del desarrollo y fisiología molecular, bajo la dirección del Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza y la supervisión técnica del M. en B. René Hernández Vargas.

II. ABSTRACT.

Parkinson's disease is the second most frequent neurodegenerative disease worldwide, only behind Alzheimer's disease. Parkinson's disease is a progressive disease characterized by the loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta*, and by the formation of protein inclusions called Lewy bodies.

The presence of α -Synuclein, in the Lewy bodies is characteristic of Parkinson disease. α -Synuclein is a protein capable of interacting with itself forming oligomers and amyloid aggregates. In this sense, this protein is one of the main factors involved in the pathogenesis of Parkinson's disease.

Synphilin is another protein involved in the pathogenesis of Parkinson's disease, it is capable of interacting directly with α -Synuclein. Moreover, the expression of either α -Synuclein or Synphilin has been demonstrated to promote dopaminergic neuron death. However, when both proteins are expressed together, aggregation of α -Synuclein is promoted by Synphilin preventing the formation of toxic oligomers.

The fruit fly, *Drosophila melanogaster*, has been used as a model for the study of Parkinson's disease. The specific expression of the human genes, *SNCA* and *SNCAIP* that code for the α -Synuclein and Synphilin proteins respectively, has been achieved through the use of the *GAL4/UAS* system.

To determine the rate of dopaminergic neuron loss caused by the expression of these genes in the flies, real time polymerase chain reactions were performed in different age groups. After that, the correlation between the expression of both *SNCAIP* and *SNCA* and the death of dopaminergic neurons was assessed by counting the number of surviving dopaminergic cells marked with green fluorescent protein. These data were also correlated with the levels of expression of the Tyrosine Hydroxylase gene which is a specific dopaminergic neuron marker.

Simultaneously, a method of cuticle transparentation was standardized to observe dopaminergic cells thus eliminating the need of dissection and using microscopy techniques. We were able to make the flies fully transparent but unfortunately the *GFP* fluorescence was lost. This work was carried out at the Institute of Biotechnology, UNAM, within the Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology, under the direction of Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza, technical supervision of M.B. René Hernández.

III. INTRODUCCIÓN.

El número de pacientes con enfermedades neurodegenerativas en el mundo ha aumentado y continuará con esa tendencia, muchos países cuentan con un desarrollo tecnológico acelerado, brindando a sus poblaciones una mejor calidad de vida y por consecuencia un aumento en la esperanza de vida. Se sabe que el envejecimiento y la edad avanzada son factores de riesgo importantes en el desarrollo de cualquier enfermedad neurodegenerativa tal como la enfermedad de Parkinson; sin embargo existen como factores ambientales, epigenéticos y genéticos, que se ha visto también juegan un papel importante en el desarrollo de estas enfermedades.

A través de diversas investigaciones se ha tratado de elucidar las causas genéticas y fisiológicas que promueven la aparición de estas enfermedades, por lo que se han diseñado varios modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, que incluyen nematodos, ratones, perros, moscas, monos, cultivos celulares, etc., con los cuales se intenta simular los procesos que se han observado en pacientes humanos. Es importante mencionar, que para algunas enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de la enfermedad de Parkinson, existen modelos basados en distintos factores determinantes de esta enfermedad, de tal manera que se han desarrollado modelos que promueven la aparición de cuerpos de Lewy, la muerte de neuronas dopaminérgicas, la inhibición del sistema de ubiquitinación y la vía del proteosoma, o que pueden cambiar la expresión normal de un gen.

Dado que aún no se comprenden del todo las causas que promueven la aparición de estas enfermedades, encontrar una cura es sumamente complicado, de tal manera que los pacientes afectados solo reciben un tratamiento con el cual se tratan de frenar o retrasar los síntomas relacionados con ellas, buscando así minimizar el impacto que reciben en su vida cotidiana, cabe señalar que muchos de estos tratamientos eventualmente generan tolerancia, lo que disminuye su efectividad con el paso del tiempo, de manera que casi siempre son progresivas y mortales

Por estas razones es muy importante identificar los mecanismos moleculares que causan este tipo de enfermedades utilizando modelos experimentales ya que esta información nos permitirá identificar blancos moleculares para posibles drogas o tratamientos que inhiban los mecanismos patológicos de éstas.

En esta tesis se busca desarrollar un método basado en PCR en tiempo real que permita cuantificar a lo largo del tiempo la pérdida de neuronas

dopaminérgicas en *D. melanogaster*. Este protocolo nos permitirá evaluar la capacidad neuroprotectora o neurotóxica de distintas sustancias *in vivo* en un modelo parkinsoniano de la enfermedad de Parkinson de *D. melanogaster*, evitando la disección de sistemas nerviosos y ahorrando tiempo en el desarrollo de futuras investigaciones.

III.I La Enfermedad de Parkinson.

La Enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez por James Parkinson en el año de 1817, en el ensayo titulado “*An Essay on the Shaking Palsy*”; en donde se refiere a ella como “parálisis agitante”, describiéndola de esta manera:

Parálisis agitante (Paralysis Agitans).

“Movimiento trémulo involuntario, con reducción en la potencia muscular en ciertas partes, en la acción e incluso en el soporte; con tendencia a doblar el tronco hacia adelante y lentitud para pasar de caminar a correr; los sentidos y el intelecto parecen ilesos” (Parkinson, 1817).

En la actualidad, la EP se define como una enfermedad neurodegenerativa y progresiva del sistema nervioso central (SNC), que patológicamente se caracteriza por una degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra pars compacta* y el desarrollo de cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas residuales, así como una ligera mejoría en síntomas motores al utilizar levodopa (Gazewood, 2013); adicionalmente, es la enfermedad neurodegenerativa con mayor frecuencia que se caracterice por movimientos anormales, y en cuanto a trastornos neurodegenerativos ocupa el segundo lugar siendo la primera la enfermedad de Alzheimer (EA) (SSA, 2006). Se estima que la EP afecta cerca de 10 millones de personas a nivel mundial, con una incidencia de 160 por cada 100 000 habitantes (Samii, 2004), afectando así aproximadamente al 1% de la población mayor de 60 años y al 4% de la población mayor de 80 (Fig. 1). El pico de incidencia de la EP ocurre entre los 60 y 69 años de edad y sólo entre el 4 y 7% de los casos comienza antes de los 40 años, en cuyo caso se define como EP juvenil (de Lau, 2006, SSA, 2006). Además, es más prevalente en hombres que en mujeres, con ratios de 1.1:1 a casi 3:1 (Schrag, 2000).

En nuestro país no se tienen datos precisos sobre la cantidad de personas que sufren esta enfermedad, pero para el 2006, la Secretaria de Salud (SSA), estimaba que existían al menos 500 000 pacientes con la EP, aunque esta cifra se incrementa cada año debido al aumento de la esperanza de vida en la población mexicana. Por otro lado, gran parte de la población afectada proviene de áreas rurales, en donde el acceso a atención médica de calidad es limitado y los factores de riesgo asociados a la EP como el uso de pesticidas y el consumo de agua de pozo están presentes con mayor frecuencia (SSA, 2006).

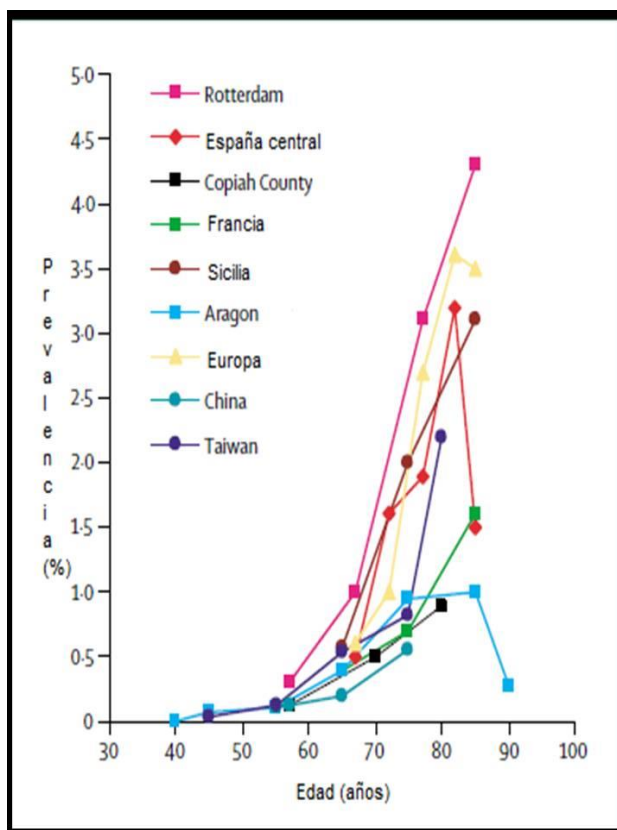


Fig. 1. Prevalencia de la enfermedad de Parkinson en algunas regiones principales del mundo. Se observa que en los países asiáticos existe una menor prevalencia de la enfermedad (Tomado y modificado de Lau, 2006).

Estudios realizados en países desarrollados sugieren una incidencia de 8 a 18 personas por cada 100 000 (de Lau, 2006), marcando así una gran diferencia en comparación con la incidencia que existe en países en desarrollo como México, ya que se estima que 50 de cada 100 000 habitantes mexicanos puede padecerla; aumento posiblemente debido al estilo de vida mexicano (Fig. 2) (INNN, 2010).

LA EP, es una patología con un alto grado de discapacidad funcional, familiar y social y tiene una profunda repercusión en los centros asistenciales por su cronicidad (SSA, 2006), ocasionando de esta manera problemas al tratar el desarrollo de la enfermedad y ofreciendo una mala o escasa atención a los pacientes que sufren la enfermedad en nuestro país. El gobierno de México contemplaba un programa específico de la EP, de los años 2001 a 2006, en donde se trataban ámbitos como prevención, diagnóstico, tratamiento continuo, falta de medicamentos, así como posibles investigaciones con ayuda de distintas universidades públicas e institutos gubernamentales (SSA, 2006), desafortunadamente no se le dio continuidad a este programa, por lo que actualmente solo existen algunos pocos centros hospitalarios donde se estudia y atiende a los pacientes.

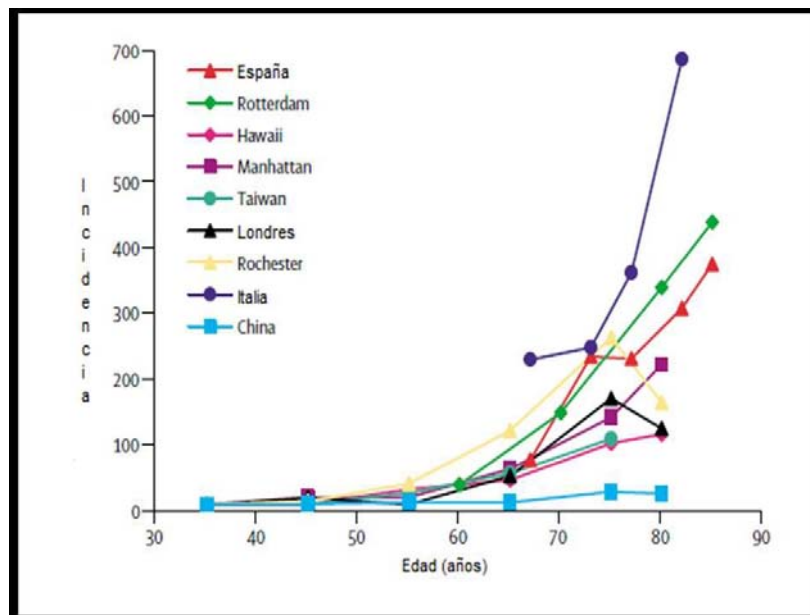


Fig. 2. Incidencia de la EP en algunas principales regiones del mundo. La incidencia se muestra como casos por cada 100 000 personas (Tomado y modificado de *de Lau, 2006*).

La EP no tiene cura, actualmente solo se atienden los síntomas relacionados con la enfermedad, se han tratado de desarrollar algunas técnicas invasivas para controlar los temblores involuntarios como la estimulación cerebral profunda, también se han desarrollado fármacos como la levodopa y carbidopa, pero que solo ofrecen una mejoría temporal, por esta razón es necesario encontrar la causa principal que da origen a la muerte de neuronas dopaminérgicas, para así desarrollar métodos que permitan frenar o eliminar el desarrollo de la enfermedad.

III.II Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson.

Aún con la tecnología actual se tienen problemas para diagnosticar la EP, debido principalmente a la falta de técnicas adecuadas y no invasivas que permitan observar la pérdida de neuronas dopaminérgicas, por lo cual, se ha planteado como solución la toma de tomografías con emisión de positrones (*CT* o *PET* por sus siglas en inglés), la cual brinda imágenes bidimensionales, pero que permiten posteriormente la fusión de varias imágenes, para de esta manera brindar una imagen tridimensional, que permita la reconstrucción y visualización de una parte del cerebro específica, esta técnica a diferencia de una tomografía normal utiliza rayos gamma en lugar de rayos X (*Herman, 2009*); a pesar de que

este tipo de técnica se ha hecho más amplia y fácil de usar, su uso para investigaciones epidemiológicas aún sigue siendo limitado (*de Lau, 2006*).

Por estas razones, la diagnosis de la EP se basa principalmente en síntomas clínicos, el criterio actual de diagnosis de parkinsonismo requiere la presencia de por lo menos 2 de los síntomas característicos de la enfermedad: temblor en reposo, bradicinesia, rigidez o pérdida de la postura; clínicamente la mejor diagnosis requiere de estudios postmortem, ya que estudios clinicopatológicos han demostrado que cerca del 80-90% de los casos diagnosticados clínicamente han sido confirmados por autopsia (*de Lau, 2006*).

Adicionalmente a estas diagnosis se han desarrollado diferentes test que facilitan la identificación de los síntomas, principalmente los motores, entre los que se encuentran (*Mhatre, 2013*):

- ❖ El test de equilibrio de Berg que proporciona una valoración cuantitativa del equilibrio en adultos y que consiste en diferentes ejercicios que requieren de cierto esfuerzo del paciente.
- ❖ El índice de marcha dinámica que se usa para determinar la probabilidad de caída en adultos mayores y en el cual se llevan a cabo diferentes ejercicios en los que se necesita subir y bajar escaleras así como evitar una serie de obstáculos.
- ❖ El test de equilibrio de Sharpened-Romberg el cual consiste en mantener una posición sin perder el equilibrio con ojos abiertos y cerrados.

Estos test, así como los diferentes síntomas que se presentan en el desarrollo de la enfermedad han permitido desarrollar una escala de gravedad de la enfermedad, dando así la escala conocida como “Escala de Hoehn y Yahr”, creada por Margaret Hoehn y Melvin Yahr en el año de 1967, y que ha sido modificada posteriormente para una mejor interpretación de la sintomatología de la enfermedad; actualmente se reconocen 6 estadios que se describen a continuación (*Hoehn, 2001*):

- Estadio 1: Afectación exclusivamente unilateral, sin afectación funcional o con mínima afectación.
- Estadio 1.5: Compromiso unilateral más afectación axial.
- Estadio 2: Afectación bilateral o axial (línea media), sin alteración del equilibrio.
- Estadio 2.5: Afectación bilateral con recuperación en el pull test (Test del jalón).
- Estadio 3: Alteración de los reflejos de enderezamiento (al dar vueltas o en pull test). Restricción discreta de las actividades laborales, pero puede hacer algunos trabajos. Vida independiente.
- Estadio 4: Enfermedad completamente desarrollada, gravemente incapacitante. El paciente aún es capaz de caminar y permanecer en pie sin ayuda.
- Estadio 4.5: El paciente no puede salir de su domicilio sin ayuda.

- Estadio 5: Confinamiento en cama o silla de ruedas, a menos que se le preste asistencia.

En estadios tempranos es común dar un diagnóstico poco preciso sobre el padecimiento de la EP; debido también a la falta de un criterio neuropatológico universal, ya que como se mencionó anteriormente no se conocen del todo las causas del desarrollo de la enfermedad, sumando además el hecho de que el tiempo de la diagnosis inicial hasta la muerte puede ser muy prolongado, dificultando así encontrar un patrón definido de la enfermedad (*Litvan, 2003*).

Los pacientes con EP, también presentan un estado depresivo, deterioro de la memoria y de la capacidad laboral, estos síntomas pueden deberse a factores tales como falta de comunicación, aislamiento social y frustración al intentar tareas que requieren destrezas motoras (*SSA, 2006*). Otros síntomas relacionados con la EP, son los llamados síntomas no motores, entre los que se encuentran desordenes del sueño, anormalidades sensoriales, disfunción autonómica, decline cognitivo, déficits olfativos y estreñimiento (*Langston, 2006*), a los cuales, en las investigaciones de la enfermedad, se les ha prestado poca atención.

En la actualidad solo existen tratamientos sintomáticos, pero ninguno de ellos puede detener el proceso de degeneración neuronal (*Dexter, 2013*). Entre los tratamientos más comunes, se encuentra la administración de levodopa (L-3,4 dihidroxifenilalanina), o L-DOPA, que es una molécula involucrada en la síntesis de catecolaminas y que posteriormente es convertida a dopamina (DA) por acción de la enzima L-DOPA descarboxilasa por lo que ésta comúnmente se mezcla con carbidopa, la cual es un inhibidor de la L-DOPA descarboxilasa (Fig. 3), ya que de lo contrario la L-DOPA se descarboxila antes de atravesar la barrera hematoencefálica y menos del 1% llega al cerebro; se utiliza L-DOPA y no dopamina ya que esta última no tiene habilidad para penetrar la barrera hematoencefálica; desafortunadamente el tratamiento con levodopa causa tolerancia por lo que su eficacia desaparece conforme pasa el tiempo, permitiendo el desarrollo de la enfermedad y en ocasiones agravándose los síntomas de la EP, aun así continua siendo el tratamiento más utilizado (*Rangel-Barajas, 2005*).

Gracias a estas sustancias, se han logrado reducir los síntomas de la EP, ya que además de ayudar para la reducción de temblores en reposo, también funciona como un método más para diagnóstico y discriminación de la enfermedad, ya que estos al estar directamente relacionados con la vía de síntesis de dopamina ayudan a reducir los síntomas solamente en los enfermos de Parkinson de manera que se puede hacer un diagnóstico diferencial con otras enfermedades que puedan llegar a tener la misma sintomatología (*Litvan, 2003*).

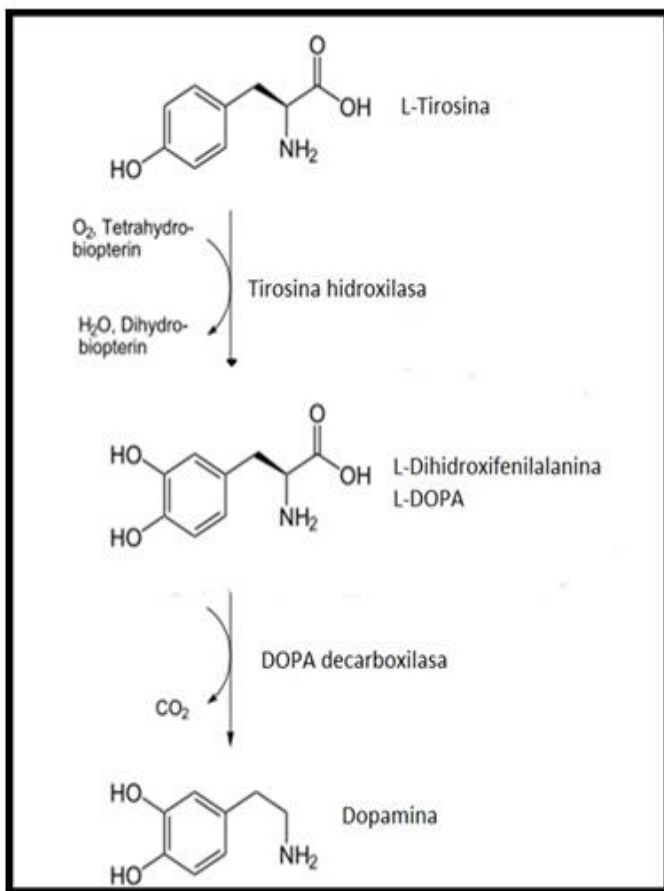


Fig. 3. Síntesis de Dopamina. A partir de L-Tirosina se produce L-DOPA por la acción de la enzima Tirosina Hidroxilasa, para después por medio de una descarboxilasa producir Dopamina (Imagen tomada y modificada del blog "Scientopia" <http://scientopia.org>)

En vista de que faltan recursos farmacológicos, se han desarrollado también algunos métodos invasivos para detener la sintomatología de la enfermedad, uno de los principales es la estimulación cerebral profunda, en la cual se inserta un estimulador eléctrico que envía impulsos a ciertas regiones del cerebro, tales como el tálamo, reduciendo de esta manera síntomas como temblor, movimientos lentos y problemas para caminar. Este tipo de tratamientos requiere de cirugía mayor y no es recomendable para todos los pacientes, también se necesita de una evaluación previa por parte de un experto, es importante recalcar que este método al igual que levodopa y carbidopa no curan la enfermedad, solo atenúan los síntomas (Follet, 2010).

Por otro lado se han hecho grandes esfuerzos para prevenir la enfermedad, existen

estudios que identifican diversas sustancias como posibles agentes neuroprotectores que incluyen a la curcumina (Fig. 4) (Villareal-Reyna, 2013), y varios antioxidantes como las vitaminas E y C, que muy probablemente protegen a las células del daño producido por el estrés oxidativo, neutralizando los radicales libres (de Lau, 2006); otra posible sustancia protectora es la nicotina, ya que se ha observado una reducción de la EP entre fumadores, esto quizás debido a que la nicotina puede estimular la síntesis de dopamina, actuar como antioxidante o alterar la actividad de la enzima monoaminasa oxidasa B, involucrada en la oxidación y degradación de monoaminas (Quik, 2004).

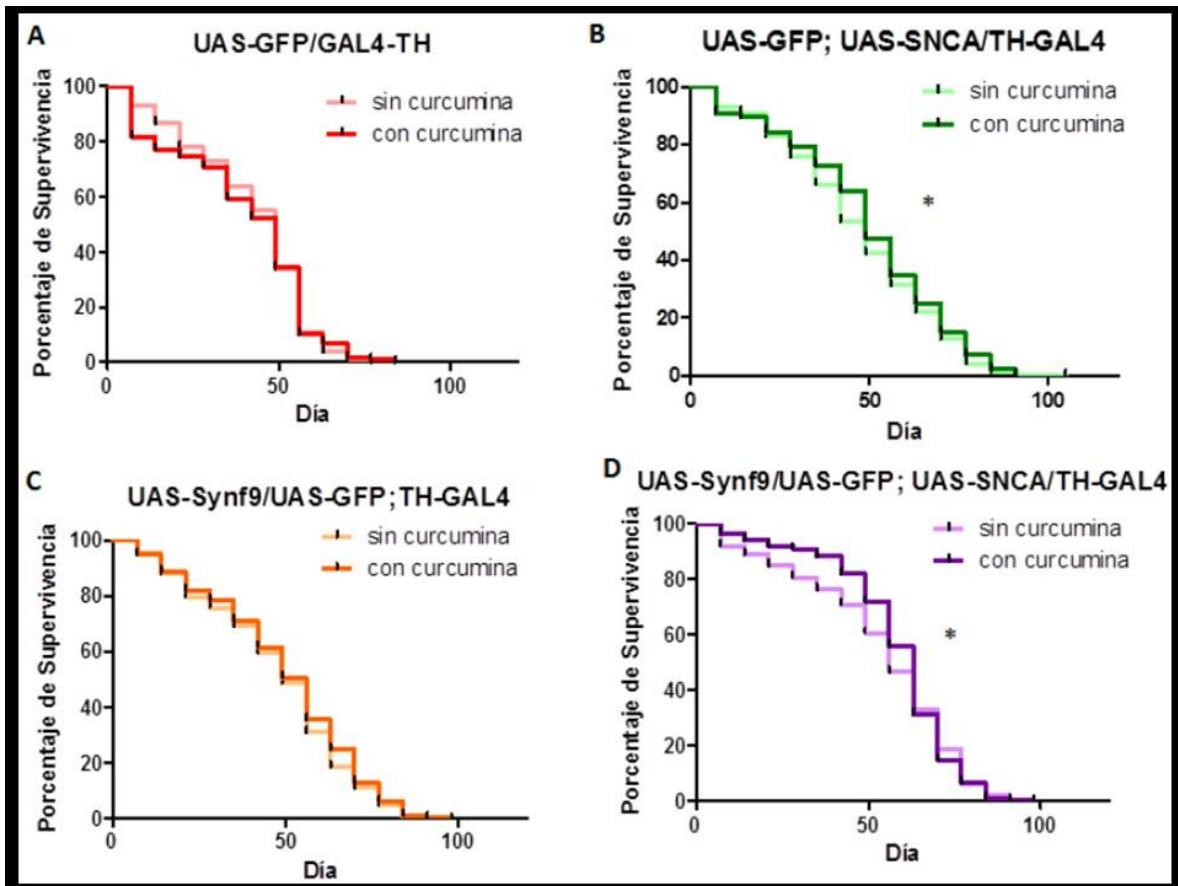


Fig. 4. Supervivencia de moscas alimentadas con curcumina. Probabilidad de supervivencia de machos alimentados sin y con curcumina que expresan en las neuronas dopaminérgicas: A) GFP B) GFP y α -Sinucleína C) GFP y Sinfilina D) GFP, α -Sinucleína y Sinfilina. * representa $p < 0.05$ (Tomado de Villareal-Reyna, 2013).

III.III Causas de la enfermedad de Parkinson.

A ciencia cierta no se conocen todas las causas de la EP, varios estudios sugieren que se trata de una enfermedad causada por el conjunto de varios factores, muchos de ellos señalando principalmente a un mal funcionamiento del sistema de ubiquitinación del proteosoma (UPS) (Mcnaught, 2001), de igual manera se ha relacionado la enfermedad con procesos de inflamación, un mal plegamiento y posterior acumulación de proteínas, disfunciones mitocondriales, estrés oxidativo, y sobreexpresión de algunos genes (Dexter, 2013).

Entre las mutaciones más comunes encontradas asociadas con la EP encontramos algunas que se encuentran en los genes que codifican para α -Sinucleína, Parkina (PARK) y Ubiquin carboxil-terminal hidrolasa L1 (UCHL1), estas han sido identificadas como causas que desencadenan la aparición de Parkinson familiar, ya que algunas están relacionadas con el fallo del correcto funcionamiento del sistema UPS, por ejemplo la proteína codificada por el gen

PARK 2 cumple un papel de E3 ubiquitin ligasa (Tabla 1)(Fig. 5) (Mcnaught, 2001).

Tabla 2. Principales genes asociados con la Enfermedad de Parkinson (Bezard, 2011).

| Gen | Proteína | Forma de herencia | Función proteínica |
|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------------|
| <i>PARK 1/4</i> | α -sinucleína | Autosómica dominante | Posible proteína sináptica |
| <i>PARK 2</i> | Parkina | Autosómica recesiva | E3 ubiquitin ligasa |
| <i>PARK 6</i> | PINK 1 | Autosómica recesiva | Cinasa mitocondrial |
| <i>PARK 7</i> | DJ-1 | Autosómica recesiva | Chaperona |
| <i>PARK 8</i> | LRRK2 | Autosómica dominante | Cinasa y GTPasa |
| <i>PARK 9</i> | ATP13A2 | Autosómica recesiva | ATPasa lisosomal |

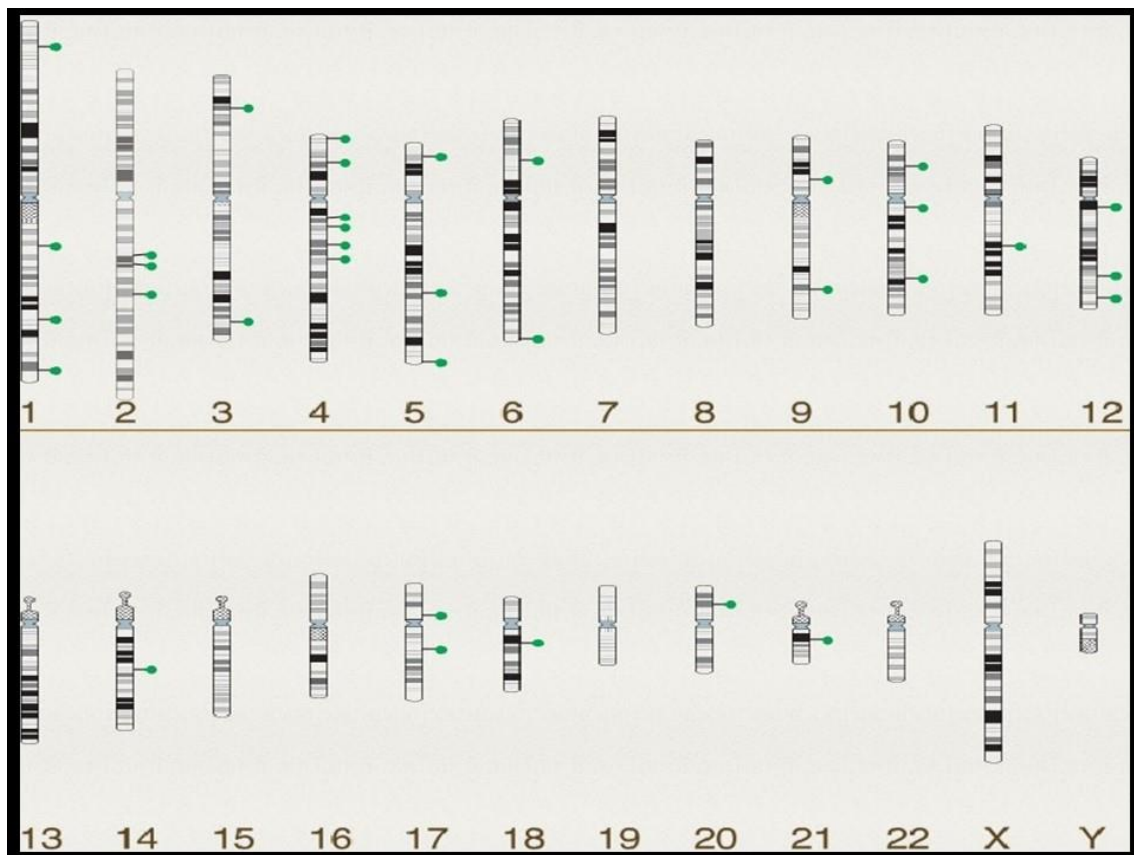


Fig. 5. Genes y Parkinson. Localización de algunos de los genes relacionados con la EP en un cariotipo humano.

Varios estudios han demostrado que la interacción con pesticidas, herbicidas y metales pesados induce la aparición de la EP; como el 1-methyl-4-phenyl-1.2.3.4-tetrahydropyridine (MPTP) que en 1983, en California, causó el desarrollo de signos típicos de parkinsonismo en varias personas drogadictas, posteriormente se descubrió que el MPTP es un derivado de la síntesis de

heroína, que está presente en algunos pesticidas y que produce daño exclusivamente en neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*, actualmente se utiliza la exposición de este químico en modelos de ratas y ratones ya que produce un cuadro clínico parecido al de la EP, con excepción de la presencia de cuerpos de Lewy (*Langston, 1983*). Por otro lado, la rotenona y el paraquat (N, N'-dimetil-4-4'-bipirinium), ambos presentes en herbicidas, inhiben específicamente el complejo mitocondrial I, lo que deriva en una disminución de dopamina y en el aumento de sustancias reactivas de oxígeno (SRO) (*Betarbet, 2000*). En estudios postmortem de paciente de EP, se ha observado que existen defectos en este complejo en la *sustancia nigra* (*Greenamyre, 2004*), por lo que estas sustancias también se utilizan en distintos modelos. Adicionalmente se sabe que existe un riesgo de desarrollo de la EP relacionado con la exposición a metales pesados tales como hierro, manganeso, cobre, plomo, aluminio o zinc, esto aunado a la acumulación de estos metales en la *sustancia nigra* y el aumento de estrés oxidativo en las células (*Lai, 2002*).

Otro posible factor causante de la enfermedad son los cuerpos de Lewy, agregados proteicos cuyo función no se conoce, ya que se especula pueden ser la causa de la neurodegeneración o quizá un mecanismo protector, de los cuales hablaré a continuación.

III.IV Cuerpos de Lewy.

Los cuerpos de Lewy (CL) (Fig. 6) son agregados eosinofílicos citoplásmicos anormales de proteínas que aparecen en células nerviosas en el cerebro humano y que están involucrados en un amplio rango de enfermedades neurodegenerativas (*Pollanen, 1993*). Son inclusiones de 5 a 25 μm de diámetro que se pueden encontrar dentro de los somas de las neuronas (*Lorraine, 2012*). Se ha observado que estos cuerpos no solo están relacionados con la EP, sino también con otras enfermedades como la EA, demencia por cuerpos de Lewy, enfermedad de Pick, entre otras, el principal componente de estas inclusiones es α -Sinucleína, proteína que le da el nombre de sinucleopatías al conjunto de enfermedades caracterizadas por la presencia de cuerpos de Lewy (*Mhyre, 2012*).

Entre los principales componentes de los CL encontramos Ubiquitina, Tirosina hidroxilasa, $\alpha\beta$ -Cristalina, Citocromo C, Dornina, Tubulina, Tau y Sinaptofisina, α -Sinucleína, el principal componente de estos cuerpos, y Sinfilina o SNCAIP (Synuclein Interacting Protein) y cuya acumulación anormal se produce como respuesta a un estrés celular o a la aparición de anomalías en la fosforilación y proteólisis (Shults, 2006, Pollanen, 1993), permitiendo así que continúe la acumulación de estas diferentes moléculas y promoviendo que exista una interrupción en la comunicación celular. Los componentes moleculares involucrados en la generación de cuerpos de Lewy no han sido totalmente dilucidados, muchas investigaciones apuntan a un mal funcionamiento de la ruta ubiquitina-proteosoma (Dickson, 2001).



Fig. 6. Cuerpos de Lewy. Cuerpos de Lewy inmunopositivos a α -sin, estos se marcan con una flecha, la barra inferior indica 13 μ m (Tomada de Spillantini, 1998).

Estos cuerpos se pueden clasificar en clásicos y corticales. Los CL clásicos o troncoencefálicos, consisten en una inclusión intracitoplasmática eosinofílica con un centro denso del que irradian fibrillas de 10 nm, principalmente aparecen en células monoaminérgicas, como en el caso de la EP, en la *sustancia nigra*, en algunas regiones del tronco cerebral y en el diencefalo, tienen un centro denso eosinófilo, hialino, a veces laminado, y un halo más claro (Gibb, 1998). Por su parte los CL corticales poseen una distribución en el sistema límbico, áreas de asociación del neocórtex, diencefalo y tronco encefálico, su composición es similar a la de los CL clásicos, aunque estos han sido menos estudiados (Block, 2013).

La capacidad citotóxica o citoprotectora de los CL sigue siendo tema de debate, ya que estas inclusiones podrían ser potencialmente perjudiciales debido a la correlación que existe entre el número de inclusiones y la gravedad de síntomas clínicos, en el otro extremo, la formación de CL podría llegar a proteger a las células nerviosas de especies moleculares tóxicas, esta conclusión se ha tomado debido a la observación en estudios postmortem de células que poseen inclusiones y que llegan a ser más saludables que células vecinas normales (Tanaka, 2004).

Adicionalmente, varios estudios demuestran que los CL no están necesariamente relacionados con la muerte neuronal, ya que estas inclusiones

proteicas se han observado en estudios postmortem de personas sin características de EP o de otra enfermedad neurodegenerativa (Forno, 1969); de igual forma en pacientes con la EP con mutaciones en el gen LRRK2, se observó que existía neurodegeneración sin presencia de CL (Gaig, 2007). En animales modelo, como primates y ratones, se observó que la toxina MPTP, está asociada con síntomas motores y neurodegeneración de células dopaminérgicas sin patología de Lewy convincente (Bezard, 2011).

Si los CL son tóxicos para la célula, esto nos indicaría como principal responsable a la α -Sinucleína, proteína que como se mencionó con anterioridad es la principal molécula que conforma a estos cuerpos.

III.IV α -Sinucleína

α -Sinucleína (α -Sin), es una proteína de 14kDa (140 aa) (Fig. 7) altamente expresada en el cerebro, principalmente en las terminales presinápticas codificada por el gen *SNCA*, localizado en humanos en 4q21-q23, no se sabe a ciencia cierta cuál es su función, pero se piensa que está fisiológicamente implicada en el tráfico de vesículas entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, también se considera que está relacionada en el ensamblaje de la maquinaria SNARE y se cree juega un papel principal en la liberación de neurotransmisores y como posible protección de las terminaciones nerviosas contra el daño, además se ha visto que juega un papel en el UPS al interactuar con PARK (Kalia, 2013).

α -sin puede presentar distintas conformaciones (Fig. 8), es capaz de interactuar consigo misma formando oligómeros y agregados amiloides, y contribuye, por su acumulación, a la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas denominadas sinucleopatías, se sabe es el mayor componente de los CL, siendo así una de las principales proteínas involucradas en la patogénesis de la EP (Conway, 2000); una de las principales conformaciones, la cual se cree está estrechamente relacionada con la EP, es la de oligómeros tóxicos, que son agregados de 2 o más monómeros de α -sin, con un tamaño que va de los 4 a los 24 nm, y que son capaces de tener varias morfologías que incluyen esferas, cadenas, anillos y estructuras tubulares (Lashuel, 2002), es importante señalar que el estudio de la formación de oligómeros de esta proteína está restringido a experimentos *in vitro*, pero se ha incrementado evidencia que muestra que la formación de oligómeros no solo ocurre en proteínas recombinantes *in vitro*, sino que también puede darse en modelos *in vivo*, esto debido a estudios bioquímicos que permiten la separación de complejos proteicos que proveen evidencia de oligómeros de α -sin endógenos en extractos de cerebros de ratones (Winner, 2011), de igual manera se ha detectado la presencia de oligómeros de esta proteína en extractos de cerebro, plasma y fluido cerebroespinal de pacientes con EP (Sharon, 2003, El-Agnaf, 2006).

En diversos trabajos se ha tratado de identificar la causa por la cual la acumulación α -sin puede promover la aparición de agregados tóxicos que desencadenan muerte neuronal (Kalia, 2013), estos estudios han demostrado que existen varias causas moleculares que pueden estar ocasionando la neurotoxicidad de esta proteína; entre las principales encontramos tres mutaciones en la secuencia de esta proteína que se han identificado hasta ahora en humanos con EP familiar: A30P, A53T y E46K, estas mutantes poseen la tendencia a formar agregados no fibrilares y fibrillas similares a CL en experimentos *in vitro* (Polymeropoulos, 1997, Conway, 1998), en modelos *in vivo* de ratones y moscas transgénicas que expresan las proteínas mutantes de humano, se ha observado no solo la formación de inclusiones de α -Sin, que son muy parecidas a CL, sino también que las mutantes A30P y A53T aceleran la formación de protofibrillas; esto relacionado además con la presencia de depósitos no fibrilares de α -Sin en cerebros de ratones transgénicos sintomáticos, que sugieren que estas protofibrillas son las especies tóxicas, aunado a que las células dopaminérgicas que contienen CL parecen ser más sanas que células dopaminérgicas que no los presentan (Lashuel, 2002).

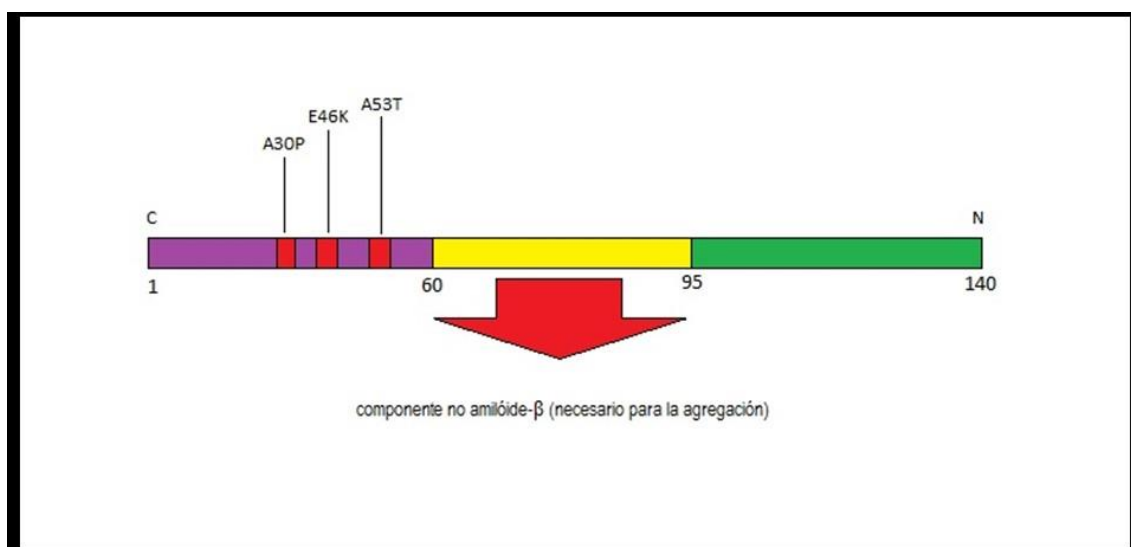


Fig. 7. α -Sinucleína. Estructura de α -Sin, se muestran las 3 mutaciones asociadas a EP familiar, del aa 60 al 95 se señala el componente no amiloide- β , relacionado con la EA, en morado se señala la región anfipática, mientras en verde se señala la región ácida. (Stefanis, 2012, Márquez-Gutiérrez, 2011)

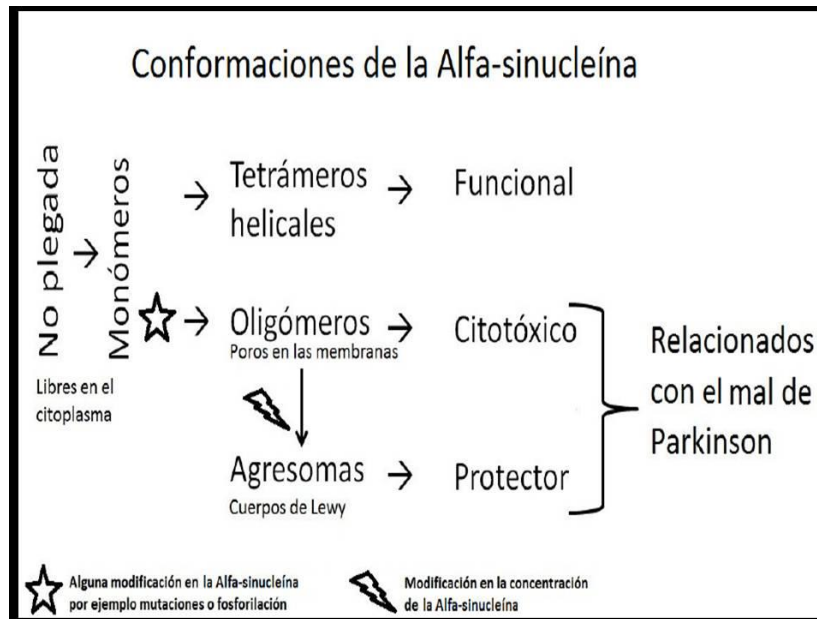


Fig. 8. Conformaciones de la proteína α -Sin y algunas de sus modificaciones relacionadas con la EP. Se sabe que los oligómeros son la principal conformación tóxica de la proteína, los agresomas aún continúan en debate acerca de su posible acción citoprotectora. (Tomada de Villareal-Reyna, 2013).

III.V Sinfilina y su interacción con α -sin.

Sinfilina (Synf) es una proteína presináptica citoplasmática de 919 aminoácidos codificada por el gen *SNCAIP*, que se localiza en 5q23.3, esta proteína está asociada a terminales nerviosas, su función específica, al igual que la de la α -sin sigue siendo desconocida, se sabe que interactúa fuertemente con ésta, y también está presente en diferentes sinucleopatías, además se cree que está involucrada con el UPS y la función sináptica, de igual forma parece desempeñar un papel clave en la formación de los CL-like, que son agregados muy parecidos a los CL, pero que difieren en algunas características estructurales; posee al menos 8 isoformas que se generan a partir del gen *SNCAIP*, pero cuatro de esas isoformas generan proteínas truncas en el extremo C-terminal, las cuales pueden estar involucradas con la aparición de neuropatías promoviendo su acumulación y la formación de CL (Ribeiro, 2002, Wakabayashi, 2000, Chung, 2001).

Otra de las características de Synf es que posee repeticiones de anquirina-like y motivos coiled-coil, los cuales sugieren funciones de interacción proteína-proteína, ya que se ha observado que Synf es capaz de interactuar con α -Sin, PARK, Cinasas 2 con repeticiones ricas en leucina, otras Ubiquitin ligasas, subunidades y reguladores del proteosoma, los cuales están implicados en la patogénesis de la EP por la agregación de proteínas (Engelender, 1999).

En modelos de *D. melanogaster* también se ha observado que la sobreexpresión de Synf incrementa el peso de las moscas, incrementa el nivel de triacilglicerol, y el tamaño de los adipositos, aumentando la acumulación de lípidos, por lo que muy probablemente también se halle relacionada con obesidad y síndromes metabólicos (Liu, 2012).

Un dato interesante es que Synf y α -Sin son tóxicas al ser expresadas independientemente, pero cuando se coexpresan parecen suprimir su toxicidad, esta interacción de ambas proteínas apoya la posibilidad de que los CL pueden llegar a ser agregados que protegen a las neuronas y contradice la hipótesis de que los CL sean agregados tóxicos que promueven muerte neuronal, en el caso de la EP se ha visto que la interacción de ambas proteínas promueve la supervivencia de células dopaminérgicas en SNC por la aparición de CL-like, esto se observó en estudios en *Drosophila melanogaster*, en donde se expresaban ambas proteínas bajo el sistema *GAL4-UAS*, y se observó un aumento en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas cuando se comparaba con moscas que expresaban α -Sin o a Synf de manera independiente (Fig. 9) (Hernández-Vargas, 2011).

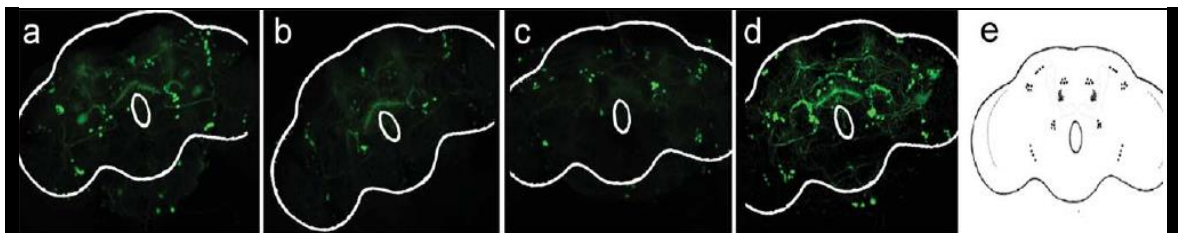


Fig. 9. Comparación de cerebros de moscas de 30 días de edad. a) Moscas que expresan solo GFP en neuronas dopaminérgicas b) Moscas que expresan GFP y Synf en neuronas dopaminérgicas. c) Moscas que expresan α -Sin y GFP en neuronas dopaminérgicas d) Moscas que expresan α -Sin, Synf y GFP en neuronas dopaminérgicas e) Mapa de la distribución de neuronas dopaminérgicas en el protocerebro de *Drosophila melanogaster*. (Tomada y modificada de Hernández-Vargas, 2011).

III.VI Tirosina hidroxilasa.

La Tirosina hidroxilasa (*TH*), es una enzima necesaria en la síntesis de dopamina en vertebrados, aunque por varios estudios se ha visto que también es necesaria en *D. melanogaster* (Budnik, 1987), esta enzima cataliza el primer paso entre la oxidación de L-tirosina a L-DOPA, siendo este un paso limitante en la vía de síntesis de Dopamina (Véase Fig. 3).

En *D. melanogaster* la TH es codificada por el gen *DTH*, consta de tres isoformas, *DTH I*, *DTH II* y *DTH III* (Fig. 10), adicionalmente se sabe que la Dopamina en insectos tiene dos papeles importantes, uno en el SNC y el otro como precursor de quinonas que son esenciales para la pigmentación y endurecimiento de la cutícula. Por otro lado se sabe que la expresión de la isoforma *DTH II*, es específica de cutícula, mientras que la isoforma *DTH I*, es la que se encuentra involucrada en la síntesis de Dopamina en el CNS (Birman, 1994).

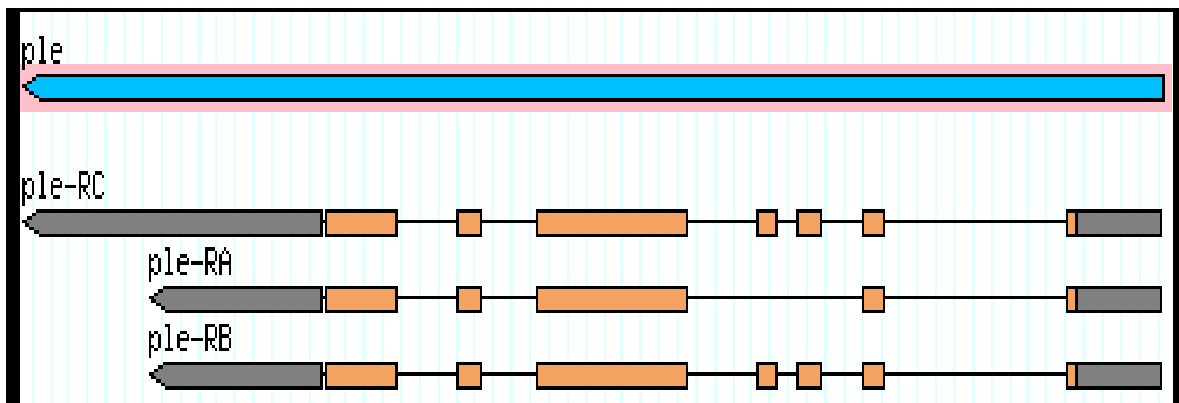


Fig. 10. Tirosina Hidroxilasa de *Drosophila melanogaster*. Esquema del gen *DTH* (*ple*) y representación de las isoformas *DTH I*, *DTH II* y *DTH III* (Fly base, 2015).

La similitud en la síntesis de dopamina entre vertebrados y *D. melanogaster*, ha favorecido el uso de esta última como modelo de la EP, utilizando a la enzima TH como marcador de las neuronas dopaminérgicas (Birman, 2002).

III.VII *Drosophila melanogaster* como modelo de la Enfermedad de Parkinson.

Uno de los principales problemas con el que se enfrenta cualquier investigador al trabajar con la EP, es el hecho de que al tratarse de una enfermedad que afecta al SNC, le es imposible trabajar con tejido obtenido directamente de pacientes afectados, es por eso que se han tratado de desarrollar modelos animales en los cuales se les permita a los científicos observar el desarrollo *in vivo* de la patología. De esta forma se han logrado obtener modelos que van desde nemátodos como *Caenorhabditis elegans*, ratones, ratas, monos, perros, todos ellos confieren sus ventajas y desventajas.

En estos modelos se han desarrollado diferentes maneras de causar síntomas o eventos celulares relacionados con la EP, entre las que se encuentran (*Bezard, 2011*):

- ❖ Interferencias con el mecanismo de almacenamiento de monoaminas en las vesículas sinápticas, que provoca una depleción en el cerebro de monoaminas, no solo de dopamina
- ❖ Antagonistas de los receptores de dopamina, como el receptor D2, provocando formas de parkinsonismo en pacientes psiquiátricos, y que al ser usado en ratones se observa una pérdida considerable de la actividad motora
- ❖ La inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), dañando, el centro del sistema catecolaminérgico en ratas adultas, y que fue replicado en ratones, gatos, perros y monos.
- ❖ El uso de MPTP, produciendo una degeneración de las neuronas dopaminérgicas.
- ❖ Paraquat, reduciendo la actividad motora y pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra.
- ❖ Rotenona, que funciona bloqueando el complejo I de la cadena de transporte de electrones y provocando inclusiones proteicas.
- ❖ Algunas anfetaminas que muestran efectos tóxicos en el sistema nervioso, causando déficit funcional así como depleción y alteraciones estructurales de las monoaminas.

Asimismo, también se intenta entender los aspectos genéticos de la enfermedad, por lo que se han desarrollado diferentes modelos en los cuales se altera la expresión de genes asociados a la EP.

D. melanogaster, es otro de los modelos que se ha utilizado para el estudio de la EP, ofrece varias ventajas entre las que encontramos que su mantenimiento necesita de un bajo costo, poco espacio y lo más importante poco tiempo, de igual forma es un organismo del cual se ha secuenciado por completo su genoma.

Es importante señalar que en *Drosophila* no existen genes homólogos a *SNCA* o *SNCAIP*, por lo que las moscas modelo para la EP se han generado a través de la inserción de estos genes por medio de transgénesis, además de que no se han encontrado en la mosca, proteínas que lleven a cabo una función similar, esto debido a que aún no se comprende la función específica de las proteínas en humano (*Hernández-Vargas, 2011*).

Se ha utilizado el sistema *GAL4-UAS* para favorecer la expresión de estos genes en un patrón espacio-temporal específico o en este caso en neuronas dopaminérgicas, el sistema consta de *GAL4*, que es un factor transcripcional de levadura que es capaz de reconocer a una secuencia UAS (Upstream Activating

Sequence), de tal manera que cuando *GAL4* se una a la secuencia UAS, los genes que se encuentren río debajo de la secuencia serán transcritos, es importante mencionar que *GAL4* se expresa bajo el control de secuencias reguladoras que le confieren especificidad espacio- temporal mientras que *UAS* no es capaz de promover la transcripción de los genes río debajo de su secuencia sin la actividad de *GAL4* (Duffy, 2002).

En *D. melanogaster*, se han construido moscas que expresan *GAL 4* bajo el promotor de *TH* (Birman, 2002), permitiendo de esta manera expresar específicamente algunas proteínas tales como α -Sin y Synf, que estén fusionadas a una región *UAS*, en neuronas dopaminérgicas (Hernández-Vargas, 2011).

Cabe destacar que no existe “El mejor modelo de la Enfermedad de Parkinson”, cada modelo permite entender la enfermedad desde un punto de vista específico, logrando así un mejor entendimiento del desarrollo de la EP y los mecanismos involucrados.

IV. ANTECEDENTES.

La importancia de investigar las causas y efectos de las enfermedades neurodegenerativas en la actualidad es de vital importancia, gracias a esto se han desarrollado distintos modelos que nos permiten estudiar de una manera eficaz diversas facetas de estas patologías.

Hernández-Vargas en 2011, realizó un estudio en el cual, por medio del sistema *GAL4-UAS*, expresó *SNCA* y *SNCAIP*, genes que codifican para las proteínas Synf y α -Sin de manera independiente y en conjunto, en neuronas dopaminérgicas en *D. melanogaster* (Hernández-Vargas, 2011). En este trabajo Hernández y colaboradores observaron que la muerte de las neuronas dopaminérgicas se agudiza al expresar *SNCA* o *SNCAIP* en cerebro de moscas, sin embargo, cuando estos genes se coexpresan, disminuye o desaparece la neurotoxicidad, lo que sugiere que una posible interacción entre α -Sin y Synf promueve protección a neuronas dopaminérgicas (Fig. 11).

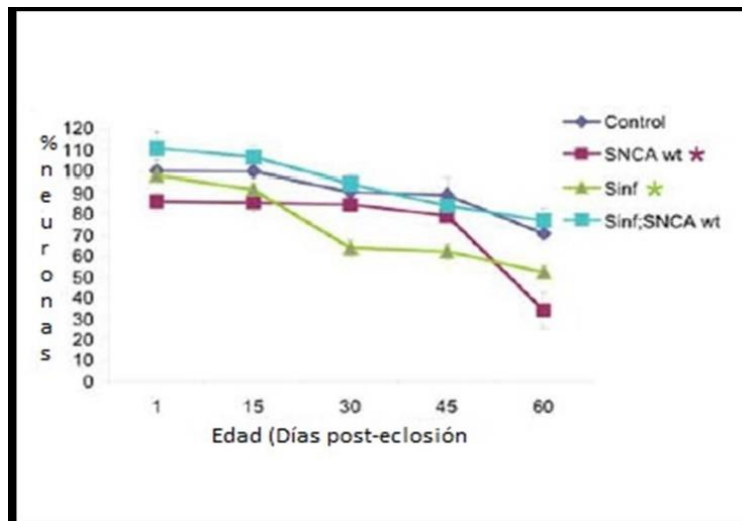


Fig. 11 .Neuronas dopaminérgicas y supervivencia en moscas. Porcentaje de supervivencia de neuronas dopaminérgicas con respecto a la edad en moscas que expresan *SNCA* y *SNCAIP* (Tomado y modificado de Hernández-Vargas, 2011).

Adicionalmente observaron que existe además, una pérdida de la movilidad y una muerte prematura en las moscas, señalando así síntomas muy parecidos a los observados en pacientes humanos con respecto a habilidades mecánicas, estos ensayos los realizaron evaluando la geotaxis negativa o la habilidad de las moscas para escalar.

Finalmente concluyen que es importante identificar los mecanismos involucrados en las enfermedades neurodegenerativas y que esto se logrará identificando genes que modifiquen los fenotipos relacionados a la expresión de

estas proteínas utilizando modelos animales que permitan reproducir la etiología de la enfermedad.

V. JUSTIFICACIÓN.

En el laboratorio del Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, se ha investigado ampliamente la relación entre las proteínas α -Sin y Synf con el desarrollo de la EP; esto se ha logrado gracias a líneas transgénicas de *D. melanogaster* capaces de expresar ambas proteínas, por separado y en conjunto.

Estudios previos en el laboratorio (*Hernández-Vargas, 2011*) muestran que existe una clara relación entre la muerte de neuronas dopaminérgicas y la presencia de estas proteínas. Debido a esto en el grupo de trabajo nos empezamos a cuestionar si existe un cambio en los niveles de expresión de los genes que codifican para estas proteínas con respecto a los niveles de expresión del gen *DTH*, que como ya se mencionó codifica para la proteína TH, enzima importante en la síntesis de dopamina y marcador de las neuronas dopaminérgicas.

El conocer la relación que exista entre los niveles de expresión de estos genes y el número de neuronas en nuestro modelo parkinsoniano, nos permitirá estandarizar una nueva manera de evaluar el daño ocasionado por la acumulación de estas proteínas y la disminución de dopamina, también podemos pensar en futuras investigaciones que permitan utilizar este nuevo método y que faciliten el entender mejor los procesos moleculares y fisiológicos que desencadena la EP.

VI. HIPÓTESIS.

Si los genes *SNCA* y *SNCAIP* están relacionados con la muerte neuronal involucrada con la enfermedad de Parkinson, entonces encontraremos que: el número de neuronas dopaminérgicas afectadas en adultos será directamente proporcional al tiempo y a los niveles de expresión de *SNCA* y *SNCAIP*, e inversamente proporcional a los niveles de expresión del gen *TH*.

VII. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Establecer un modelo de neurodegeneración dopaminérgica en el sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster*, causada por la expresión de *SNCA* y *SNCAIP*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Determinar si la expresión individual de *SNCA* o de *SNCAIP* en el sistema nervioso central, induce la muerte de neuronas dopaminérgicas en *Drosophila melanogaster* a lo largo del envejecimiento.
- 2) Determinar si la coexpresión de *SNCA* y *SNCAIP* en el sistema nervioso central induce la muerte de neuronas dopaminérgicas en *Drosophila melanogaster* a lo largo del envejecimiento.
- 3) Establecer un método de transparentación de moscas enteras que permita observar neuronas dopaminérgicas en *Drosophila melanogaster in toto* evitando la disección.
- 4) Determinar si existe una relación citoprotectora o citotóxica entre α -Sinucleína y Sinfilina por medio de la expresión en conjunto de *SNCA* y *SNCAIP*.

VIII. MATERIAL Y MÉTODO.

MUERTE NEURONAL Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron líneas transgénicas de *Drosophila melanogaster*, que expresan proteínas humanas silvestres asociadas a la EP. Las moscas transgénicas que expresan α -Sin fueron obtenidas directamente del banco de moscas *Drosophila*, en Bloomington, en la Universidad de Indiana, Estados Unidos de América (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). Las moscas transgénicas que expresan Synf y las drivers que expresan los genes *GFP* y *GAL4* asociados al promotor de *TH*, fueron construidas previamente en el laboratorio. Las moscas dobles transgénicas, es decir las que expresan tanto α -Sin como Synf, fueron obtenidas por medio de cruzas; todas las líneas fueron estabilizadas por medio de cromosomas balanceadores, que impiden la recombinación entre los organismos, permitiéndonos de esta manera mantener estables las líneas transgénicas.

DISEÑO DE CRUZAS.

Para obtener las moscas experimentales, se procedió a diseñar un sistema de cruzas que nos permitiera identificar y recolectar a las moscas de interés. De esta manera, el sistema de cruzas quedó como se indica en la Figura 12.

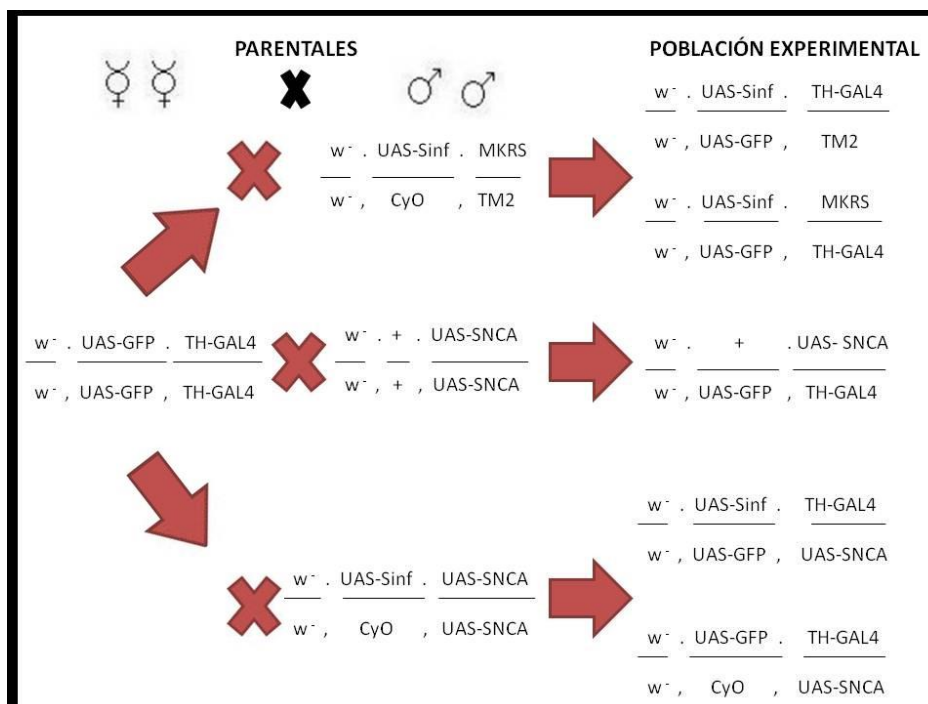


Fig. 12. Moscas experimentales. Sistema de cruzas por las cuales se obtuvieron las moscas experimentales. (El resto de la descendencia se omitió por no ser de interés para el desarrollo de esta tesis).

Se recolectaron las moscas experimentales y se separaron según su sexo, para este trabajo experimental se utilizaron solo moscas macho, como control se utilizó a la línea GFP-TH cruzada con la línea White para de esta manera obtener moscas heterocigas para los genes *GAL4* y *GFP*.

EXTRACCIÓN DE RNA.

Para la extracción de RNA, se utilizaron 15 cabezas de moscas por cada línea, estas se realizaron a partir del momento de eclosión, nombrándolo como el día 1 del día 1, a partir de ahí cada 5 días se realizaron extracciones de RNA hasta el día en que las moscas sobrevivieron, este fue de aproximadamente 45 días. Para obtener el RNA se utilizó el RNeasy Mini Kit de Qiagen (véase protocolo en internet¹), posterior a la extracción, se cuantificaba en el Nanodrop[®] Spectrophotometer ND-1000 y se mantenía a -72°C.

SÍNTESIS DE cDNA.

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el Kit QuantiTect[®] Reverse Transcription (disponible en línea²), se cuantificaron de nuevo todos los RNA y se obtuvieron alícuotas de una concentración final de 3ng/μl de cDNA. Este se mantuvo a -20 °C.

qPCRs.

Los PCR cuantitativos se realizaron una vez se obtuvieron todas las muestras de RNA de la curva de envejecimiento de cada línea. Se sintetizaron los oligos en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El termociclador que se utilizó fue el Step One de Applied Biosystems[®], cada gen de interés se estandarizó para obtener la mayor eficiencia de amplificación y no obtener productos inespecíficos. Las condiciones para cada gen fueron las siguientes:

| <i>SNCAIP</i> | <i>DTH</i> | <i>SNCA</i> |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| 95°C 10 min | 95°C 10 min | 95°C 10 min |
| 95°C 15 s } 40 | 95°C 15 s } 40 | 95°C 15 s } 40 |
| 66°C 1 min } ciclos | 64°C 1 min } ciclos | 60°C 1 min } ciclos |
| Curva de fusión | Curva de fusión | Curva de fusión |

RP49

95°C 10 min

95°C 15 s } 40
55°C 1 min } ciclos

Curva de fusión

Para cada reacción de qPCR se utilizó lo siguiente:

| | |
|---|-----------------------|
| 6 µl SYBR Master Mix (Thermo Scientific®) | 1 µl cDNA (3 ng/µl) |
| 0.5 µl oligo 5' | 4 µl H ₂ O |
| 0.5 µl oligo 3' | Total: 12 µl/reacción |

Las curvas de fusión nos permitieron observar que se obtuviera un solo producto de amplificación, aun así se corrió un gel de agarosa al 2% para asegurarnos que obtuvimos nuestros productos del tamaño correcto.

ANÁLISIS DE LOS qPCR.

El método seleccionado para comparar el nivel de expresión de los diferentes genes fue el conocido como ΔCt , el cual nos permite comparar cada gen con respecto a un control, en este caso RP49 un gen ribosomal, Para este método es necesario que todos los genes presenten una eficiencia de amplificación similar, por lo que se realizaron curvas estándar para conocer esta eficiencia y poder comparar la expresión de los genes entre sí (Véase Anexo 1). Posteriormente se usó el método de estandarización de $1/\Delta Ct$ para conocer los valores relativos de expresión de cada gen en cada línea.

Debido a que el termociclador Step One® solo tiene capacidad para 48 muestras y que se necesitaban de diferentes condiciones para la amplificación de nuestros genes, se utilizó el programa DataAssit® que nos permite coleccionar los resultados obtenidos en varios experimentos y así poder compararlos entre sí, se graficaron los resultados utilizando el programa GraphPad Prism®, y se realizaron Pruebas de Tukey (Véase Anexo 2).

DISECCIÓN Y FOTOGRAFIA DE CEREBROS.

Para disectar los cerebros se seleccionaron 5 moscas machos cada 5 días de las diferentes líneas. Estos se disectaron en PBS 1x y se mantenían en la misma solución, una vez obtenidos los cerebros se procedió a montarlos utilizando 5 µl

de citifluor (Ted Pella Inc.) sobre un cubreobjetos de 25 x 50 mm y colocándoles encima un cubreobjetos circular de 12 mm. Inmediato a esto se observaron al microscopio de epifluorescencia invertido (Zeiss) y se tomaron por lo menos 10 fotos de cada cerebro en diferentes planos y a un aumento de 5x.

CUANTIFICACIÓN DE NEURONAS.

A partir de las 10 fotografías de cada cerebro se cuantificó el número de neuronas presentes para cada cerebro, se calculó la media y desviación estándar para cada día y cada línea. Se graficaron los resultados utilizando el programa GraphPad Prism®.

TRANSPARENTACIÓN DE CUTÍCULA.

Para las pruebas de transparentación se utilizaron moscas de la línea GFP-TH y como control moscas de la línea white; se llevaron a cabo diferentes protocolos utilizados para la transparentación de tejido de ratones, los cuales fueron modificados para ser utilizados en tejido de *D. melanogaster*, estos se describen a continuación:

*Scale (Hama, 2011).

- 1) Se seleccionaron 5 moscas adultas de cada línea sin importar el sexo del organismo.
- 2) Se fijaron en solución de paraformaldehído/PBS al 4% durante 30 minutos a 4°C en agitación sin luz.
- 3) Se pasaron las muestras a solución de sucrosa/PBS al 20% durante 24 horas a 4°C en agitación sin luz para su deshidratación.
- 4) Se realizó un lavado de las muestras en PBS a temperatura ambiente.
- 5) Se volvieron a colocar en solución de paraformaldehído/PBS al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación sin luz.
- 6) Se colocaron en 1 ml de solución Scale view A2 en tubos de 1.5 ml con aluminio para evitar la exposición a la luz, estos se colocaron en agitación a 4°C durante varias semanas reemplazando esta solución cada semana.
- 7) Se observó si había algún indicio de transparentación y si había presencia de proteína fluorescente por medio del microscopio de disección y con filtros.

*See Deep Brain (See DB) (Ke, 2013).

- 1) Se seleccionaron 5 moscas adultas de cada línea, sin importar el sexo del organismo.

2) Se fijaron en solución de paraformaldehído/PBS al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente sin luz.

3) Las muestras se incubaron en soluciones de fructosa (Savien®)/PBS a diferentes concentraciones, 20%, 40%, 60% todas con un 0.5% de 2-Mercaptoethanol (Sigma®), las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml en agitación durante 4 h en cada solución, sin luz y a temperatura ambiente.

4) Posteriormente se incubaron en una solución 80% de fructosa/PBS y 0.5% de 2-Mercaptoethanol durante 12 h a temperatura ambiente, en agitación sin luz.

5) Después de transcurrido ese tiempo, las muestras se incubaron en una solución 100% fructosa/PBS y 0.5% de 2-Mercaptoethanol durante 24 h, en las mismas condiciones.

6) Finalmente se incubaron las muestras en la solución SeeDB, la cual contiene fructosa al 115% y 0.5% de 2-Mercaptoethanol durante 24 h.

Nota: Cabe señalar que las moscas tratadas con estas soluciones no se observaron al microscopio confocal (véase resultados para más detalles).

*Clarificación de Murray-BABB. (*McGurk, 2007*).

1) Se seleccionaron 5 moscas adultas de cada línea, sin importar el sexo de organismo.

2) Las muestras se fijaron en solución paraformaldehído/PBS al 4% durante 4 horas a temperatura ambiente.

3) Se deshidrataron las muestras en alcohol etílico al 70% durante toda la noche a temperatura ambiente, con agitación sin luz.

4) Se colocaron al menos 6 h en una solución 2:1, es decir 2 partes de alcohol bencílico por 1 parte de benzil benzoato (solución BABB).

5) Se procedió a observarlas en el microscopio confocal invertido montándolas en una gota de la solución BABB

Todas las muestras se montaron en un cubreobjetos de 24 X 40 mm para inmediatamente después observarlas al microscopio confocal invertido.

Adicionalmente a estos métodos se utilizó peróxido de hidrógeno en diferentes concentraciones (0.1%, 0.5% y 1%) para observar si existía alguna señal de transparentación en la cutícula de la mosca.

IX. RESULTADOS.

MÉTODO DE TRANSPARENTACIÓN.

El peróxido de hidrogeno ocasiona daños en el tejido de la mosca.

Con la finalidad de estandarizar un método para transparentar la cutícula de las moscas probamos diferentes agentes, es así, que al exponer a las moscas a diferentes soluciones de peróxido de hidrogeno, se observó que en concentraciones bajas (0.1%) no hay ninguna diferencia en el tejido de las moscas (datos no mostrados) mientras que estas sufren de un daño considerable al tejido cuando son sometidas a la concentración de 1%, ya que observamos un aumento en el volumen del abdomen, por otro lado, en una concentración media (0.5%), si bien no se observa transparentación, fuimos capaces de observar un blanqueamiento en el tejido (Fig.13).

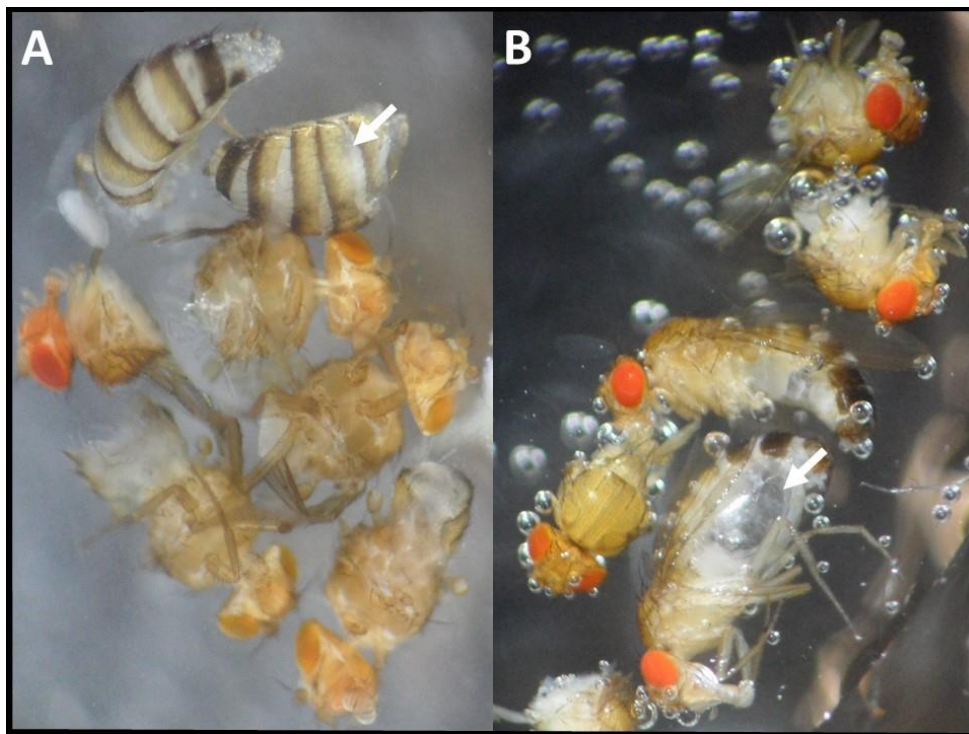


Fig. 13. Moscas tratadas con peróxido de hidrogeno. En el Panel A se muestran moscas tratadas con peróxido de hidrógeno 0.5%, se observa un aclaramiento en el tejido, principalmente en la zona del abdomen. En el panel B se muestran moscas que fueran tratadas con peróxido de hidrógeno 1%, se observa que sufrieron daño en el tejido del abdomen, el cual se muestra inflado. Las flechas señalan la zona donde se observó lo detallado anteriormente.

La cutícula de la mosca es capaz de transparentarse pero la proteína verde fluorescente no mantiene su integridad después del tratamiento.

Una vez que probamos que el peróxido de hidrogeno era incapaz de transparentar a la cutícula de la mosca, nuestro siguiente objetivo fue el probar métodos ya estandarizados en modelos marinos. Al probar los diferentes métodos de transparentación en mosca, se observó que si existen indicios de transparentación de la cutícula pero solo al utilizar el método de Murray (BABB), con los otros dos métodos, SeeDB y *Scale*, no observamos ningún indicio de transparentación; aun así cabe mencionar que en el método de *Scale*, pudimos observar una pérdida del pigmento del ojo en comparación con los otros dos métodos; desafortunadamente no fuimos capaces de observar señal de GFP en ninguna de las muestras en el cerebro en el microscopio confocal invertido (Fig. 14).

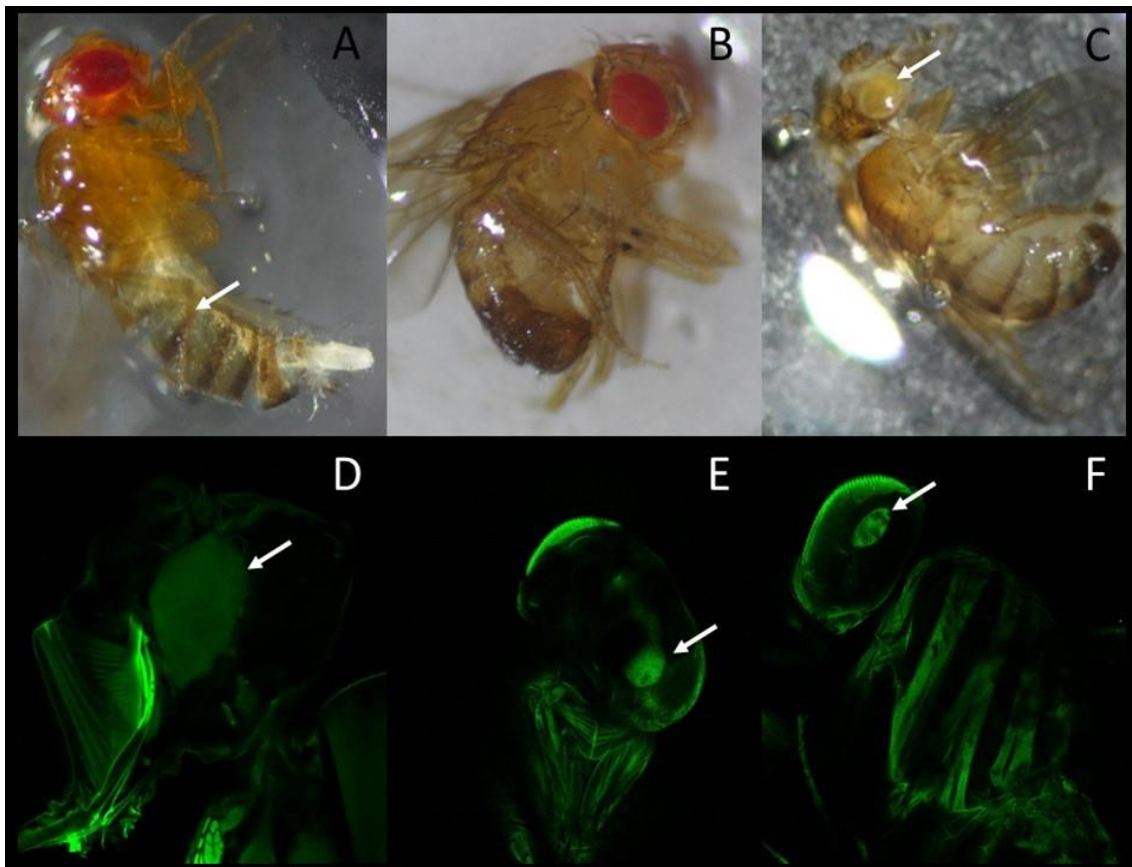


Fig. 14. Moscas tratadas con los diferentes métodos de transparentación. El panel A muestra las moscas tratadas con el método de Murray o BABB. Se puede observar una completa transparentación del abdomen excepto por las tergitas (Flecha) El panel B muestra una mosca tratada con el método de SeeDB, no se observó ninguna transparentación. El panel C muestra una mosca tratada con el método de Scale. Las flechas marca el ojo de la mosca, donde el pigmento desapareció. Este método fue muy largo (2 meses) y el tejido empezó a mostrar degradación. Panel D, E, F muestran moscas tratadas con BABB observadas utilizando microscopia confocal, las flechas marcan el cerebro sin ningún signo de fluorescencia de GFP, quizá relacionado con la autofluorescencia de la cutícula.

Si bien no se detectó ninguna señal de GFP en los cerebros de las moscas, se observó un pequeño indicio de fluorescencia en la región del ganglio torácico abdominal (Fig. 15) pero no se pudo concluir nada debido a la señal de autofluorescencia.

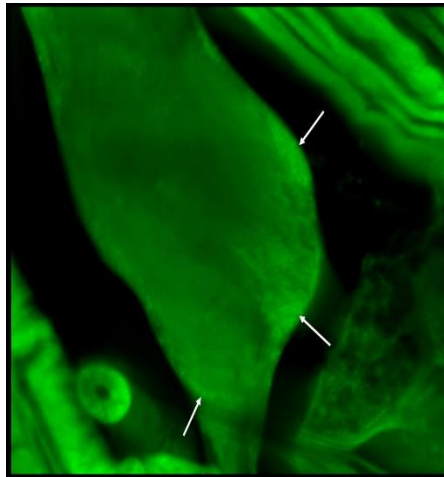


Fig. 15. Ganglio torácico abdominal. Imagen de microscopia confocal en la que se observan indicios de la señal de GFP en el ganglio torácico abdominal, estas zonas se señalan con las flechas blancas.

La cutícula de la mosca gana autofluorescencia en las diferentes soluciones.

Si bien, las muestras que fueron tratadas con peróxido de hidrógeno y con las soluciones *Scale* y *SeeDB* no se llevaron a microscopia confocal, estas si se observaron utilizando el microscopio estereoscópico y con la ayuda de filtros especiales para observar diferentes proteínas fluorescentes, desafortunadamente en estas moscas se observó una señal muy intensa ocasionada por la cutícula de la mosca, incluso en moscas *white*, las cuales no expresan la proteína *GFP*, se notaba una señal verde (Fig. 16), razón por la cual ya no se culminó el procedimiento; adicionalmente, en ningún caso se observó transparentación como ya se mencionó anteriormente.

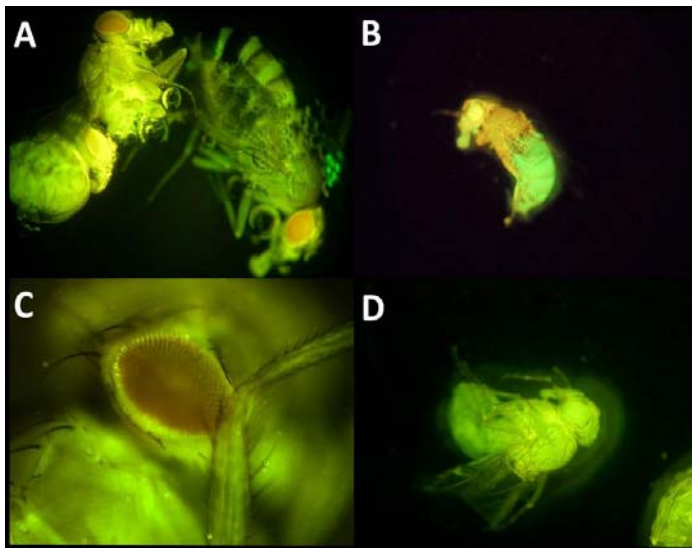


Fig. 16. Autofluorescencia de la cutícula. A) Mosca tratada con peróxido de hidrógeno 1%. B) Mosca tratada con Scale. C) Mosca tratada con solución SeeDB. D) Mosca white tratada con SeeDB. En todas se observa una señal verde debido a la autofluorescencia ganada con cada uno de los métodos.

MUERTE NEURONAL Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

*La presencia de α -Sin y Synf ocasionan que haya un menor número de neuronas dopaminérgicas en el cerebro de *D. melanogaster*.*

Para determinar si la expresión de *SNCA* y *SNCAIP*, genes que codifican para α -Sin y Synf y que se sabe están involucradas en la aparición de la EP, quisimos determinar el número de neuronas sobrevivientes a través del tiempo en presencia de estas proteínas, por separado y en conjunto. Al obtener los cerebros de las diferentes líneas, pudimos observar que existe un menor número de neuronas en las líneas transgénicas en comparación al control, lo que nos está indicando una propiedad citotóxica de las proteínas α -Sin y Synf, siendo la línea transgénica de Synf la más afectada, ya que como se puede observar en la figura 17, en el día 1 se nota un menor número de neuronas, característica que se mantiene a lo largo del tiempo, e inclusive en el día 30 prácticamente no le queda ninguna neurona dopaminérgica, lo cual es opuesto a lo que se observa en las demás líneas y en el control. Resultados similares se observan en la línea *SNCA*, aunque no tan drásticamente como en la línea Synf. Por otro lado, en la línea doble, se puede observar como la interacción de ambas proteínas está reduciendo el efecto citotóxico que poseen de manera individual (Fig. 17)

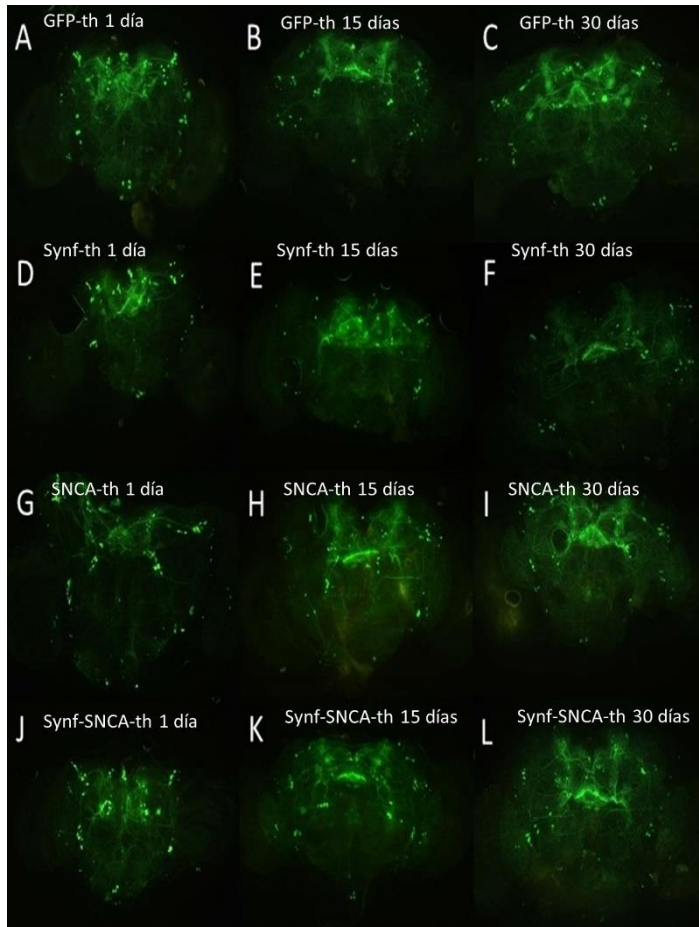


Fig. 17. Cerebros de las diferentes líneas transgénicas. En la primera columna observamos los cerebros de las diferentes líneas al día 1, en la segunda columna los cerebros al día 15 y en la tercera columna los cerebros al día 30. De los paneles A al C observamos la línea control (GFP-th). En los paneles D al F la línea Synf-th, se puede observar claramente como presentan un menor número de neuronas con respecto a las demás líneas. De los paneles G al I la línea SNCA-th. Y finalmente de los paneles J al L la línea doble (SNCA-Synf) en la que podemos notar como la interacción de ambas proteínas confiere una protección a la citotoxicidad que poseen cuando se tienen por separado.

La expresión de SNCA y SNCAIP acelera la muerte de neuronas dopaminérgicas.

Para determinar si la presencia de α -Sin y Synf causaba una citotoxicidad en las células dopaminérgicas, procedimos a cuantificar el número de neuronas sobrevivientes a través del tiempo, es así que al expresar los genes que codifican para las proteínas α -Sin y Synf bajo el promotor del gen *TH*, observamos que existe una disminución en el número de neuronas presentes en el cerebro de las moscas, siendo más tóxico para las células la presencia de la proteína Synf, esta disminución se mantiene a lo largo del tiempo, ya que desde el primer día post eclosión, hasta el último día de cuantificación, las moscas que expresan estos genes mostraron un menor número de neuronas con respecto al control. Por otro lado, de manera interesante se observa una leve disminución en la muerte neuronal cuando se coexpresan ambos genes (Fig. 18).

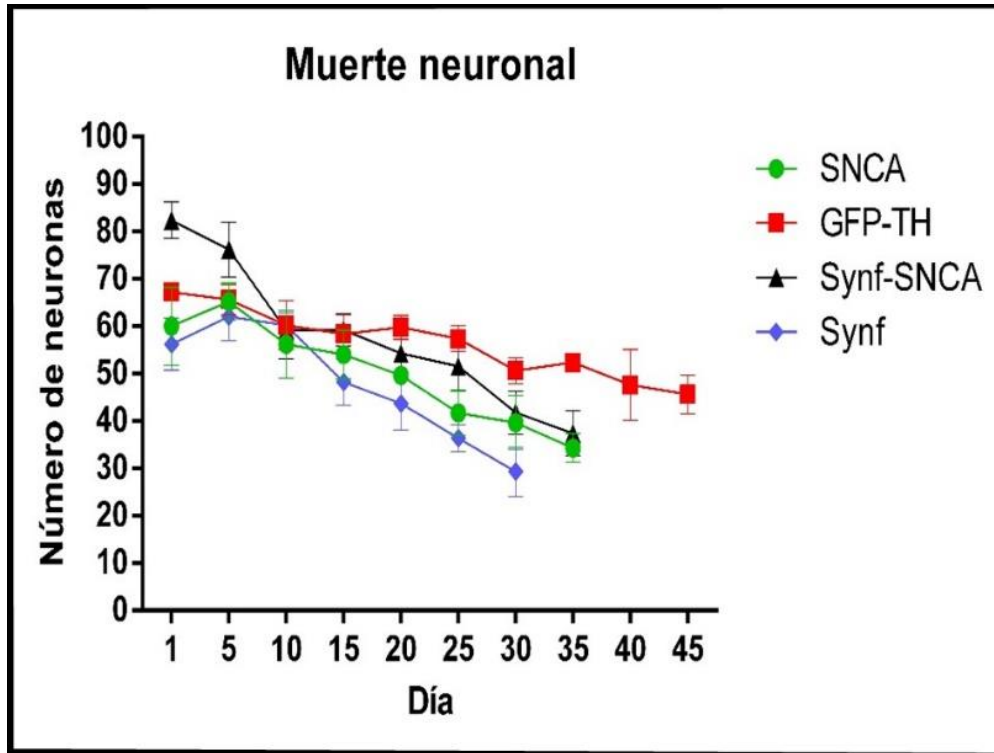


Fig. 18. Muerte neuronal en las diferentes líneas. Se observa como desde el primer día post eclosión la presencia de las proteínas α -Sin y Synf acelera la muerte neuronal en el cerebro de las moscas, pero de manera interesante se observa que cuando se coexpresan hay una leve disminución en la muerte de las neuronas.

La presencia de α -Sin y Synf en conjunto, promueve una disminución en la muerte neuronal.

Si bien la expresión de *SNCA* y *SNCAIP* por separado resulta en un menor número de neuronas dopaminérgicas y en una muerte celular más acelerada, observamos que cuando expresamos en conjunto estos genes, hay un leve aumento en el número de neuronas con respecto a las otras dos líneas sencillas en el primer día post eclosión; además de que, en edades más avanzadas, 20 y 30 días, la interacción de Synf con α -Sin, parece estar disminuyendo la toxicidad dada por Synf, ya que observamos un mayor número de neuronas cuando se compara con la línea que solo expresa el gen *SNCAIP* (Fig. 19).

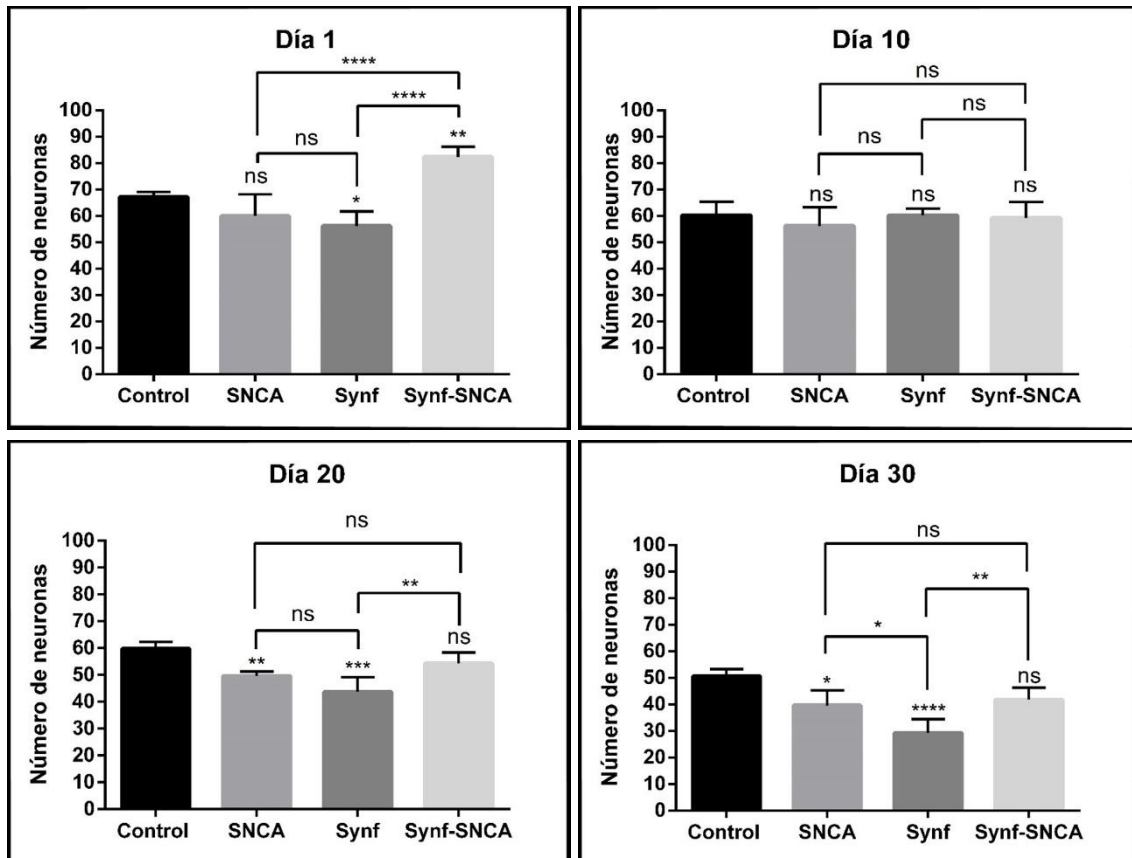


Fig. 19. La interacción de α -Sin con Synf, protege de la toxicidad dada por Synf. Gráficas que muestran el número de neuronas en los días 1, 10, 20 y 30 post eclosión de las distintas líneas, se observa que al día 1 hay un mayor número de neuronas en la línea doble, inclusive más que en el control, y que en días posteriores, la presencia de α -Sin, reduce la toxicidad de Synf. (ns: no significativo, *: 0.05, **:0.01, ***:0.005, ****:0.001, n=5)

La expresión del gen DTH disminuye en presencia de α -Sin.

Al analizar los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión de los genes *DTH*, *SNCA* y *SNCAIP*, pudimos percatarnos que existe una disminución significativa en la expresión del gen codificante para la proteína TH en aquellas líneas transgénicas que expresan el gen *SNCA*, tanto en la línea sencilla como en la doble, por otro lado en la línea de Synf, observamos una expresión de *DTH* similar al control en edades antes de los 20 días y viendo una disminución significativa con respecto al control en edades avanzadas (Fig. 20).

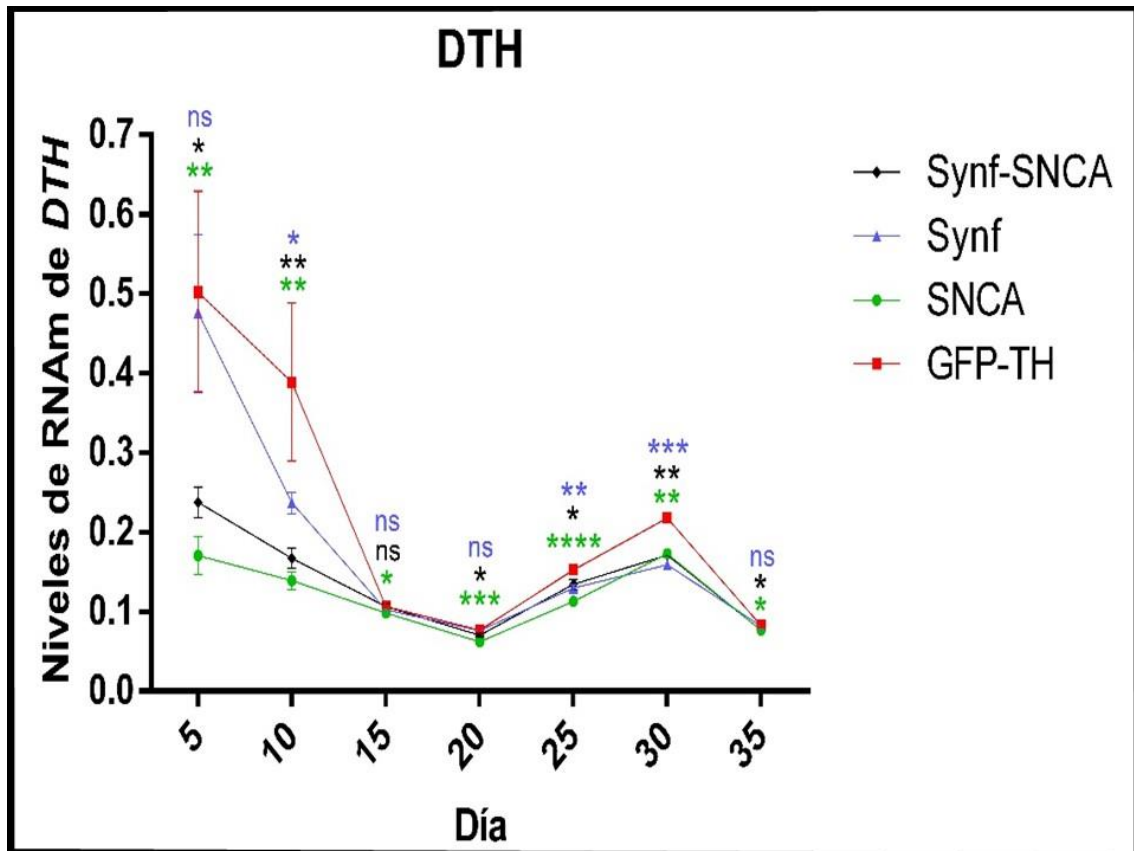


Fig. 20. Expresión del gen *DTH*. En esta gráfica se muestra una disminución de la expresión en gen *DTH* en aquellas líneas que sobreexpresan α -Sin. La presencia de la proteína Synf no interfiere con los niveles de expresión normales del gen *DTH* en edades tempranas, mientras que en edades avanzadas se observa una disminución en su expresión, debido quizá a que hay un menor número de neuronas. Se muestran las diferencias significativas con respecto al control GFP-TH. (ns: no significativo, *: 0.05, **:0.01, ***:0.005, ****:0.001, n=5)

La presencia de Synf aumenta los niveles de expresión del gen SNCA.

Por otro lado observamos que existe un aumento significativo en los niveles de expresión del gen *SNCA* en presencia de la proteína Synf, esto se observó en la línea doble transgénica Synf-SNCA y se comparó con respecto a la línea sencilla SNCA, registramos un aumento desde el primer día de cuantificación conservándose esta tendencia hasta el día 30 (Fig. 21).

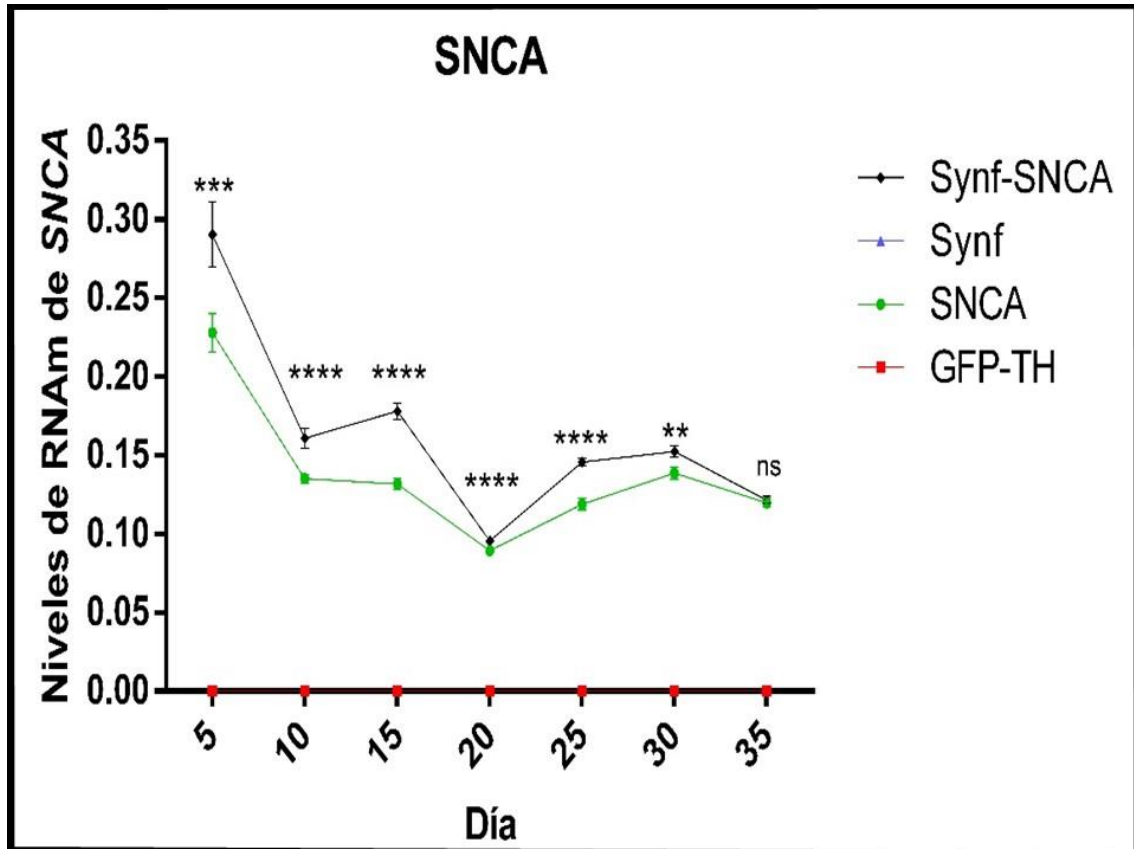


Fig. 21. Expresión del gen *SNCA*. Se puede notar como la presencia de la proteína Synf, induce un aumento en la expresión del gen *SNCA*, esta tendencia se mantiene en todos los puntos a través del tiempo, solo siendo no significativa en el día 35. (ns: no significativo, *: 0.05, **: 0.01, ***: 0.005, ****: 0.001, n=5)

La expresión del gen SNCAIP es variable a través del tiempo.

Si bien la presencia de Synf resulta ser la más tóxica para las neuronas dopaminérgicas, al cuantificar los niveles del gen que la codifica, *SNCAIP*, no observamos ninguna tendencia, registramos que existe un comportamiento dinámico en la expresión de este gen, tanto en la línea doble transgénica como en la línea sencilla, ya que notamos que en edades tempranas existe más expresión del gen *SNCAIP* en la línea sencilla, mientras que en edades avanzadas hay más nivel de expresión en la línea doble (Fig. 22)

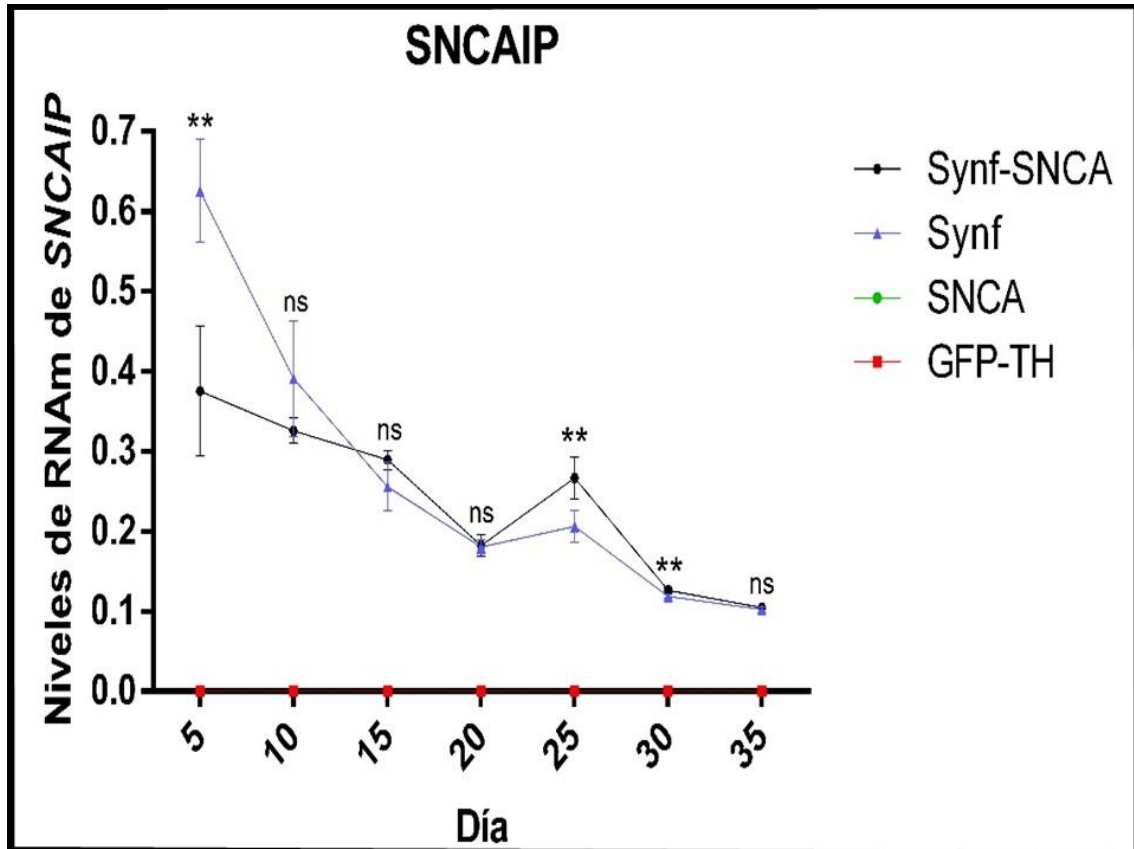


Fig. 22. Expresión del gen *SNCAIP*. Se observa como no existe una tendencia en los niveles de expresión del gen *SNCAIP*, ya que en edades tempranas vemos un nivel de expresión más alto en la línea sencilla, mientras que en edades avanzadas observamos un mayor nivel de expresión en la línea doble. (ns: no significativo, *: 0.05, **:0.01, ***:0.005, ****0.001, n=5)

X. DISCUSIÓN.

Drosophila melanogaster representa un modelo biológico muy importante para entender a las enfermedades neurodegenerativas, el tamaño del organismo confiere ventajas que permiten manipularlo de una manera sencilla y rápida; por otro lado el sistema nervioso de este animal es poco “complejo”, lo que nos permite entender su fisiología y funcionamiento. Es por eso que el observar este sistema sin alterar su morfología es importante para de esta manera comprender mejor la relación que existe entre la muerte de neuronas dopaminérgicas y la EP.

En esta tesis se trataron de estandarizar métodos reportados previamente en modelos murinos para transparentar cerebros, esto con el fin de que seamos capaces de observar dinámicas neuronales utilizando a la GFP como marcador para su uso en el estudio de *D. melanogaster*.

Uno de los principales problemas que tuvimos al tratar de estandarizar un método de transparentación fue la ganancia de autofluorescencia en cada uno de los protocolos usados en esta tesis; mucha de esta fluorescencia ganada por la cutícula se puede atribuir a que cada una de las muestras recibieron un tratamiento de fijación con paraformaldehído al 4% disuelto en PBS 1X (Fig. 16), impidiéndonos así el observar alguna señal de GFP originada por las neuronas dopaminérgicas, de tal manera que no podemos concluir si la proteína GFP mantiene su integridad o no a los tratamientos utilizados.

Existen algunos agentes capaces de reducir la señal ocasionado por la autofluorescencia de los tejidos, como es el caso del Sudan Black B, usado principalmente para teñir triglicéridos y lípidos. Algunas publicaciones han reportado que el uso de este agente es capaz de reducir el ruido de la autofluorescencia, esto fue probado en tejido renal murino en distintos métodos de fijación (*Sun, 2011*), por lo que quizás en un futuro ensayo podríamos pensar en utilizar este agente para reducir los efectos de autofluorescencia ocasionados por el método de fijación del tejido.

También podemos pensar en utilizar moscas cuyas neuronas estén marcadas con proteínas que no sean GFP, como la proteína cian fluorescente (CFP), o proteína roja fluorescente (RFP), esto para conocer si somos capaces de diferenciar la fluorescencia propia de estas proteínas de la señal autofluorescente que gana la cutícula de la mosca.

Así que sí bien no se logró visualizar a las neuronas dopaminérgicas con ninguno de los métodos utilizados en esta tesis, fuimos capaces de estandarizar un método para transparentar la cutícula, además de que sorprendentemente notamos que los músculos de *D. melanogaster* son visibles cuando las muestras son tratadas con el método de Murray y vistas en el microscopio confocal

invertido, permitiendo de esta manera visualizar parte de su morfología, así que si bien a nosotros no nos funcionó para la finalidad que teníamos planeada, esto puede permitir en otras investigaciones estudiar patologías o mutaciones relacionadas a la malformación o deterioro de la musculatura en *D. melanogaster* (Fig. 23).

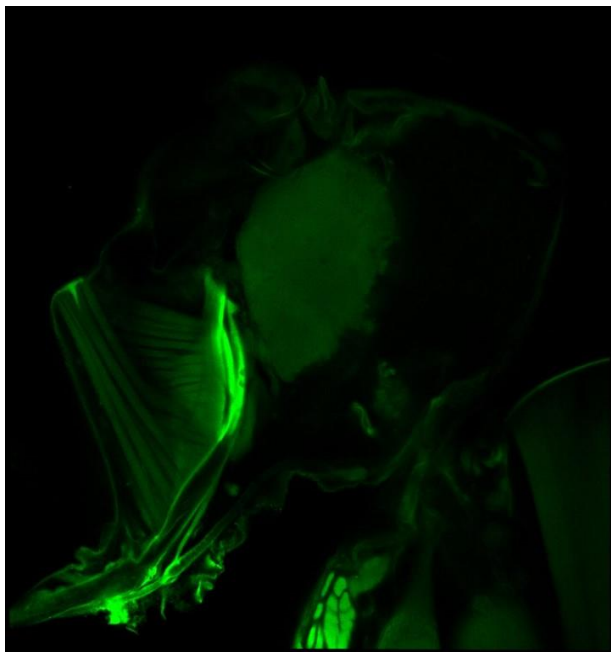


Fig. 23. Músculos de la proboscis en *D. melanogaster*. En esta imagen se puede observar claramente la tinción de la musculatura que controla la proboscis en la mosca después de recibir el tratamiento de Murray.

Cuantificación relativa de genes.

Por el otro lado, al realizar la cuantificación de los genes asociados a las proteínas relacionadas directamente con la muerte de las neuronas dopaminérgicas y a la aparición de síntomas parkinsonianos en *D. melanogaster*, notamos varias cuestiones bastante interesantes a lo largo del tiempo.

En primer lugar observamos una disminución más dramática en el número de neuronas dopaminérgicas que se pierden al estar presente la proteína Synf, esto en comparación con las otros dos líneas transgénicas, la sencilla de α -Sin y la doble. Si bien no fueron reproducibles los resultados que *Hernández-Vargas* publicará en el 2011, en el que se demostraba que la presencia de ambas proteínas confería una protección a las neuronas dopaminérgicas e inclusive un mayor número en comparación al control; en esta tesis si fuimos capaces de observar una protección a las neuronas dopaminérgicas cuando se encuentran ambas proteínas, en comparación con las líneas sencillas, aunque no se observó

ningún fenotipo que indicara que la presencia de ambas proteínas fuera mejor para la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas (Fig. 18).

La interacción de estas proteínas se ha comprobado en distintos modelos como ya se ha mencionado anteriormente, es así que probablemente la toxicidad que se está dando por la presencia de ambas proteínas por separado se está anulando cuando estas proteínas interactúan (*Hernández-Vargas, 2011*). Por un lado sabemos que α -Sin puede tomar varias conformaciones, en las cuales los oligómeros son la conformación tóxica de la proteína, lo que además impide que esta al agregarse sea imposible de degradarse, lo que conlleva a una mayor agregación y a la interacción con otro número más de proteínas (*Lashuel, 2002*). Por el otro lado sabemos que Synf es una proteína que mantiene una fuerte interacción con α -Sin, si bien no se sabe a ciencia cierta cuál es la función de estas proteínas, podemos pensar que Synf está interaccionando con α -Sin para que esta tome su conformación funcional, evitando así que esta tome conformaciones no funcionales y tóxicas para la célula (*Engelender, 1999*). Adicionalmente, por otros estudios se sabe que α -Sin interactúa con Parkina, una Ubiquitin ligasa relacionada con el sistema de ubiquitinación del proteosoma, por lo que además de que Synf quizá esté jugando un papel en la función correcta de α -Sin, probablemente también esté relacionada con la correcta degradación de la proteína por medio del proteosoma, ya que Parkina sería incapaz de reconocer a la proteína si esta se encuentra en forma de agregados (*Kalia, 2013*).

Interesantemente cuando realizamos la cuantificación relativa de los genes asociados a la expresión de estas proteínas, así como de *DTH*, pudimos notar que la expresión de *DTH* es mayor en la línea de Synf en comparación con la línea de α -Sin, a pesar de que las moscas que expresan el gen *SNCAIP*, poseen un menor número de neuronas; pero también a través del tiempo se observa que existe una disminución más drástica de la expresión de *DTH* en esta línea, en comparación a la de α -Sin, que si bien es menor la cantidad de expresión, esta se mantiene constante a través del tiempo,

Esto nos hace pensar que α -Sin de alguna forma disminuye el metabolismo normal de las neuronas dopaminérgicas, pero permite que estas sobrevivan mucho más tiempo, lo que sería mejor para el organismo, ya que mantendría una cantidad constante de Tirosina Hidroxilasa en todo su ciclo de vida, mientras que Synf quizá no está modificando el metabolismo de la célula, pero resulta que es más tóxica desencadenando en una acelerada muerte de las neuronas, lo que conlleva a la muerte de organismo a una edad más temprana. (Fig. 20).

Otro dato que nos sorprendió, fue el aumento en la expresión de *SNCA*, cuando está presente la proteína Synf, ya que en cada punto en el cual cuantificamos fuimos capaces de observar que existe un aumento significativo en la expresión de este gen (Fig. 21). Ahora bien, sabemos que estos dos genes no son propios

de la mosca, ya que estos se encuentran bajo el sistema *GAL4/UAS*, por lo que no podríamos determinar si estos dos genes se regulan entre sí, en el futuro se plantea la posibilidad de medir la expresión de *GAL4* y determinar así la dinámica transcripcional de ambos transgenes.

La cuantificación de la expresión del gen *SNCAIP*, nos muestra una conducta bastante dinámica de la actividad transcripcional. Observamos que existe una disminución en la línea sencilla de *Synf*, esto obviamente relacionado con la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas, mientras que en la línea doble, observamos una disminución menos drástica, lo que no hablaría de nuevo de la protección que se está dando cuando se encuentran tanto α -Sin como *Synf* presentes en la célula, que si bien también ocurre una muerte neuronal, esta se lleva en periodos de tiempo más largos (Fig. 22).

Finalmente, en todas las gráficas observamos dos fases, la primera fase hacia el día 20, en la cual se nota claramente una disminución de todos los genes cuantificados, lo que nos permitiría concluir que es esta es la fase relevante para la patología de la EP, ya que en esta fase es en la que las neuronas dopaminérgicas están bajando aceleradamente su metabolismo y muriendo por la acción de *Synf* y α -Sin. Por otro lado, observamos una segunda fase, donde observamos un ligero aumento en la expresión de los genes cuantificados, estos se traduciría en que las células residuales están adaptándose a los cambios metabólicos ocasionados por la presencia de ambas proteínas, de tal manera que tratan de contrarrestar la decadencia de Tirosina Hidroxilasa.

En conclusión, si bien no pudimos estandarizar un método efectivo para cuantificar la muerte de neuronas dopaminérgicas en *D. melanogaster*, si fuimos capaces de observar la dinámica que existe en la expresión de estos genes. Todo esto nos abre nuevas áreas de investigación, para comprobar el papel de ambas proteínas en la patología de la EP y su relación con la disminución de Tirosina Hidroxilasa, así como la protección que se está dando debido a la presencia de ambas proteínas, *Synf* y α -Sin.

XI. CONCLUSIONES.

- ❖ La cutícula de la moscas es capaz de transparentarse pero desafortunadamente la fluorescencia de GFP se pierde, esto quizá debido al tratamiento previo con paraformaldehído y a la presencia de autofluorescencia de la cutícula.
- ❖ El método de Murray fue el más efectivo de los 3 métodos, siendo el de SeeDB el menos útil al no observar signos de transparentación de la cutícula ni pérdida de coloración en el ojo, como si lo pudimos observar con *Scale*.
- ❖ Si bien el método de Murray no funcionó para ver observar neuronas dopaminérgicas, sirvió para teñir a los músculos de la mosca.
- ❖ La presencia de la proteína Synf resulta ser más tóxica para las neuronas dopaminérgicas.
- ❖ Cuando se encuentran Synf y α -Sin, estas proteínas interactúan promoviendo una ligera protección a las neuronas.
- ❖ La expresión de *DTH* disminuye drásticamente cuando se encuentra Synf, mientras que es más constante cuando se encuentra α -Sin.
- ❖ La expresión de *SNCA* aumenta cuando está presente la proteína Synf.
- ❖ La expresión de *SNCAIP* es muy dinámica, en la línea sencilla de Synf disminuye rápidamente, mientras que en la doble esta disminución es menos drástica.
- ❖ En conclusión, la expresión de los genes *SNCA* y *SNCAIP*, mantienen una relación directamente proporcional con relación al número de neuronas dopaminérgicas, ya que estos bajan sus niveles de expresión cuando hay un menor número de neuronas.

XII. PERSPECTIVAS.

- ❖ Combinar los métodos de transparentación con protocolos que permitan la eliminación o reducción de autofluorescencia, con el uso de agentes químicos como el Suddan Black B.
- ❖ Probar los métodos de transparentación con moscas que sinteticen alguna otra proteína fluorescente, como RFP o CFP, para determinar si se puede diferenciar de la autofluorescencia de la cutícula.
- ❖ Cuantificar el número de neuronas en larvas para observar que se repita el mismo patrón que en adulto.
- ❖ Cuantificar la expresión relativa de los genes *SNCAIP*, *SNCA* y *DTH* en larvas.
- ❖ Determinar la expresión de cada gen, normalizándolos bajo la expresión del factor transcripcional *GAL4*.
- ❖ Realizar RNA-seq para determinar la dinámica de otros genes en *D. melanogaster*, por la presencia de Synf y α -Sin.
- ❖ Cuantificar la cantidad de proteína a través del tiempo por medio de Western Blot.

XIII. REFERENCIAS.

XIII.I Publicaciones.

Betarbet, R., Sherer, T. B., Mackenzie, G., Garcia-osuna, M., Panov, A. V, & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson' s disease, *Nat. Neurosci.* 26, 1301–1306.

Bezard E, Brotchie JM, Gross CE. (2001). Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat Rev Neuroscience* 2001; 2:577-88

Bezard, E., & Przedborski, S. (2011). A tale on animal models of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 26(6), 993–1002.

Chung, K.K., Zhang, Y., Lim, K.L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C.A., Dawson, V.L., Dawson, T.M., (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewybody formation in Parkinson disease. *Nat. Med.* 7

Conway KA, Harper JD, Lansbury PT (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med* 4: 1318–1320.

Conway KA, Harper JD, Lansbury PT Jr. 2000. Fibrils formed in vitro from alpha synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39:2552–2563.

Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, et al. (2006) Alphasynuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313: 324–328

Dexter, D. T., & Jenner, P. (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free radical biology & medicine*, 62, 132–44. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018

Dickson DW, Feany MB, Yen SH, Mattiace LA, Davies P. (1996). "Cytoskeletal pathology in non-Alzheimer degenerative dementia: new lesions in diffuse Lewy body disease, Pick's disease, and corticobasal degeneration". *Journal of Neural Transmission. Supplementum* : 31–46.

Dickson DW.(2001) Neuropathology of Alzheimer's disease and other dementias. *Clin. Geriatr. Med.* 2001;17:209-27.

El-Agnaf, O. M. a, Salem, S. a, Paleologou, K. E., Curran, M. D., Gibson, M. J., Court, J. Allsop, D. (2006). Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease.

FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 20(3), 419–25. doi:10.1096/fj.03-1449com

Follett, K., Weaver, F., Stern, M., Hur, K., Harris, C., Ping Luo, P., Marks, W., Rothlind, J., Sagher, O., Moy, C., Pahwa, R., Burchiel, K., Hogarth, P., Lai, E., Duda, J., Holloway, K., Samii, A., Horn, S., Bronstein, J., Stoner, G., Starr, P., Simpson, R., Baltuch, G., De Salles, A., Huang, G., Reda, D. (2010). Pallidal versus Subthalamic Deep Brain Stimulation for Parkinson's Disease. *The New England Journal of Medicine* 362; June 3, 2010. 2077-2091

Forno, L.S. (1969) Concentric hyaline intraneuronal inclusions of Lewy type in the brains of elderly persons (50 incidental cases): relationship to parkinsonism. *J Am Geriatr Sc* 1969; 17:557-575.

Gaig, C., Martí, M. J., Ezquerro, M., Rey, M. J., Cardozo, A., & Tolosa, E. (2007). G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 78(6), 626–8. doi:10.1136/jnnp.2006.107904

Gazewood, J. D., Richards, D. R., & Clebak, K. (2013). Parkinson disease: an update. *American family physician*, 87(4), 267–73.

Gibb W, Less A,(1998) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1988;51:745-752

Greenamyre, J. T., & Hastings, T. G. (2004). Biomedicine. Parkinson's—divergent causes, convergent mechanisms. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674), 1120–2.

Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Miyawaki, A. (2011). Scale : a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature Neuroscience*, 14(11), 1481–1488. doi:10.1038/nn.2928

Herman, Gabor T. (2009). *Fundamentals of Computerized Tomography: Image Reconstruction from Projections* (2nd ed.). Springer.

Hernández-Vargas, R., Fonseca-Ornelas, L., López-González, I., Riesgo-Escovar, J., Zurita, M., & Reynaud, E. (2011). Synphilin suppresses α -synuclein neurotoxicity in a Parkinson's disease *Drosophila* model. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 49(5), 392–402.

Hoehn, M. M., & Yahr, M. D. (2001). Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967. *Neurology*, 57(10 Suppl 3), S11–26.9.

Hornykiewicz O. (2002). L-DOPA: from a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids* 2002; 23:65-70.

Jordi Humbert, Katrin Beyer, Cristina Carrato, José L. Mate, Isidro Ferrer, and Aurelio Ariza (2007) Parkin and synphilin-1 isoform expression changes in Lewy body diseases. *Neurobiology of Disease* 26 2007 681–687.

Kalia, L. V, Kalia, S. K., McLean, P. J., Lozano, A. M., & Lang, A. E. (2013). α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Annals of neurology*, 73(2), 155–69. doi:10.1002/ana.23746

Ke, M.-T., Fujimoto, S., & Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature neuroscience*, 16(8), 1154–61. doi:10.1038/nn.3447

Kosaka T., Diffuse Lewy bodies disease in Japan. (1990) *J Neurol* 1990 237 : 197-204

Kosaka, K. (2010). *Neuropsychiatric Disorders*. (K. Miyoshi, Y. Morimura, & K. Maeda, Eds.), 255–259.

Lai, B. C. ., Marion, S. ., Teschke, K., & Tsui, J. K. (2002). Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 8(5), 297–309.

Langston, J.W., Ballard P.A., Tetrud J.W., Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of mepedirine-analog synthesis. *Science*, 1983; 219:979-980.

Langston, J.W. Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 1998; 44 (Suppl.):45-52.

Langston, J.W. (2006) The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann. Neurol* 59: 591-596

Lashuel, H. a., Petre, B. M., Wall, J., Simon, M., Nowak, R. J., Walz, T., & Lansbury, P. T. (2002). α -Synuclein, Especially the Parkinson's Disease-associated Mutants, Forms Pore-like Annular and Tubular Protofibrils. *Journal of Molecular Biology*, 322(5), 1089–1102.

de Lau LM, Breteler MM. (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006; 5(6): 525-535.

Litvan, I., Bhatia, K. P., Burn, D. J., Goetz, C. G., Lang, A. E., Mckeith, I., Wenning, G. K. (2003). Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force Appraisal of Clinical Diagnostic Criteria for Parkinsonian Disorders, *Mov. Disord*, 2003.18(5), 467–486.

McGurk, L., Morrison, H., Keegan, L. P., Sharpe, J., & O'Connell, M. a. (2007). Three-dimensional imaging of *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 2(9), e834.

Mcnaught, K. S. P., Olanow, C. W., Halliwell, B., Isacson, O., & Jenner, P. (2001). Failure of the ubiquitin–proteasome system in Parkinson’s disease, *Nature Reviews, Neuroscience* Volume 2, August 2001. pp. 589-594

Mhyre, T. R., Boyd, J. T., Hamill, R. W., & Maguire-zeiss, K. A. (2012). *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease*. (J. R. Harris, Ed.) (Vol. 65). Dordrecht: Springer Netherlands.

Mikiei Tanaka, Yong Man Kim, Gwang Lee, Eunsung Junn, Takeshi Iwatsubo, and M. Maral (2004) Mouradian. Aggresomes Formed by α -Synuclein and Synphilin 1 Are Cytoprotective. *The Journal of biological chemistry* Vol. 279, No. 6, Issue of February 6, pp. 4625–4631, 2004.

Miyasaki, J. M., Martin, W., Suchowersky, O., Weiner, W. J., & Lang, a. E. (2002). Practice parameter: Initiation of treatment for Parkinson’s disease: An evidence-based review: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 58(1), 11–17.

Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 14(2), 223–36; discussion 222.

Ross, C. a, & Poirier, M. a. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 10 Suppl(July), S10–7.

Samii, A., Nutt, J. G., & Ransom, B. R. (2004). Parkinson’s disease. *Lancet*, 363(9423), 1783–93.

Sandal, M. Valle F., Tessari I., Mammi S., Bergantino E., Musiani F., Brucale M., Bubacco L., Samorì B. (2008) Conformational Equilibria in Monomeric α -Synuclein at the Single-Molecule Level *PLoS BIOLOGY* January 2008 Volume 6 Issue 1 e6 α

Secretaria de Salud & Mora, J.F. (2006) Programa específico de enfermedad de Parkinson 2001-2006. SSA

Sharon, R., Bar-joseph, I., Frosch, M. P., Walsh, D. M., Hamilton, J. A., & Selkoe, D. J. (2003). The Formation of Highly Soluble Oligomers of α -Synuclein Is Regulated by Fatty Acids and Enhanced in Parkinson’s Disease *Brigham and Women ’ s Hospital*, 37, 583–595.

Shults, C. W. (2006). Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), 1661–8.

Tanaka, M., Kim, Y. M., Lee, G., Junn, E., Iwatsubo, T., & Mouradian, M. M. (2004). Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *The Journal of biological chemistry*, 279(6), 4625–31.

Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 14(2), 223–36; discussion 222.

Pollanen M, Dickson D, Bergeron C. (1993) Pathology and biology of the lewy body. *Journal of neuropathology and experimental neurology* vol 52 no 3 mayo 1993 pp183-191.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, et al. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045–2047.

Quik, M. (2004). Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends in neurosciences*, 27(9), 561–8.

Rangel-Barajas, C., Florán-Garduño, B (2005). Activación de receptores dopaminérgicos por L-DOPA. De la acción terapéutica a las discinesias. *Rev Biomed* 2005; 16:pp.273-280

Ribeiro, C.S., Carneiro, K., Ross, C.A., Menezes, J.R., Engelender, S., (2002). Synphilin-1 is developmentally localized to synaptic terminals, and its association with synaptic vesicles is modulated by alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 277, 23927–23933.

Schrag, A., Quinn, N. P., Irving, R. J., Oram, S. H., Boyd, J., Rutledge, P., Bloomfield, P. (2000). Cross sectional prevalence survey of idiopathic Parkinson's disease and parkinsonism in London Ten year audit of secondary prevention in coronary bypass patients, 321(July), 21–22.

Villareal-Reyna, S. Z., (2013) Efecto de la curcumina y la tioflavina T sobre el fenotipo de la expresión de alfa-sinucleína y sinfilina en *Drosophila melanogaster*. (Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias) Cuernavaca, Morelos. UNAM, 2013. 70 págs.

Wakabayashi, K., Engelender, S., Yoshimoto, M., Tsuji, S., Ross, C.A., Takahashi, H., (2000). Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 47, 521–523.

Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., & Aigner, S. (2011). In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. doi:10.1073/pnas.1100976108/
/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1100976108

Yan Sun, Hong Yu, Dong Zheng, Qi Cao, Ya Wang, David Harris, Yiping Wang. (2011). Sudan Black B Reduces Autofluorescence in Murine Renal Tissue. *Arch Pathol Lab Med*—Vol 135, October 2011

XIV. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.

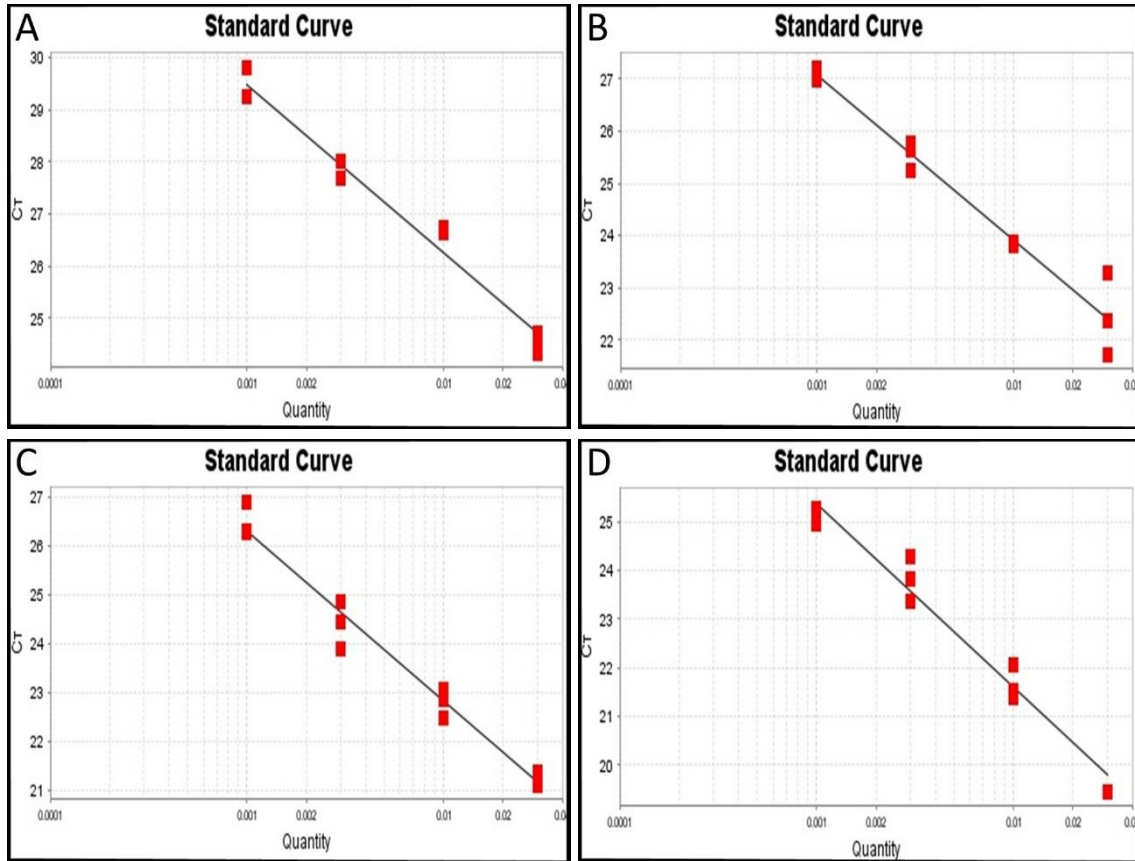
¹http://www.genome.duke.edu/cores/microarray/services/rnaqc/documents/RNeasy_Mini_Handbook.pdf

²<http://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=f0de5533-3dd1-4835-8820-1f5c088dd800&lang=en>

<http://www.inn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/parkinson.html>

XV. ANEXOS.

ANEXO 1.

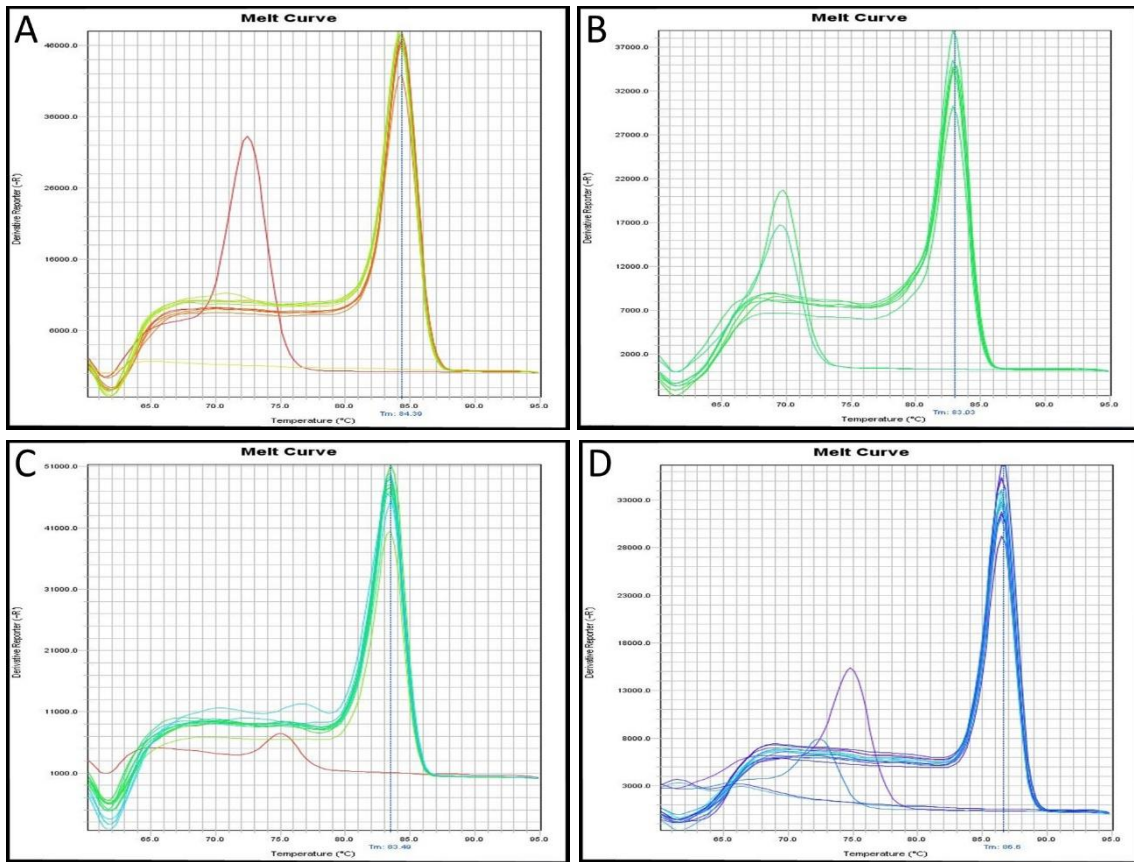


Curvas estándar. A) Curva estándar para el gen DTH. B) Curva estándar para el gen SNCA. C) Curva estándar para el gen SNCAIP. D) Curva estándar para el gen RP49. Todas las curvas estándar se realizaron usando diluciones seriadas a partir de 1 µg de RNA de mosca total, 1:30, 1:90, 1:270, 1:810 (4.8 ng/µl, 1.536 ng/µl, 0.489 ng/µl y 0.157 ng/µl de cDNA respectivamente).

Curvas estándar.

| Gen | Pendiente | R ² | Eficiencia (%) |
|--------|-----------|----------------|----------------|
| DTH | -3.18 | 0.978 | 104.532 |
| SNCA | -3.161 | 0.962 | 107.174 |
| SNCAIP | -3.49 | 0.972 | 93.452 |
| RP49 | -3.789 | 0.962 | 83.627 |

Para poder comparar adecuadamente la expresión relativa de varios genes, se recomienda que estos cuenten con una eficiencia de amplificación similar, está según la literatura puede ir de 80% a 120% (*Applied Biosystems*)



Curvas de fusión. A) Curva de fusión del gen DTH. B) Curva de fusión del gen SNCA. C) Curva de fusión del gen SNCAIP. D) Curva de fusión del gen RP49. Se muestra en las gráficas el pico único de amplificación, también observamos algunos picos que no correlacionan con la temperatura de fusión, que corresponden a los negativos.

ANEXO 2.

Estadística expresión DTH.

Número de familias: 1
 Numero de comparaciones por familia: 6
 Alpha: 0.05

DÍA 5.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|---------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.3317 | 0.1174 to 0.5460 | Yes | ** |
| GFP-TH vs. Synf | 0.02615 | -0.1881 to 0.2404 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.2643 | 0.05003 to 0.4786 | Yes | * |
| SNCA vs. Synf | -0.3056 | -0.5198 to -0.09129 | Yes | ** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.06741 | -0.2817 to 0.1469 | No | ns |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.2382 | 0.02388 to 0.4524 | Yes | * |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|--------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.5022 | 0.1705 | 0.3317 | 0.06691 | 3 | 3 | 7.011 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0.5022 | 0.476 | 0.02615 | 0.06691 | 3 | 3 | 0.5528 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.5022 | 0.2379 | 0.2643 | 0.06691 | 3 | 3 | 5.586 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.1705 | 0.476 | -0.3056 | 0.06691 | 3 | 3 | 6.458 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.1705 | 0.2379 | -0.06741 | 0.06691 | 3 | 3 | 1.425 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.476 | 0.2379 | 0.2382 | 0.06691 | 3 | 3 | 5.034 | 8 |

DÍA 10.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|--------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.25 | 0.1165 to 0.3835 | Yes | ** |
| GFP-TH vs. Synf | 0.1519 | 0.01839 to 0.2854 | Yes | * |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.2215 | 0.08797 to 0.3549 | Yes | ** |
| SNCA vs. Synf | -0.09809 | -0.2316 to 0.03539 | No | ns |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.02851 | -0.1620 to 0.1050 | No | ns |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.06958 | -0.06390 to 0.2031 | No | ns |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|--------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.3889 | 0.1389 | 0.25 | 0.04168 | 3 | 3 | 8.481 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0.3889 | 0.237 | 0.1519 | 0.04168 | 3 | 3 | 5.153 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.3889 | 0.1674 | 0.2215 | 0.04168 | 3 | 3 | 7.513 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.1389 | 0.237 | -0.09809 | 0.04168 | 3 | 3 | 3.328 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.1389 | 0.1674 | -0.02851 | 0.04168 | 3 | 3 | 0.9673 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.237 | 0.1674 | 0.06958 | 0.04168 | 3 | 3 | 2.361 | 8 |

DÍA 15.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|------------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.008026 | 0.0003120 to 0.01574 | Yes | * |
| GFP-TH vs. Synf | 0.004294 | -0.003420 to 0.01201 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.0001088 | -0.007605 to 0.007823 | No | ns |
| SNCA vs. Synf | -0.003732 | -0.01145 to 0.003982 | No | ns |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.007917 | -0.01563 to -0.0002032 | Yes | * |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.004185 | -0.01190 to 0.003529 | No | ns |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|---------|---------|------------|-------------|----|----|---------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.1066 | 0.09857 | 0.008026 | 0.002409 | 3 | 3 | 4.712 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0.1066 | 0.1023 | 0.004294 | 0.002409 | 3 | 3 | 2.521 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.1066 | 0.1065 | 0.0001088 | 0.002409 | 3 | 3 | 0.06387 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.09857 | 0.1023 | -0.003732 | 0.002409 | 3 | 3 | 2.191 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.09857 | 0.1065 | -0.007917 | 0.002409 | 3 | 3 | 4.648 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.1023 | 0.1065 | -0.004185 | 0.002409 | 3 | 3 | 2.457 | 8 |

DÍA 20.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.0146 | 0.009267 to 0.01993 | Yes | *** |
| GFP-TH vs. Synf | 0.0008161 | -0.004516 to 0.006148 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.006823 | 0.001491 to 0.01216 | Yes | * |
| SNCA vs. Synf | -0.01378 | -0.01912 to -0.008451 | Yes | *** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.007776 | -0.01311 to -0.002444 | Yes | ** |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.006007 | 0.0006749 to 0.01134 | Yes | * |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|---------|---------|------------|-------------|----|----|--------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.07696 | 0.06236 | 0.0146 | 0.001665 | 3 | 3 | 12.4 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0.07696 | 0.07614 | 0.0008161 | 0.001665 | 3 | 3 | 0.6931 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.07696 | 0.07013 | 0.006823 | 0.001665 | 3 | 3 | 5.795 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.06236 | 0.07614 | -0.01378 | 0.001665 | 3 | 3 | 11.71 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.06236 | 0.07013 | -0.007776 | 0.001665 | 3 | 3 | 6.604 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.07614 | 0.07013 | 0.006007 | 0.001665 | 3 | 3 | 5.102 | 8 |

DÍA 25.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.03963 | 0.02601 to 0.05325 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf | 0.02289 | 0.009273 to 0.03651 | Yes | ** |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.01858 | 0.004955 to 0.03220 | Yes | * |
| SNCA vs. Synf | -0.01674 | -0.03036 to -0.003116 | Yes | * |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.02105 | -0.03467 to -0.007433 | Yes | ** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.004317 | -0.01794 to 0.009303 | No | ns |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.1528 | 0.1132 | 0.03963 | 0.004253 | 3 | 3 | 13.18 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0.1528 | 0.1299 | 0.02289 | 0.004253 | 3 | 3 | 7.612 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.1528 | 0.1342 | 0.01858 | 0.004253 | 3 | 3 | 6.176 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.1132 | 0.1299 | -0.01674 | 0.004253 | 3 | 3 | 5.565 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.1132 | 0.1342 | -0.02105 | 0.004253 | 3 | 3 | 7 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.1299 | 0.1342 | -0.004317 | 0.004253 | 3 | 3 | 1.436 | 8 |

DÍA 30.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|---------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.04463 | 0.01876 to 0.07049 | Yes | ** |
| GFP-TH vs. Synf | 0.05844 | 0.03257 to 0.08430 | Yes | *** |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.04609 | 0.02022 to 0.07196 | Yes | ** |
| SNCA vs. Synf | 0.01381 | -0.01206 to 0.03968 | No | ns |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.001466 | -0.02440 to 0.02733 | No | ns |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.01234 | -0.03821 to 0.01352 | No | ns |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|--------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.2176 | 0.173 | 0.04463 | 0.008078 | 3 | 3 | 7.813 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0.2176 | 0.1592 | 0.05844 | 0.008078 | 3 | 3 | 10.23 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.2176 | 0.1715 | 0.04609 | 0.008078 | 3 | 3 | 8.069 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.173 | 0.1592 | 0.01381 | 0.008078 | 3 | 3 | 2.418 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.173 | 0.1715 | 0.001466 | 0.008078 | 3 | 3 | 0.2566 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.1592 | 0.1715 | -0.01234 | 0.008078 | 3 | 3 | 2.161 | 8 |

DÍA 35.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.006291 | 0.0008929 to 0.01169 | Yes | * |
| GFP-TH vs. Synf | 0.001041 | -0.004357 to 0.006439 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.005822 | 0.0004240 to 0.01122 | Yes | * |
| SNCA vs. Synf | -0.00525 | -0.01065 to 0.0001480 | No | ns |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.0004689 | -0.005867 to 0.004929 | No | ns |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.004781 | -0.0006169 to 0.01018 | No | ns |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|---------|---------|------------|-------------|----|----|--------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0.08278 | 0.07649 | 0.006291 | 0.001686 | 3 | 3 | 5.278 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0.08278 | 0.08174 | 0.001041 | 0.001686 | 3 | 3 | 0.8733 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0.08278 | 0.07696 | 0.005822 | 0.001686 | 3 | 3 | 4.885 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.07649 | 0.08174 | -0.00525 | 0.001686 | 3 | 3 | 4.405 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.07649 | 0.07696 | -0.0004689 | 0.001686 | 3 | 3 | 0.3934 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.08174 | 0.07696 | 0.004781 | 0.001686 | 3 | 3 | 4.011 | 8 |

Estadística expresión SNCA.

Número de familias: 1
 Numero de comparaciones por familia: 6
 Alpha: 0.05

DÍA 5.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | -0.2278 | -0.2588 to -0.1969 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | -0.03093 to 0.03093 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.2903 | -0.3213 to -0.2594 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | 0.2278 | 0.1969 to 0.2588 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.06248 | -0.09341 to -0.03156 | Yes | *** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.2903 | -0.3213 to -0.2594 | Yes | **** |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0.2278 | -0.2278 | 0.009658 | 3 | 3 | 33.36 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0 | 0 | 0.009658 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.2903 | -0.2903 | 0.009658 | 3 | 3 | 42.51 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.2278 | 0 | 0.2278 | 0.009658 | 3 | 3 | 33.36 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.2278 | 0.2903 | -0.06248 | 0.009658 | 3 | 3 | 9.149 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0 | 0.2903 | -0.2903 | 0.009658 | 3 | 3 | 42.51 | 8 |

DÍA 10.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | -0.135 | -0.1441 to -0.1260 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | -0.009078 to 0.009078 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.1609 | -0.1700 to -0.1518 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | 0.135 | 0.1260 to 0.1441 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.02586 | -0.03494 to -0.01678 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.1609 | -0.1700 to -0.1518 | Yes | **** |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0.135 | -0.135 | 0.002835 | 3 | 3 | 67.37 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0 | 0 | 0.002835 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1609 | -0.1609 | 0.002835 | 3 | 3 | 80.27 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.135 | 0 | 0.135 | 0.002835 | 3 | 3 | 67.37 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.135 | 0.1609 | -0.02586 | 0.002835 | 3 | 3 | 12.9 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1609 | -0.1609 | 0.002835 | 3 | 3 | 80.27 | 8 |

DÍA 15.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | -0.1318 | -0.1399 to -0.1238 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | -0.008057 to 0.008057 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.1781 | -0.1861 to -0.1700 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | 0.1318 | 0.1238 to 0.1399 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.04625 | -0.05430 to -0.03819 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.1781 | -0.1861 to -0.1700 | Yes | **** |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0.1318 | -0.1318 | 0.002516 | 3 | 3 | 74.1 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0 | 0 | 0.002516 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1781 | -0.1781 | 0.002516 | 3 | 3 | 100.1 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.1318 | 0 | 0.1318 | 0.002516 | 3 | 3 | 74.1 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.1318 | 0.1781 | -0.04625 | 0.002516 | 3 | 3 | 25.99 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1781 | -0.1781 | 0.002516 | 3 | 3 | 100.1 | 8 |

DÍA 20.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-------------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | -0.0893 | -0.09007 to -0.08852 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | -0.0007774 to 0.0007774 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.09549 | -0.09627 to -0.09472 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | 0.0893 | 0.08852 to 0.09007 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.006197 | -0.006974 to -0.005420 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.09549 | -0.09627 to -0.09472 | Yes | **** |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|---------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0.0893 | -0.0893 | 0.0002428 | 3 | 3 | 520.2 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0 | 0 | 0.0002428 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.09549 | -0.09549 | 0.0002428 | 3 | 3 | 556.3 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.0893 | 0 | 0.0893 | 0.0002428 | 3 | 3 | 520.2 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.0893 | 0.09549 | -0.006197 | 0.0002428 | 3 | 3 | 36.1 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0 | 0.09549 | -0.09549 | 0.0002428 | 3 | 3 | 556.3 | 8 |

DÍA 25.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | -0.1189 | -0.1247 to -0.1131 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | -0.005793 to 0.005793 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.1456 | -0.1514 to -0.1398 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | 0.1189 | 0.1131 to 0.1247 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.02667 | -0.03247 to -0.02088 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.1456 | -0.1514 to -0.1398 | Yes | **** |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0.1189 | -0.1189 | 0.001809 | 3 | 3 | 92.95 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0 | 0 | 0.001809 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1456 | -0.1456 | 0.001809 | 3 | 3 | 113.8 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.1189 | 0 | 0.1189 | 0.001809 | 3 | 3 | 92.95 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.1189 | 0.1456 | -0.02667 | 0.001809 | 3 | 3 | 20.85 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1456 | -0.1456 | 0.001809 | 3 | 3 | 113.8 | 8 |

DÍA 30.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | -0.1386 | -0.1456 to -0.1316 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | -0.006991 to 0.006991 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.1523 | -0.1593 to -0.1453 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | 0.1386 | 0.1316 to 0.1456 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.01366 | -0.02065 to -0.006666 | Yes | ** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.1523 | -0.1593 to -0.1453 | Yes | **** |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0.1386 | -0.1386 | 0.002183 | 3 | 3 | 89.8 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0 | 0 | 0.002183 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1523 | -0.1523 | 0.002183 | 3 | 3 | 98.64 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.1386 | 0 | 0.1386 | 0.002183 | 3 | 3 | 89.8 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.1386 | 0.1523 | -0.01366 | 0.002183 | 3 | 3 | 8.847 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1523 | -0.1523 | 0.002183 | 3 | 3 | 98.64 | 8 |

DÍA 35.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | -0.1198 | -0.1243 to -0.1152 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | -0.004591 to 0.004591 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.1214 | -0.1260 to -0.1168 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | 0.1198 | 0.1152 to 0.1243 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.001679 | -0.006270 to 0.002912 | No | ns |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.1214 | -0.1260 to -0.1168 | Yes | **** |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0.1198 | -0.1198 | 0.001434 | 3 | 3 | 118.1 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0 | 0 | 0.001434 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1214 | -0.1214 | 0.001434 | 3 | 3 | 119.8 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0.1198 | 0 | 0.1198 | 0.001434 | 3 | 3 | 118.1 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0.1198 | 0.1214 | -0.001679 | 0.001434 | 3 | 3 | 1.656 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1214 | -0.1214 | 0.001434 | 3 | 3 | 119.8 | 8 |

Estadística expresión SNCAIP.

Número de familias: 1
 Numero de comparaciones por familia: 6
 Alpha: 0.05

DÍA 5.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|--------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | -0.1351 to 0.1351 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf | -0.6258 | -0.7609 to -0.4907 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.3756 | -0.5107 to -0.2405 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | -0.6258 | -0.7609 to -0.4907 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.3756 | -0.5107 to -0.2405 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.2502 | 0.1151 to 0.3853 | Yes | ** |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0 | 0 | 0.04218 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0.6258 | -0.6258 | 0.04218 | 3 | 3 | 20.98 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.3756 | -0.3756 | 0.04218 | 3 | 3 | 12.59 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0 | 0.6258 | -0.6258 | 0.04218 | 3 | 3 | 20.98 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0 | 0.3756 | -0.3756 | 0.04218 | 3 | 3 | 12.59 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.6258 | 0.3756 | 0.2502 | 0.04218 | 3 | 3 | 8.388 | 8 |

DÍA 10.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|---------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | -0.09694 to 0.09694 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf | -0.3913 | -0.4882 to -0.2943 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.3256 | -0.4225 to -0.2286 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | -0.3913 | -0.4882 to -0.2943 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.3256 | -0.4225 to -0.2286 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.06568 | -0.03125 to 0.1626 | No | ns |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0 | 0 | 0.03027 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0.3913 | -0.3913 | 0.03027 | 3 | 3 | 18.28 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.3256 | -0.3256 | 0.03027 | 3 | 3 | 15.21 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0 | 0.3913 | -0.3913 | 0.03027 | 3 | 3 | 18.28 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0 | 0.3256 | -0.3256 | 0.03027 | 3 | 3 | 15.21 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.3913 | 0.3256 | 0.06568 | 0.03027 | 3 | 3 | 3.069 | 8 |

DÍA 15.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | -0.04279 to 0.04279 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf | -0.2557 | -0.2985 to -0.2129 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.2893 | -0.3321 to -0.2465 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | -0.2557 | -0.2985 to -0.2129 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.2893 | -0.3321 to -0.2465 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.03364 | -0.07643 to 0.009150 | No | ns |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0 | 0 | 0.01336 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0.2557 | -0.2557 | 0.01336 | 3 | 3 | 27.06 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.2893 | -0.2893 | 0.01336 | 3 | 3 | 30.62 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0 | 0.2557 | -0.2557 | 0.01336 | 3 | 3 | 27.06 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0 | 0.2893 | -0.2893 | 0.01336 | 3 | 3 | 30.62 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.2557 | 0.2893 | -0.03364 | 0.01336 | 3 | 3 | 3.56 | 8 |

DÍA 20.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|---------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | -0.02109 to 0.02109 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf | -0.1807 | -0.2018 to -0.1596 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.1824 | -0.2035 to -0.1613 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | -0.1807 | -0.2018 to -0.1596 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.1824 | -0.2035 to -0.1613 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.001733 | -0.02282 to 0.01935 | No | ns |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|--------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0 | 0 | 0.006585 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0.1807 | -0.1807 | 0.006585 | 3 | 3 | 38.8 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1824 | -0.1824 | 0.006585 | 3 | 3 | 39.18 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0 | 0.1807 | -0.1807 | 0.006585 | 3 | 3 | 38.8 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1824 | -0.1824 | 0.006585 | 3 | 3 | 39.18 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.1807 | 0.1824 | -0.001733 | 0.006585 | 3 | 3 | 0.3722 | 8 |

DÍA 25.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|---------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | -0.04324 to 0.04324 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf | -0.2062 | -0.2494 to -0.1629 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.2668 | -0.3100 to -0.2235 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | -0.2062 | -0.2494 to -0.1629 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.2668 | -0.3100 to -0.2235 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.06058 | -0.1038 to -0.01734 | Yes | ** |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0 | 0 | 0.0135 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0.2062 | -0.2062 | 0.0135 | 3 | 3 | 21.6 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.2668 | -0.2668 | 0.0135 | 3 | 3 | 27.94 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0 | 0.2062 | -0.2062 | 0.0135 | 3 | 3 | 21.6 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0 | 0.2668 | -0.2668 | 0.0135 | 3 | 3 | 27.94 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.2062 | 0.2668 | -0.06058 | 0.0135 | 3 | 3 | 6.345 | 8 |

DÍA 30.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | -0.005047 to 0.005047 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf | -0.1187 | -0.1238 to -0.1137 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.1265 | -0.1315 to -0.1214 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | -0.1187 | -0.1238 to -0.1137 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.1265 | -0.1315 to -0.1214 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.007723 | -0.01277 to -0.002676 | Yes | ** |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0 | 0 | 0.001576 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0.1187 | -0.1187 | 0.001576 | 3 | 3 | 106.5 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1265 | -0.1265 | 0.001576 | 3 | 3 | 113.5 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0 | 0.1187 | -0.1187 | 0.001576 | 3 | 3 | 106.5 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1265 | -0.1265 | 0.001576 | 3 | 3 | 113.5 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.1187 | 0.1265 | -0.007723 | 0.001576 | 3 | 3 | 6.93 | 8 |

DÍA 35.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|--------------|---------|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | -0.003614 to 0.003614 | No | ns |
| GFP-TH vs. Synf | -0.1022 | -0.1059 to -0.09863 | Yes | **** |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | -0.1046 | -0.1082 to -0.1010 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf | -0.1022 | -0.1059 to -0.09863 | Yes | **** |
| SNCA vs. Synf-SNCA | -0.1046 | -0.1082 to -0.1010 | Yes | **** |
| Synf vs. Synf-SNCA | -0.002344 | -0.005957 to 0.001270 | No | ns |

| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff. | SE of diff. | n1 | n2 | q | DF |
|----------------------|--------|--------|------------|-------------|----|----|-------|----|
| GFP-TH vs. SNCA | 0 | 0 | 0 | 0.001128 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf | 0 | 0.1022 | -0.1022 | 0.001128 | 3 | 3 | 128.1 | 8 |
| GFP-TH vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1046 | -0.1046 | 0.001128 | 3 | 3 | 131.1 | 8 |
| SNCA vs. Synf | 0 | 0.1022 | -0.1022 | 0.001128 | 3 | 3 | 128.1 | 8 |
| SNCA vs. Synf-SNCA | 0 | 0.1046 | -0.1046 | 0.001128 | 3 | 3 | 131.1 | 8 |
| Synf vs. Synf-SNCA | 0.1022 | 0.1046 | -0.002344 | 0.001128 | 3 | 3 | 2.937 | 8 |