



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES
QUIMIOSENSORIALES EN UN MODELO PARA LA
ENFERMEDAD DE PARKINSON EN *Drosophila melanogaster*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ESTEFANÍA DE ALLENDE BECERRA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD GARZA
Instituto de Biotecnología, UNAM



LOS REYES IZTACALA, TLANEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO
MARZO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

SINODALES

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu

Dra. María Rosa de Lourdes Ávila Costa

M. en C. María Eugenia Heres Pulido

M. en C. Luis Felipe Santos Cruz

“Tú me llamaste y clamaste hasta romper finalmente mi sordera. Con tu fulgor espléndido pusiste en fuga mi ceguera. Tu fragancia penetró en mi respiración y ahora suspiro por ti. Gusté tu sabor y por eso ahora tengo más hambre y más sed de ese gusto. Me tocaste y con tu tacto me encendiste en tu paz”

“Entiendo para creer y creo para entender (*intelligo ut credam, credo ut intelligam*)”.

-Agustín de Hipona

El presente trabajo de grado (Licenciatura) fue realizado en el laboratorio del Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza, que pertenece al departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelos.

Agradecemos el apoyo económico otorgado para efectuar este proyecto mediante los siguientes programas:

-DGAPA/UNAM PAPIIT-IN206517

-CONACyT 255478

Agradecimientos

"Yo soy una parte de todo aquello que he encontrado en mi camino". -

Alfred Tennyson

Muchas son las personas que han formado parte de mi vida hasta ahora, y pienso que cada una de ellas ha aportado algo especial y ha influido para que el día de hoy, yo sea quien soy.

Por eso quiero dedicar una sección de esta tesis para agradecer a quienes que me han apoyado a lo largo de este camino, al gran Yo Soy, a todos aquellos a los que apreció, con quienes estoy muy agradecida y sin los cuales, hoy no estaría viviendo esta importante etapa de mi vida.

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), porque no puedo imaginar lo que habría sido esta parte de mi vida en otra universidad. Por todo lo que me ha brindado, por permitirme crecer y desarrollarme en ella, por darme todos los recursos necesarios para poder formarme como bióloga y por darme mucho más que conocimiento académico. Espero pronto poder retribuir aunque sea un poco de lo mucho que me ha dado.

Muy especialmente, quiero agradecer a mi tutor el Dr. Enrique A. Reynaud Garza, por aceptarme en su laboratorio y confiar en mí, dándome la libertad para plantear mi propio proyecto, expresar mis ideas, diseñar mis experimentos y prototipos. Quiero decirle que es una persona a la cual admiro, que considero un gran científico y muy inteligente; la verdad es que su ejemplo es una de las cosas que me inspira a continuar en este camino. Gracias por todos sus consejos, los *rides*, el apoyo intelectual, personal y económico; por ayudarme a entender un poco más lo que es la investigación científica y la tolerancia a la frustración, pero que eso nos ayuda a aprender más. Disfruto y aprendo mucho de las pláticas con usted y espero poder seguir aprendiendo en su laboratorio y de su persona.

Agradezco a mi sinodal el Dr. Takuya Nishigaki, primero que nada por darme un espacio en su agenda y estar dispuesto a ser asesor de esta tesis, por sus valiosas sugerencias y consejos. Espero poder seguir aprendiendo de usted y su labor científica.

A la Dra. María Rosa Ávila Costa, porque a pesar de que las circunstancias no se dieron para que yo pudiera hacer mi tesis en su laboratorio de neuromorfofisiología, estuvo dispuesta a ser mi asesora y brindarme sus valiosos consejos.

A la M. en C. María Eugenia Heres Pulido, por sus consejos, observaciones y sugerencias. Por su tiempo y porque aún sin conocerme mostró interés por mi trabajo y decidió confiar en mí y darme su apoyo.

Al M. en C. Luis Felipe Santos Cruz, quien también fue asesor de esta tesis, mi profesor durante la licenciatura, y a quien además considero me ha brindado su amistad. Gracias por todo el apoyo, por sus consejos, su sentido del humor y su sinceridad.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por ser como una segunda casa para mí durante estos años, y a todos los profesores que a lo largo de la carrera me ayudaron y compartieron su sabiduría conmigo, especialmente al Biol. Arnulfo Reyes, la M. en C. Josefina Vázquez, el M. en C. Ángel Durán, Dr. Hugo Perales, Dra. Martha Salcedo, M. en C. Roberto Moreno, M. en C. Francisco Javier Martínez, Dr. Héctor Barrera, Dr. Elías Piedra, Dr. Guillermo Horta Puga, Biol. Felipe de Jesús Cruz, M. en C. Teresa Ramírez, M. en C. Luis Enrique Paez, M. en C. Leonor Abundiz, M. en C. B. Leticia Espinoza, Dr. Silvia Rodríguez, M. en C. María de Lourdes Castañeda, al Dr. Alejandro Cristin y al Dr. Federico Ávila, por ser excelentes profesores, compartir el conocimiento de las diferentes áreas de la biología y enseñar con el ejemplo.

Al Dr. Saúl Flores Maya, quien desde la preparatoria influyó grandemente en mí a través de sus maravillosas clases y posteriormente al involucrarme y apoyarme con la realización de mi primer proyecto de investigación, gracias al cual pudimos publicar el que sería mi primer artículo en una revista científica. Le agradezco mucho porque más que un maestro, se ha convertido en mi amigo. Lo admiro mucho en todos los ámbitos, gracias por todas las cosas que he aprendido de usted, por siempre confiar en mí y apoyarme a lo largo de la carrera con sus consejos y su amistad.

A la maestra Gabriela Sánchez Fabila por el apoyo brindado desde segundo semestre, al involucrarme en las actividades académicas que ella organizaba para semestres superiores, por su gran ayuda durante los talleres de Administración y Profesionalización de la Biología, por su comprensión y por brindarme la oportunidad para desarrollarme de manera más plena como estudiante.

A la Lic. Elizabeth Ortiz Longoria, por ser tan buena en su trabajo, ser amable y brindarme el apoyo necesario en el último año de licenciatura y durante el proceso de titulación.

Al Instituto de Biotecnología (IBt), por abrirme sus puertas e instalaciones para la realización de este estudio y de mi servicio social, porque aquí he conocido gente impresionante y he logrado desarrollarme en el ámbito científico.

Quiero agradecer a los técnicos académicos, al Dr. Iván Sánchez Díaz y al M. B. René Hernández Vargas, por todo el apoyo que me han brindado, por ser excelentes en su trabajo y también brindarme su amistad. Gracias por ser como los hermanos mayores del laboratorio y siempre preocuparse por todos los que estamos ahí.

También a mis compañeros del laboratorio, Fernando Rosales, Ángel Carvajal, Iván Fernández, Andrés Nieto, Miguel Ángel Urioso, Jocelyn Chávez, Silvia Meyer y Eduardo Calvario, por su compañía, amistad, consejos y por compartir su experiencia y ayudarme a aprender nuevas técnicas cuando fue necesario.

Al Dr. Mario Zurita Ortega por permitirme convivir, aprender de usted y de su equipo de trabajo.

A la Sra. María del Carmen Muñoz, con quien la investigación en el laboratorio es mucho más sencilla. Gracias por siempre ser amable, por prepararnos la comida para nuestras moscas y por ser un gran apoyo.

A Don Carlos Granados García, la Sra. Angélica Embriz Méndez y la Sra. Lourdes Cazadero por su admirable labor en el laboratorio, la cual nos ayuda a seguir avanzando.

A mis amigos de la FESI: Miguel Angel Jiménez, Pedro A. Díaz, Nadia M. Rodríguez y José M. Bernal, por estar conmigo a lo largo de la carrera, por todas las aventuras que compartimos, tanto en laboratorio como en campo, por ser excelentes colegas y amigos. Gracias porque en momentos difíciles han estado conmigo, me han defendido, apoyado, aguantado y aun brindado sus hombros para llorar. Sé que siempre podré contar con ustedes como lo he hecho hasta ahora y saben que ustedes también pueden contar conmigo.

A Mauricio y Rodrigo Cunillé, por el apoyo que me brindaron durante este año en Cuernavaca, por las risas y los momentos divertidos, por querer a mi familia y ser parte de ella.

A Mariana Bernal por ser mi amiga más cercana, porque desde segundo de primaria he podido contar con ella. Gracias por ser esa amiga fiel y leal a quien siempre puedo recurrir pase lo que pase. Por ser tan transparente y, ya sea para bien o para mal, y aunque a veces duela, darme tu opinión sincera y ubicarme, sabes que eres como una hermana más para mí.

A Cecilia Garcilazo por ser una de las personas más lindas que conozco, además de excelente amiga. Sé que siempre puedo contar contigo y sabes que yo también estoy para ti cuando lo necesites; gracias por tus sabios consejos y por siempre escucharme.

A Rubén y Raúl Ríos, Antonio Minor, Emmanuel Barcenás y Benjamín Enríquez, por ser los mejores hermanos que Dios pudo darme, porque como tales hemos crecido y los quiero con todo mi corazón. Definitivamente sin ustedes yo no sería la mujer que hoy soy. Gracias por las increíbles aventuras que hemos vivido, por lo mucho que he aprendido a su lado; espero que esta amistad dure para siempre, sé que como hasta hoy, ni el tiempo, ni la distancia podrán alejarnos.

A José Roberto Ponce, por ser una parte tan importante de mi vida. Gracias por ser quien me impulsó para venir finalmente a Cuernavaca como había querido desde tiempo atrás; por brindarme tu apoyo y cariño en todo momento. Sabes que tienes un lugar muy especial en mi corazón, gracias por lo mucho que he aprendido a tu lado.

A mi tío Agustín Enríquez, porque es una de las personas a las que más admiro y quien ha sido un pilar importante en mi vida. Gracias por ser ese segundo papá para mí, por todo el apoyo que me has dado a lo largo de mi vida, por ser además ese líder y guía en la parte espiritual. Sabes que te quiero muchísimo y eres un ejemplo a seguir para mí. Gracias por todo tu apoyo y amor.

A mi tía, Reina María De Allende, por haber sido siempre tan linda conmigo y por apoyarme siempre. Estás y estarás en mi corazón, gracias por todo lo que me diste, sé que estarías muy contenta al ver todas las cosas que han pasado hasta ahora, quisiera poder visitarte y mandarte correos como solíamos hacer, me encantaría tu opinión sobre muchas cosas y poderte contar todas las aventuras que actualmente estoy viviendo, pues sé que me entenderías, pero también sé que algún volveremos a reírnos juntas.

A mis hermanas Ximena y Priscila De Allende, quienes han sido mis compañeras en las buenas y en las malas, con quienes he vivido tantas cosas. Gracias por todas las risas, por siempre estar conmigo, por todo el amor que siento de ustedes aunque ya no estemos juntas como cuando éramos chiquitas. Gracias porque sé que incondicionalmente estarán ahí para mí, y yo también lo estaré para ustedes. En sus bodas ya les dije muchas cosas que no voy a repetir ahora, pero saben que las amo.

A Bernardo De Allende, mi papá, porque sin él no podría haber llegado hasta donde estoy, por todo el apoyo que me ha dado y por darme su amor. Gracias porque gran parte de mi curiosidad científica se debe a ti, a que desde que era niña respondías a todas mis preguntas como si ya fuera grande, y sin dudar que pudiera entender cada una de tus explicaciones sobre la vida, la naturaleza, economía, etc., gracias porque aun hoy en día sigues solucionándome muchas dudas... Sabes que te amo y siempre lo haré. También quiero agradecer a Marcela Blando por querer a mi papá, por el apoyo que me ha brindado en diversas áreas, y por ser buena conmigo siempre. Gracias por tu cariño.

A mi mamá, la más hermosa de todas, Consuelo Becerra, quien definitivamente ha sido mi guía más importante y a quien amo inmensamente. Gracias por ser esa mujer fuerte que me ha enseñado tantas cosas, quien siempre me enseñó a buscar a Dios y permanecer en su camino, a amar a los animales, a respetar y amar la vida en todas sus formas de expresión; por ser siempre quien está dispuesta a escucharme y aconsejarme. Gracias por todos tus abrazos, por aguantarme por tantos años, corregirme, consolarme, y darme siempre lo mejor de ti. Gracias porque nunca has renunciado, por enseñarme con el ejemplo, por seguir conmigo y darme la libertad de seguir adelante y perseguir mis sueños. Te amo, tú sabes cuánto. Gracias por heredarme lo cursi, sentimental y bohemio, sin lo cual no estaría escribiendo estos agradecimientos interminables.

Finalmente quiero agradecer a quien le debo todo lo que soy, al mejor diseñador, quien ha dibujado mi vida y tiene previsto cada momento de ella. A quien me ha permitido conocer, convivir y amar a todas las personas que anteriormente he mencionado. Existe la idea de que a los científicos e intelectuales les es difícil creer en Dios pero eso no es necesariamente cierto; a veces la contemplación del cuerpo humano, la naturaleza, sus fenómenos y el universo mismo, producen una impresión tan profunda, que les hace volver a plantear sus convicciones, o es incluso el aliento y la inspiración que permite a quienes ya contábamos con una convicción innata, preservarla. Por eso, quiero agradecer a Dios, por ser mi inspiración, por su fidelidad, porque puedo dar testimonio de sus maravillas y de cómo siempre ha estado en mi vida, y me ha respaldado; de cómo todas las cosas siempre han sido para mi bien, por más oscuras que en su momento puedan parecer. Nunca lo cambiaría por nada, y le pido que continúe guiándome y abriendo las puertas hacia dónde Él quiere que vaya.

Dedicatoria

A mi abuelo, el Dr. Agustín Becerra Hernández, con quien me habría encantado poder convivir por más tiempo, y comentarle sobre todas las cosas de la carrera. Con quien me hubiera gustado poder platicar de biólogo a bióloga.

“El sentido mudo”, porque el oler es algo difícil de describir, pero además, es interesante, porque lo primero que hacemos al momento de nacer es inhalar aire y cuando morimos exhalamos aire por última vez, con una mezcla de moléculas que constituyen uno o varios olores, los cuales pasan o han pasado a lo largo de toda una vida por nuestros órganos olfatorios, mediante aproximadamente 23,040 respiraciones por día, que logran que movamos 12 metros cúbicos de aire.”

– Montes de Oca y Montes de Oca, 2005.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
	2.1 Percepción sensorial.....	2
	2.2 Transducción olfativa	3
	2.2.1. Mecanismos en <i>Homo sapiens</i>	3
	2.2.2. Mecanismos en <i>Drosophila melanogaster</i>	7
	2.2.3. Homología y diferencia de procesos entre ambas especies	11
	2.3 Anosmia, hiposmia y su relación con enfermedades neurodegenerativas.....	13
	2.4 Enfermedad de Parkinson	15
	2.4.1. Epidemiología y generalidades	15
	2.4.2. Dopamina.....	18
	2.4.3. Papel de la α -Sinucleína en la enfermedad de Parkinson	21
	2.4.4. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de la Enfermedad de Parkinson	23
III.	ANTECEDENTES	25
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	27
V.	HIPÓTESIS	28
VI.	OBJETIVOS	28
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
	7.1 Stocks y cruzas de líneas transgénicas.....	29
	7.2 Genotipificación	29
	7.3 Prueba olfativa de Laberinto en Y.....	30
	7.4 Prueba olfativa de Laberinto en T.....	31
	7.5 Análisis estadístico	32
VIII.	RESULTADOS	33
	8.1 Comprobación de los genotipos	33
	8.2 Prueba olfativa de Laberintos en Y	33
	8.3 Prueba olfativa en Laberinto en T.....	38
IX.	DISCUSIÓN.....	42
	9.1 Prueba olfativa de laberinto en Y	42
	9.2 Respuesta olfativa de <i>Drosophila melanogaster silvestre</i>	45
	9.3 Papel de la SNCA en la respuesta olfativa de <i>Drosophila melanogaster</i>	46

X.	CONCLUSIONES	48
XI.	PERSPECTIVAS	49
	LITERATURA CITADA	50
	REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	58
	ANEXOS	59
	ANEXO I. Genoma de <i>Drosophila melanogaster</i>	59
	ANEXO II. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	59
	ANEXO III. Oligonucleótidos utilizados para Genotipificación	60
	ANEXO IV. Dimensiones de laberinto en T.....	60

Lista de abreviaturas (Orden de aparición)

ORN: Neurona receptora	HD: Enfermedad de Huntington
HBC: Célula basal horizontal	PD: Enfermedad de Parkinson
GBC: Célula basal globosa	LB: Cuerpo de Lewy
GPCR: Receptor acoplado a proteínas G	SNpc: sustancia nigra pars compacta
G_{olf}: proteína G estimuladora, subtipo específico del olfato	SNCA: α -sinucleína
AMPC: Adenosín monofosfato cíclico	Sinf: Sinfilina
ACIII: Adenilato ciclasa III	TH: Tirosina-hidroxilasa
CNGC: Canal iónico regulado por nucleótidos cíclicos	L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina
CaCC: Canal cloruro-calcio-dependiente	VMAT: transportador vesicular de monoaminas
TRPC2: Canal catiónico potencial C2 de receptor transitorio	MAO-A: Forma A de la monoamino oxidasa
OEC: Célula olfativa envainada en fascículos	DOPAC: Ácido dihidroxifenilacético
PLC: Fosfolipasa C	HVA: Ácido homovanílico
PIP2: Fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato	COMT: Catecol-O-metiltransferasa
IP3: Inositol-1, 4, 5-trifosfato	NAC: Componente no-amiloideo
DAG: Diacilglicerol	SNARE: receptores de proteínas de fijación soluble del factor sensible a N-etilmaleimida
OBP: Proteína de unión a odorantes	UAS: Secuencias activadoras río arriba
OR: Receptor olfativo	W¹¹¹⁸: Línea White de <i>Drosophila melanogaster</i>
Orco: Correceptor Or83b	GFP: Proteína verde fluorescente
PKC: Proteína quinasa C	OCT: 3-octanol
AL: Lóbulo antenal	MCH: 4-metilciclohexanol
PN: Neuronas de proyección	Ác.: Ácido
LN: Interneurona local	IA: Índice de atracción
MB: Cuerpo fungiforme	
LH: Astas laterales	
AD: Enfermedad de Alzheimer	

I. RESUMEN

Los quimiosentidos desempeñan un papel importante en la percepción ambiental y resultan imprescindibles en la sobrevivencia de los organismos. Por otro lado, los déficits olfativos (anosmia e hiposmia) correlacionan con la etiología de padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, que es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común. Si bien se considera que la pérdida del olfato es un síntoma temprano de esta enfermedad, no existen estudios farmacológicos que reviertan la hiposmia causada por ella.

En el laboratorio del Dr. Reynaud se ha medido la capacidad motriz en moscas transgénicas que expresan proteínas asociadas a la enfermedad de Parkinson y en éste y otros laboratorios se ha demostrado que es un buen modelo animal para estudiarla. Sin embargo, no se han hecho análisis olfativos en este modelo, y en general en el ámbito científico no se tiene suficiente información sobre el efecto olfativo de esta enfermedad. Por otro lado, la esperanza de vida humana va en aumento y como consecuencia de ello la incidencia de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, por lo que es importante estudiar afecciones en la actividad quimiosensorial de *D. melanogaster* con la etiología parkinsoniana. Por estas razones, en el presente estudio se establecieron pruebas etológicas que permiten medir deficiencias olfativas, como el Laberinto en Y y el Laberinto en T, optimizándolos a través de prueba y error, y evaluación cuidadosa de resultados en distintas condiciones. En este trabajo se evaluó el índice de atracción de moscas de 1-5, 10-15 y 40-45 días de edad post-emergencia pupal, expuestas a ácido láctico al 2% y 4-metilciclohexanol (sustancias atrayente y repelente, respectivamente) a través de lo cual, se logró concluir que la línea transgénica de *D. melanogaster* que expresa la proteína α -sinucleína, presenta hiposmia desde etapas muy tempranas y juveniles, hasta etapas de envejecimiento tardío, lo que concuerda con lo observado en pacientes con enfermedad de Parkinson; además, las moscas control sufren un decaimiento natural de la respuesta olfativa, que es directamente proporcional al tiempo de vida. Por otro lado, se determinó que el laberinto en Y no es la prueba etológica más eficiente para medir la percepción olfativa en este modelo, al menos con los atrayentes y las condiciones probadas en este estudio.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Percepción sensorial

El reconocimiento del entorno está determinado de forma directa por los órganos sensoriales, ya que a través de ellos se reciben señales e información del medio que promueven reacciones apropiadas a los estímulos ambientales. Como es bien sabido, cinco son los sentidos canónicos encargados de esta percepción sensorial; el tacto, la vista, la audición, el gusto y el olfato; cada uno de ellos y en conjunto, son de gran importancia para la sobrevivencia de los organismos.

El tacto juega un papel interesante en la interacción con el entorno, pues forma parte de la cognición social (Ebisch *et al.*, 2008), además la percepción háptica, es decir, cuando el componente táctil y el kinestésico se combinan, es capaz de suministrar información sobre ciertas dimensiones de las cosas, como su temperatura, peso, textura, etc., que no pueden percibirse a través de otras modalidades sensoriales (Ballesteros, 1993).

Por otro lado, la vista es un sentido complejo que brinda a los organismos la capacidad fotorreceptiva para captar e interpretar imágenes de los objetos que los rodean. Los ojos (vertebrados e invertebrados) y estructuras menos especializadas, como los ocelos (algunos invertebrados), son los órganos en los que recae de manera directa este sentido, pues la visión ocurre debido a la interacción de la luz con receptores sensoriales localizados en dichos órganos (Rizzo, 2016; González-Martín-Moro *et al.*, 2017).

Por otra parte, la audición es el sentido que brinda información a través de fluctuaciones de la presión estática del medio, las cuales son producidas por la vibración de los objetos (Plack, 2014). En algunos organismos, las estructuras auditivas también están relacionadas con el equilibrio o balance, y es parte de las funciones que desempeña este sentido, entre algunas otras, tales como la detección de peligro, orientación espacial, detección de presas, parte crucial en la comunicación animal, como el reconocimiento a distancia entre hembra y macho, entre otras (Fay y Popper, 2000; Smith *et al.*, 2004; Kuntzman y Hall, 2014).

Cabe destacar la funcionalidad de los llamados quimiosentidos, es decir, aquellos que son estimulados a través de señales químicas, como es el caso del gusto y el olfato,

ambos indispensables para la sobrevivencia y adaptación de muchas especies, incluyendo al ser humano. El sentido del gusto confiere la capacidad de percepción química que permite percibir el potencial nutricional de los alimentos y previene la ingesta de sustancias tóxicas (French *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2015), mientras que el olfato es importante para la orientación espacial, búsqueda del alimento, el cortejo y/o la atracción sexual, la detección de ciertas toxinas, e incluso influye en algunos aspectos del estatus endocrino de los organismos (Bellmann *et al.*, 2010; Grosjean *et al.*, 2011; Pause, 2012). La integración de ambos sentidos, sumado a algunos estímulos somato-sensoriales, tiene como resultado la percepción de lo que se conoce como sabor, esta percepción influye incluso en distintos aspectos del comportamiento social de algunas especies (Small y Prescott, 2005; Labbe *et al.*, 2008).

2.2 Transducción olfativa

2.2.1. Mecanismos en *Homo sapiens*

La mucosa olfativa humana, es un epitelio columnar pseudoestratificado localizado sobre una lámina propia, que se distribuye en el tabique nasal, cornetes y en la región superior de la cavidad nasal, justo debajo de la placa cribiforme (Figura 1A), constituye el 1.25 % de la mucosa nasal y abarca un área de ~2 cm². Está conformada por cuatro tipos de células: las neuronas receptoras olfativas (ORNs), las células sustentaculares o de soporte, las células microvillares y las células basales, además de las pequeñas glándulas de Bowman, encargadas de la secreción de moco (Figura 1B), que es esencial para la transducción olfativa (Leopold *et al.*, 2000; Godoy *et al.*, 2015; Zapiec *et al.*, 2017).

Las ORNs son neuronas bipolares cuya función es transducir odorantes para la despolarización membranal, y constituyen del 75-80% de las células del epitelio olfativo. Cuentan con una única dendrita, la cual se extiende a la superficie apical del neuroepitelio, y un axón desmielinizado que se proyecta, a través de la lámina basal y la placa cribiforme, hacia los glomérulos (conglomerados de neuropilos axónicos) que se conectan directamente con las células mitrales del bulbo olfatorio. De los botones dendríticos apicales de estas células, surgen cilios inmóviles y especializados, con receptores de membrana a los cuales se unen las moléculas odorantes. Estos cilios se

extienden, a lo largo de aproximadamente 25 mm, por la delgada capa de moco que cubre el epitelio y es ahí donde inician los eventos de transducción olfativa (Gold, 1999; Ronnet y Moon, 2002; Godoy *et al.*, 2015).

Estas neuronas se encuentran rodeadas por las células sustentaculares, que en general se consideran de soporte. Sin embargo, también se presume que contribuyen en la regulación y conservación del ambiente iónico para una adecuada transducción, y producen factores de crecimiento importantes para el desarrollo de las ORNs. Las células sustentaculares se extienden desde la superficie epitelial hasta la lámina basal, y secretan componentes que contienen altas concentraciones de enzimas desintoxicantes, incluyendo al citocromo P450 y algunas enzimas parecidas a ellas como la UDP glucuronil transferasa (Lazard *et al.*, 1991), las cuales se piensa oxidan a los odorantes, y ya que éstos deben ser hidrofóbicos para ser volátiles y difundirse rápidamente a través de las membranas celulares; la oxidación en las células de soporte reduce su difusión membranal o los inactiva, evitando que lleguen directamente al cerebro. ^{Ibidem}

Por otro lado, las células microvillares se distribuyen de manera uniforme por todo el epitelio sensorial y su densidad es aproximadamente de una célula por cada 20 ORNs, su función no es del todo conocida; se especulaba que podrían ser quimiorreceptores secundarios, pero al ser la única fuente de neuropéptido Y en el epitelio olfatorio adulto, se ha dicho que están involucradas en el control de la regeneración de las neuronas olfativas (Montani *et al.*, 2006). También se ha pensado que podrían tener relación con el órgano de Johnson o vomeronasal, ya que los receptores de éste, también son parecidas a estas células, y es una estructura que juega un papel importante en la detección de olores y captación de feromonas en muchos organismos (Morrison y Constanzo, 1990), sin embargo, en humanos se ha considerado como un órgano vestigial, aunque aún existe cierto debate sobre el tema (Vasuki *et al.*, 2016; D'Aniello *et al.*, 2017).

El último tipo de células presentes en el epitelio olfatorio son las células basales, que funcionan como precursoras para la generación de ORNs durante la edad adulta. Son las células progenitoras de este epitelio, por lo que tienen la capacidad de regenerarlo continuamente. Se dividen en dos grupos, las células basales horizontales (HBCs) que expresan citoqueratina y que se mantienen mitóticamente quiescentes cuando el epitelio

olfatorio está ileso, y la globosas (GBCs) que dan origen a las ORNs. Se considera a las HBCs como células troncales de reserva ya que no están intrínsecamente comprometidas para generar neuronas, mientras que las GBCs son una población progenitora más activa, y son las responsables del reemplazamiento neuronal día con día, así como de la reconstitución de las poblaciones neuronales y no neuronales del epitelio después de una lesión (Gold, 1999; Ronnet y Moon, 2002; Godoy *et al.*, 2015; Schwob *et al.*, 2017).

Propiamente, la transducción olfativa inicia cuando los odorantes interaccionan con receptores específicos (GPCRs) en los cilios de las ORNs, los cuales están acoplados a proteínas G (G_{olf}) de membrana. La activación de la mayoría de los ORNs, involucra la vía canónica de AMPc (Figura 2A), por lo tanto, la transducción incluye normalmente a la enzima adenilato ciclasa III (ACIII), que cuando es activada por la proteína G produce un aumento en la concentración intracelular de AMPc. Dicho incremento abre canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos (CNGC) que permiten el incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , provocando la apertura de canales Cl^- calcio-dependientes (CaCCs). Esta apertura desencadena el eflujo de iones Cl^- , despolarizando la célula receptora y generando un potencial de acción (Ronnett y Moon, 2002; Kaupp, 2010).

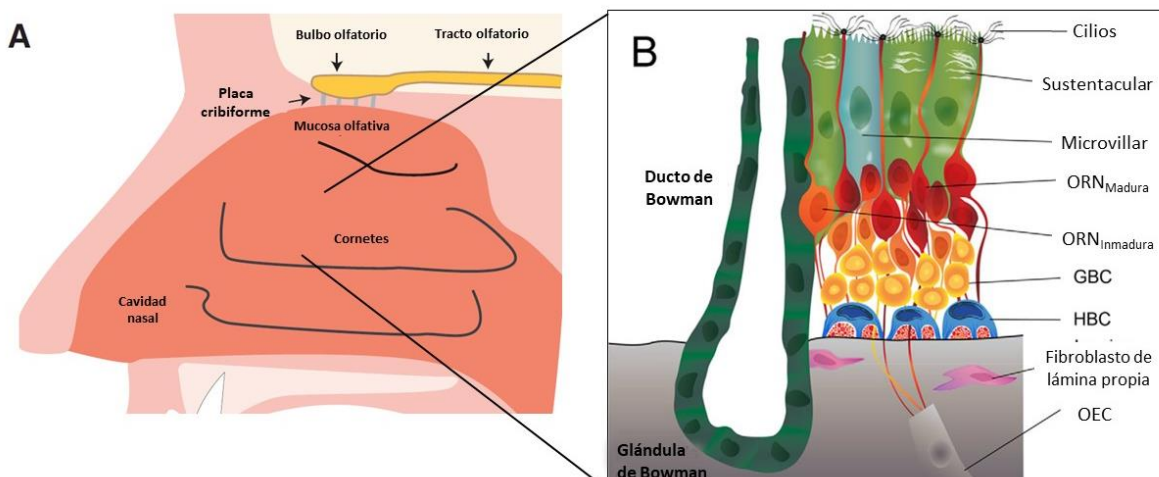


Figura 1.- Distribución y organización del epitelio olfativo humano. A) Vista lateral de cabeza humana. Las dendritas y los somas de las ORNs se localizan en la mucosa olfativa, dentro de la cavidad nasal, mientras que los axones proyectan a través de la placa cribiforme hacia el bulbo olfatorio en la cavidad craneal. **B)** Esquema de la organización microscópica del epitelio olfativo. ORN: neurona receptora olfativa. GBC: Célula basal globosa. HBC: Célula basal horizontal. OEC: Célula olfativa envainada en fascículos. (Modificado de: Schwob *et al.*, 2017; Zapiec *et al.*, 2017).

Existen mecanismos adicionales de transducción olfativa (Figura 2B), pues se piensa que la vía de AMPc es la principal pero se activa en respuesta a cierto tipo de odorantes, sin embargo, otra clase de odorantes, interaccionan con diferentes GPCRs involucrados en la activación de isoformas tipo β de la enzima fosfolipasa C (PLC). Esta enzima hidroliza al lípido fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) en la membrana plasmática, produciendo inositol-1, 4, 5 -trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), por lo que existen vías alternativas que utilizan IP3 y/o DAG como segundos mensajeros y moduladores, con la consiguiente entrada de iones Ca^{2+} en las neuronas olfatorias (Ronnelt y Moon, 2002; Gold, 1999).

Existen estudios que proponen que todos los odorantes estimulan ambas vías, pero en diferente medida y que incluso esto podría ser un factor determinante para la discriminación de olores (Ronnelt *et al.*, 1993).

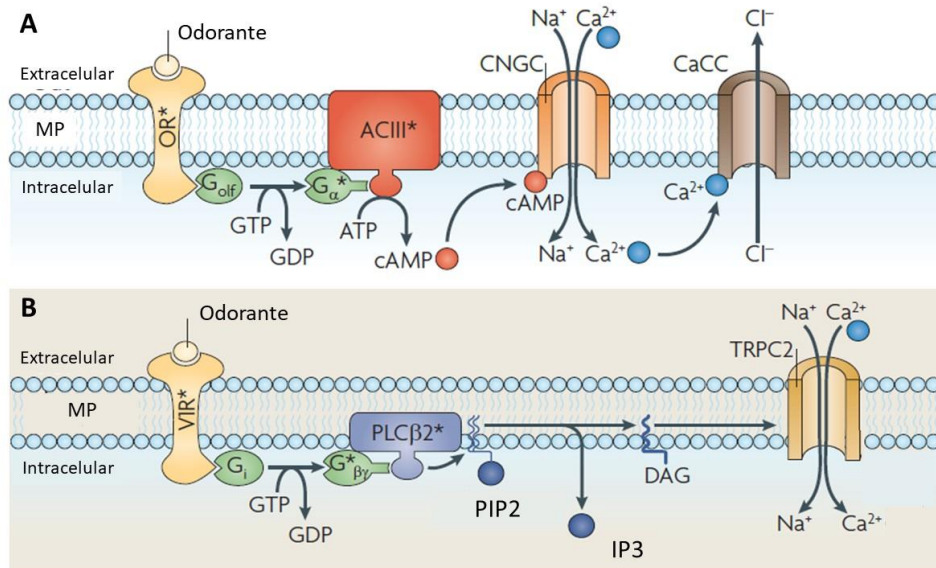


Figura 2.- Transducción olfativa humana. A) Vía canónica de AMP cíclico (AMPC). **B)** Vía del Inositol-1, 4, 5 -trifosfato (IP3). MP: Membrana plasmática., OR: Receptor olfativo., ACCIII: adenilato ciclasa III., CNGC: canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos., CaCC: canales Cl^- calcio-dependientes., $\text{PLC}\beta 2$: Fosfolipasa C tipo β ., PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato., DAG: Diacilglicerol., TRPC2: canal catiónico potencial C2 de receptor transitorio (transient receptor potential cation channel C2) (Modificado de: Kaupp, 2010).

Los potenciales de acción generados por dichas estimulaciones, son transportados a lo largo de los axones hasta el bulbo olfatorio, donde conectan con las neuronas mitrales y de penacho, para continuar hasta el tracto olfativo y llevar la señal eléctrica a las áreas primarias de la corteza olfativa, como el núcleo olfatorio anterior y la corteza entorrinal, y

la amígdala; finalmente las señales serán procesadas principalmente en la corteza orbitofrontal (Mahmut y Stevenson, 2012; Godoy *et al.*, 2015).

2.2.2. Mecanismos en *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, conocida coloquialmente como la mosca de la fruta, es un artrópodo perteneciente a la clase de los insectos, particularmente al orden díptera. Es un organismo que ha sido ampliamente estudiado, pues sus similitudes moleculares, celulares y del desarrollo, respecto a eucariontes superiores, han permitido grandes avances en diversas áreas del conocimiento (Martin *et al.*, 2013; Wilson, 2013).

En este sentido, su sistema olfatorio también ha despertado cierto interés, pues los procesos que en él ocurren son extrapolables al ser humano. Cuenta con un sistema olfativo de alta sensibilidad que, de manera externa, está compuesto por dos apéndices pareados: el tercer segmento de las antenas y los palpos maxilares (Figura 3A). Éstos se encuentran recubiertos por numerosas microvellosidades sensoriales que se denominan sensilias, en cuyo interior se encuentran las dendritas de hasta cuatro ORNs, y en la parte basal, los somas y células auxiliares o accesorias (Ebbs y Amrein, 2007; Kaupp, 2010).

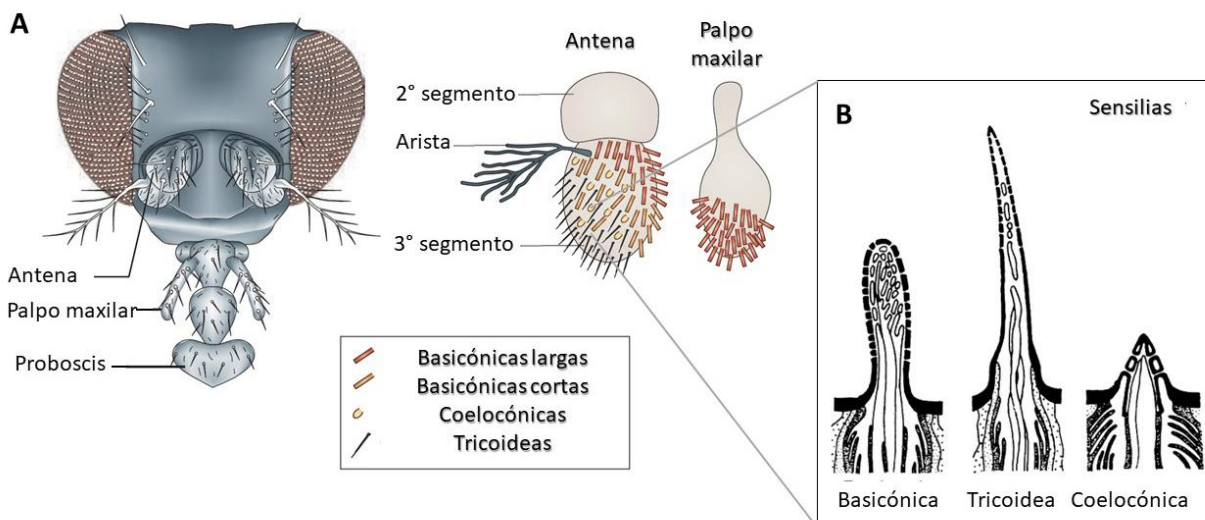


Figura 3.- Sistema olfatorio de *Drosophila melanogaster*. A) Organización macroscópica, en donde se resaltan los apéndices olfativos (antenas y palpos maxilares), recubiertas con sus respectivas sensilias sensoriales. B) Estructura y organización de los distintos tipos de sensilias olfativas. (Modificado de: Vosshall, 2000; Kaupp, 2010).

Las paredes de todas las sensilias olfativas presentan múltiples poros que permiten el paso de los odorantes, sin embargo, existen diferentes tipos morfológicos que pueden clasificarse en tres grupos: las basicónicas, las tricoideas y las coelocónicas (Figura 3B). Las primeras se localizan tanto en antenas como en palpos maxilares, y se ha visto que son responsables de la detección de múltiples olores relacionados con la alimentación, incluyendo ésteres, alcoholes y aldehídos; mientras que los otros dos tipos, únicamente se localizan en las antenas, y detectan olores relacionados con su propio organismo o el de sus semejantes (v.g., feromonas); y distintos ácidos y aminos, respectivamente (Joseph y Carlson, 2015).

Por otro lado, se reconocen tres tipos de células auxiliares, éstas son las células tecógenas, tricógenas y tormógenas, que mediante ciertas secreciones cuticulares durante el desarrollo, dan origen a las respectivas sensilias. Una vez desarrolladas dichas estructuras, la célula tecógena rodea las ORNs, mientras que la tricógena y la tormógena contribuyen a la organización del espacio linfático que rodea a las dendritas (Figura 4).

Además, las células tormógenas, contribuyen a mantener la composición química de la linfa de las sensilias para el correcto funcionamiento de las neuronas (Guidobaldi y Guerenstein, 2012).

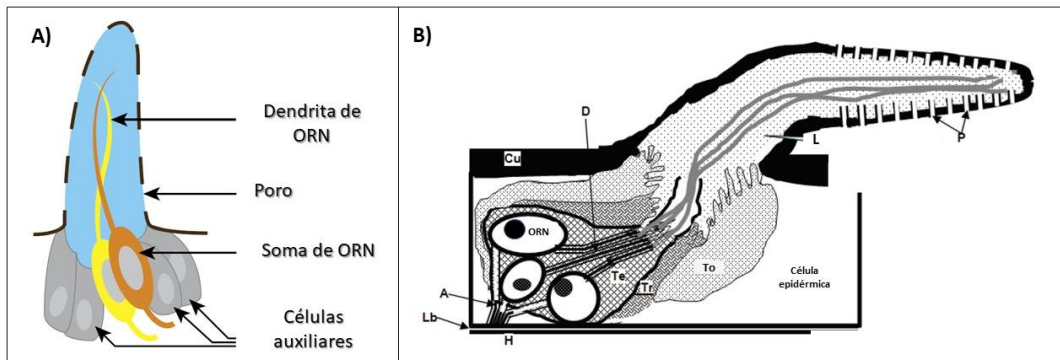


Figura 4.- Esquema de sensilia olfatoria. A) Componentes celulares de una sensilia olfatoria. **B)** Acercamiento hacia una sensilia olfatoria, haciendo énfasis en las células auxiliares y sus distintos tipos. Cu: Cutícula., A: Axones., Lb: Lámina basal., H: Hemolinfa., D: Dendritas., Te: Célula tecógena., Tr: Célula tricógena., To: Célula tormógena., L: Linfa., P: Poros. (Modificado de: Guidobaldi y Guerenstein, 2012; Joseph y Carlson, 2015).

Las células accesorias también secretan, hacia la linfa que rodea las dendritas de las ORNs, proteínas de unión a odorantes (OBPs), las cuales han sido propuestas como acarreadoras de odorantes hacia los receptores olfatorios (ORs) de las membranas dendríticas. También tienen la capacidad de solubilizar odorantes hidrofóbicos (Vosshall, 2000; Joseph y Carlson, 2015).

En cuanto a las ORNs se refiere, a diferencia de los vertebrados, pueden presentar de una a cuatro dendritas, aunque lo usual en este organismo es que sean dos (Wilson, 2013), y es en éstas donde se localizan los ORs. La gran mayoría expresa dos tipos de receptores de manera conjunta: el correceptor Or83b (Orco) que se considera “universal”, ya que se encuentra altamente conservado entre los insectos y las ORNs, y un OR variable, formando así, una unidad funcional (Kain *et al.*, 2008; Kaupp, 2010).

La presencia de esta unidad funcional, ha dado pie a la búsqueda de posibles vías de señalización y la naturaleza de los receptores involucrados (Figura 5), tema que actualmente sigue siendo controvertido, pues hay quienes afirman que los ORs de insectos son receptores ionotrópicos heteroméricos (Sato *et al.*, 2008) y quienes afirman que son tanto ionotrópicos, como metabotrópicos (CNGCs y dependientes de proteínas G); es decir, que altas concentraciones de odorante activan la vía ionotrópica directa, considerada de corta duración, mientras que bajas concentraciones, activan la síntesis de AMPc a través de una proteína G, lo que a su vez activa a Or83b, quien toma el papel de un canal iónico regulado por AMPc, este mecanismo es de duración prolongada (Wicher *et al.*, 2008). Por otro lado, también se ha reportado que la actividad de Or83b es regulada mediante fosforilación, a través de la proteína cinasa C (PKC), que es activada por la cascada de transducción de IP3/DAG (Sargsyan *et al.*, 2011).

Una vez despolarizada la membrana de la neurona y generado el potencial de acción, esta señal eléctrica es transportada a través del axón. Muchos olores activan combinaciones específicas de ORs que tienen propiedades dinámicas y sensitivas distintivas, por lo que los circuitos periféricos transforman la identidad e intensidad del olor en lo que se puede llamar un “código glomerular” único, o también conocido como “mapa de olor” (Kaupp, 2010; Ramdya y Benton, 2010).

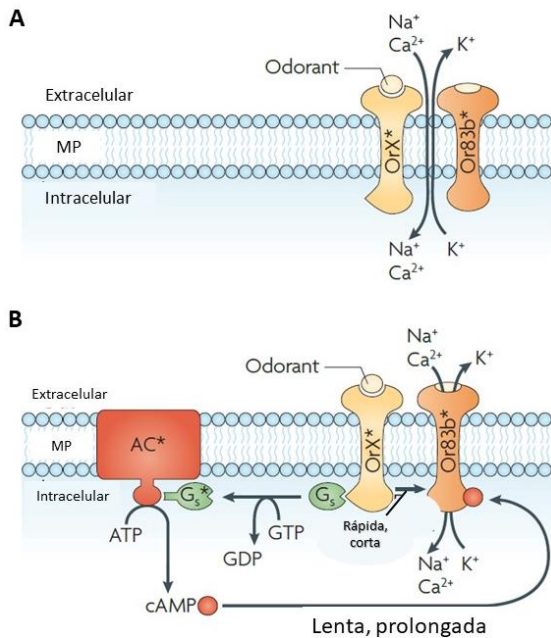


Figura 5.- Modelos de vías de señalización para la transducción olfativa en insectos. A) Modelo ionotrópico, en el que el canal iónico se abre directamente en respuesta a la unión del odorante. **B)** Modelo metabotrópico, en el que existen dos posibles mecanismos: la vía rápida y corta, donde Or83b es activado de manera directa abriendo el canal iónico; y la vía lenta y prolongada, donde Or83b es activado de manera indirecta mediante una proteína G, que promueve la síntesis de AMPc, el cual se une a Or83b, abriendo el canal y generando corrientes de despolarización lentas y prolongadas. MP: membrana plasmática., G_s: Proteína G estimuladora., AC: Adenil ciclasa., cAMP: AMP cíclico, * indica la forma activa de la molécula. (Modificado de: Kaupp, 2010.)

Los axones de las ORNs que expresan los mismos receptores, convergen en uno o varios glomérulos olfativos de lo que en conjunto se conoce como lóbulo antenal (AL), que es considerado la primera unidad de procesamiento olfativo del sistema nervioso central, homólogo al bulbo olfatorio en vertebrados. En el AL, las ORNs hacen sinapsis con neuronas de segundo orden, es decir neuronas de proyección (PN), o lo que serían las células mitrales y de penacho en vertebrados, quienes transmiten la información a centros cerebrales superiores (Ramdya y Benton, 2010; Martin *et al.*, 2013; Wicher, 2015).

En *D. melanogaster*, estos centros son los cuerpos fungiformes (MB) y las astas laterales (LH) (Figura 6), los cuales se pensaba estaban involucrados en las respuestas olfativas aprendidas e innatas, respectivamente (Li y Liberles, 2015). Sin embargo, se ha visto que las LH participan en ambos tipos de respuestas (Schultzhaus *et al.*, 2017).

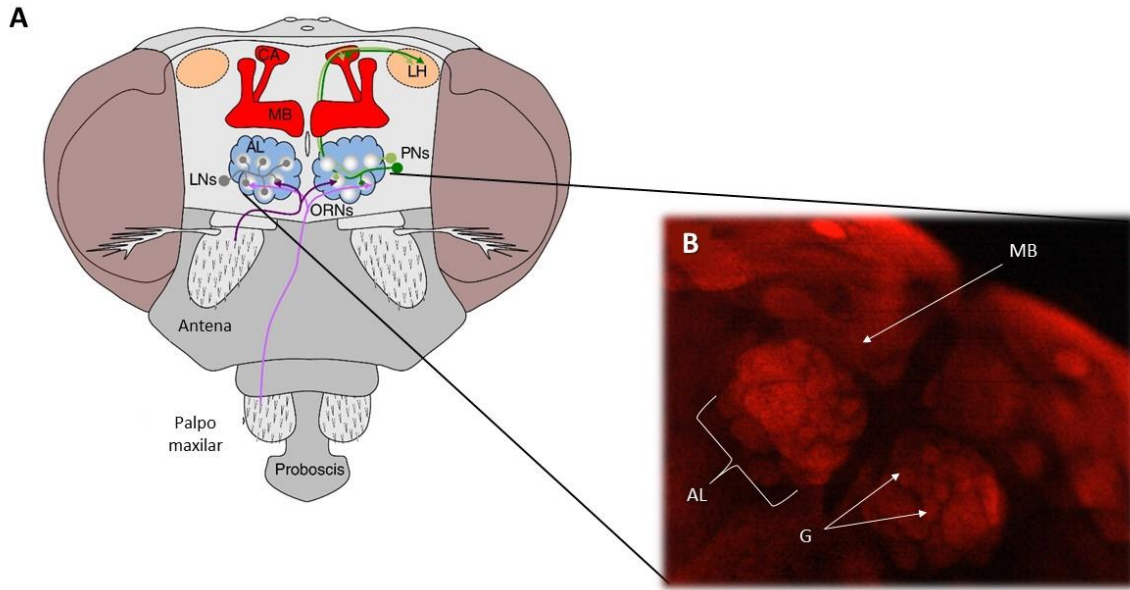


Figura 6.- Estructuras y centros olfatorios de *Drosophila melanogaster*. A) Vía olfatoria. Los palpos maxilares y el tercer segmento de las antenas proyectan las dendritas de sus ORNs hacia los glomérulos (G) del lóbulo antenal (AL), en donde las señales eléctricas son integradas por interneuronas locales (LNs). La información una vez procesada es transmitida hacia el cáliz (CA) de los cuerpos fungiformes (MB) y las astas laterales (LH) gracias a las neuronas de proyección (PNs). (Modificado de: Perisse *et al.*, 2013). **B)** Acercamiento de centros cerebrales. Inmunotinción contra neuropilos de lóbulos antenales y cuerpos fungiformes. (Fotografía: Estefanía De Allende-Becerra).

2.2.3. Homología y diferencia de procesos entre ambas especies

Como se puede observar, y según se ha reportado, los mecanismos en la cascada de transducción y procesamiento olfativo en humano y en mosca, son muy semejantes y se consideran de alta homología. La intención de esta sección es únicamente recapitular estas semejanzas y señalar las diferencias existentes en este ámbito entre ambas especies.

A nivel global, la organización de ambos sistemas olfativos coincide entre sí, ya que ambos se distribuyen en un eje dorso-ventral a través de la cabeza y, aunque las estructuras anatómicas (nariz/palpos maxilares y antenas) encargadas de la captación primaria de odorantes son bastante disimiles, la organización celular del epitelio olfatorio humano, es semejante a la organización interna de las sensillas olfativas, teniendo tipos celulares homólogos y soluciones que cumplen funciones similares, como el moco y la

linfa. Sin embargo, considerando las ORNs bipolares de ambos organismos, existe variación por ejemplo, en el número de dendritas con las que éstas cuentan, pues, mientras las ORNs humanas cuentan una dendrita, las ORNs de mosca presentan de una a cuatro; aunque si se considera que las dendritas humanas exhiben múltiples cilios, la extensión abarcada y la eficacia de las dendritas de ambos organismos, podría ser equivalente.

Por otro lado, los receptores olfativos presentes en ambos organismos, se distribuyen de manera aleatoria. En humanos, son dependientes de proteínas G, es decir, GPCRs, mientras que los receptores de mosca no necesariamente, pues se piensa que dependiendo de la concentración de odorante, sus receptores pueden ser mediados por estas proteínas (metabotrópicos) o activarse de manera directa como un receptor ionotrópico.

Además, se sabe que en humano se expresa un receptor por cada neurona, mientras que en mosca generalmente son dos OR por cada ORN, sin embargo considerando que muchas veces los ORs de mosca se ensamblan en complejo para formar una unidad funcional, la regla OR-ORN 1:1 es válida en sentido funcional (Kaupp, 2010). Sin embargo, la secuencia y topología membranal de los ORs humanos y los ORs de mosca, difieren entre sí.

Entrando en el ámbito de los receptores olfativos, otro punto que se puede contrastar, es la dirección de la señal que se desencadena. En ambas especies, las ORNs que expresan el mismo OR, envían sus axones hacia algunos glomérulos del bulbo olfatorio o el lóbulo antenal, generando patrones de actividad glomerular únicos para cada olor. Estos centros primarios de procesamiento olfativo tienen una organización muy parecida entre sí, y en ellos los axones de las ORNs convergen con dendritas de, ya sea células mitrales y de penacho en humano, o interneuronas locales y neuronas de proyección en mosca.

En ambas especies, las señales en el sistema olfativo en general, son transportadas y mediadas de la misma manera, siguiendo etapas semejantes y en centros de procesamiento similares.

2.3 Anosmia, hiposmia y su relación con enfermedades neurodegenerativas

El olfato ha sido llamado “el sentido olvidado”, pues se le ha dado mayor importancia a la vista, el gusto, el tacto, e incluso el oído; y frecuentemente no es tomado en cuenta por la medicina en general, ni por la investigación biomédica. También es raro que el paciente se queje de trastornos olfativos y acuda a consulta (Montes de Oca y Montes de Oca, 2005). Sin embargo, los desórdenes olfativos representan problemas en diversas áreas de la vida cotidiana, como es la higiene personal, la seguridad, la salud emocional, la ingesta alimenticia, el comportamiento y desempeño sexual, entre muchas otras cosas (Masala *et al.*, 2017).

Los trastornos olfativos pueden ser agrupados en cuantitativos (anosmias, hiposmias e hiperosmias), dependiendo del nivel olfatorio que se presente; y cualitativos, cuando no se ha alterado la capacidad olfativa, sino que la habilidad para detectar y discriminar olores se encuentra distorsionada (Chacón *et al.*, 2008).

Hasta cierto punto, estos desórdenes llegan a ser una cuestión que se presenta con frecuencia y por diversas razones, ya sean de manera temporal o definitiva. Por ejemplo, simplemente la función olfativa mengua conforme la persona envejece (presbiosmia) y se ha reportado que es más severo en hombres que en mujeres, de hecho, ésta es la causa más frecuente del decline olfativo en adultos sanos (Godoy *et al.*, 2015). Este cambio es tan notable que, se ha reportado que un 2% de los estadounidenses menores de 65 años, y en contraste, un 75% mayores de 80 años, presentan anosmia (Nordin *et al.*, 2012). De igual manera en México la situación no es muy diferente, pues, aunque debido a la falta de investigaciones no se tienen datos exactos, también se registra un alto porcentaje de personas anósmicas o con problemas olfativos, especialmente a partir de los 50 años de edad (Guarneros *et al.*, 2015).

Aunque existen casos de anosmia congénita, la mayoría de los trastornos olfativos son adquiridos; el epitelio olfatorio sólo está separado del exterior por una delgada capa de moco, lo cual lo hace vulnerable a las agresiones ambientales, agentes infecciosos, traumas y tóxicos, incluso está comprobado que el resfriado común puede ser causa de anosmia permanente, sobre todo en aquellos casos en donde el epitelio olfatorio ya ha

acumulado daños (Montes de Oca y Montes de Oca, 2005; Doty y Mishra, 2001). Por otro lado, diversas patologías como los pólipos nasales, la rinitis, sinusitis, algunas alergias, epilepsia, la presencia de tumores y ciertas enfermedades neurológicas y psiquiátricas, también son factores que provocan trastornos olfativos (Chacón *et al.*, 2008; Nazar y Pardo, 2011; Masala *et al.*, 2017).

Recientemente, se han registrado una amplia gama de enfermedades neurológicas como, el Alzheimer (AD), la enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), entre otras; que entre sus síntomas iniciales se encuentran los desórdenes olfativos (Passali *et al.*, 2015). La hiposmia y la anosmia, correlacionan con la etiología de algunas de estas enfermedades neurodegenerativas, como es el caso del Parkinson y Alzheimer, y se han propuesto como síntomas diagnósticos de la mismas, ya que suelen presentarse incluso décadas antes de desarrollar síntomas motores o conductuales. En paralelo, se asocia con la aparición de biomarcadores de dichas enfermedades, por ejemplo: elevados niveles de placas amiloides en el cerebro o la formación de cuerpos de Lewy. Se ha observado que en algunos casos, la anosmia se debe principalmente a una reducción del hipocampo y adelgazamiento de la corteza entorrinal (Miranda *et al.*, 2006; Growdon *et al.*, 2015).

De hecho, aunque recientemente se ha dejado de lado o pareciera que ha sido un poco olvidada, hace algún tiempo se propuso lo que se conoce como la “hipótesis del vector olfativo” (Roberts, 1986), idea que sugiere que el origen de ciertas enfermedades neurodegenerativas se encuentra vinculado con las vías olfativas, es decir, que el sistema olfativo brinda a los xenobióticos una ruta directa al cerebro para desencadenar esta enfermedad. No obstante, la información en este ámbito sigue siendo escasa, por lo que resultan indispensables investigaciones en las cuales se indague en la relación de este quimiosentido con las enfermedades de este tipo.

2.4 Enfermedad de Parkinson

2.4.1. Epidemiología y generalidades

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer, afectando entre el 1-2% de la población mundial (Pickrell y Youle, 2015). Se caracteriza por la presencia de agregados proteicos conocidos como cuerpos de Lewy (LB), y la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc) (elemento importante del sistema de ganglios basales), que lleva a la disminución de dopamina en el estriado, generando

principalmente alteraciones motoras con cierto grado de asimetría (Elbaz *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2017).

Sus principales manifestaciones son la bradicinesia, rigidez, dificultad para mantener una postura y temblor en las extremidades. Sin embargo, la participación de otras regiones cerebrales conlleva a la aparición de síntomas no motores (Figura 7), como las alteraciones olfativas ya mencionadas, trastornos del sueño, problemas digestivos, depresión, ansiedad, problemas cardíacos, disfunción eréctil, entre otros (Calderón Alvarez-Tostado *et al.*, 2010; Martínez-Fernández *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2017; Schapira *et al.*, 2017).

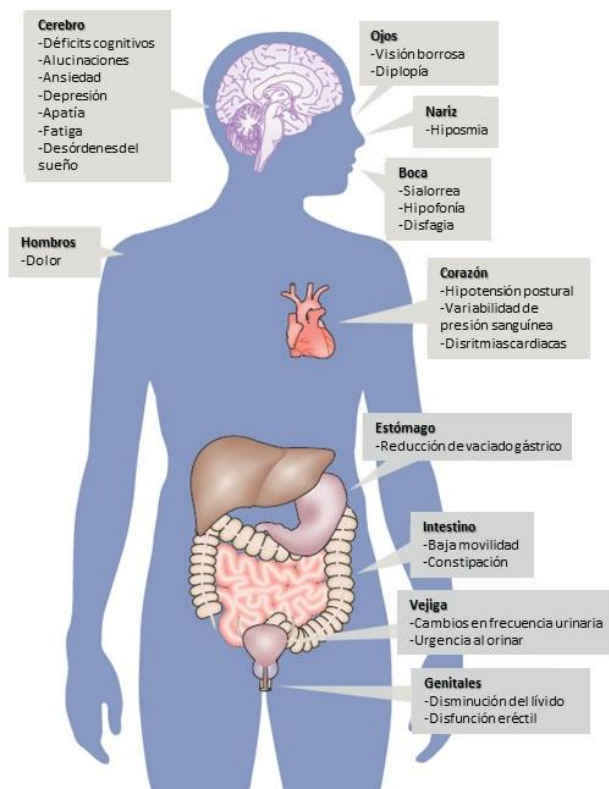


Figura 7.- Principales síntomas no motores de la enfermedad de Parkinson (Modificada de: Schapira *et al.*, 2017).

Se ha observado que existe una relación directamente proporcional entre la edad y la incidencia demográfica de esta enfermedad (Tabla 1), estimándose, en la población de 60-69 años de edad en Norte América, una incidencia de 540 personas afectadas por cada 100 000 habitantes, mientras que en la población de mayores de 80 años, la

incidencia es de 2 953 personas por cada 100 000 (Pringsheim *et al.*, 2014), no existiendo actualmente ningún dato concreto sobre incidencia o prevalencia nacional en México. Sin embargo, se ha dicho que los datos recaudados en ciertas áreas del país, son comparables a otros registros internacionales (Cervantes-Arriaga *et al.*, 2013).

En algunas ocasiones, esta enfermedad se presenta antes de los 40 años, en cuyo caso, es conocido como Parkinson juvenil. Su incidencia es muy baja, representando el 5% de los pacientes con PD. Esta es una enfermedad que afecta en mayor medida a hombres que a mujeres, en una relación 3:1 y la mayoría de los estudios reportan que la prevalencia es de 1.5 a 2 veces mayor en hombres que en mujeres (Schrag *et al.*, 2000; Martínez-Fernández *et al.*, 2016).

Tabla 1. Incidencia de la enfermedad de Parkinson a nivel mundial. (Datos obtenidos de: Pringsheim *et al.*, 2014).

Localización Geográfica	Edad			
	50-59 años	60-69 años	70-79 años	+ 80 años
Asia	88	376	646	1 418
Europa/Norteamérica/Australia	113	540	1 602	2 953
Sudamérica	228	637	2 180	6 095

Se sabe que existen diversos factores de riesgo como la exposición a tóxicos y metales pesados, sin embargo, hasta la fecha, no se ha determinado una causa concreta para esta enfermedad. No obstante, en términos muy generales, se piensa que se debe a factores ambientales y genéticos, por lo que ha sido categorizada en dos grandes grupos: PD adquirido (o esporádico) (90%) y PD familiar (10%), respectivamente (Ascherio y Schwarzschild, 2016).

De manera más concreta, se han propuesto diversas causas subyacentes, pues se piensa es una enfermedad multifactorial, dentro de ellas está la disfunción mitocondrial, lisosomal, el estrés oxidativo, dado que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc están particularmente expuestas a este estrés, debido a que el metabolismo de la dopamina origina diversas moléculas que, si el sistema no se encuentra bajo un control adecuado de los procesos metabólicos, pueden actuar como toxinas endógenas (Lotharius y Brundin, 2002). Otras posibles causas son, un mal funcionamiento del sistema de ubiquitinación del proteosoma, y la acumulación de proteínas, como α -sinucleína (SNCA) y sinfilina (Sinf), que en distintos mamíferos incluyendo al ser humano, al estar mutadas y/o sobre expresadas, son altamente neurotóxicas, afectando especialmente a las neuronas dopaminérgicas, razón por la cual se le ha dado peso a este factor como probable causa intrínseca (Singleton *et al.*, 2003; Corti *et al.*, 2011).

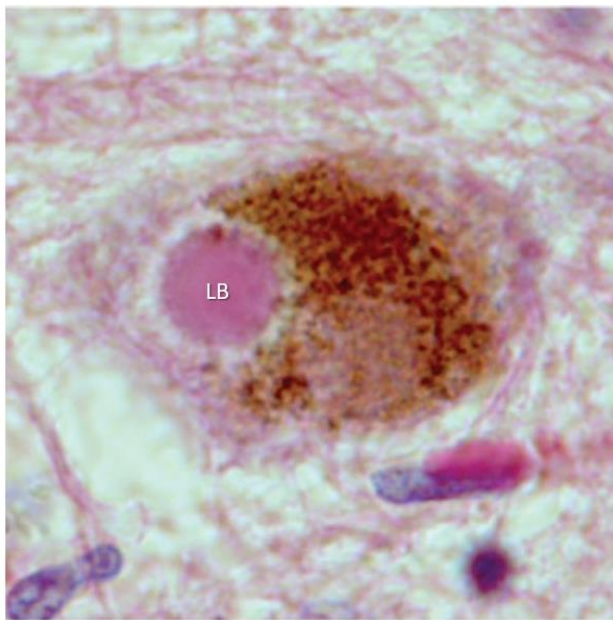


Figura 8.- Cuerpo de Lewy dentro de neurona. LB: Cuerpo de Lewy (Modificada de: McCann *et al.*, 2016).

Los indicadores cardinales de esta enfermedad son los cuerpos de Lewy (Figura 8), que son agregados proteicos compuestos principalmente de SNCA y Sinf, los cuales en esta enfermedad se desarrollan principalmente en la SNpc, más no se limitan exclusivamente a ella, hallándose también en el núcleo motor del nervio vago, el hipotálamo, en la corteza cerebral y el bulbo olfatorio (Goedert, 2001). Por otro lado, se ha observado que la distribución de estos cuerpos a lo largo del sistema nervioso, correlaciona con la progresión de la

enfermedad, comenzando en regiones como el bulbo olfatorio y avanzando en etapas crónicas al mesencéfalo, idea a la cual se le conoce como “Estadios de Braak y Braak” (Braak *et al.*, 2003; McCann *et al.*, 2016).

Actualmente no existe una cura para esta enfermedad, ni nada que detenga la progresión de esta neurodegeneración, aunque existen tratamientos quirúrgicos y farmacológicos que contrarrestan algunos de sus síntomas. El medicamento más antiguo y el más utilizado para el tratamiento del PD es la levodopa, que es precursor de la dopamina, y ha resultado eficaz contrarrestando las manifestaciones motoras de la enfermedad, por otro lado, también se utilizan medicamentos como la rasagilina y agonistas dopaminérgicos no ergóticos como la rotigotina, pramipexol o ropiniro. Los agonistas dopaminérgicos ergóticos como la cabergolina, pergolida y la lisurida, han dejado de utilizarse pues se reporta un aumento de riesgo de fibrosis valvular cardíaca, por lo que su administración requiere controles ecográficos constantes. En México, el 76.8% de los pacientes reciben alguna formulación con levodopa, el 54.4% son tratados con agonistas dopaminérgicos (pramipexol o rotigotina), y el 18.1% reciben algún inhibidor de la monoaminooxidasa (selegilina o rasagilina) (Cervantes-Arriaga *et al.*, 2013; Martínez-Fernández *et al.*, 2016).

Claro está, que el tratamiento puede y debe ir cambiando conforme la enfermedad progresa, pues éste tiene que ser acorde al tiempo de evolución, fase de la enfermedad, tipo de sintomatología presente y las discapacidades que conlleve (motora y no motora). Además de los tratamientos farmacológicos, existen otras alternativas, como es la estimulación cerebral profunda, las bombas de perfusión de apomorfina, de levodopa/carbidopa enteral, y algunos otros que aún están en fase de estudio clínico, como la subtalamotomía y la talamotomía, pero generalmente todas estas técnicas son utilizadas en etapas más avanzadas de la enfermedad o en pacientes que no responden a los tratamientos farmacológicos (Martínez-Fernández *et al.*, 2016).

2.4.2. Dopamina

La dopamina es un neurotransmisor que, junto con la epinefrina (adrenalina) y la norepinefrina (noradrenalina), pertenece al grupo de las catecolaminas. Las funciones que este neurotransmisor desempeña, son variadas, por un lado se ha observado que su déficit cerebral trae consecuencias en la planeación y control de los movimientos, en cuestiones cognitivas y de memoria, e incluso en cuestiones emocionales; por otro lado, también se sabe que se ve involucrado en comportamientos de condicionamiento a base

de recompensa y en mecanismos de adicción. En el sistema nervioso periférico, la dopamina es un modulador de la función cardíaca y renal, del tono vascular y de la motilidad gastrointestinal (Schultz, 2002; Daubner *et al.*, 2011).

La neuronas dopaminérgicas se distribuyen en diferentes partes del sistema nervioso, como el bulbo olfatorio, el hipotálamo, la hipófisis, el nervio vago; pero principalmente, la mayoría de sus somas se localizan en la región ventroanterior del cerebro medio (*sustancia nigra* y *área tegmental ventral*), desde el área caudo-lateral hasta la rostro-medial. A partir de estas regiones se establecen distintas vías de proyección axonal. Aquellas que proyectan del *área tegmental ventral* hacia la *amígdala*, el sistema límbico o la corteza frontal, se denominan *vía tuberoinfundibular*, *vía mesolímbica* y *vía mesocortical*, respectivamente. Por otro lado, en la *vía nigro-estriatal*, los axones de las neuronas dopaminérgicas se proyectan de manera diferencial desde la *SNpc* hacia el *núcleo caudado* y el *putamen* (Figura 9) (Schultz, 2002).

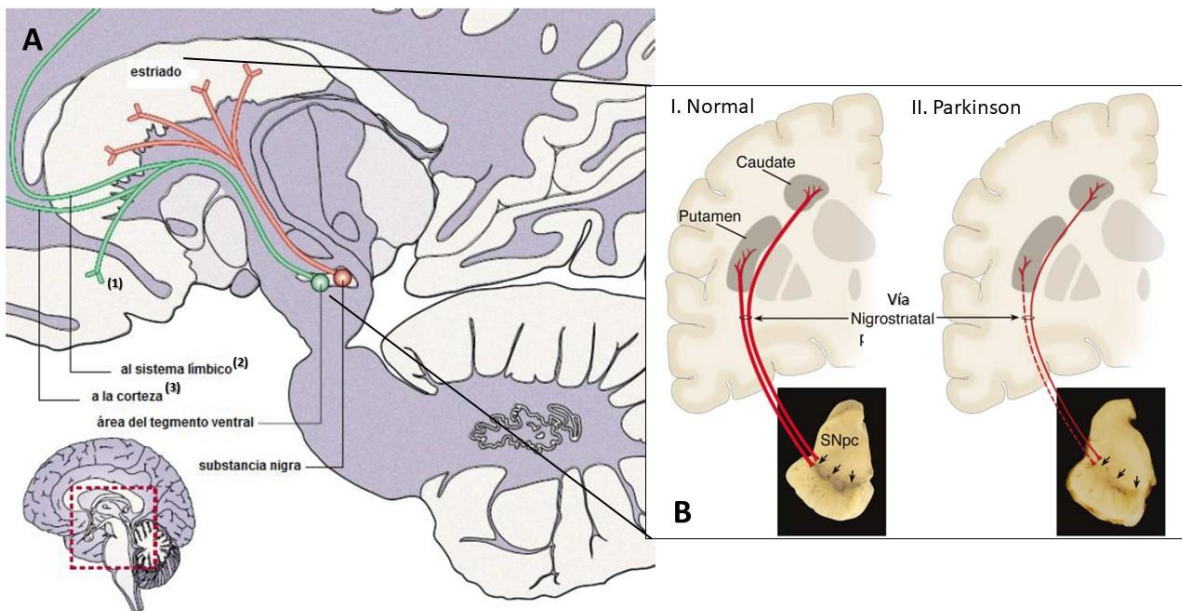


Figura 9.- Vías dopaminérgicas en cerebro humano. A) Esquemización de las vías tuberoinfundibular (1), mesolímbica (2) y mesocortical (3) (Verde) y de la vía nigro-estriatal (Rojo). **B)** Vía nigro-estriatal. I. Funcionamiento de la vía en una persona sana. II. Funcionamiento en paciente con PD. El grosor de las líneas rojas denota la pérdida de proyecciones hacia los núcleos, observándose que hay una pérdida muy marcada de neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el putamen (línea punteada) y una disminución menos abrupta de las que proyectan hacia el núcleo caudado (línea continua delgada). Flechas: somas de neuronas dopaminérgicas. SNpc: sustancia nigra pars compacta. (Modificada de: Goedert, 2001; Dauer y Przedborski, 2003).

La dopamina es una de las moléculas más importantes en la PD, pues, aunque en etapas tempranas no todos los núcleos dopaminérgicos se encuentran afectados, en última instancia la disminución del nivel de dopamina en el sistema nervioso, principalmente en la SNpc, lleva a la aparición de los síntomas más característicos de esta enfermedad.

La síntesis de este neurotransmisor (Figura 10) se lleva a cabo en las terminales nerviosas dopaminérgicas, donde se encuentra una alta concentración de las enzimas necesarias para las reacciones involucradas en este proceso. Esta biosíntesis inicia a partir de la L-tirosina, que es el sustrato de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima encargada de catalizar la primera reacción, la cual consiste en la adición de un grupo hidroxilo para transformar el sustrato en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Posteriormente, gracias a la enzima dopamina descarboxilasa, un grupo carboxilo es eliminado de este producto, en forma de CO₂, dando como resultado a la dopamina (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000; Schwaerzel *et al.*, 2003).

Para su liberación, la dopamina es cargada en vesículas sinápticas mediante la acción de un transportador vesicular de monoaminas (VMAT), y una vez en el espacio intersináptico es reconocida de manera específica, en las terminales nerviosas post-sinápticas, por GPCRs dopaminérgicos, los cuales se agrupan en dos grandes familias, D-1 y D-2, que estimulan e inhiben a la adenilato ciclasa, respectivamente, regulando así los niveles de AMPc. Finalmente, la dopamina es recapturada en las terminales nerviosas o por células gliales circundantes, utilizando un transportador de dopamina dependiente de sodio (DAT) (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000).

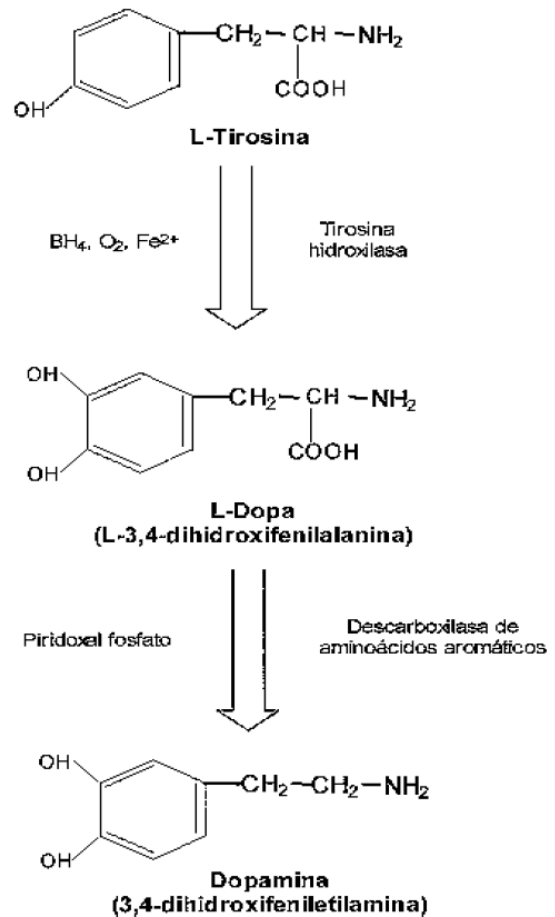


Figura 10.- Biosíntesis de dopamina. (Tomado de: Bahena-Trujillo *et al.*, 2000)

En el interior de la terminal nerviosa, la dopamina recapturada es catabolizada al convertirse, gracias a la acción de la forma A de la enzima monoamino-oxidasa (MAO-A), en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), el cual es liberado al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000; Lotharius y Brundin, 2002).

Cuando la dopamina no es recapturada, puede ser metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAOA, o bien, puede autooxidarse formando peróxido de hidrógeno y dopamina-quinona, los cuales son productos citotóxicos. Se ha propuesto que ciertas mutaciones en el gen que codifica para la SNCA impiden el correcto almacenamiento de la dopamina en vesículas sinápticas, lo que aumenta la concentración citoplásmica y el incremento en el estrés oxidativo, provocaría que este neurotransmisor tendiera a oxidarse y causara daño neuronal, como en el caso de la PD (Lotharius y Brundin, 2002).

2.4.3. Papel de la α -Sinucleína en la enfermedad de Parkinson

Como ha sido mencionado en secciones anteriores, esta proteína (SNCA) juega un papel fundamental en PD, pues es el componente predominante del indicador celular más importante y característico de esta enfermedad, es decir, los cuerpos de Lewy. Por lo tanto, vale la pena ahondar un poco en sus características y estructura.

La α -sinucleína (Figura 11), perteneciente a la familia de las sinucleínas (α , β , γ), es una proteína de 140 aminoácidos y aproximadamente 40 kDa, codificada por el gen *PARK-1* (o *SNCA*) que consta de seis exones que van de 42 a 1110 pb. Esta proteína cuenta con tres dominios: 1) el extremo N-terminal en α -hélice (residuos 1-87), que es de unión a lípidos gracias a sus motivos de KTKEGV, 2) el segmento hidrofóbico central o componente no-amiloideo (NAC) (residuos 61-95), y la cola ácida del extremo C-terminal (residuos 96-140) (Emamzadeh, 2016).

A pesar de su alta abundancia en el sistema nervioso, su función no se encuentra aun plenamente entendida, sin embargo, se ha encontrado evidencia que da pauta para atribuirle ciertas funciones. Por ejemplo, debido a su interacción con el complejo SNARE (receptores de proteínas de fijación soluble del factor sensible a N-etilmaleimida), el cual

participa en la fusión vesicular, se ha considerado que puede tener un papel importante en los procesos de transporte y reciclaje vesicular y en la exocitosis para la liberación de neurotransmisores (Villegas *et al.*, 2014).

Por otro lado, también se sospecha su participación en la plasticidad sináptica, pues se ha observado en estudios realizados en aves, que su conformación transcriptómica cambia de manera específica en regiones cerebrales involucradas en el canto, sin embargo, aún no se sabe exactamente de qué manera esta proteína podría verse implicada y cuál sería su regulación. Finalmente, a consecuencia de su dominio de unión a lípidos, se ha considerado que podría actuar como una proteína de unión a ácidos grasos (Goedert, 2001; Emamzadeh, 2016; Koprach *et al.*, 2017).

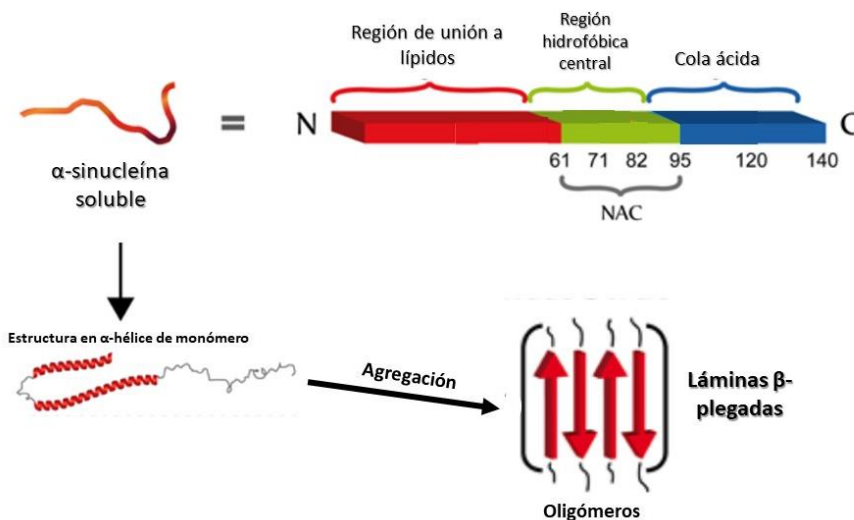


Figura 11.- Estructura primaria y secundaria de α -sinucleína. NAC: componente no-amiloideo. (Modificado de: Pacheco *et al.*, 2012).

En un entorno patológico, el papel de esta proteína ha sido elucidado gracias a las consecuencias que su acumulación y/o mutación ocasiona. Hasta ahora, seis mutaciones puntuales (*A53T*, *E46P*, *A30P*, *H50Q*, *G51D* y *A53E*) que provocan neurotoxicidad, han sido descubiertas (Delamarre y Meissner, 2017). Además, se ha demostrado que la sola sobreexpresión de *SNCA* silvestre, debido a un aumento de la dosis génica, es suficiente para desencadenar la PD, aún en ausencia de mutaciones en su secuencia codificadora, lo cual sugiere que el simple incremento de esta proteína, incluso sin cambios conformacionales, genera neurotoxicidad y un efecto de dosis-respuesta. La duplicación

del gen produce un patrón como el observado en PD esporádico, mientras que la triplicación del mismo genera la aparición temprana y más agresiva de la enfermedad (Singleton *et al.*, 2003; Chartier-Harlin *et al.*, 2004).

También se ha observado que el daño oxidativo de la SNCA, provoca la inhibición del proteosoma (Hodara *et al.*, 2004), lo que promueve que ésta y otras proteínas defectuosas continúen acumulándose. Hasta la fecha, no está totalmente claro si la formación de inclusiones (LB) es parte de un proceso neuroprotector-adaptativo o una reacción patogénica frente a estímulos no conocidos relacionados con la neurodegeneración.

2.4.4. *Drosophila melanogaster* como modelo de la Enfermedad de Parkinson

D. melanogaster es uno de los organismos más estudiados en biología, pues a partir de las investigaciones realizadas por Thomas H. Morgan en 1910, se ha demostrado que es un excelente sistema genético y sirve como modelo para muchos tipos de investigaciones. Tal es la similitud biológica que se ha observado entre la mosca de la fruta y el humano, que Rubin en 2008 mencionó que las *D. melanogaster* han resultado ser “pequeños humanos con alas”.

Como ya se discutió en secciones previas, posee gran homología en distintos procesos moleculares y celulares comunes en eucariontes superiores, incluidos los seres humanos (Adams *et al.*, 2000; Held, 2017).

Para el estudio de distintos fenómenos neurobiológicos, se han utilizado organismos modelo como el ratón (*Mus musculus*), el nematodo (*Caenorhabditis elegans*), el pez zebra (*Danio rerio*) y la mosca de la fruta (*D. melanogaster*). Los tres modelos comparten características fisiológicas y moleculares similares (Piali y Aravinthan, 2009; Kalueff *et al.*, 2013; Ellenbroek y Youn, 2016), sin embargo, *D. melanogaster* ofrece ciertas ventajas, como el hecho de que posee solamente cuatro pares de cromosomas (Anexo I), lo que simplifica las diferentes técnicas genéticas que se conocen hasta el momento, además de que su mantenimiento es de bajo costo y su ciclo de vida (Anexo II) relativamente corto (10-15 días).

Por otro lado, cuenta con un sistema nervioso bien caracterizado, y su genoma se encuentra completamente secuenciado (Adams *et al.*, 2000), lo que ha dado origen a distintos centros de almacenamiento de líneas de moscas con mutaciones en genes específicos, o inserciones genéticas, en donde es accesible adquirir el genotipo deseado (Grueber *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2000).

En diferentes áreas de investigación en donde este organismo es utilizado, el sistema *UAS/GAL4* (Figura 12), ha resultado ser de gran ayuda, pues permite controlar de manera específica la expresión génica, y la dirección tisular *in vivo* de cualquier gen, ya sea de mosca u otro organismo.

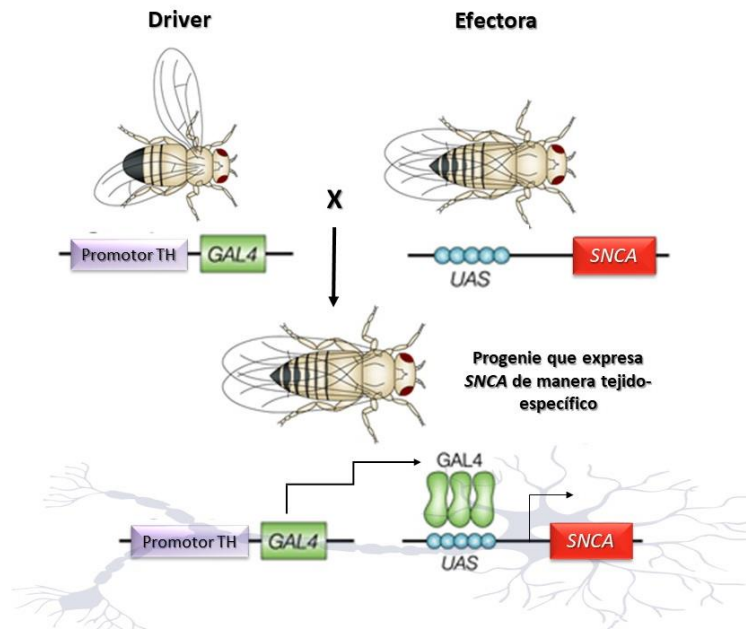


Figura 12.- Sistema *GAL4/UAS*. TH: tirosina hidroxilasa. SNCA: α -sinucleína. (Modificado de: Johnston, 2002).

GAL4 es un factor de transcripción, originario de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuya función es activar la expresión de los genes encargados de la asimilación de galactosa. Sin embargo, para que este factor pueda funcionar, se requiere que los genes a activar, cuenten con una secuencia reguladora (análoga a un *enhancer* en organismos pluricelulares), que se denomina “Upstream Activating Sequences” (*UAS*). La unión de *GAL4* con *UAS* es altamente específica, por lo que este factor no puede activar a ningún gen que no la contenga. En *D. melanogaster* no existen genes homólogos a *GAL4* y

ningún gen de la mosca contiene secuencias *UAS* endógenas, por lo que se ha optado por el diseño de moscas transgénicas que contengan cierto gen de interés (gen efector) *downstream* a las *UAS*, y moscas transgénicas que expresen *GAL4* bajo promotores endógenos de la mosca (*driver*), para que dirijan de manera específica la expresión tisular de este factor. Posteriormente se puede realizar cruza tradicionales entre ambas líneas de moscas, para que la progenie que herede ambos transgenes exprese el gen efector, mientras que los progenitores y la progenie que sólo contenga el factor de transcripción o la secuencia *UAS*, permanezcan como moscas normales, es decir, sin la expresión del gen efector (Duffy, 2002).

En este organismo modelo, la síntesis de SNCA no es realizada de manera natural o endógena, por lo que se han desarrollado líneas de moscas transgénicas que, gracias al sistema previamente descrito, expresan esta proteína en las neuronas dopaminérgicas (bajo la dirección de la tirosina hidroxilasa) y son capaces de recapitular síntomas y aspectos fisiológicos, celulares y etológicos característicos de PD (Chartier-Harlin *et al.*, 2004), por lo que se utilizan como modelos de esta enfermedad.

III. ANTECEDENTES

En cuanto al estudio de la enfermedad de Parkinson, un gran avance se logró cuando Feany y Bender (2000), desarrollaron tanto las moscas transgénicas que en la presente investigación se utilizan como modelo, es decir, aquellas que expresan el gen humano de la *SNCA^{wt}*, como aquellas que expresan este mismo gen pero con las mutaciones que ya se mencionaron con anterioridad. En ambos casos se observó la pérdida de neuronas dopaminérgicas y la presencia de LBs. Además, estos investigadores evaluaron la motricidad de las moscas de este modelo y detectaron que presentan alteraciones del comportamiento y que cuando envejecen, importantes deficiencias en las pruebas de locomoción son detectadas.

Sin embargo, actualmente, no existen estudios en los que se les haya evaluado la respuesta olfativa, y tampoco hay reportes de investigaciones en los que de manera farmacológica se haya logrado revertir la pérdida del olfato a causa de la PD, de hecho los agonistas dopaminérgicos, fármacos más utilizados en el tratamiento de esta

enfermedad, parecen no tener un efecto significativo en las funciones olfativas. No obstante, otras terapias no farmacológicas han sido propuestas, como la de Hummel *et al.* (2005), quienes implementaron la estimulación cerebral profunda en el núcleo subtalámico en pacientes con PD que presentaban déficit olfativo (hiposmia), obteniendo una ligera mejoría de dicho quimiosentido.

Otra aproximación, aunque no relacionada directamente con la PD, es la realizada por McIntyre *et al.* (2012), en donde se empleó terapia génica en ratones congénitamente anósmicos para el desarrollo de cilios celulares. Se utilizó un adenovirus para introducir una copia sana del gen causante de la anosmia en los ratones, que afectaba los niveles de la proteína IFT88, de esta manera las respuestas, medidas en el tejido celular y los niveles sinápticos, indicaron la restauración total de la función olfativa, esta terapia podría ser una alternativa en otros modelos anósmicos asociados a PD.

Por su parte Chambers *et al.* (2013), evaluaron la respuesta olfativa de una línea de *D. melanogaster* con el gen *Park25* (asociado a PD), y encontraron que en las mutantes heterocigotas para este gen se observaba disminución de la esperanza de vida, disfunción motora progresiva y déficit olfativo, en comparación a las moscas control. Además, reportaron que en el día 5 después de emergidas de la pupa, aún al no observarse anomalías motoras, sí se presentaban déficit olfativo.

Por otro lado, Zapiec *et al.* (2017) realizaron un estudio en el que utilizando tejido humano *post-mortem* de pacientes con PD y personas sanas, reconstruyeron tridimensionalmente el bulbo olfatorio. En dicho estudio, inmunotñeron el tejido para la localización de TH y SNCA, y para la observación de glomérulos olfativos, pudiendo concluir que los pacientes con PD tienen menor volumen glomerular total respecto a los sanos, quedando en duda si esto es debido a la disminución del tamaño de los glomérulos o del número de los mismos. También observaron que existe una relación inversamente proporcional entre este volumen y la cantidad de SNCA, es decir, que a mayor concentración de esta proteína, el volumen glomerular disminuye.

IV. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que gracias a los avances científicos y tecnológicos, la esperanza de vida humana ha ido en aumento, y con ello, la población geriátrica también ha acrecentado su densidad. Sin embargo, esto también conlleva al incremento de diversas patologías relacionadas con la edad, y que son consideradas problemas de salud pública. Tal es el caso de la enfermedad de Parkinson, cuya incidencia se estima que por diversas causas ambientales, como la contaminación y exposición a tóxicos, y demográficas, se habrá duplicado para el 2030 (Dorsey *et al.*, 2007), por lo que resulta imprescindible tomar medidas de precaución que puedan alertar con premura la posible aparición de ésta y otras enfermedades semejantes.

Los trastornos olfativos son síntomas tempranos de dicha enfermedad, sin embargo, las bases patológicas de tales disfunciones son aún, en gran parte desconocidas, por lo que un modelo hipósmico de esta enfermedad ayudará a la comprensión de dichas bases y su posible aplicación.

Además, la importancia del estudio del olfato y el papel que éste desempeña en las enfermedades neurodegenerativas, cobra especial relevancia debido a cuestiones como el diagnóstico preclínico, asuntos de seguridad y calidad de vida, (v.g., la detección de tóxicos volátiles), una ingesta nutricional inadecuada y la disminución en la habilidad para experimentar placeres asociados social y culturalmente con la comida y el erotismo (Small y Prescott, 2005; Pause, 2012; Masala *et al.*, 2017).

Por otro lado, en el ámbito del conocimiento de estas enfermedades, la contribución que esta información representa para la patogénesis de las mismas, a través de las vías de señalización olfativas en el cerebro, constituye el posible vínculo entre las alteraciones olfativas pre-sintomáticas y distintos marcadores genéticos, además de las similitudes entre sustratos neuroanatómicos y mecanismos patológicos (Mesholam *et al.*, 1998).

En el laboratorio del Dr. Reynaud, se han realizado evaluaciones motoras de la línea de mosca transgénica que expresa *SNCA*, la cual presenta la etiología de un cuadro parkinsoniano. Sin embargo, no se han llevado a cabo análisis olfativos y/o gustativos de

la misma, por lo cual resulta interesante e importante estudiar si la expresión de esta proteína causa afecciones y/o modificaciones en la actividad quimiosensorial de dicha línea, por lo que la caracterización de los efectos sensoriales de la expresión de esta proteína asociada a la enfermedad de Parkinson es de interés en este estudio.

V. HIPÓTESIS

La anosmia e hiposmia son indicadores tempranos de la enfermedad de Parkinson, por tanto la línea transgénica de *D. melanogaster* [TH-GAL4 / UAS-SNCA^{wt}], utilizada como modelo parkinsoniano, puede presentar afecciones y/o alteraciones en la respuesta a estímulos sensoriales olfativos.

VI. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es evaluar afecciones y/o modificaciones en la actividad olfativa en la línea transgénica de *D. melanogaster* que expresa SNCA silvestre (SNCA^{wt}).

En tanto que los objetivos particulares derivados del anterior, son los siguientes:

- Comparar el ensayo de laberinto en Y, respecto a la prueba de laberinto en T, y determinar la prueba etológica más eficiente y adecuada para evaluar la percepción olfativa en *D. melanogaster*.
- Determinar la respuesta olfativa de *D. melanogaster* silvestre (Oregon) adulta en diferentes etapas de envejecimiento mediante la realización de una curva de percepción quimiosensorial.
- Determinar la respuesta olfativa de *D. melanogaster* transgénica (SNCA^{wt}) adulta en diferentes etapas de envejecimiento mediante la realización de una curva de percepción quimiosensorial.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Stocks y cruzas de líneas transgénicas

Los organismos se mantuvieron en condiciones óptimas para su desarrollo, es decir, medio estándar de levadura a 25°C y 80% de humedad, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Las líneas de moscas P [*UAS-SNCA*^{wt}], P [*UAS-GFP; TH-GAL4*], White¹¹¹⁸ (W¹¹¹⁸) y Oregon, fueron obtenidas del banco de moscas de *Drosophila* (<http://flystocks.bio.indiana.edu>) de Bloomington, en la Universidad de Indiana, Estados Unidos.

Las moscas de la línea efectora P[*UAS-SNCA*^{wt}], son aquellas que presentan el gen de α -sinucleína silvestre, a través de la inserción simple de un elemento P, mientras que la línea P[*UAS-GFP;TH-GAL4*] es aquella que presenta la inserción de *GFP* dirigida específicamente a TH, ya que además en esta construcción se encuentra unida a la secuencia *GAL4*, necesaria para la activación de este sistema, por lo que se utilizó como *driver* de la expresión de la proteína de interés. Para la obtención de la población experimental, se realizó la cruce de la línea efectora con el *driver* que tuvo como resultado el genotipo W¹¹¹⁸/+; *UAS-GFP*/+; *TH-GAL4/UAS-SNCA*^{wt}.

Como controles se utilizaron las líneas W¹¹¹⁸ (Fondo genético) y Oregon. También se realizó la cruce del *driver* con W¹¹¹⁸ para obtener organismos heterocigotos comparables con la población experimental y de esta manera utilizarse como control de expresión, para comprobar que los efectos observados en la respuesta olfativa no se debieran a la construcción de la línea experimental.

7.2 Genotipificación

Para garantizar la veracidad genotípica de las moscas experimentales, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Anexo III), para amplificar las secuencias de los genes *GAL4*, *SNCA* y *rp49* (utilizado como control de la expresión génica endógena), lo que permitió hacer PCR punto final para corroborar la presencia de estos genes en las diferentes líneas. Los amplicones resultantes se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

7.3 Prueba olfativa de Laberinto en Y

Una aproximación para conocer la preferencia o en este caso la presencia o ausencia de respuesta olfativa, son las pruebas etológicas, algunas de ellas como los ensayos a utilizar en este estudio, consisten en la medición de la atracción o repulsión de distintas sustancias odorantes.

Para esto, se hicieron experimentos por triplicado en donde 10 machos de 1-5, 25-30 y 40-45 días de post-emergencia pupal, se sometieron a 20 h de ayuno en viales con placas húmedas de algodón en la base para evitar su deshidratación. Posteriormente, se evaluó la respuesta olfativa en un laberinto Y de diseño y ensamble personalizado, el cual consta de tres viales unidos entre sí mediante un conector plástico de dos vías en Y y puntas de pipeta de 1 mL (Figura 14).

En el vial base se colocaron las moscas a evaluar y se conectó al dispositivo mediante una punta de pipeta adaptada de tal manera que el espacio de entrada y salida de los individuos fuese de 1 cm de diámetro. Por otro lado, en uno de los viales de los extremos del laberinto se colocó una sustancia de interés, ya sea un odorante atrayente (3-octanol puro (OCT), levadura, ácido acético al 0.125% y al 10%, etanol al 8%, o ácido láctico al 2%) en papel filtro de 1 cm²; o un odorante repelente, 4-metilciclohexanol (MCH) puro (Fuyama, 1978; Hussain *et al.*, 2018); y en el otro extremo papel filtro de las mismas dimensiones pero únicamente con agua; estos últimos viales se conectaron al dispositivo mediante puntas de pipeta adaptadas de tal forma que la apertura final de las mismas fuese de 2 mm de diámetro, suficiente para que los individuos fueran capaces de llegar a su destino, mas no de regresar una vez efectuada su decisión.

De la misma manera, se llevó a cabo el ensamblaje de los dispositivos control en donde ambos viales únicamente contenían papel filtro con agua. La orientación de los dispositivos se alternó de manera cuidadosa para que todos quedaran siempre en diferente posición.

Las moscas permanecieron 15 h en el laberinto en un cuarto oscuro para evitar efectos fototáxicos, a 25° C y con extractor de aire. Posteriormente, se contabilizó el número de individuos localizados en el extremo con la sustancia de interés, y el número de individuos

en el extremo control. El manejo y anestesia de las moscas, cuando fue necesario, se realizó utilizando hielo, prescindiendo de CO₂ para evitar interferencia en los resultados.

7.4 Prueba olfativa de Laberinto en T

Esta prueba etológica es muy parecida a la prueba de laberinto en Y, y las condiciones óptimas para su realización fueron tomadas de los resultados efectivos de la misma, sin embargo el dispositivo utilizado y las dimensiones varían.

Se realizaron experimentos por triplicado en donde 30 machos de grupos de 1-5, 10-15 y 40-45 días de edad post-emergencia pupal, se sometieron a 18 h de ayuno en viales con placas húmedas de algodón en la base evitando así su deshidratación, para posteriormente evaluar la respuesta olfativa, en un laberinto T de acrílico (Figura 13), el cual consta de dos viales unidos a una cámara intermedia con capacidad de cierre y apertura para impedir el paso de las moscas al inicio y final del experimento.

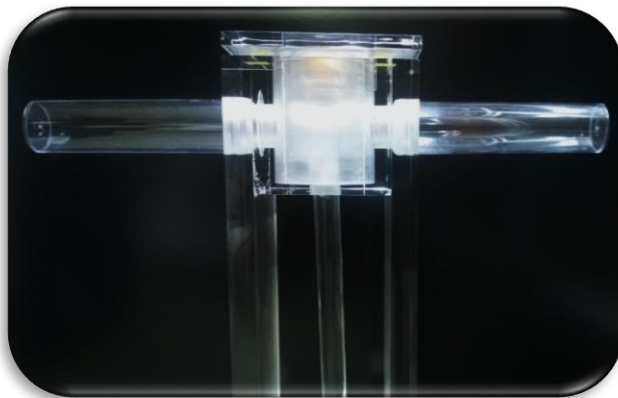


Figura 13.- Laberinto en T utilizado para pruebas olfativas. Fotografía: Estefanía De Allende-Becerra.

En uno de los viales de los extremos del laberinto se colocó 45 μ L de una sustancia de interés, ya sea un odorante atractivo, en este caso de ácido láctico al 2% en papel filtro de 1 cm², o un odorante repelente como MCH; y en el otro extremo papel filtro de las mismas dimensiones pero únicamente con diluyente (agua). De la misma manera se llevó a cabo el ensamblaje de los dispositivos control en donde ambos viales únicamente contenían papel filtro con diluyente. La orientación de los dispositivos se alternó de manera cuidadosa, para que todos quedaran siempre en diferente orientación.

Posterior a las horas de ayuno, las moscas permanecieron 1 h en el laberinto, a 25° C, en un espacio oscuro para evitar efectos fototáxicos. Después, se contabilizó el número de individuos localizados en el extremo con la sustancia de interés, y el número de individuos en el extremo control. Al igual que en el laberinto en Y, el manejo y anestesia de las moscas se realizó en frío, prescindiendo de CO₂.

7.5 Análisis estadístico

El nivel de atracción de los individuos hacia las sustancias evaluadas fue determinado mediante el siguiente Índice de Atracción (IA) propuesto por Fuyama en 1976:

$$IA = (\text{No. de individuos en vial con sustancia de interés} - \text{No. de individuos en vial control}) / n$$

Donde valores de 1 fueron interpretados como “Extrema atracción”, mientras valores de -1 como “Extrema repulsión”.

Mediante el programa estadístico Graphpad Prism 4.0, la media y desviación estándar fueron calculadas para cada tratamiento y los controles.

Se verificó la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks para muestras pequeñas y posteriormente, para la determinación de la significancia estadística entre las medias, se aplicó ANOVA de un factor ($\alpha = 0.05$). La diferencia entre líneas fue calculada utilizando un análisis de comparación múltiple de Fisher para establecer las medias altamente significativas.

VIII. RESULTADOS

8.1 Comprobación de los genotipos

La correcta expresión de los genes *SNCA*, *GAL4* y *rp49*, se corroboró a través de PCRs, realizados a partir de DNA genómico de las diferentes líneas transgénicas y controles. Los amplicones resultantes (Figura 14) mostraron que sí se trabajó con las líneas deseadas, y el control negativo comprobó la ausencia de amplificaciones inespecíficas de los oligonucleótidos utilizados.

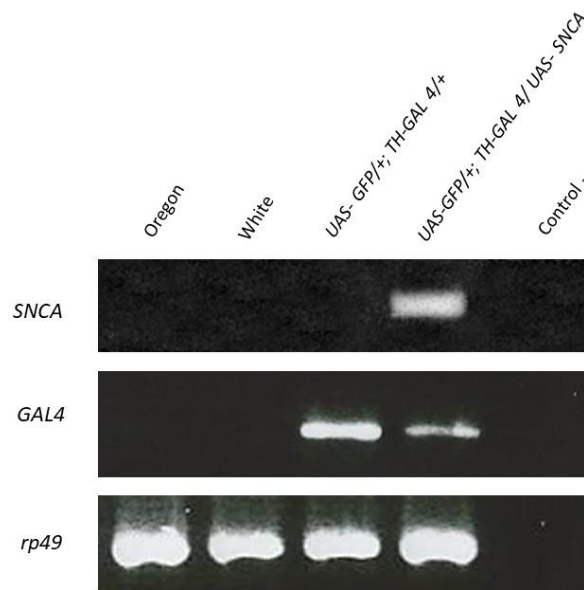


Figura 14.- Genotipificación. Productos de PCR obtenidos de las distintas líneas de moscas, visualizados mediante electroforesis en gels de agarosa al 2%.

8.2 Prueba olfativa de Laberintos en Y

Para cumplir los objetivos del presente estudio, fue necesario evaluar la efectividad del laberinto en Y y establecer las condiciones óptimas para la realización de los ensayos olfativos, lo cual se llevó a cabo a través de prueba y error, y una evaluación escrupulosa de los resultados en las distintas condiciones y sus cambios.

A continuación se muestran las diferentes modificaciones efectuadas que llevaron a la correcta estandarización de los ensayos utilizando laberintos en Y.

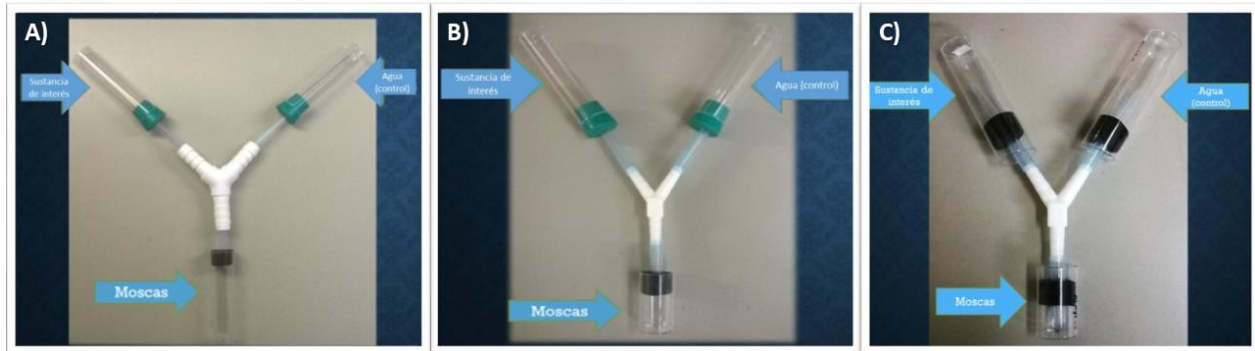


Figura 15.- Prototipos probados de laberintos en Y. A) Primer prototipo. **B)** Segundo prototipo. **C)** Tercer prototipo.

Utilizando el primer prototipo de laberinto en Y (Figura 14A), se efectuaron ensayos de olfato en moscas de las líneas White y Oregon, sometidas a 20 h de ayuno en las condiciones previamente descritas. Ninguna de las dos líneas respondió de la manera esperada según lo reportado, pues no se observó atracción hacia la sustancia atrayente más reportada (OCT), ni la suficiente repulsión hacia el MCH, sobre todo por parte de White, quien ante los tres estímulos respondió con cierta neutralidad (Gráfico 1).

Aunado al índice de atracción no esperado que se observó al evaluar a los grupos control con el primer prototipo de laberinto en Y, se observaron algunas anomalías, tales como el lento o nulo desplazamiento de los individuos, la baja atracción de las moscas hacia el OCT, la muerte de cantidad importante de moscas, entre otras cosas; por lo que se modificaron las dimensiones del dispositivo y ciertas condiciones que se habían establecido, obteniendo así un nuevo prototipo (Figura 14B).

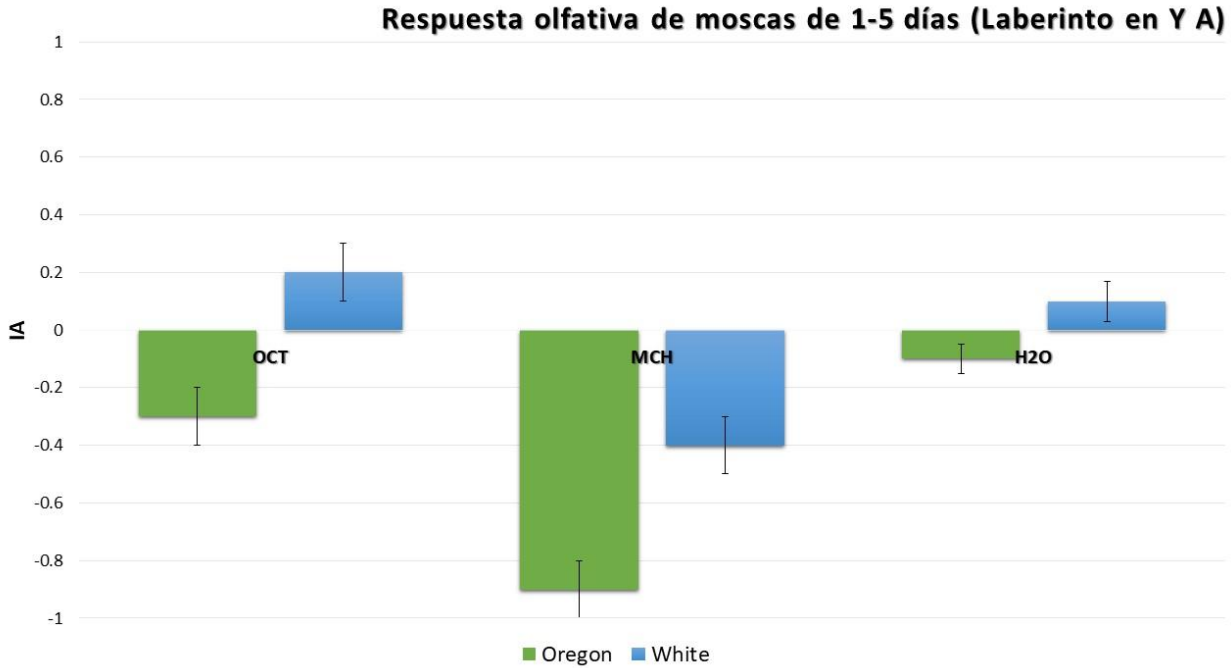


Gráfico 1.- Respuesta olfativa de moscas White y Oregon menores de 5 días post-emergencia pupal, utilizando el primer prototipo (A) de laberinto en Y. IA: índice de atracción, OCT: 3-Octanol, MCH: 4-metil-ciclohexanol.

Con el fin de probar este nuevo prototipo y también el de tener una aproximación para comparar, en medida de lo posible, los cambios en la respuesta olfativa que pudiesen existir en las líneas control conforme los organismos envejecen, se llevó a cabo otra prueba olfativa, de la manera antes descrita pero con ligeras modificaciones. Inicialmente el tamaño de los tres viales era el mismo, pero en este nuevo prototipo se modificó el vial inicial por uno de menor tamaño para que, debido al poco espacio para explorar, las moscas se vieran obligadas a entrar más pronto en el conector en Y y de esta manera optar por alguna de las sustancias odorantes.

Por otro lado, las horas de ayuno se redujeron a 18 h esperando así un menor agotamiento físico de los individuos. También se cambiaron los conectores de dos vías por conectores de menor tamaño, haciendo más fácil el acceso de los individuos a través de los mismos y facilitando el flujo odorante. El tiempo de los individuos en el laberinto se incrementó a 20 h.

Utilizando este segundo prototipo, los datos obtenidos no resultaron del todo satisfactorios (Gráfico 2), pues a pesar del envejecimiento, se esperaba un alto IA hacia el OCT, contrario a esto, se registró en Oregon una respuesta de repulsión comparable a la obtenida hacia MCH, mientras que la respuesta de White continuó dentro de la neutralidad. Razón por la cual nuevamente se modificó el laberinto y las condiciones en las que se llevaron a cabo los ensayos para generar un tercer prototipo (Figura 14C).

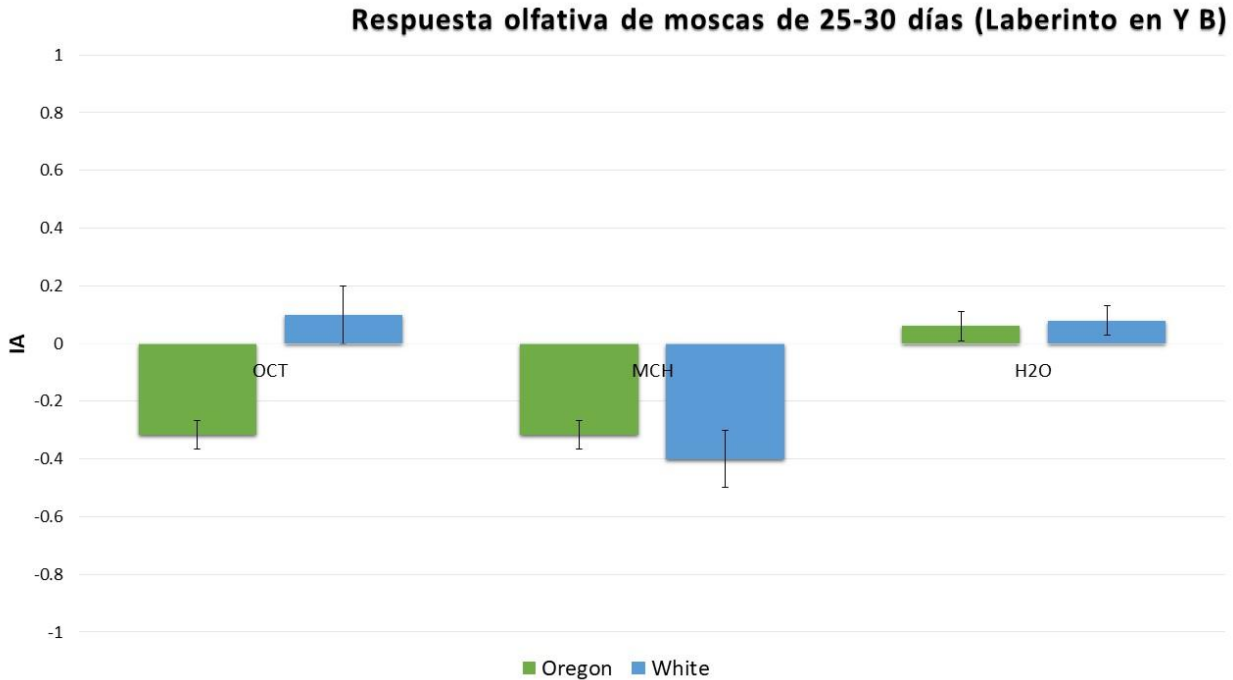


Gráfico 2.- Respuesta olfativa de moscas Oregon y White de 25-30 días post-emergencia pupal, utilizando el segundo prototipo (B) de laberinto en Y. IA: índice de atracción, OCT: 3-Octanol, MCH: 4-metil-ciclohexanol.

Este nuevo prototipo fue probado utilizando machos Oregon de 40-45 días de edad, consta de los mismos elementos que el prototipo anterior, sin embargo, el volumen de los odorantes se vio modificado, siendo administrado esta vez ya no por sumersión, sino directamente 45 µL de OCT, MCH o agua, según fue el caso, en 1 cm² de papel filtro. Además los ensayos no se llevaron a cabo en un cuarto oscuro sino en una caja oscura de 55 cm x 37 cm x 29 cm, previamente lavada y ventilada. La distancia entre los viales y el conector en Y se disminuyó y los organismos se mantuvieron en los laberintos durante 24 h.

Los datos obtenidos con este tercer prototipo no fueron satisfactorios pero si benéficos para la investigación, pues en algunos casos se observó la defunción de un gran número de individuos incluso durante el tiempo de ayuno, lo que da indicio para pensar que el tiempo de ayuno utilizado (18 h) quizás es excesivo para organismos de mayor edad y que es necesario reducirlo una vez más para todos los casos. Con este último prototipo también se probaron distintas sustancias atrayentes para determinar cuál de ellas funcionaba mejor para este tipo de pruebas. El ácido láctico al 2% resultó ser la sustancia más atrayente y se comprobó la alta repulsión de los organismos hacia el MCH (Gráfico 3).

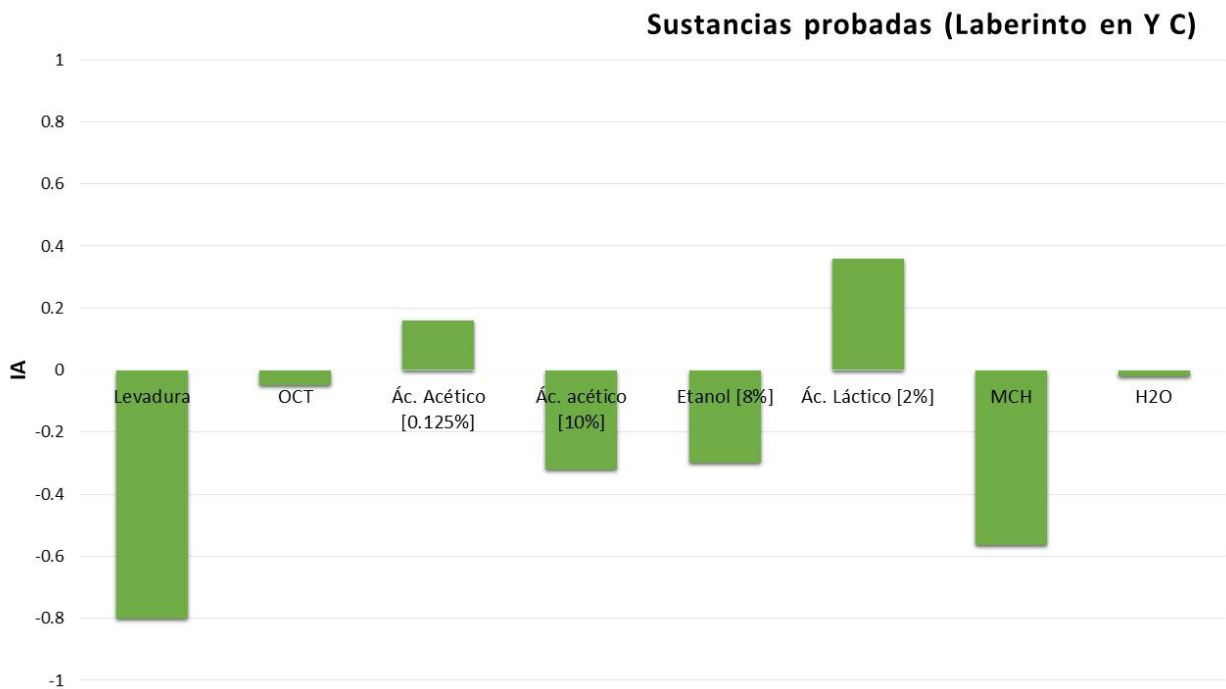


Gráfico 3.- Sustancias probadas como odorantes, utilizando moscas Oregon de diversas edades post emergencia pupal, utilizando el tercer prototipo (C) de laberinto en Y. IA: Índice de atracción, OCT: 3-Octanol, Ác. Acético: ácido acético, Ác. Láctico: ácido láctico, MCH: 4-metil-ciclohexanol.

8.3 Prueba olfativa en Laberinto en T

Una vez establecidas las condiciones adecuadas para las pruebas olfativas, se procedió a evaluar la respuesta de *D. melanogaster*, utilizando esta vez el Laberinto en T, determinando así, el IA de las líneas control y de la línea transgénica que expresa *SNCA^{wt}*.

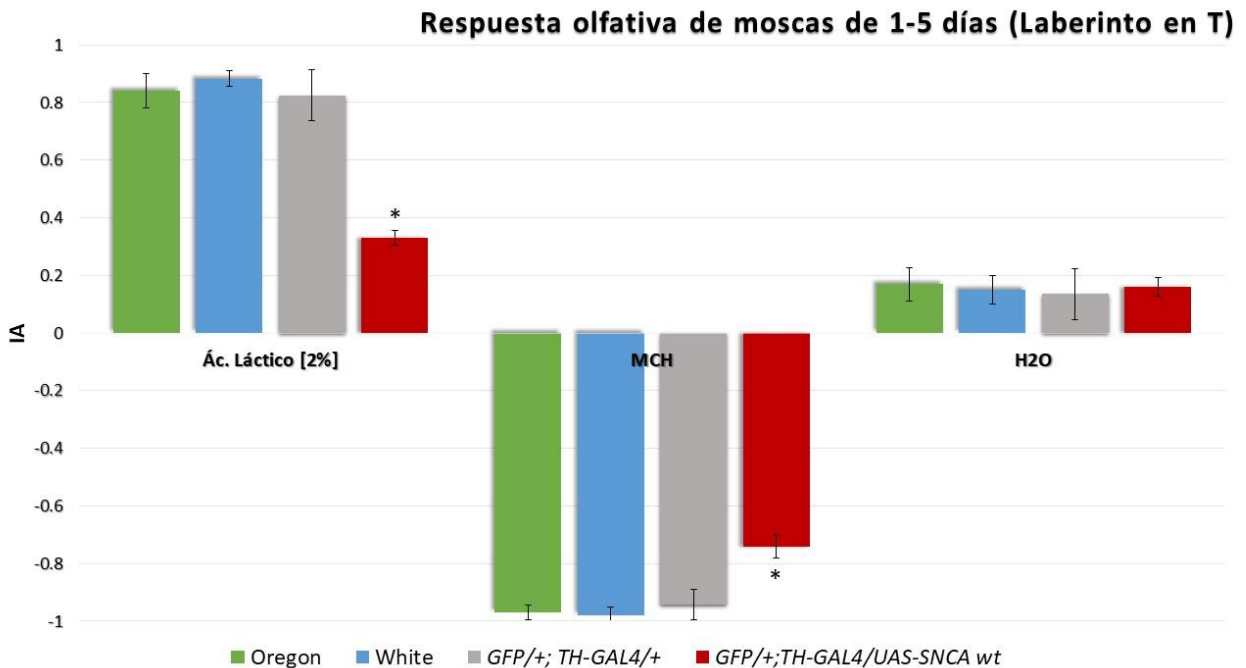


Gráfico 4.- Respuesta olfativa en laberinto en T de moscas control y aquellas con *SNCA^{wt}*, menores de 5 días post-emergencia pupal. IA: índice de atracción, MCH: 4-metilciclohexanol. *Diferencia significativa ($P < 0.05$ en ANOVA de un factor y comparación múltiple de LSD).

De esta manera, se observó que estas últimas moscas, presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a su fondo genético (*White*), a *GFP/+; TH/+*, y a *Oregon*, en las diferentes etapas de envejecimiento evaluadas. Es decir, este modelo parkinsoniano presenta alteraciones olfatorias desde etapas muy tempranas (Gráfico 4) y juveniles (Gráfico 5), hasta etapas del envejecimiento tardío (Gráfico 6).

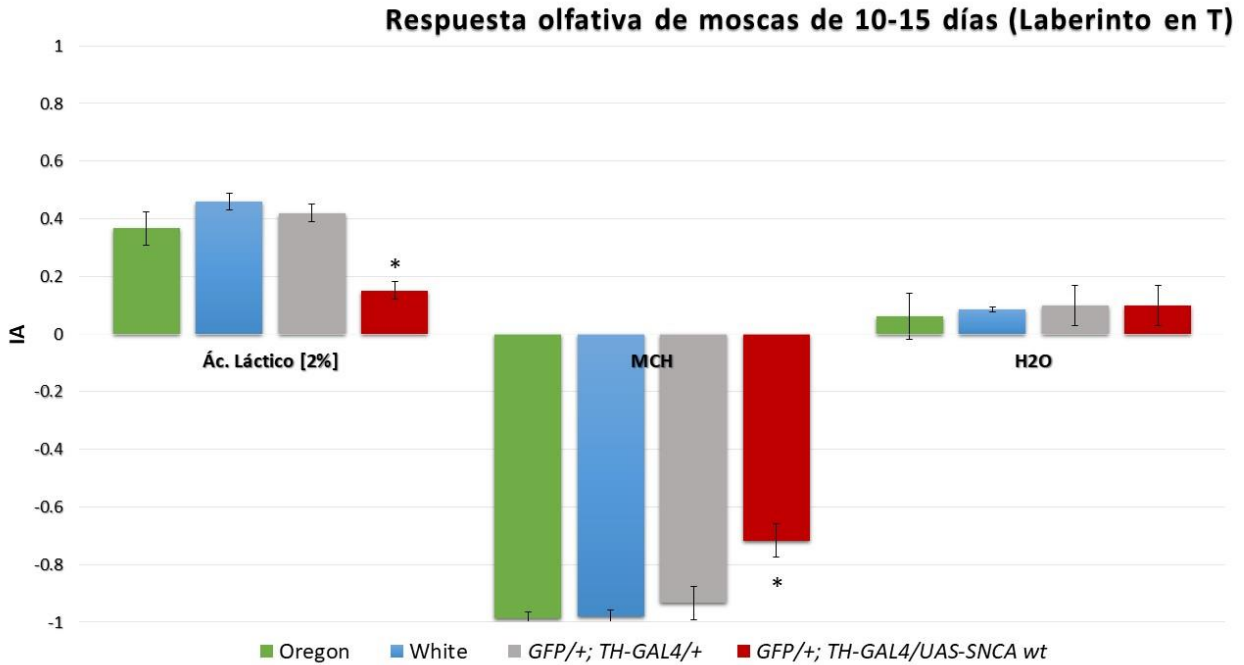


Gráfico 5.- Respuesta olfativa en laberinto en T de moscas control y aquellas con *SNCA^{wt}*, de 10-15 días post-emergencia pupal. IA: índice de atracción, MCH: 4-metilciclohexanol. *Diferencia significativa ($P < 0.05$ en ANOVA de un factor y comparación múltiple de LSD).

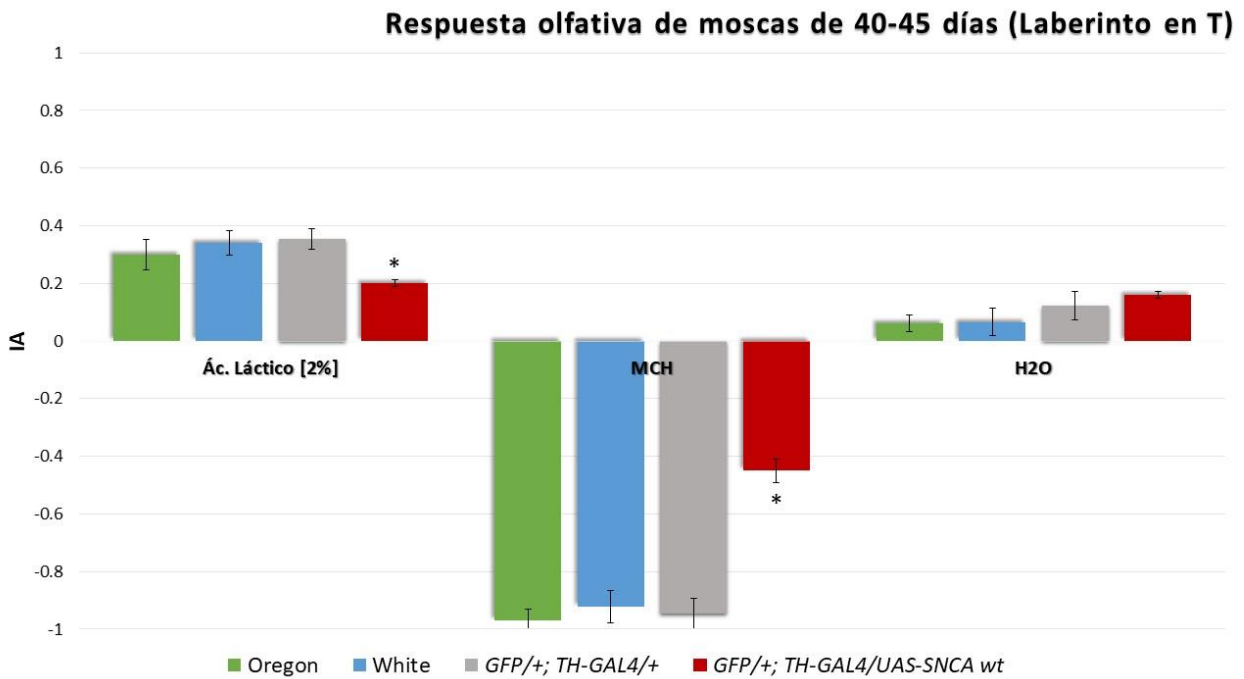


Gráfico 6.- Respuesta olfativa en laberinto en T de moscas control y aquellas con *SNCA^{wt}* de 40-45 días post-emergencia pupal. IA: índice de atracción, MCH: 4-metilciclohexanol. *Diferencia significativa ($P < 0.05$ en ANOVA de un factor y comparación múltiple de LSD).

Al parecer el efecto del atrayente es menos intenso que el de la sustancia repelente (MCH), por lo tanto, al comparar las moscas menores de cinco días post-emergencia pupal (Gráfico 4), con las moscas más viejas (Gráfico 5), se aprecia que la edad no llega a afectar totalmente la respuesta hacia el repelente. Esta diferencia entre sustancias podría confirmar el diagnóstico de hiposmia observado para el modelo parkinsoniano, y dar indicio para descartar la anosmia, ya que las moscas evaluadas no pierden del todo la capacidad olfativa.

Por otro lado, también se aprecia el decaimiento de la respuesta olfativa en las moscas sanas conforme pasa el tiempo, especialmente al evaluar el ácido láctico como sustancia atrayente (Gráfico 7), ya que este cambio no es tan evidente en la evaluación ante el repelente (Gráfico 8). La curva de percepción olfativa en respuesta al agua, únicamente se realizó con fines de control de los experimentos (Gráfico 9).

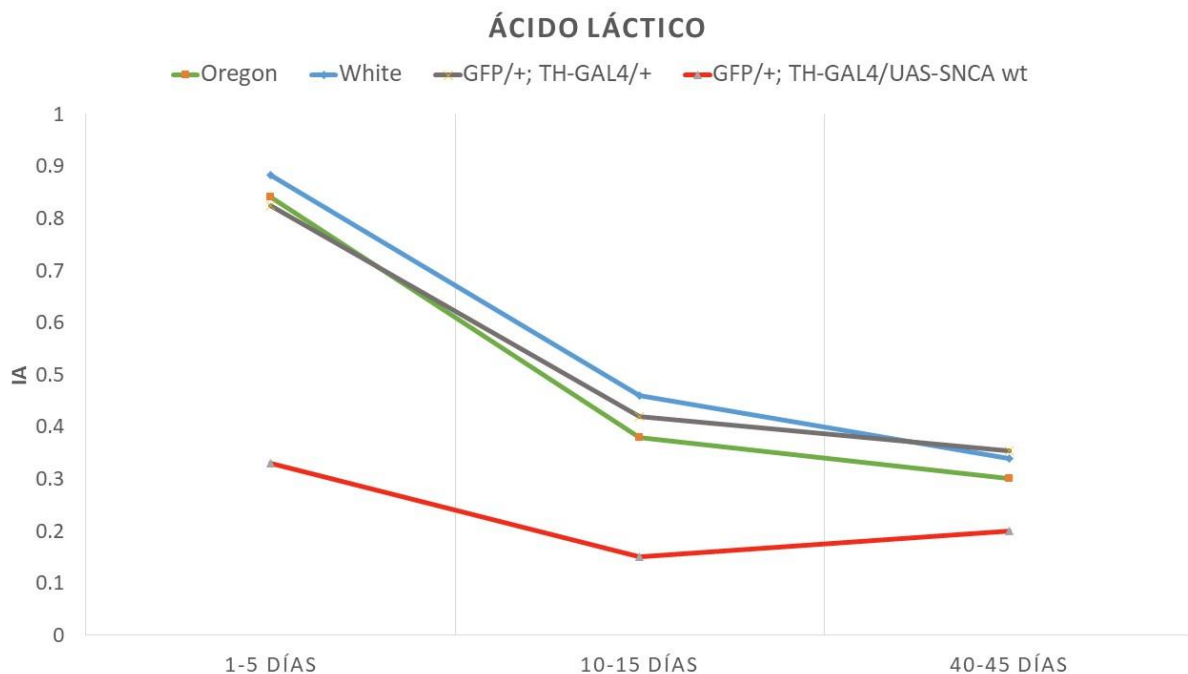


Gráfico 7.- Curva de percepción olfativa ante ácido láctico [2%] de moscas control y experimentales (*GFP/+; TH-GAL4/UAS-SNCA^{wt}*), en distintas etapas de envejecimiento. IA: índice de atracción.

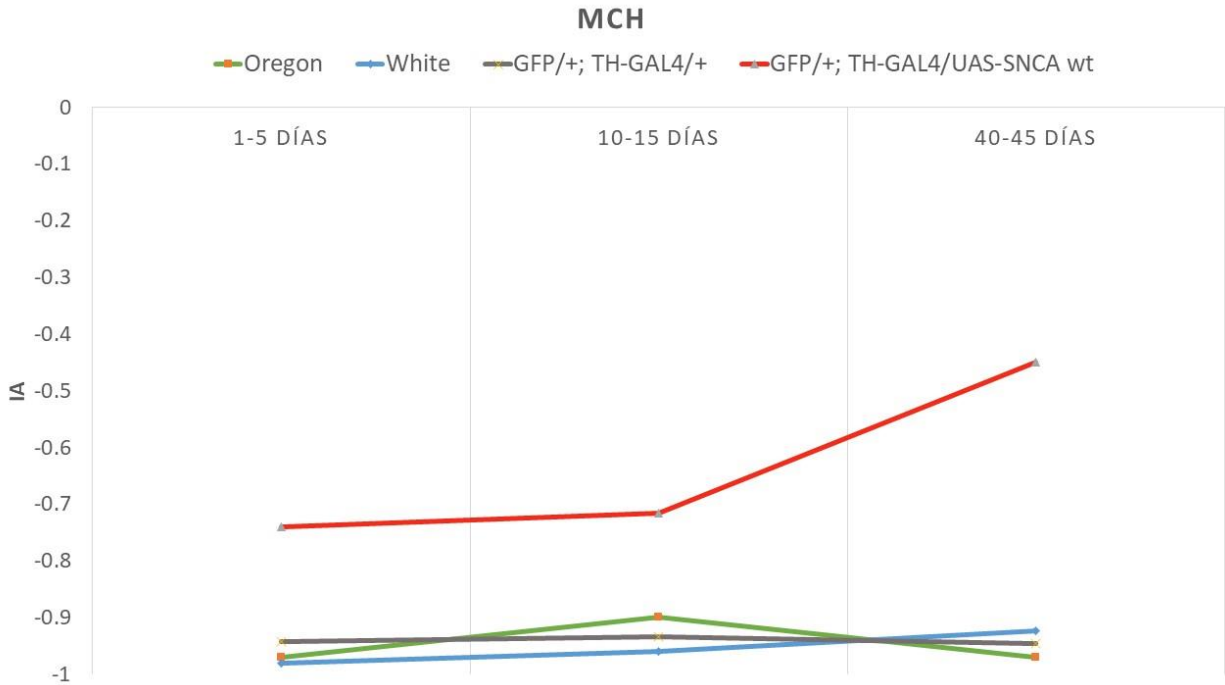


Gráfico 8.- Curva de percepción olfativa ante 4-Metil-ciclohexanol puro (MCH) de moscas control y experimentales (*GFP/+; TH-GAL4/UAS-SNCA^{wt}*), en distintas etapas de envejecimiento. IA: índice de atracción.

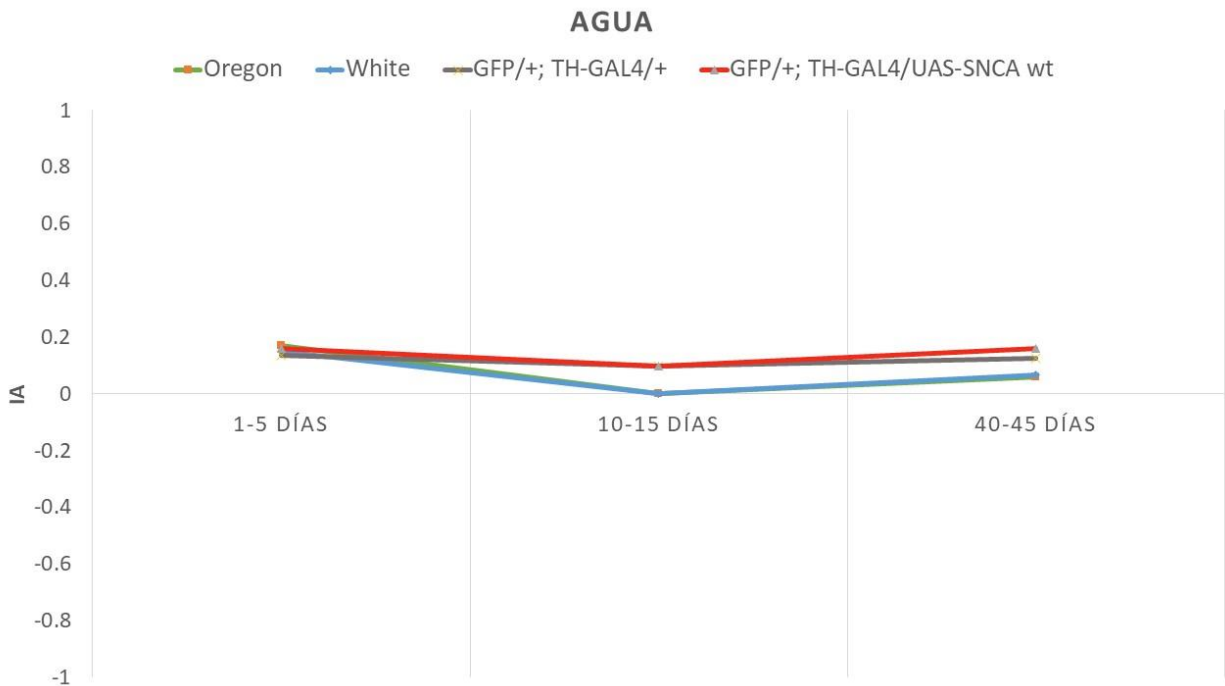


Gráfico 9.- Curva de percepción olfativa ante agua, utilizada como sustancia neutra, de moscas control y experimentales (*GFP/+; TH-GAL4/UAS-SNCA^{wt}*), en distintas etapas de envejecimiento. IA: índice de atracción.

IX. DISCUSIÓN

9.1 Prueba olfativa de laberinto en Y

En la literatura se tienen reportados distintos tipos de dispositivos para medir la respuesta olfativa en *D. melanogaster*, desde electroantenogramas hasta múltiples tipos de laberintos T (Alcorta, 1991; Suh *et al.*, 2007), y aunque los laberintos en Y también se han empleado en distintos experimentos olfativos, son menos comunes y algunos de ellos presentan desventajas que podrían alterar los datos de interés.

El diseño de los prototipos evaluados en este estudio, se basó en un esquema previo planteado por Simonnet *et al.* (2014), sin embargo se le realizaron modificaciones y fue planeado de tal manera que se pudieran evitar sesgos en los resultados a obtener, y se adaptara al tipo de estudio programado en la presente investigación. Una de las primeras ventajas de los prototipos diseñados con respecto a otros, es la apertura de las vías de salida a los viales con sustancia odorante, ya que dichas aperturas están diseñadas para permitir el paso de los organismos mas no su retorno, facilitando así la recopilación de los datos. Esta misma estructura también tiene otras funciones, pues al ser pequeña la apertura, reduce la difusión de los odorantes a lo largo del laberinto, limitándola a la zona de elección de los organismos.

En otros estudios como el planteado por Tully y Quinn (1985), para probar el condicionamiento clásico en *D. melanogaster*, se emplean laberintos T en donde uno de los extremos contiene una sustancia atractiva y el extremo contrario una repelente; en su caso, para evitar la difusión excesiva de los odorantes y no causar confusión en los organismos, se utilizó un sistema de flujo aerodinámico mediante entradas de aire en los extremos y salida del mismo en la parte central; en el caso del presente estudio, se consideró que el flujo podría interferir en los resultados, así como el uso de bombas reguladoras podría estresar a los organismos, no obstante, para evitar la difusión excesiva de sustancia se empleó la ya mencionada estrecha apertura solamente al final de los ductos de salida de las moscas y se decidió evaluar las sustancias odorantes por separado, teniendo así, mayor control y evitando sesgos en la información a obtener.

Una desventaja de los laberintos en Y respecto a otros dispositivos, es que en ciertos laberintos tipo T el tiempo de exposición que se requiere para que los organismos hagan su elección es de minutos, mientras que en este laberinto se requieren varias horas, sin embargo esto mismo puede representar una ventaja para ciertos ensayos, pues la decisión en un laberinto de este tipo es mayormente “reflexiva” y no un reflejo espontáneo, o simplemente una entrada aleatoria (Simonnet *et al.*, 2014), y es un tiempo considerablemente razonable en comparación con otros laberintos como el empleado por Chambers *et al.* (2013), en donde es necesario un tiempo de exposición de 60 a 85 h dependiendo del sexo.

Otra modificación que representa una ventaja para este estudio, es el acortamiento del vial inicial, es decir que las moscas inicien el trayecto a través del laberinto desde un vial más pequeño, forzándolas a explorar el conector y exponerse al aroma de las sustancias para efectuar su decisión.

Por otro lado, el tiempo de ayuno que se tiene reportado para ensayos quimiosensoriales va de 16 a 20 h (Schwaerzel *et al.*, 2003; Sellier *et al.*, 2011; Simonnet *et al.*, 2014), dado que durante periodos de déficit de energía, muchas especies animales, dentro de las cuales *D. melanogaster* no es la excepción, se vuelven menos selectivas para escoger y buscar su alimento, debido a que hay un incremento en la sensibilidad hacia fuentes nutricionales (Inagaki *et al.*, 2014). Lo anterior, tiene como consecuencia una respuesta más rápida al momento de realizar los ensayos de comportamiento, pues los organismos capaces de detectar las sustancias odorantes, relacionarán la sustancia atractiva con una posible fuente de alimento.

El tiempo de ayuno utilizado en estos ensayos, puede resultar eficiente dependiendo de los objetivos que se quieran lograr, pero es necesario tomar en cuenta las particularidades de cada estudio, pues de la misma manera se han reportado casos en los que los ensayos se pueden efectuar aún sin privación nutricional, como el realizado por Hussain *et al.*, (2016). De hecho, Inagaki *et al.* en su estudio sobre la neuromodulación durante períodos de ayuno, realizado en 2014, afirman que cambios de estado internos tales como emociones, excitación, ayuno o cambios en sueño, afectan decisiones etológicas en animales. En el presente estudio, gracias a los resultados

obtenidos mediante la estandarización de este ensayo olfativo, se definió que es mejor un tiempo menor de privación nutricional respecto a los reportados en su mayoría, pues los organismos se requieren sensibles y perceptivos quimiosensorialmente, más no débiles debido al déficit de energía.

Otro punto importante que debe tomarse en cuenta, es la edad de los organismos, pues los estudios reportados con anterioridad en este sentido, utilizaban organismos jóvenes (3 a 10 días post-emergencia pupal), sin embargo al utilizar en este estudio organismos con intervalos de edad variable, el tiempo de ayuno que ellos utilizan no resulta conveniente en este caso, siendo mejor ayunos de 10 h y 18 h para pruebas en laberinto en Y y en laberinto en T, respectivamente.

Por otro lado, con base en los resultados obtenidos en este estudio, la sustancia atrayente probada (OCT), aparenta ser repelente en los tres prototipos, obteniendo incluso el mismo índice de atracción que MCH; así mismo, al utilizar el prototipo 2 se observa que la repulsión hacia este último compuesto se ve disminuida respecto a lo obtenido con el prototipo 1, y aunque los datos no son del todo comparables dado que las condiciones fueron distintas, esta disminución podría verse explicada también, posiblemente por el envejecimiento de los individuos.

Los datos necesitan ser corroborados mediante la realización de más ensayos en los distintos tiempos, bajo las mismas condiciones, sin embargo, hasta el momento los datos confirman que la línea Oregon, la cual puede ser considerada como una de las líneas más silvestres, es un buen control y un parámetro de comparación para analizar el cambio en la percepción olfativa respecto a otras líneas.

Si el uso de estos laberintos en Y quisiera retomarse por cuestiones de productividad, sería necesario implementar nuevos cambios para que éstos funcionen de manera adecuada, tales como la disminución a 10 h de ayuno y la experimentación con otro tipo de odorantes atrayentes más potentes y de otra naturaleza (v.g., feromonas), sin embargo, por disponibilidad de tiempo, se optó por emplear el siguiente dispositivo disponible, es decir, el laberinto en T, y aplicar en él lo aprendido con los resultados obtenidos de esta sección experimental.

9.2 Respuesta olfativa de *Drosophila melanogaster silvestre*

Al evaluar a las moscas control en diferentes etapas del envejecimiento, se aprecian las esperadas respuestas atrayentes y aversivas, observándose las máximas respuestas olfativas en los estadios más tempranos (1-5 días), mientras que en los tiempos posteriores se puede apreciar un decaimiento natural de esta respuesta, lo cual corrobora lo sospechado en las pruebas realizadas con los laberintos en Y, y coincide con lo reportado por Nazar y Pardo (2011), quienes afirman que la hiposmia es un fenómeno común en individuos de mayor edad y un proceso normal del envejecimiento, incluso al encontrarse sanos. La causa de esta disfunción es desconocida; sin embargo, en humanos se asocia a una serie de factores, como alteraciones anatómicas y fisiológicas del epitelio y bulbo olfatorio, de hecho, Godoy *et al.*, mencionaron en 2015 que la invasión del tejido respiratorio en el epitelio olfatorio aumenta con la edad, es decir, que el 1.25 % de la mucosa nasal que se estima es ocupado por el epitelio olfatorio, llega a ser menor conforme se envejece, ya que el epitelio respiratorio comienza a invadirlo dependiendo de las necesidades del entorno, por lo que se puede asumir que tanto la localización como la estructura del neuroepitelio puede variar entre individuos y a través del tiempo.

Por otro lado, dado que las ORNs son las células neuronales más superficiales en el cuerpo, y por tanto las más expuestas al entorno de manera directa, podrían considerarse como una “ventana hacia el cerebro”, lo cual favorece la acumulación de daños por diversos factores, provocando afecciones a distintos niveles, generando así que el organismo no reaccione de la misma manera en etapas tempranas de vida que en la vejez. Basado en lo anterior, cabe la posibilidad de que en la mosca ocurran procesos semejantes, y que la acumulación de daños hacia, en este caso, el lóbulo antenal a través de las ORNs, con el paso del tiempo debiliten de manera natural la respuesta olfativa.

Por otra parte, al contrastar la respuesta generada ante la sustancia atrayente contra la respuesta ante el repelente, se observa que esta última es más intensa y, aunque también decae ligeramente conforme los organismos envejecen, prácticamente se mantiene constante, a diferencia de la respuesta hacia el atrayente, que decae más abruptamente. Esto podría deberse a la diferencia de concentración entre ambas sustancias, ya que las respuestas olfativas en ciertos casos son dependientes de la cantidad de moléculas de

odorante, por lo que al encontrarse el MCH puro, cabe la posibilidad de que se estén activando mayor cantidad de ORs que en el caso del ácido láctico al 2% (Li, 2015). Por otro lado, sabiendo que en *D. melanogaster* existen dos posibles vías de activación de la transducción olfativa (ionotrópica y metabotrópica) dependientes de la cantidad de odorante presente (Wicher *et al.*, 2008), la constancia en la olfacción hacia el repelente podría deberse no sólo a la activación de un mayor número de ORs, sino también a que altas concentraciones de odorante activan la vía ionotrópica directa, mientras que para la detección de concentraciones bajas es necesaria la activación de la vía ionotrópica, a través de la metabotrópica. Al involucrar entonces una vía indirecta como la necesaria para bajas concentraciones de odorante, se requiere de mayor energía y complejidad, por lo que en moscas de mayor edad, puede resultar un mecanismo más complicado de mantener a diferencia de la vía directa.

9.3 Papel de la SNCA en la respuesta olfativa de *Drosophila melanogaster*

Se sabe que la acumulación de SNCA o el mal plegamiento de la misma debido a mutaciones del gen, son factores relacionados con el desarrollo de PD, sin embargo, aún existen ciertas incógnitas sobre de qué manera influye esta proteína y sus agregados en los síntomas pre-motores.

Este estudio confirma el hecho de que su sobreexpresión tiene una fuerte influencia al menos en uno de estos síntomas pre-motores: el olfato. Se comprueba que la sola sobreexpresión de SNCA silvestre es suficiente para desencadenar síntomas de la enfermedad de Parkinson, pues aún sin la expresión de las posibles mutaciones de este gen (*A53T*, *A30P*, etc.) se presentan alteraciones quimiosensoriales. En el modelo de *D. melanogaster* que la expresa y que fue utilizado en este estudio, la capacidad olfativa se ve afectada significativamente desde etapas vitales muy tempranas, resultados quimiosensoriales que coinciden con lo que Chambers *et al.*, observaron en 2013, pues al igual que lo observado aquí, se presentaron anomalías olfatorias apenas a los cinco días post-emergencia pupal. Ellos no evaluaron la progresión olfativa a través del tiempo, sin embargo en la curva de percepción quimiosensorial realizada en nuestro estudio, la respuesta olfativa observada en las moscas menores de cinco días, es equivalente

incluso a la respuesta presentada por las líneas sanas en envejecimiento tardío (40-45 días), observándose al igual que en estas últimas, un declive olfativo directamente proporcional a la edad.

Al igual que en las moscas control, se observa una diferencia entre las respuestas generadas frente a los dos odorantes evaluados, siendo predominante la respuesta ante el repelente. Dicha diferencia y el hecho de que la respuesta ante MCH en ningún momento llegó a ser neutral en los tiempos evaluados, indica que el fenómeno que se presenta en este modelo es de tipo hipósmico más no anósmico, pues los organismos no llegan a perder por completo su capacidad olfativa, pudiendo detectar aún en la vejez la sustancia repelente.

El hecho de que en estas líneas transgénicas se registre hiposmia desde etapas tempranas, puede ser explicado con base en el mapa de sinucleopatía descrito por Braak y Braak en 2003, quienes afirman que la aparición de los síntomas, tanto motores como no motores, correlaciona con la distribución de los agregados proteicos de SNCA en el sistema nervioso, es decir, los LBs. Estos mismos autores, dividen esta enfermedad en seis etapas de acuerdo a su progresión y a la distribución de dichos cuerpos, siendo la I y la II las que involucran a los síntomas anteriores al desarrollo del síndrome motor de PD, durante estos estadios hay depósito de SNCA en las neuronas olfatorias y bulbares (en este caso lóbulo-antenas), lo que podría explicar el déficit olfativo en etapas tempranas. Schapira *et al.* (2017) indican que se ha observado acumulación de LBs en bulbo y áreas relacionadas al olfato, sin embargo también mencionan que no se observa pérdida de neuronas dopaminérgicas en los mismos, por lo que se podría descartar esta pérdida como posible explicación.

De acuerdo a lo reportado por Zapiec *et al.* (2017), existen diferencias importantes a nivel glomerular entre pacientes con PD y personas sanas, observándose en los primeros, bulbos olfatorios de forma irregular y casi la mitad de volumen glomerular que en los pacientes sanos. Además estos autores notaron que existe una relación inversamente proporcional entre la cantidad de SNCA y el volumen glomerular. Estos datos podrían ser extrapolados a los resultados obtenidos en la presente investigación, complementando la posible explicación, mencionada con anterioridad, para los déficits en la olfacción

observados en este modelo, pudiendo asumir que muy probablemente la expresión de SNCA esté afectando en este caso los glomérulos olfativos del lóbulo antenal al reducir su volumen, como se reportó ocurre en humanos. Estos datos necesitan ser explorados y corroborados con ensayos histológicos mediante los que se pueda vislumbrar si realmente esto es también lo que está ocurriendo en *D. melanogaster* y si dicha reducción de volumen se debe a un menor número de glomérulos, o a la degeneración y reducción de tamaño de los mismos, integrando subsecuentemente los resultados etológicos actualmente obtenidos para este modelo.

X. CONCLUSIONES

- ✓ La prueba olfativa con laberinto en T es más efectiva para este tipo de estudio respecto a la prueba con laberinto en Y, al menos bajo las condiciones probadas en esta investigación.
- ✓ La prueba olfativa con laberinto en Y puede aún ser mejorada si se encuentra un atrayente más potente, sin embargo las principales mejoras implementadas en los prototipos de este estudio fueron: el acortamiento del vial inicial para una mejor introducción de los organismos al dispositivo, la reducción de las horas de ayuno acopladas a las necesidades fisiológicas de los individuos, y la difusión adecuada de odorantes a través de los diámetros de salida establecidos.
- ✓ El atrayente más efectivo resultó ser el ácido láctico al 2%, mientras que el mejor repelente fue el 4-metil-ciclohexanol.
- ✓ Las moscas sanas (Oregon, White y *GFP/+; TH-GAL4/+*) sufren un decaimiento natural (presbiosmia) de la respuesta olfativa, que es directamente proporcional al tiempo de vida.
- ✓ La línea transgénica de *D. melanogaster* que expresa el gen para α -sinucleína, presenta hiposmia desde etapas muy tempranas y juveniles, hasta etapas de

envejecimiento tardío, lo que concuerda con lo observado en pacientes con enfermedad de Parkinson.

XI. PERSPECTIVAS

Se planea continuar con la investigación iniciada en esta tesis, mediante la realización de distintos experimentos, para complementar los datos obtenidos en el presente estudio, y poder dilucidar los diferentes mecanismos involucrados en la quimiorrecepción natural, y la vinculada a procesos de neurodegeneración, tales como la enfermedad de Parkinson.

Para ello, se podrían realizar técnicas inmunohistoquímicas hacia los centros cerebrales olfativos y analizar, en las diferentes etapas del envejecimiento, algunos aspectos importantes, tales como el número de neuronas dopaminérgicas, el volumen glomerular, la cantidad de SNCA presente, los niveles de agregación de las mismas, entre algunas otras cosas.

Además, la evaluación de la capacidad olfativa de los genotipos de interés, ante otro tipo de odorantes, resulta imprescindible para comprender de manera global la respuesta olfativa y como podría estarse modificando ante la neurodegeneración. Por ejemplo, además de analizar la respuesta ante mayor número de sustancias atrayentes y repelentes relacionadas con la alimentación, podrían evaluarse algunas sustancias relacionadas con procesos de reproducción (v. g. feromonas), y de esta manera valorar qué tipo de respuesta es la que se ve afectada en enfermedades de este tipo, o si es una afección general a este sistema.

Por otro lado, aunque la SNCA es la proteína predominante en los cuerpos de Lewy, no es la única que se encuentra presente, siendo importante también la sinfilina, por lo que podrían evaluarse moscas que presentaran dicha proteína, y otras con la co-expresión. Más adelante, también podrían realizarse el mismo tipo de investigación en moscas que expresen las distintas mutaciones que han sido reportadas para la SNCA.

LITERATURA CITADA

- Adams, M., D.; Celniker, S., E.; Holt, R., A.; Evans, C., A.; Gocayne, J., D.; Amanatides, P. G.; Venter, J., C. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*". *Science*. 287(5461): 2185–2195.
- Alcorta, E.; (1991). "Characterization of the Electroantennogram in *Drosophila melanogaster* and its use for Identifying Olfactory Capture and Transduction Mutants". *Journal of Neurophysiology*. 65 (3): 702:714
- Ascherio, A. y Schwarzschild, M., A. (2016) "The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention", *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd, 15(12): 1257–1272.
- Bahena-Trujillo, R.; Flores, G. y Arias-Montaña, J., A. (2000). "Dopamina : síntesis, liberación y receptores en el Sistema". 11(1): 39–60.
- Ballesteros, S. (1993). "Percepción háptica de objetos y patrones realizados: una revisión". *Psicothema*. 5 (2): 311-321.
- Bellmann, D.; Richardt, A.; Freyberger, R.; Nuwal, N.; Schwärzel, M.; Fiala, A. y Störtkuhl. (2010). "Optogenetically induced olfactory stimulation in *Drosophila* larvae reveals the neuronal basis of odor-aversion behavior." *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 4(27):1-10.
- Braak, H.; Del Tredici, K.; Rüb, U.; de Vos, R., A., I.; Jansen, S., E., N., H. y Braak, E. (2003). "Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson ' s Disease Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson ' s disease", *Neurobiology of Aging*. 4580: 197–211.
- Calderón Alvarez-Tostado, J., L.; Bolaños-Jiménez, R.; Carrillo-Ruiz, J., D. y Rivera-Silva, G. (2010). "Interpretación neuroanatómica de los principales síntomas motores y no-motores de la enfermedad de Parkinson", *Revista Mexicana de Neurociencias*, 11(3): 218–225.
- Cervantes-Arriaga, A.; Rodríguez-Violante, M.; López-Ruiz, M.; Estrada-Bellmann, I.; Zuñiga-Ramírez, C.; Otero-Cerdeira, E.; Camacho-Ordoñez, A.; González-Latapi, P.; Morales-Briceño, H. y Martínez-Ramírez, D. (2013). "Caracterización de la enfermedad de Parkinson en México: estudio ReMePARK ARTÍCULO ORIGINAL", *Gaceta Médica de México*, 149, pp. 497–501.
- Chacón, M., J.; Morales, P., J., M.; Jiménez, A., J., A. (2008). "Patología de la olfacción. Olfatometría. Manejo de los problemas olfativos". *Hospital Virgen de la Salud, Toledo*:1–14.

- Chambers, R., P; Call, G., B.; Meyer, D.; Smith, J.; Techau, J., A.; Pearman, K. y Buhlman, L. (2013). "Nicotine increases lifespan and rescues olfactory and motor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson's disease." *Behavioral Brain Research*. 253: 95-102.
- Chang, D.; Nalls, M., A.; Hallgrímsson, I., B.; Hunkapiller, J.; van der Brug, M.; Cai, F.; International Parkinson's Disease Genomics Consortium; and Me Research Team; Kerchener, G., A.; Ayalon, G.; Bingol, B.; Sheng, M.; Hinds, D.; Behrens, T., W.; Singleton, A., W.; Bhangale, T., R. y Graham, R., R. (2017). "A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci", *Nature Genetics*. Nature Publishing Group: 1-6.
- Chartier-Harlin, M.; Kachergus, J.; Roumier, C.; Mouroux, V.; Douay, X.; Lincoln, S.; Levecque, C. ; Larvor, L.; Andrieux, J. ; Hulihan, M. ; Waucquier, N.; Defebvre, L.; Amouyel, P.; Farrer, M. y Destée, A. (2004). "α-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease." *Lancet*. 364; 1167-1169.
- Corti, O., Lesage, S. y Brice, A. (2011). "What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease". *Physiological Reviews*, 91(4): 1161–1218.
- D'Aniello, B.; Semin, G., R.; Scandurra, A. y Pinelli, C. (2017). "The Vomeronasal organ: A neglected organ". *Frontiers in Neuroanatomy*. 11 (70): 1-3.
- Daubner, S., C.; Le, T. y Wang, S. (2011). "Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis", *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Elsevier Inc., 508(1): 1–12.
- Dauer, W. y Przedborski, S. (2003). "Parkinson's Disease: Mechanisms and Models". *Neuron*. 39: 889-909.
- Delamarre, A. y Meissner, W., G. (2017). "Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease." *La Presse Médicale*. 46 (2): 175-181.
- Dorsey, E., R.; Constantinescu, R.; Thompson, B., A.; Biglan, K., M.; Holloway, R., G.; Kieburtz, K.; Marshall, F., J.; Ravina, B., M.; Schifitto G.; Sideworf, A. y Tanner, C., M. (2007). "Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030". *Neurology*. 68 (5):384-386.
- Doty, R. y Mishra, A. (2001). "Olfaction and his alteration after nasal obstruction, rihinitis and rhinosinusitis". *Laryngoscope*. 111(3):409-23.
- Duffy, J. B. (2002). "GAL4 system indrosophila: A fly geneticist's swiss army knife". *Genesis*. 34(1–2): 1–15.
- Ebisch, S., J., H.; Perrucci, M., G.; Ferretti, A.; Del Gratta, C.; Romani, G., L. y Gallese, V. (2008). "The Sense of Touch: Embodied Simulation in a Visuotactile Mirroing

Mechanism for Observed Animate or Inanimate touch.” *Journal of Cognitive Neuroscience*. 20 (9): 1611-1623.

- Ebbs, M., L. y Amrein, H. (2007). “Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*”. *Pflugers Archive European Journal of Physiology*. 454(5): 735–747.
- Elbaz, A.; Carcaillon, L.; Moisan, F. (2015). “Epidemiology of Parkinson ’ s disease”, *Revue Neurologique*. Elsevier Masson SAS, 172(1):14–26.
- Ellenbroek, B. y Youn, J. (2016). “Rodent models in neuroscience research: is it a rat race?” *Disease Models & Mechanisms*. 9(10): 1079–1087.
- Emamzadeh, F. N. (2016). “Alpha-synuclein structure, functions, and interactions”. *Journal of Research in Medical Sciences*. 21(2).
- Fay, R., R. y Popper, A., N. (2000). “Evolution of hearing in vertebrates: the inner ears and processing.” *Hearing Research*. 149: 1-10.
- French, A., S.; Sellier, M.; Agha, M., A.; Guigue, A.; Chabaud, M.; Reeb, P., D.; Mitra, A.; Grau, Y.; Soustelle, L. y Marion-Poll, F. (2015). “Dual Mechanism for bitter avoidance in *Drosophila*.” *The Journal of Neuroscience*. 35 (9):3990-4004.
- Fuyama, Y. (1976). “Behavior Genetics of Olfactory Responses in *Drosophila*. I. Olfactometry and Strain Differences in *Drosophila melanogaster*.” *Behavior Genetics*. 6 (4): 407-420).
- Godoy, M., D., C., L.; Voegels, R., L.; de Rezende, P., F.; Imamura, R. y Farfel, J., M. (2015). “Olfaction in Neurologic and Neurodegenerative Diseases: A literature review”. *International Archives of Otorhinolaryngology*. 19(2):176-179.
- Goedert, M. (2001). “Alpha-synuclein and neurodegenerative disease”. *Nature rev. Neuroscience*. 2:492-501.
- Gold, G., H. (1999). “Controversial issues in vertebrate olfactory transduction.” *Annual Review of Physiology*. 61:857-871.
- González-Martín-Moro, J.; Hernández-Verdejo, J., L. y Jiménez-Gahete, A., E. (2017). “Curiosidades sobre el sistema visual de los invertebrados.” *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 92 (1): 19-28.
- Grosjean, Y.; Rytz, R.; Farine, J., P.; Abuin, L.; Cortot, J.; Jefferis, G., S., X., E. y Benton, R. (2011). “An olfactory receptor for food-derived odours promotes male courtship in *Drosophila*”. *Nature*. 478:236-240.
- Growdon, M. E.; Schultz, A. P.; Dagley, A. S.; Amariglio, R. E.; Hedden, T.; Rentz, D. M.; Johnson, K., A.; Sperling, R., A.; Albers, M., W. y Marshall, G. A. (2015). “Odor

identification and Alzheimer disease biomarkers in clinically normal elderly.” *Neurology*, 84(21): 2153–2160.

- Grueber, W., B.; Ye, B.; Yang, C., H.; Younger, S.; Borden, K.; Jan, L. Y. y Jan, Y., N. (2007). “Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous system: links with peripheral dendrite morphology.” *Development*. 134(1): 55-64.
- Guidobaldi, F. y Guerenstein, P. (2012). “El sistema olfativo de los insectos”, 46-71 En: Rojas, J., C. y Malo, E., A. (eds.) *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. El Colegio de la Frontera Sur. México. 446 p.
- Guarneros, M.; Hudson, R.; López-Palacios, M. y Drucker-Colín, R. (2015). “Reference values of Olfactory Function for Mexico City inhabitants.” *Archives of Medical Research*. 46 : 84-90.
- Hales, K., G.; Korey, C., A.; Larracuenta, A., M. y Roberts, D., M. (2015). “Genetics on the fly: A primer on the *Drosophila* model system.” *Genetics*. 201 (3): 815:842.
- Held, Jr., L. (2017). “Deep Homology?: Uncanny Similarities of Humans and Flies Uncovered by Evo-Devo.” *Cambridge: Cambridge University Press*.
- Hodara, R.; Norris, E., H.; Giasson, B., I.; Mishizen-Eberz, A., J.; Lynch, D., R.; Lee, V., M. e Ischiropoulos, H. (2004). “Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: Diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation”. *Journal of Biological Chemistry*. 279:47746–47753.
- Hummel, T.; Jahnke, U.; Sommer, U.; Reichmann, H. y Muller, A. (2005). “Olfactory function in patients with idiopathic Parkinson’s disease: effects of deep brain stimulation in the subthalamic nucleus.” *Journal of Neural Transmission*. 112:669-676.
- Hussain, A.; Zhang, M.; Üçpınar, H., K. ; Svensson, T. ; Quillery, E. ; Gompel, N. ; Ignell, R. ; Grunwald-Kadow, I., C. (2016). “Ionotropic chemosensory receptor mediate the taste and smell of polyamines.” *PLoS Biology*. 14 (5): 1-30.
- Inagaki, H., K.; Panse, K. y Anderson, D., J. (2014). “Independent, reciprocal neuromodulatory control of sweet and bitter taste sensitivity during starvation in *Drosophila*.” *Neuron*. 84 (4): 806-820.
- Johnston, D., S. (2002). “The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*”. *Nature Reviews Genetics*. 3:176-188.
- Joseph, R., M. y Carlson, J., R. (2015). “*Drosophila* Chemoreceptors: A Molecular Interface Between the Chemical World and the Brain”, *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd. 31(12):683–695.

- Kain, P. ; Chakraborty, T., S.; Sundaram, S.; Siddiqi, O.; Rodrigues, V. y Hasan, G. (2008). "Reduced Odor Responses from Antennal Neurons of Gq α , Phospholipase C β , and *rdgA* Mutants in *Drosophila* Support a Role for a Phospholipid Intermediate in Insect Olfactory Transduction". *Journal of Neuroscience*. 28(18): 4745–4755.
- Kalueff, A., V.; Gebhardt, M.; Stewart, A., M.; Cachat, J., M; Brimmer, M.; Chawla, J., S.; Craddock, C.; Kyzar, E., J.; Roth, A.; Landsman, S.; Gaikwad, S.; Robinson, K.; Baatrup, E.; Tierney, K.; Shamchuk, A.; Norton, W.; Miller, N.; Nicolson, T.; Braubach, O.; Gilman, C., P.; Pittman, J.; Rosemberg, D., B.; Gerlai, R., Echevarria, D.; Lamb, E.; Neuhauss, S., C., F.; Weng, W.; Bally-Cuif, L.; Schneider, H.; y Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC). (2013). "Towards a comprehensive catalog of Zebrafish behavior 1.0 and beyond". *Zebrafish*. 10 (1).
- Kaufman, T., C. (2017). "A short history and description of *Drosophila melanogaster* classical genetics: Chromosome aberrations, forward genetic screens, and the nature of mutations." *Genetics*. 206 (2): 665-689.
- Kaupp, U., B. (2010). "Olfactory signalling in vertebrates and insects: Differences and commonalities". *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 11(3): 188–200.
- Kuntzman, M., L. y Hall, N., A. (2014). "Sound source localization inspired by the ears of the *Ormia ochracea*." *Applied physics letters*. 105 (3): 033701-4.
- Koprach, J., B.; Kalia, L., V. y Brotchie, J., M. (2017). "Animal models of α -synucleinopathy for Parkinson disease drug development". *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 18(9): 515–529.
- Labbe, D.; Gilbert, F. y Martin, N. (2008). "Impact of olfaction on taste, trigeminal, and texture perceptions." *Chemosensory Perception*. 1:217-226.
- Lazard, D.; Zupko, K.; Poria, Y.; Nef, P.; Lazarovits, J., Horn, S.; Khen, M. y Lancet, D. (1991). "Odorant signal termination by olfactory UDP-glucuronosyl transferase". *Nature* 349:790–93
- Lee, G.; Foss, M.; Goodwin, S., F.; Carlo, T.; Taylor, B., J. y Hall, J., C. (2000). *Journal of Neurobiology*. 43: 404-426.
- Li, H., T. y Liberles, S., D. (2015). "Aversion and attraction through olfaction", *Current Biology*. 25(3):120–129.
- Lotharius, J. y Brundin, P. (2002). "Pathogenesis of parkinson's disease: Dopamine, vesicles and α -synuclein". *Nature Reviews Neuroscience*. 3(12): 932–942.
- Mahmut, M., K. y Stevenson, R., J. (2012). "Olfactory abilities and psychopathy: Higher psychopathy scores are associated with poorer odor discrimination and

identification". *Chemosensory Perception*. 5(3–4): 300–307.

- Vasuki., A., K. M.; Fenn, T., K., A.; Devi, M., N.; Hebzibah, T., D., J.; Jamuna, M. y Sundaram, K., K. (2016). "Fate and Development of human Vomeronasal organs- A microscopic fetal study". *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 10 (3): 8-11.
- Martin, F.; Boto, T.; Gómez-Díaz y Alcorta, E. (2013). "Elements of olfactory reception in adult *Drosophila melanogaster*", *Anatomical Record*, 296(9):1477–1488.
- Martínez-Fernández, R.; Gasca-Salas, C., C.; Sánchez-Ferro, A. y Obeso, J., A. (2016). "Actualización en la enfermedad de Parkinson. Parkinson's disease: A review." *Revista médica clínica Las Condes*. 27 (3): 363-379.
- Masala, C.; Saba, L.; Cecchini, M., P.; Solla, P. y Loy, F. (2017). "Olfactory function and age: a sniffin' sticks extended test study performed in Sardinia." *Chemosensory Perception*. <https://doi.org/10.1007/s12078-017-9233-7>.
- McCann, H., Cartwright, H. y Halliday, G. M. (2016). "Neuropathology of α -synuclein propagation and braak hypothesis", *Movement Disorders*, 31(2): 152–160.
- McIntyre, J., C. ; Davis., E., E. ; Joiner, A. ; Williams, C., L.; Tsai, I.; Jenkins, P., M.; McEwen, D., P.; Zhang, L.; Escobado, J.; Thomas, S.; Szymanska, K.; Johnson, C., A.; Beales, P., L.; Green, E., D.; Mullikin, J., C.; Sabo, A.; Muzny, D., M.; Gibbs, R., A.; Attié-Bitach, T.; Yoder, B., K.; Reed, R., R.; Katsanis, N. y Martens, J., R. (2012). "Gene therapy rescues cilia defects and restores olfactory function in a mammalian ciliopathy model." *Nature Medicine*. 18: 1423-1428.
- Meshulam, R., I.; Moberg, P., J.; Mahr, R., N. y Doty, R., L. (1998). "Olfaction in Neurodegenerative Disease. A meta-analysis of Olfactory Functioning in Alzheimer's and Parkinson's Diseases". *Archives of Neurology*. 55(1): 84-90.
- Miranda, C., M.; Slachevsky, C. y Pérez, J., C. (2006). "Preliminary validation of a smelling test in a sample of Chilean population and its role in the differential diagnosis of Parkinson's disease." *Revista Médica Chile*. 134: 1071-1072.
- Montani, G.; Tonelli, S.; Elsaesser, R. ; Paysan, J. y Tirindelli, R. (2006). "Neuropeptide Y in the olfactory microvillar cells." *European Journal of Neuroscience*. 24(1): 20-24.
- Montes de Oca, R., D. y Montes de Oca, F., E. (2005). "El olfato como problema de salud pública en México. Una propuesta de planteamiento". *Revista Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría*. 38(3):111–114.
- Morrison, E., E., y Constanzo, R., M. (1990). "Morphology of the human olfactory epithelium." *The Journal of Comparative Neurology*. 297: 1-13.

- Nazar, R. y Pardo, J., J. (2011). "Patología nasosinusal benigna en el adulto mayor." *Revista- Hospital Clínico Universidad de Chile*. 22: 20-30.
- Nordin, S.; Almkvist, O. y Berglund, B. (2012). "Is loss in odor sensitivity inevitable to the aging individual? A study of "successfully aged" elderly". *Chemosensory Perception*. 5: 188-196.
- Pacheco, C.; Aguayo, L., G. y Opazo, C. (2012). "An extracellular mechanism that can explain the neurotoxic effects of α -synuclein aggregates in the brain". *Frontiers in Physiology*. 3 (297):1-10.
- Passali, G., C.; Politi, L. ; Crisanti, A. ; Loglisci, M.; Anzivino, R. y Passali, D. (2015). "Tau protein detection in anosmic Alzheimer's disease patient's nasal secretions". *Chemosensory Perception*. 8 (4): 201-206.
- Pause, B., M. (2012). "Processing of Body Odor Signals by the Human Brain." *Chemosensory Perception*. 5(1): 55-63.
- Peng, Y.; Gillis-Smith, S.; Jin, H.; Tränkner, D.; Ryba, N., J., P. y Zuker, C., S. (2015). "Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals." *Nature*. 527: 512-522.
- Perisse, E.; Burke, C.; Huetteroth, W. y Waddell, S. (2013). "Shocking revelations and Saccharin sweetness in the study of *Drosophila* Olfactory memory." *Current Biology*. 23(17): 752-763.
- Pialli, S. y Aravinthan, D., T., S. (2009). "*C. elegans*: a model system for systems neuroscience". *Current Opinion in Neurobiology*. 19 (6): 637-643.
- Pickrell, A., M. y Youle, R., J. (2015). "The roles of PINK1, Parkin, and Mitochondrial feidelity in Parkinson's Disease." *Neuron*. 85: 257-273.
- Plack, C., J. (2014). "The sense of hearing." 2da ed. Nueva York, EUA: Psychology Press.
- Pringsheim, T.; Jette, N.; Frolkis, A. y Steeves, T., D., L. (2014). "The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis". *Movement Disorders*, 29(13): 1583–1590.
- Ramdya, P. y Benton, R. (2010). "Evolving olfactory systems on the fly". *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd. 26(7): 307–316.
- Rizzo, D., C. (2016). "Fundamentals of Anatomy and Physiology." 4ta ed. Boston, EUA: Cengage Learning.
- Roberts, E. (1986). "Alzheimer's disease may begin in the nose and may be caused by Aluminosilicates". *Neurobiology of Aging*. 7(6): 561–567.

- Ronnett, G., V.; Cho, H.; Hester, L., D.; Wood, S., F. y Synder, S., H. (1993). "Odorants differentially enhance phosphoinositide turnover and adenylyl cyclase in olfactory receptor neuronal cultures.", *Journal of Neuroscience*, 13(4): 1751–1758.
- Ronnett, G., V. y Moon, C. (2002). "G Proteins and Olfactory Signal Transduction". *Annual Review of Physiology*, 64(1): 189–222.
- Sargsyan, V.; Negash, G., M.; Lavista, L., S.; Olsson, S., B.; Hansson, B., S. y Wicher, D. (2011). "Phosphorylation via PKC Regulates the Function of the *Drosophila* Odorant Co-Receptor", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 5(5):1–8.
- Sato, K.; Pellegrino, M.; Nakagawa, T.; Nakagawa, T.; Vosshall, L., B. y Touhara, K. (2008). "Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels". *Nature*. 452(7190): 1002–1006.
- Schapira, A., H., V.; Chaudhuri, K., R. y Jenner, P. (2017). "Non-motor features of Parkinson disease". *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group. 18(7): 435–450.
- Schrag, A.; Quinn, N., P.; Irving, R., J.; Oram, S., H.; Boyd, J.; Rutledge, P. y 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". *British Medical Journal*. 321:21–22.
- Schultz, W. (2002). "Getting formal with dopamine and reward". *Neuron*. 36(2): 241–263.
- Schultzhaus, J., N.; Saleem, S.; Iftikhar, H. y Carney, G., E. (2017). "The role of the *Drosophila* lateral horn in olfactory information processing and behavioral response". *Journal of Insect Physiology*. Elsevier Ltd. 98:29–37.
- Schwaerzel, M.; Monastirioti, M.; Scholz, H.; Friggi-Grelin, F.; Birman, S. y Heisenberg, M. (2003). "Dopamine and Octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*." *The Journal of Neuroscience*. 23(33):10495-10502.
- Schwob, J., E.; Jang, W.; Holbrook, E., H.; Lin, B.; Herrick, D., B.; Peterson, J., N. y Coleman, J., H. (2017). "Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium. Taking poetic license." *The Journal of Comparative Neurology. Research in Systems Neuroscience*. 525: 1034-1054.
- Sellier, M., J.; Reeb, P. Marion-Poll, F. (2011). "Consumption of bitter alkaloids in *Drosophila melanogaster* Multiple-Choice test conditions." *Chemical senses*. 36 (4): 323-334.
- Simonnet, M., M.; Berthelot-Grosjean, M. y Grosjean, Y. (2014). "Testing *Drosophila* Olfaction with a Y-maze assay." *Journal of Visualized Experiments*. 88: 1-4

- Singleton, A., B.; Farrer, M.; Johnson, J.; Singleton, A.; Hague, S.; Kachergus, J.; Hulihan, M.; Peuralinna, T.; Dutra, A.; Nussbaum, R.; Lincoln, S.; Crawley, A.; Hanson, M.; Maraganore, D.; Adler, C.; Cookson, M., R.; Muenter, M.; Baptista, M.; Miller, D.; Blancato J.; Hardy, J.; Gwinn-Hardy, K. (2003). "a-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease." *Science*. 302 (5646): 841.
- Small, D., M. y Prescott, J. (2005). "Odor/taste integration and the perception of flavor." *Experimental Brain Research*. 166: 345-357.
- Smith, M., E.; Kane, A., S. y Popper, A., N. (2004). "Noise-induced stress response and hearing loss in goldfish (*Carassius auratus*)." *The Journal of Experimental Biology*. 207: 427-435.
- Suh, G., S., B.; Ben-Tabou de Leon, S.; Tanimoto, H.; Fiala, A.; Benzer, S. y Anderson, D., J. (2007). "Light activation of an innate olfactory avoidance response in *Drosophila*." *Current Biology*. 17: 905-908.
- Tully, T. y Quin, W., G. (1985). "Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*." *Journal of Comparative Physiology*. 157:263-277.
- Villegas, P., N., L.; Chávez, M., A.; Montiel, C., D.; González, H., B. y González-Horta, A. (2014). "Análisis funcional de oligómeros de alfa-sinucleína en la permeabilidad de membranas." *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 48 (4): 437-445.
- Vosshall, L., B. (2000). "Olfaction in *Drosophila*". *Current opinion in neurobiology*. : 498–503.
- Wicher, D.; Schäfer, R.; Bauernfeind, R.; Stensmyr, M., C.; Heller, R.; Heinemann, S., H. y Hansson, B., S. (2008). "*Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide- activated cation channels", *Nature*. 452(7190): 1007–1011.
- Wicher, D. (2015). "*Olfactory signaling in insects*." 1a ed, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 1a ed. Elsevier Inc.
- Wilson, R. I. (2013). "Early Olfactory Processing in *Drosophila*: Mechanisms and Principles". *Annual Review of Neuroscience*. 36(1): 217–241.
- Zapiec, B.; Dieriks, B., V.; Tan, S.; Faull, R., L., M.; Mombaerts, P.; Curtis, M., A. (2017). "A ventral glomerular deficit in Parkinson's disease revealed by whole olfactory bulb reconstruction". *Brain. A Journal of Neurology*. : 1-15.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

<http://flystocks.bio.indiana.edu> (Consultado el día 4 de diciembre de 2017).

ANEXOS

ANEXO I. Genoma de *Drosophila melanogaster*

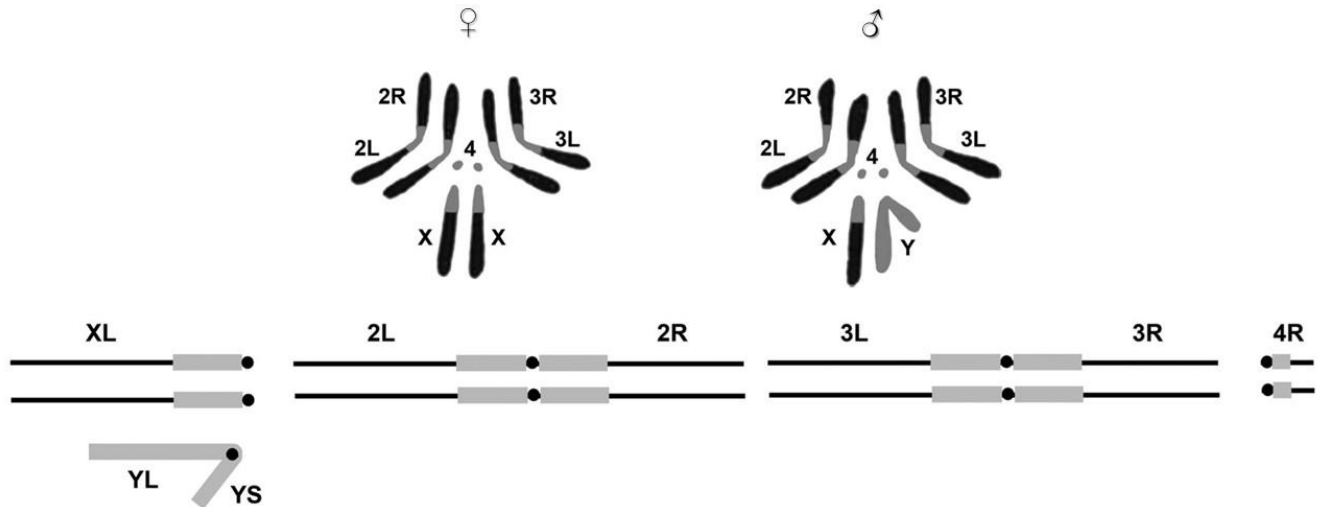


Figura 16.- Cariotipo de *Drosophila melanogaster* y esquematización de su genoma, indicando los brazos de los cromosomas. Las zonas de heterocromatina se muestran en gris. (Tomado de: Kaufman, 2017).

ANEXO II. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

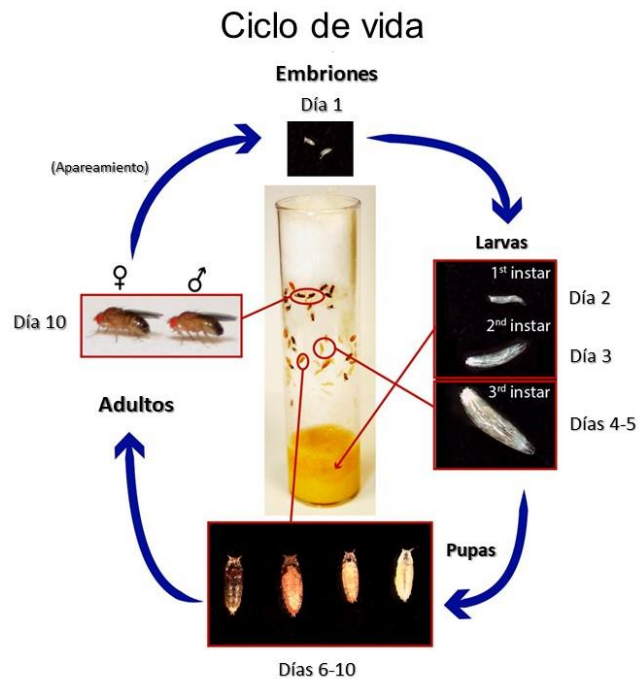


Figura 17.- Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. (Modificado de: Hales et al., 2015).

ANEXO III. Oligonucleótidos utilizados para Genotipificación

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
<i>rp49</i>	5' TCA AGA TGA CCA TCC GCC CA 3'	5' GTT CTC TTG AGA ACG CAG GC 3'
<i>GAL4</i>	5' CGT CAC AGA TAG ATT GGC TTC AGT GG 3'	5' GCG TCG GTG AGT GCA CGA TAG GGC 3'
<i>SNCA</i>	5' TCT CTA TGT AGG CTC CAA AAC 3'	5' TTC GTA GTC TTG ATA CCC TTC 3'

ANEXO IV. Dimensiones de laberinto en T

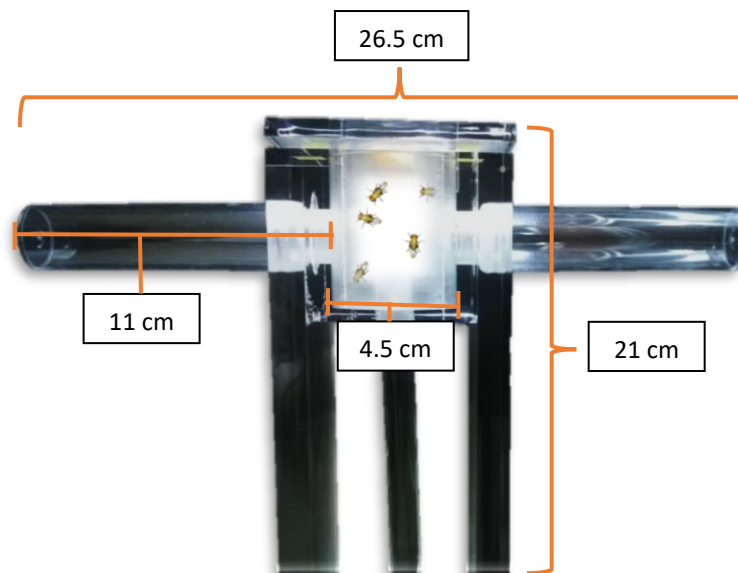


Figura 18.- Dispositivo utilizado para realización de pruebas olfativas en *Drosophila melanogaster*, en donde se muestran las dimensiones correspondientes a cada sección estructural del mismo.