



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PARTICIPACIÓN DEL PROTEASOMA EN ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS UTILIZANDO UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE
PARKINSON EN *Drosophila melanogaster***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. IVAN FERNÁNDEZ CRUZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ENRIQUE A. REYNAUD GARZA

Instituto de Biotecnología, UNAM

COTUTORES:

Dr. JOSE FERNANDO LLEDIAS MARTÍNEZ

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. FATUEL TECUAPETLA

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Abstract

Parkinson's disease is the most common motor neurodegenerative disease worldwide. In the ninety percent of cases its etiology is unknown and it is characterized by the loss of the dopaminergic neurons in the *substantia nigra*. The most common histopathological mark in the remaining neurons is the presence of cytoplasmatic aggregated proteins, mainly conformed by the proteins α -synuclein and ubiquitin.

The ubiquitin proteasome system is the responsible of the degradation of most cytoplasmatic proteins and its dysfunctions has been related with the appearance and progression of Parkinson's disease symptoms. *Post mortem* brain analysis of the sporadic form of Parkinson's disease has revealed a decrease amount of several proteasome subunits, but it remains unknown the contribution or function of each subunits in the dysfunction or progression in Parkinson's disease.

In this work, it was performed a screening in which thirteen proteasome subunits were independently decreased in *Drosophila* nervous system using interference RNA to determine if their decrease can cause neurodegeneration and locomotion defects associated with Parkinson's disease. Prominently, it was identified that the decrease of the Rpt2 proteasome subunit cause a neurodegenerative phenotype in the *Drosophila* eye and that this phenotype is augmented by the human α -sinucleína co-expression.

The directed decrease of Rpt2 in *Drosophila* dopaminergic neurons caused neurodegeneration of particular dopaminergic neuron groups, decrease of survival, hyperactivity and sleep deregulation. These results suggest that the decrease of certain subunits of the proteasome can recapitulate characteristic symptoms of Parkinson's disease in an *in vivo* model.

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es la enfermedad neurodegenerativa motriz más común a nivel mundial. En el 90% de los casos su etiología es desconocida y se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas en la *substancia nigra*. La marca histopatológica más común de las neuronas sobrevivientes en la EP es la presencia de agregados proteicos citoplasmáticos, conformados principalmente por α -sinucleína y ubiquitina.

El sistema ubiquitina-proteasoma (SUP) es el responsable de degradar la mayoría de las proteínas citoplasmáticas y su disfunción se ha relacionado con la aparición y progresión de los síntomas en la EP. El análisis de cerebros *post mortem* de pacientes con la EP esporádica ha revelado que existe una disminución de diversas subunidades del proteasoma, pero no se conoce la contribución o el papel de cada subunidad en la inducción y/o progresión de la EP en un modelo *in vivo*.

En este trabajo se realizó un tamizaje en donde se disminuyeron de manera independiente 13 subunidades del proteasoma 26S en el sistema nervioso de *Drosophila* utilizando RNA de interferencia para determinar si la disminución de alguna subunidad causa neurodegeneración o defectos en la locomoción asociados a la EP. La disminución de la mayoría de las subunidades estudiadas genera neurodegeneración y defectos en la locomoción en *Drosophila*. Destacadamente, se identificó que la disminución de la subunidad Rpt2 del proteasoma causa un fenotipo neurodegenerativo severo en el ojo de *Drosophila* y este fenotipo se aumenta al coexpresar α -sinucleína humana.

La disminución de Rpt2 dirigida solo en las neuronas dopaminérgicas causó neurodegeneración en ciertos grupos de neuronas dopaminérgicas, una disminución en la supervivencia, hiperactividad y desregulación del sueño. Estos resultados sugieren que la disminución de ciertas subunidades del proteasoma 26S es suficiente para inducir síntomas característicos de la EP en un modelo *in vivo*.

Agradecimientos

Le doy gracias al Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza por permitirme realizar mi tesis de doctorado en su laboratorio; por enseñarme, asesorarme y darme consejos en el transcurso de mi estancia. Pero, sobre todo, por su amistad, por confiar en mí y por alentarme en mi desarrollo como científico.

Le doy gracias a mi familia por su apoyo incondicional en todos los momentos y proyectos de mi vida. Le agradezco a mi madre por incentivarme a superarme, a buscar siempre la verdad y la justicia, y por enseñarme con su ejemplo afectivo, que la humildad debe estar siempre presente en cada logro obtenido. Le agradezco a mi padre por enseñarme las lecciones de la tolerancia y el trabajo constante, y por sembrar en mí la fortaleza que se necesita para alcanzar las metas de mi vida.

Le doy gracias a mis amigos y compañeros del laboratorio por sus consejos y asesorías en el transcurso de la elaboración de mi tesis, y por los momentos de alegría que compartimos que hicieron más agradable mi estancia en el laboratorio.

Finalmente, le doy gracias a mis sinodales y miembros del jurado por sus aportaciones en la realización de mi tesis.

Contenido

Abstract	2
Resumen	3
Agradecimientos	4
Lista de abreviaturas	10
Introducción	11
La Enfermedad de Parkinson.....	11
Prevalencia e incidencia	11
Neuropatología.....	12
Causas genéticas	13
Factores de riesgo	15
Síntomas no motrices.....	15
Tratamientos	16
Mecanismos afectados de las enfermedades neurodegenerativas más comunes.....	16
Sistema Ubiquitina-Proteasoma.....	16
Ubiquitina	17
Ubiquitinación	17
Proteasoma	18
Genes del SUP asociados a la EP	20
<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico	20
El ojo de <i>Drosophila</i> para encontrar modificadores genéticos neurodegenerativos	21
Antecedentes	23
Inhibición del proteasoma mediante el uso de fármacos.....	23
Disminución de la expresión de subunidades del proteasoma.....	23
Inhibición del proteasoma en <i>Drosophila melanogaster</i>	25
Modelo de la enfermedad de Parkinson en <i>Drosophila melanogaster</i>	25
Relación entre el SUP y α -sinucleína	26
Justificación	27
Hipótesis.....	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27

Materiales y Métodos	28
Líneas de moscas.....	28
Microscopía de luz.....	28
Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	28
Electroforesis nativa.....	29
Western blot.....	29
Análisis de proteínas ubiquitinadas insolubles	29
Inmunofluorescencia.....	29
qRT-PCR.....	30
Ensayos de locomoción en larvas.....	30
Curvas de supervivencia.....	30
Geotaxis negativa.....	30
Locomoción espontánea	30
Cuantificación de periodos de sueño	31
Locomoción en arena circular	31
Cuantificación de dopamina y serotonina mediante HPLC.....	31
Análisis estadístico	31
Resultados	32
Reducción de distintas subunidades del proteasoma 26S en el sistema visual.....	32
Defectos en la locomoción en larvas causada por la disminución de distintas subunidades del proteasoma	40
Cuantificación de la subunidad Rpt2 y de la ubiquitina al disminuir Rpt2 en adultos de manera panneuronal.	42
Expresión de α -sinucleína y el RNAi contra la subunidad Rpt2 bajo el promotor de la tirosina hidroxilasa.....	45
Curva de supervivencia	45
Colocalización de neuronas dopaminérgicas utilizando el promotor TH y el anticuerpo anti-TH.....	46
Expresión de la GFP en neuronas dopaminérgicas de manera espacio-temporal.....	47
Cuantificación neuronal de grupos dopaminérgicos.....	47
Locomoción inducida mediante ensayos de geotaxis negativa	52
Locomoción espontánea mediante el monitor de actividad: “ <i>Trikinetics</i> ”	54
Análisis de sueño.....	56
Caracterización específica de individuos con la reducción de Rpt2.....	59
Repetición de curva de supervivencia.....	59

Análisis de la locomoción en arena circular	60
Cuantificación dopamina y serotonina.....	60
Cuantificación <i>cnc</i> /Nrf2.....	62
Discusión	63
Reducción de diferentes subunidades del proteasoma 26S en sistema nervioso de <i>Drosophila</i>	63
Disminución de Rpt2 usando el promotor de tirosina hidroxilasa.....	65
Análisis de la supervivencia.....	66
Circuito dopaminérgico y neurodegeneración.....	66
Locomoción inducida	67
Locomoción espontánea	68
Locomoción en arena circular	69
Sueño.....	69
Relación entre hiperactividad y sueño	70
Relación entre dopamina y serotonina	70
Desregulación del proteasoma.....	71
Conclusiones.....	73
Perspectivas.....	74
Financiamiento	75
Agradecimientos	75
Bibliografía.....	75

Índice de Figuras

Figura 1. Neuropatología de la Enfermedad de Parkinson.	11
Figura 2. Población mundial mayor de 65 años.	12
Figura 3. Cuerpo de Lewy.	12
Figura 4. Agregación y dominios de α -sinucleína.	13
Figura 5. Aparición de los síntomas motrices y no motrices de la EP con el tiempo.	15
Figura 6. Proceso de ubiquitinación.	18
Figura 7. Esquema de proteasoma 26S y sus componentes.	19
Figura 8. Sistema Gal4-UAS acoplado a un “enhancer-trap”.	21
Figura 9. Alteración en la expresión de subunidades del proteasoma 26.	24
Figura 10. Estructura del ojo de tipo silvestre.	33
Figura 11. Reducción en el ojo de subunidades α	34
Figura 12. Reducción en el ojo de subunidades β	35
Figura 13. Reducción en el ojo de subunidades regulatorias con actividad ATPasa.	36
Figura 14. Reducción en el ojo de subunidades regulatorias sin actividad ATPasa.	37
Figura 15. Fenotipo tipo “lagaña”.	39
Figura 16. Ensayos de locomoción en larvas de tercer instar.	41
Figura 17. Sistema termosensible Gal4-UAS acoplado con Gal80 ^{ts}	42
Figura 18. Western Blots de cerebros con Rpt2 disminuida.	44
Figura 19. Curva supervivencia en días.	46
Figura 20. Proyección de Imágenes confocales de cerebro de adulto de 1 día de edad.	46
Figura 21. Proyección en z de imágenes obtenidas por microscopía confocal representativa de cerebro de adulto de 8 días de edad.	47
Figura 22. Esquema de la distribución simétrica de los grupos dopaminérgicos analizados en el protocerebro del adulto de Drosophila.	48
Figura 23. Proyecciones en Z de imágenes obtenidas por microscopía confocal de inmunotinciones utilizando anti-TH en protocerebros.	49
Figura 24. Cuantificación del número de neuronas de los grupos dopaminérgicos PPL1.	50
Figura 25. Cuantificación del número de neuronas de los grupos dopaminérgicos PPL2.	50
Figura 26. Cuantificación del número de neuronas de los grupos dopaminérgicos PPM1/2.	51
Figura 27. Cuantificación del número de neuronas de los grupos dopaminérgicos PPM3.	51
Figura 28. Cuantificación del número de neuronas de los grupos dopaminérgicos PAL.	52
Figura 29. Actividad inducida por ensayo de geotaxis negativa.	53
Figura 30. Regresión lineal de la locomoción inducida.	53
Figura 31. Actogramas de actividad espontánea usando el monitor de actividad “TriKinetics”.	54
Figura 32. Actividad espontánea en ciclos de Luz/Oscuridad.	55
Figura 33. Actividad espontánea solo en el periodo de Luz.	55
Figura 34. Actividad espontánea en el periodo de oscuridad.	56
Figura 35. Actogramas de la cantidad de sueño.	57
Figura 36. Sueño en el periodo de luz/oscuridad.	57
Figura 37. Sueño en el periodo de luz.	58
Figura 38. Sueño en el periodo de Oscuridad.	58

Figura 39. Repetición de la curva de supervivencia.	60
Figura 40. Ensayos de locomoción en arena circular.	60
Figura 41. Cuantificación de dopamina y serotonina mediante HPLC.	61
Figura 42. Correlación entre la dopamina y la serotonina.	62
Figura 43. Cuantificación de cnc.....	62

Índice de Tablas

Tabla 1. Genes implicados en la enfermedad de Parkinson familiar.	14
Tabla 2. Genotipo de las líneas de RNAi contra las subunidades del proteasoma.	28
Tabla 3. Penetrancia y expresividad de la morfología externa del ojo.	38
Tabla 4. Viabilidad de Drosophila al disminuir subunidades del proteasoma en todo el sistema nervioso....	41

Lista de abreviaturas

CL	Cuerpos de Lewy
CP	Partícula catalítica
EP	Enfermedad de Parkinson
RNAi	ARN de interferencia
RP	Partícula regulatoria
Rpn	Partícula Regulatoria sin actividad ATPasa
Rpt	Partícula Regulatoria de la familia ATPasa triple A
SNC	Sistema Nervioso Central
SUP	Sistema Ubiquitina-Proteasoma
TH	Tirosina Hidroxilasa
Ub	Ubiquitina

Introducción

La Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común seguida por la enfermedad de Alzheimer, afectando aproximadamente al 2 % de las personas de más de 65 años. Es una enfermedad progresiva y crónica, causada por la degeneración relativamente lenta de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta* (Figura 1). El cuadro clínico motriz que acompaña al diagnóstico de esta enfermedad es: temblores en reposo, rigidez, bradicinesia (movimientos lentos) e inestabilidad postural (Tapia-Núñez y Chaná-Cuevas 2004). Se ha determinado que para que los signos clínicos se hagan evidentes, se requiere de una pérdida superior al 80 % de las neuronas de esta región del cerebro. Tener la enfermedad no representa un factor de mortalidad severo. Sin embargo, la calidad de vida de las personas afectadas y de los familiares que los atienden se encuentra drásticamente disminuida.

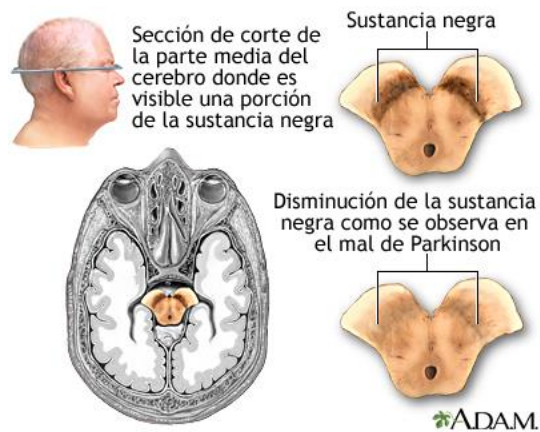


Figura 1. Neuropatología de la Enfermedad de Parkinson. Esquema que muestra la región de la *sustancia nigra* en el cerebro y la pérdida de neuronas dopaminérgicas característica de la EP.

Prevalencia e incidencia

Los reportes de la prevalencia e incidencia para la EP varían debido a la metodología empleada en cada estudio. La prevalencia de la EP incrementa con la edad, afectando al 1 % de personas mayores de 60 años y más del 5 % a personas mayores de 80 años. La EP afecta entre 1.5 y 2 veces más a hombres que a mujeres. La incidencia anual se calcula de 15 por cada 100,000 personas (Tysnes y Storstein 2017). Para el año 2040 se espera que la población mayor de 65 años se duplique (Figura 2), por tanto, se estima que el número de individuos afectados por esta enfermedad se duplique en las siguientes décadas debido al incremento en la expectativa de vida. En México, no existen cifras exactas de las personas afectadas por la EP. En el año 2013 se reportaron más de 500 mil casos. La incidencia de la enfermedad en México está entre 40 a 50 por cada 100,000 habitantes, y esta aumenta a 314 por cada 100,000 en personas mayores de 65 años (Rodríguez-Violante, Velásquez-Pérez, y Cervantes-Arriaga 2019). Lo que representa una de las enfermedades emergentes de mayor riesgo para la población mexicana.

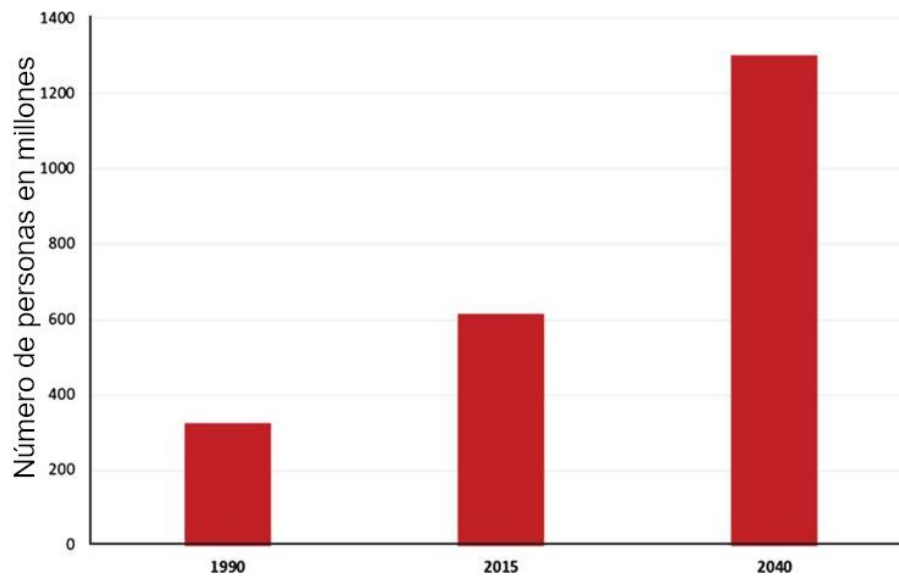


Figura 2. Población mundial mayor de 65 años. Número de personas en millones y la predicción del aumento para el año 2040 (Dorsey et al. 2018)

Neuropatología

El principal síntoma histopatológico de la EP es la presencia de agregados proteicos citoplasmáticos denominados Cuerpos de Lewy (CL) (Figura 3). El principal componente de los CL es la proteína α -sinucleína seguido de diversas proteínas ubiquitinadas. Se han identificado más de 90 componentes presentes en los CL (Wakabayashi et al. 2013). La aparición de los CL en autopsias varían entre 5 y 30 %, y no se limita a las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*, también se pueden formar en tejido nervioso periférico y en diversas regiones del cerebro (Jellinger 2017). En un principio se creía que los CL eran los responsables de la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, cada vez hay más evidencias apuntando a que no son la causa de la muerte neuronal, incluso se han relacionado con una función neuroprotectora que ayuda a contener con las proteínas oxidadas y agregadas que no pueden ser degradadas.

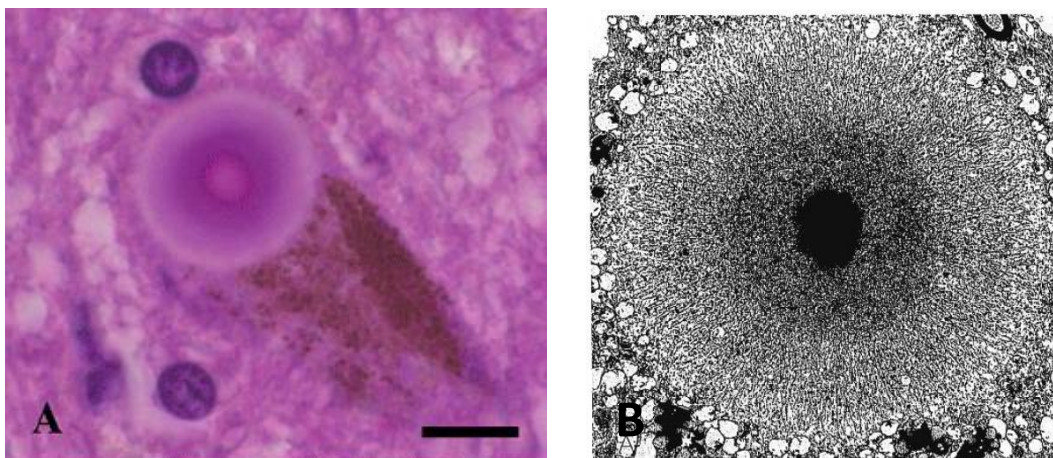


Figura 3. Cuerpo de Lewy. A) Cuerpo de Lewy en neurona dopaminérgica de la *sustancia nigra*, se puede observar la neuromelanina, la cual es la responsable del color oscuro de las neuronas dopaminérgicas. Tinción con hematoxilina y eosina, barra = 10 μ m. (Imagen modificada de: (Wakabayashi et al. 2013) B) Micrografía capturada a través de microscopía electrónica de transmisión que muestra la morfología de un CL, conformado por un núcleo denso y un halo alrededor, donde las fibras de α -sinucleína es su principal componente. Aumento de 6000X, (Forno 1996).

Causas genéticas

Entre el 5 y 10 % de los casos de la EP son causados por herencia genética. El primer gen identificado cuyas mutaciones son causantes de la EP familiar fue el que codifica para la α -sinucleína (SNCA) (Polymeropoulos et al. 1997). Diferentes mutaciones puntuales del gen de SNCA causan formas autosómicas dominantes de la EP, entre las más comunes están: A53T, A30P y E46K. La función de la α -sinucleína no se conoce con exactitud, pero se ha relacionado con la liberación de vesículas en las terminales sinápticas (Ottolini et al. 2017). La α -sinucleína presenta una estructura intrínsecamente desordenada, pero puede formar oligómeros que se han relacionado con su forma tóxica. Además, puede adquirir la conformación de fibrillas amiloides que se han asociado con una conformación neuroprotectora (Figura 4) (Hansen y Li 2012). La fosforilación en la posición S129 y el corte en la región ácida cercana al C-terminal son modificaciones post-traduccionales que puede presentar α -sinucleína favoreciendo su agregación.

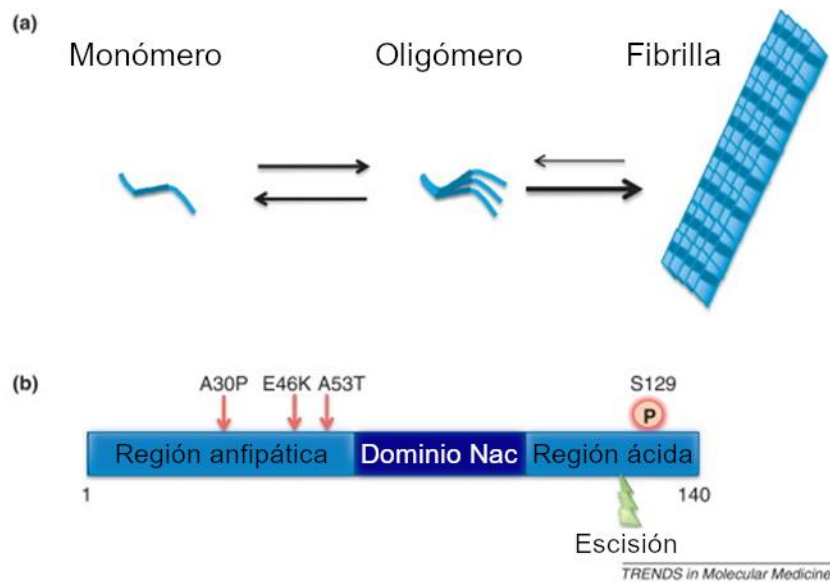


Figura 4. Agregación y dominios de α -sinucleína. A) Diferentes conformaciones que puede adquirir α -sinucleína. Nótese la direccionalidad y grosor de las flechas indicando que puede ser reversible el proceso y que existe una dirección favorable. B) Dominios funcionales de α -sinucleína y localización de las mutaciones puntuales asociadas a las causas autosómicas dominantes de la EP. También se muestra el sitio de fosforilación y el sitio de escisión que favorecen su agregación (Hansen y Li 2012).

Después del descubrimiento de las mutaciones en SNCA, se han identificado diversas formas monogénicas en la enfermedad de Parkinson familiar (Tabla 1). Los genes caracterizados que causan las formas autosómicas dominante son: SNCA, UCHL1, LRRK2, VPS35 y CHCHD2. Los genes responsables de las formas autosómicas recesiva son: Parkin, PINK1, DJ-1, ATP13A2, FBXO7 y PLA2G6. Las variaciones del gen GBA han demostrado ser un fuerte factor de riesgo en la EP (Pang et al. 2019). En la tabla 1 se mencionan algunas de las funciones de estos genes que han aportado información sobre los procesos celulares y moleculares afectados en la EP.

Gen	Nombre	Función
SNCA	α -sinucleína	Regulación de vesículas sinápticas
PINK-1	PTEN-induced kinase 1	Control de calidad mitocondrial
Parkin	Parkin	E3-Ubiquitina Ligasa Control de calidad mitocondrial
DJ-1	DJ-1	Regula flujo de calcio mitocondrial Protección contra el estrés oxidativo
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2	Tráfico vesicular Funciones mitocondriales Regulador de la vía endosómica-lisosomal
UCHL1	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	Des-ubiquitinasa
ATP13A2	ATPase cation transporting 13A2	Transporte de cationes inorgánicos
GBA	Glucocerebrosidasa	Su disfunción causa acumulación de proteínas, entre ellas sinucleína.
VSP35	VPS35 retromer complex component	Clasificación de proteínas vacuolares
CHCHD2	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	Se transloca desde el espacio de intermembrana mitocondrial al núcleo
FBXO7	F-box protein 7	Fosforilación dependiente de ubiquitinación
PLA2G6	phospholipase A2 group VI	Cataliza la liberación de ácidos grasos de fosfolípidos

Tabla 1. Genes implicados en la enfermedad de Parkinson familiar.

Factores de riesgo

El 90 % de los casos de pacientes con la EP es de etiología desconocida. El principal factor de riesgo es el incremento en la edad. De los principales factores de riesgo se han identificado compuestos que causan daños en el proceso de transporte de electrones en la mitocondria como: la exposición crónica a agentes desacoplantes de la mitocondria como el MPTP, pesticidas como la Rotenona; y herbicidas como el Paraquat. Entre los factores de riesgo menores se encuentran: el uso de metanfetaminas, padecer de diabetes tipo 2, lesiones traumáticas cerebrales y padecer cáncer de melanoma. También se han identificado factores que disminuyen el riesgo de desarrollar la enfermedad, entre los más destacados se encuentran: fumar cigarrillos de tabaco de manera crónica, consumo de café, consumo de té verde, compuestos con propiedades antioxidantes y la actividad física (Ascherio y Schwarzschild 2016).

Síntomas no motrices

Dentro de los síntomas no motrices se pueden presentar: estreñimiento, desregulación del sueño, pérdida del olfato, somnolencia excesiva, problemas visoespaciales y depresión. Varios de estos síntomas se pueden presentar varios años antes de que se manifiesten los síntomas motores típicos de la EP (Lorraine V Kalia y Lancet 2015). En las etapas más avanzadas los síntomas se agravan y aparecen diferentes tipos de demencias.

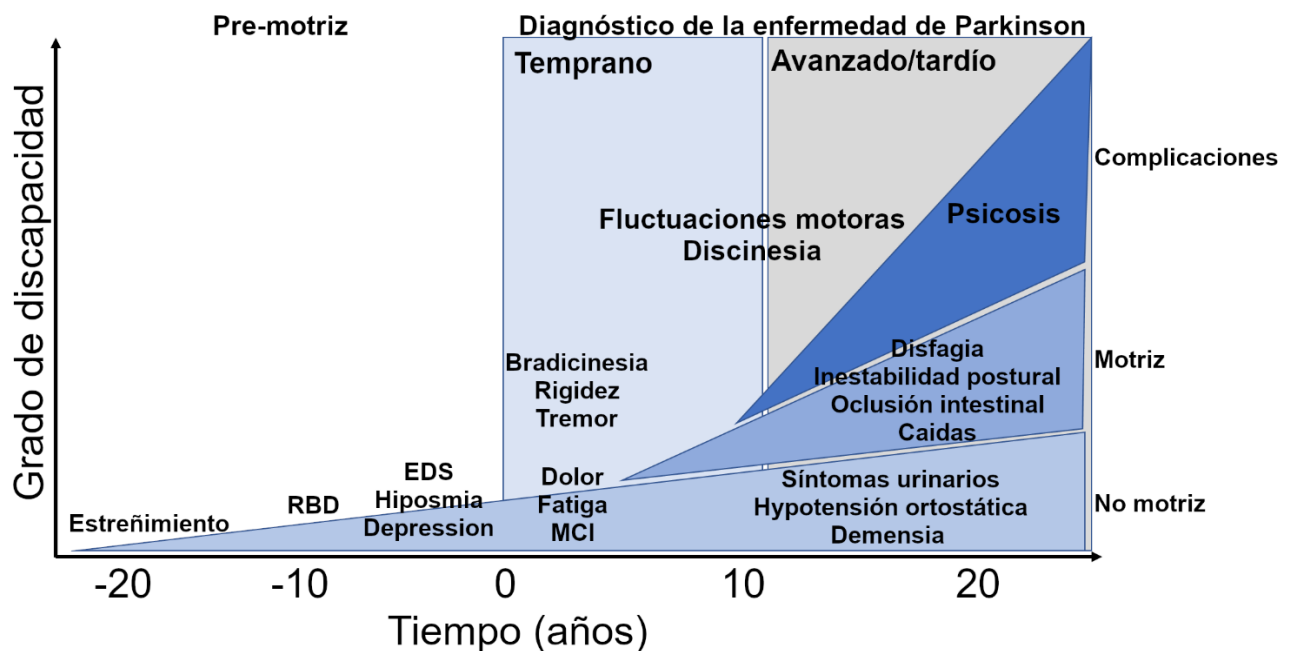


Figura 5. Aparición de los síntomas motrices y no motrices de la EP con el tiempo. Gráfica que muestra el grado de incapacidad funcional de diversos órganos y sentidos, y el tiempo en años de la aparición predicha de cada síntoma antes de la aparición de los síntomas motrices que diagnostican la enfermedad, que se considera en la gráfica a partir del cero. EDS (excesivo sueño diurno), MCI (disfunción cognitiva mediana), RBD (desorden de sueño en la fase REM), (Kalia LV & Lang AE 2005).

Tratamientos

Hasta la fecha no existe una cura. El tratamiento se enfoca en disminuir los síntomas mediante la activación del sistema dopaminérgico. La administración de levodopa es la opción más utilizada para tratar los síntomas motrices. La levodopa atraviesa la barrera hematoencefálica hasta llegar a las neuronas dopaminérgicas, las cuáles la convierten a dopamina. Dentro de los efectos secundarios reportados por el uso prolongado de la levodopa se incluyen: depresión, alucinaciones, movimientos inusuales de las extremidades y dificultad para tragar o respirar (Connolly y Lang 2014). Otros tratamientos incluyen a los agonistas dopaminérgicos, pero sin lograr la misma eficiencia que la levodopa y con efectos adversos a largo plazo tales como: ataques del sueño, apostador compulsivo y comportamientos sexuales anormales (Stacy y DO 2008). La estimulación profunda del cerebro es otro tratamiento que consiste en la introducción de un electrodo en la región del núcleo subtalámica para mandar estímulos eléctricos que activan/inhiban circuitos motrices cuando el paciente se encuentra en una etapa avanzada de la enfermedad. Este procedimiento quirúrgico ha demostrado disminuir los síntomas de la EP, pero posee las desventajas de que durante la cirugía pueda ocasionar defectos neurocognitivos o estimular zonas no deseadas del cerebro (Benabid et al. 2009).

Mecanismos afectados de las enfermedades neurodegenerativas más comunes.

Las causas de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas no se conocen aún, pero se han identificado ciertos factores que favorecen la aparición de estas enfermedades, tales como factores ambientales y genéticos. Las causas de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas son multifactoriales y el principal factor de riesgo es el incremento en la edad. Se cree que tan solo el 10 % de los casos se deben a factores genético, mientras que para el 90 % restante se desconocen sus causas y se consideran enfermedades esporádicas. A pesar de que se han identificado los genes que conforman los agregados proteicos distintivos de cada enfermedad, apenas se está empezando a entender las causas de la formación de estos agregados, que bien pueden ser la causa o la manifestación final de la enfermedad (Taylor, Hardy, y Fischbeck 2002; Ross y Poirier 2004).

El funcionamiento incorrecto de la maquinaria de degradación de proteínas correlaciona con la aparición y progresión de distintas enfermedades neurodegenerativas, como en la enfermedad Alzheimer y en la EP (Tanaka y Matsuda 2014). Existen dos maquinarias celulares principales involucradas en la degradación de proteínas: la vía autofagia-lisosomal y el Sistema Ubiquitina-Proteasoma (SUP). La autofagia involucra la degradación por lisosomas y vesículas intracelulares también llamadas autofagosomas. La autofagia se subdivide en: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia. Por su parte, el SUP se encarga de degradar proteínas individuales marcadas con ubiquitinas de manera selectiva, incluyendo a las de vida corta, proteínas dañadas o mal plegadas. El SUP degrada entre el 80 y el 90% de todas las proteínas intracelulares (Lilienbaum 2013). El SUP consiste en dos componentes principales: el sistema de ubiquitinación que se encarga de seleccionar y marcar proteínas para su degradación a través de la ubiquitinación, y el proteasoma, el cual es un complejo multiproteico que se encarga de la degradación (Jansen, Reits, y Hol 2014).

Sistema Ubiquitina-Proteasoma

El SUP es el principal mecanismo de la célula para el catabolismo proteico, interviniendo de manera directa en el funcionamiento y recambio de muchas proteínas reguladoras. Esta importante vía se encuentra involucrada en la regulación de procesos celulares críticos, tales como: el control del ciclo celular, la

reparación del ADN, oncogénesis, el catabolismo de proteínas anormales, la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, la modulación de receptores de superficie y canales iónicos, el procesamiento de antígenos, la biogénesis de los ribosomas, transcripción, infección vírica, degeneración neuronal y muscular, diferenciación celular y respuesta al estrés (Cascales-Angosto 2005).

La degradación de una proteína por el SUP implica dos etapas sucesivas: 1) conjugación covalente de múltiples residuos de ubiquitina a una proteína, y 2) degradación de la proteína marcada con poliubiquitina por el complejo proteasoma 26S, lo que libera a la ubiquitina que es reutilizable. Para asegurar la eliminación eficiente de una cierta proteína en un determinado momento, tanto la conjugación de la ubiquitina como la degradación de los sustratos ubiquitinados tienen que estar estrictamente regulados.

Ubiquitina

La ubiquitina (Ub) es una proteína de 76 aminoácidos (~ 8kDa) que se expresa en todas las células eucariontes. Es filogenéticamente muy conservada y su secuencia de aminoácidos es casi idéntica desde las levaduras hasta los humanos (Atkin y Paulson 2014). La unión covalente y selectiva de Ub a proteínas (ubiquitinación) es capaz de desencadenar la degradación proteica, pero también altera la función, la estabilidad y la localización de las proteínas. Además, existen enzimas desubiquitinantes que eliminan la ubiquitina de las proteínas que son antagonistas al proceso de ubiquitinación.

Ubiquitinación

El proceso de ubiquitinación consiste en la unión de la Ub a proteínas blanco, el cual involucra una cascada ordenada y secuencial de tres pasos (Figura 6). La conjugación se inicia con la activación, dependiente de ATP, de la Ub por parte de la enzima conjugadora de Ub (E1) generando un intermediario tiol-éster de alta energía entre la E1 y el grupo carboxilo Glicina 76 (G76) de la Ub, generando: E1-S-Ub. La Ub es posteriormente transferida a una de las varias proteínas portadoras o conjugadoras de Ub (E2), la reacción de transtiolación resulta en la formación de otro intermediario de alta energía tiol-éster, esta vez E2-S-Ub. La E2 transfiere la Ub al sustrato que está unido específicamente a un miembro de la familia de proteínas ligadoras de Ub (E3 o E3-ligasas). Existen diferentes clases de enzimas E3s, las de dominio HECT (homólogo al C-Terminal de E6-AP) y las que poseen dominio RING (*Really Interesting New Gene*) (Figura 6). En el caso de las E3s con dominio HECT, la Ub es transferida primero al residuo de cisteína del sitio activo de la E3, para generar un tercer intermediario tiol-éster de alta energía, Ub-S-E3, antes de que esta sea transferida al sustrato unido a la E3-ligasa. Las E3s que poseen un dominio RING transfieren directamente la Ub activada, al sustrato unido a E3. De esta forma la Ub es finalmente transferida al sustrato, generalmente a un grupo -NH₂ de un residuo interno de lisina (Lys) en el sustrato generando un enlace covalente isopeptídico. Si este proceso presenta adiciones sucesivas de Ub activada a residuos internos de lisina sobre la molécula de Ub previamente conjugada, se le denomina poliubiquitinación, formando así cadenas de poliubiquitina (poliUb). La señal mínima para que se lleve a cabo la degradación del sustrato por el proteasoma consiste en una cadena de cuatro moléculas de Ub conectadas en serie por un enlace isopeptídico entre el C-terminal de una de las moléculas y la Lys48 de otra molécula (Sorokin, Kim, y Ovchinnikov 2010).

El sistema de ubiquitinación en mamíferos posee cientos de enzimas que incluyen: una enzima E1, 50 enzimas E2 y cerca de 500 enzimas E3-ligasas (Sorokin, Kim, y Ovchinnikov 2010). En cada paso del proceso de ubiquitinación, la complejidad del sistema aumenta y son las E2s en conjunto con las múltiples E3s las que determinan la especificidad del reconocimiento del sustrato. Una regulación adicional del sistema es llevado a cabo por las enzimas desubiquitinadoras (DUBs), también conocidas como ubiquitina hidrolasas,

las cuales regulan la longitud de cadenas de poliUb y liberan las moléculas de Ub unidas a las proteínas haciendo de la ubiquitinación un proceso dinámico y reversible (Cascales-Angosto 2005).

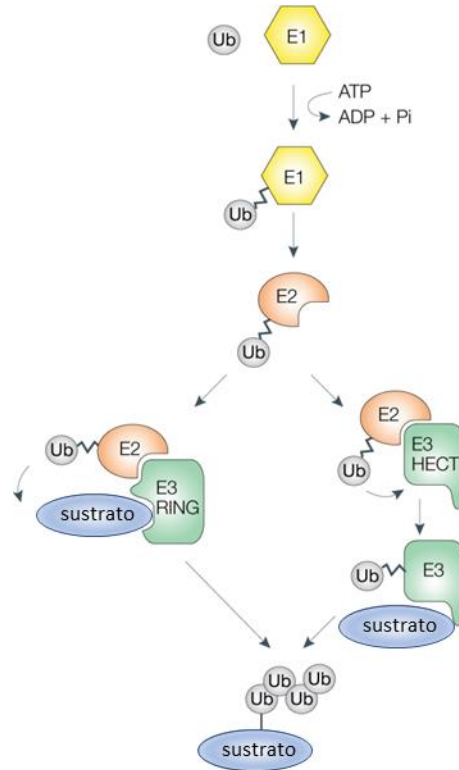


Figura 6. Proceso de ubiquitinación. Las tres enzimas que se requieren para la ubiquitinación de sustrato son: ubiquitina de activación (E1), ubiquitina de conjugación (E2) y una ubiquitina de ligación (E3). Dos principales clases de E3s-ligases están representadas: E3 RING y E3 HECT (Modificado de: Woelk et al. 2007).

Proteasoma

El proteasoma se encarga de degradar una amplia variedad de proteínas citoplasmáticas, nucleares y de membrana, que hayan sido marcadas para su degradación mediante la unión de moléculas de ubiquitina. Los proteasomas de eucariontes son grandes complejos proteicos de alrededor de 2,500 kDa, con arquitectura modular y existen en múltiples formas en las células eucariotas. En todas las isoformas se encuentra la partícula catalítica (CP, *core particle*) conocido como proteasoma 20S (Figura 7) y se requiere de la hidrólisis del ATP para el desdoblamiento de la proteína, de manera que tenga accesibilidad al núcleo catalítico (Glickman y Ciechanover 2002). El proteasoma canónico 26S posee un 20S y una o dos partículas regulatorias (RP, *regulatory particle*) 19S, la cual se encarga del reconocimiento, desdoblamiento y desubiquitinación de los sustratos blanco.

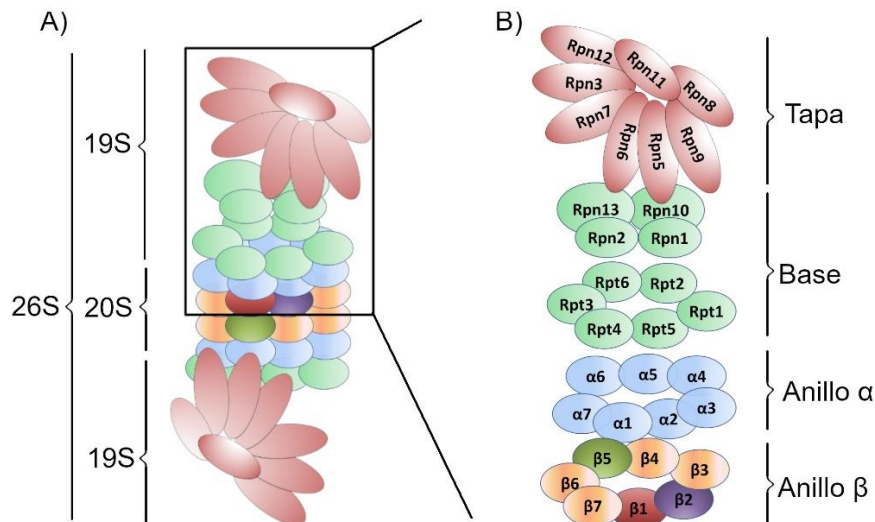


Figura 7. Esquema de proteasoma 26S y sus componentes. A) El proteasoma 26S consiste en la partícula catalítica 20S y una o dos partículas reguladoras 19S. B) Composición de las subunidades del proteasoma 26S. El 19S se divide a su vez en la base y la tapa que están conformadas por subunidades regulatorias con actividad ATPasa de la familia triple-A (Rpt) y la partículas no regulatorias sin actividad ATPasa (Rpn). La subunidad Rpn10 se localiza en la interfase entre la base y la tapa.

Partícula catalítica 20S

La partícula catalítica 20S posee una conformación cilíndrica que consiste en cuatro anillos con siete subunidades diferentes cada uno. Los cuatro anillos son heteroheptaméricos yuxtapuestos y están formados por subunidades α o β , unidas axialmente formando una estructura $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$, con centros multicatalíticos localizados dentro de la cavidad interna de las subunidades β . Las subunidades α no son catalíticamente activas, forman antecámaras de la cavidad central del complejo 20S y tienen la función de establecer una compuerta a través de la cual las proteínas entran al sitio catalítico. La subunidad principal encargada de la apertura del proteasoma es la subunidad α_3 , cuyos residuos de su N-terminal funcionan a modo de compuerta (Sorokin, Kim, y Ovchinnikov 2010). En eucariontes, tres subunidades β poseen actividad catalítica: la subunidad β_1 tiene actividad de tipo caspasa, la subunidad β_2 de tipo tripsina y la subunidad β_5 de tipo quimiotripsina (Kniepert y Groettrup 2014).

Partícula reguladora 19S

La forma del proteasoma que reconoce y degrada las proteínas poliubiquitinadas es el proteasoma 26S. Este complejo multienzimático está formado por el núcleo catalítico 20S, antes mencionado y una o dos copias de un complejo regulador denominado 19S. El 19S está compuesto por 18 subunidades de tamaños diferentes, desde 25kDa a 110 kDa y lleva a cabo las siguientes funciones: es receptor de la cadena de ubiquitina, tiene actividad ATPasa necesaria para desdoblar a las proteínas y actividad de isopeptidasa desubiquitinante (Ben-Nissan y Sharon 2014).

Base del complejo regulador 19S

El complejo 19S está formado por una base que está en íntimo contacto con el núcleo de 20S en la entrada al canal y con la cubierta o tapa. La base está conformada por seis subunidades Rpt (1-6) y cuatro subunidades Rpn (Rpn1, Rpn2, Rpn10 y Rpn13). Las subunidades Rpt tienen similitud de secuencia con las proteínas AAA (ATPasas Asociadas con Actividades celulares) y se encuentran formando un anillo hexamérico en contacto directo con el anillo de las subunidades α del extremo del núcleo 20S (Figura 7). El

C-terminal de las subunidades Rpt2 y Rpt5 se encuentran interaccionando con regiones del N-terminal de subunidades α y son las responsables de inducir cambios conformacionales para la apertura del proteasoma. También existen evidencias que indican la participación de las subunidades Rpn1 y Rpn2 para la apertura del proteasoma. La subunidad Rpn10 participa en el reconocimiento de proteínas poliubiquitinadas al unirse a la Ub, gracias a que contiene un sitio de unión a Ub en un “cluster” hidrofóbico de su C-terminal que contiene un motivo LALAL. Las subunidades Rpn1 y Rpn2 poseen dominios de repeticiones ricas en leucinas (LRR) lo que podrían estar involucradas en interacciones no específicas de tipo proteína-proteína y participar en la unión del sustrato a degradar (Sorokin, Kim, y Ovchinnikov 2010). La subunidad Rpn13 también participa en la unión y reconocimiento de cadenas de ubiquitina unidas al sustrato (Chondrogianni et al. 2014).

Tapa del complejo regulador 19S

La tapa está conformada por 8 subunidades básicas: Rpn3, Rpn (5-9), Rpn11 y Rpn12, y se ha propuesto que su actividad principal es la desubiquitinación (Sharon et al. 2006). La subunidad Rpn11 participa en la desubiquitinación al realizar la hidrólisis del enlace isopeptídico dependiente de ATP entre el sustrato y la molécula de Ub, esto gracias a su actividad de metalopeptidasa dependiente de Zn^{2+} (Sorokin, Kim, y Ovchinnikov 2010).

Genes del SUP asociados a la EP

Los genes asociados al SUP que causan formas hereditarias de la EP son: *parkina* y *UCHL1*. En los casos de la enfermedad de Parkinson esporádica, la Parkina se acumula en los esferoides axonales y en algunos CL. Como la Ub es uno de los principales componentes de los CL y los esferoides axonales, Choi *et al.* decidieron investigar la relación entre la Parkina y la ubiquitina (Choi et al. 2000). Los datos obtenidos por estos investigadores demostraron que la Parkina era un sustrato de esta vía degradativa, y también que la Parkina jugaba un papel en la fisiopatología de la EP esporádica. La Parkina es una E3 ligasa, que regula por ubiquitinación a proteínas del ciclo celular (como la ciclina E). Mutaciones de la Parkina lleva a la acumulación de ciclina E y esto desencadena muerte neuronal por apoptosis (Miller y Wilson 2003). El gen *UCHL1* posee funciones como desubiquitinasa y como ubiquitín-ligasa, la mutación puntual en I93M causa una forma autosómica dominante de la EP (Setsuie y Wada 2007).

Drosophila melanogaster como modelo biológico

Los modelos biológicos que se utilizan para entender las causas y progresiones de las enfermedades neurodegenerativa han ayudado a identificar genes y componentes celulares característicos de dichas enfermedades. Dentro de estos modelos biológicos, aquellos que sean genéticamente manipulables con más facilidad y tengan un ciclo de vida más corta ofrecerán más ventajas para la investigación de estas enfermedades. Entre los modelos que se han establecido con las características mencionadas se encuentran: la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En particular, usar a *Drosophila* ofrece las siguientes ventajas para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas:

1. Permite realizar tamizajes genéticos a gran escala para la detección de nuevos genes involucrados en la neurodegeneración.
2. La expresión de genes se puede inhibir usando ARN de interferencia (RNAi): actualmente existe una librería de 22,247 moscas transgénicas que acarrean el sistema UAS-RNAi contra un 80% de genes

que codifican para alguna proteína del genoma de *Drosophila* disponible en el centro de almacenamiento de RNAi de Viena (<http://www.vdrc.at/rnai-library/>).

3. La expresión de maneja tejido-específico de proteínas o RNAi mediante el sistema Gal4-UAS (Figura 8)
4. Es rutinario hacer moscas transgénicas mediante la utilización de elementos-P.
5. El 75% de los genes humanos asociados a algún síndrome o enfermedad genética tiene un homólogo en *Drosophila*.
6. Disponibilidad de distintos modelos neurodegenerativos que recapitulan los mecanismos celulares y los síntomas parecidos a las enfermedades neurodegenerativas más comunes, como: la enfermedad del Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica y de las enfermedades por poliglutaminas, entre otras, lo que permite la examinación detallada de las causas y mecanismos de las enfermedades neurodegenerativas humanas (Bilen y Bonini 2005).
7. Ciclo de vida corto, en 12 días es posible obtener un organismo adulto que puede llegar a vivir hasta 4 meses.
8. Sistema nervioso simple y caracterizado con funciones complejas similares a las de los mamíferos.

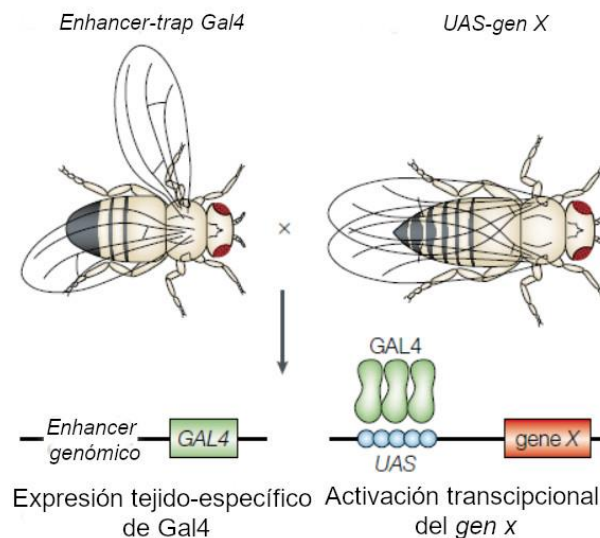


Figura 8. Sistema Gal4-UAS acoplado a un "enhancer-trap". El activador transcripcional Gal4 de levadura puede ser utilizado para regular la expresión de genes en *Drosophila* al insertar la secuencia de activación río arriba (UAS), la cual debe estar fusionada a algún gen de interés. El gen Gal4 se inserta en un sitio aleatorio del genoma de *Drosophila* para generar líneas "enhancer-trap", las cuales expresan GAL4 bajo el control de "enhancers" cercanos del genoma. La expresión del gen X es llevada a cabo a través de cruzar una línea GAL4 enhancer-trap con otra que contenga UAS-gene X. Este sistema se ha utilizado para llevar a cabo los "screens" para genes que expresan fenotipos particulares cuando se expresan de manera incorrecta en un tejido en particular. (Daniel St. Johnston, (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. Nature Review Genetics. 3, p180).

Por todas estas características, se propone utilizar en este trabajo a *Drosophila* para identificar y caracterizar las subunidades del proteasoma que estén involucradas en la neurodegeneración asociada a la EP.

El ojo de *Drosophila* para encontrar modificadores genéticos neurodegenerativos

El ojo de *Drosophila* se ha utilizado durante mucho tiempo como un buen modelo para estudiar fenómenos neurodegenerativos, ya que las mínimas perturbaciones genéticas del contexto neuronal pueden alterar la estructura regular y organizada del ojo que puede ser fácilmente detectada y analizada. Además, el ojo de

Drosophila ha demostrado ser un modelo ideal para estudiar el control genético de la neurodegeneración ya que no es esencial para la viabilidad de la mosca. Muchas de las enfermedades neurodegenerativas de humanos se han modelado en la mosca, permitiendo un mejor entendimiento de la función/disfunción del respectivo gen (Prüßing, Voigt, y Schulz 2013). En muchos casos, los genes involucrados y su función se encuentran conservados entre moscas y humanos. Aún más sorprendente es el hecho de que al expresar ectópicamente genes de humanos que no poseen un homólogo en la mosca, se pueda inducir neurodegeneración en el ojo de la mosca, que es detectado a través de: fototaxis aberrante, electrofisiología alterada y defectos en la morfología del ojo (Lu 2005).

Antecedentes

Una de las características distintivas de los CL en la EP es la acumulación de proteínas ubiquitinadas (Metropolitan et al. 1988). Normalmente, no se acumulan altos niveles de proteínas ubiquitinadas en células saludables, ya que son rápidamente degradadas por el SUP. La deficiencia en la degradación de proteínas ubiquitinadas correlaciona con la neurodegeneración, la pérdida de actividad del proteasoma, el aumento en la edad, deficiencias mitocondriales y estrés oxidativo (Yeh, Jansen, y Schmidt-Glenewinkel 2011).

Inhibición del proteasoma mediante el uso de fármacos

La inhibición del proteasoma en cerebros de ratones a través de micro-inyecciones en la *sustancia nigra* usando distintos inhibidores que se unen al sitio activo del proteasoma, como la lactacistina, PSI y MG-132 generan una diversidad de síntomas asociados a la EP, tales como la pérdida de neuronas dopaminérgicas, activación de vías apoptóticas, acumulación de gránulos insolubles de α -sinucleína y Ub, inflamación mediada por microglía y defectos motrices (Xie et al. 2010; Lorenc-Koci et al. 2011; Bentea et al. 2015), lo que sugiere fuertemente la participación del proteasoma en la aparición de síntomas asociados a la EP.

La inhibición del proteasoma utilizando MG-132 y epoximicina en un modelo *in vitro* de células de neuroblastoma mostró la agregación de α -sinucleína y la acumulación de distintos sustratos poliubiquitinados en cuerpos de tipo Lewy (Dyllick-Brenzinger et al. 2010). De igual modo, en otro estudio usando los mismos inhibidores del proteasoma, pero en cultivo primario de neuronas corticales de ratón, se detectó la acumulación de grandes cantidades de α -sinucleína y Ub, y posteriormente la muerte de dichas neuronas (MacInnes et al. 2008).

Disminución de la expresión de subunidades del proteasoma

El 90% de los casos de EP tienen causas desconocidas, pero diversos estudios *post mortem* de cerebros de pacientes con la EP idiopática han revelado que existe una disminución en la cantidad de ciertas subunidades del proteasoma 26S (Figura 9). En un estudio realizado por McNaught y colaboradores (2003) identificaron la reducción de subunidades α , pero no de subunidades β en la *sustancia nigra* (St. P. McNaught et al. 2003). Grünblatt y colaboradores (2004) analizaron la expresión de los mRNA de la *sustancia nigra* usando microarreglos e identificaron la reducción de la expresión de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, Rpt3 y Rpn12 (Grünblatt et al. 2004). En un trabajo posterior, Grünblatt y colaboradores (2010) encontraron una correlación entre niveles reducidos de la subunidad $\alpha 2$ en células sanguíneas en pacientes con la EP, sugiriendo que esta reducción es un factor de riesgo (Grünblatt et al. 2010). Duke y colaboradores (2006) también realizaron un análisis de microarreglos en la *sustancia nigra* y encontraron una reducción de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\beta 4$, Rpt2, Rpt4, Rpn2, Rpn5 y Rpn6 (Duke et al. 2006). Bukhatwa y colaboradores (2010) encontraron la disminución de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ en neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* (Bukhatwa et al. 2010). Finalmente, Wills y colaboradores (2010) reportaron una reducción en la cantidad de la subunidad $\alpha 5$ en el estriado y en el giro frontal inferior (Wills et al. 2010). A pesar de que aparentemente no existe un consenso sobre estos hallazgos, la evidencia sugiere que la reducción las subunidades del proteasoma 26S tienen un papel importante en la EP. Utilizar un modelo animal para determinar la contribución de cada subunidad del proteasoma 26S en la EP aportará conocimiento sobre la relevancia que cada una de estas subunidades pueda tener en la inducción o desarrollo de la EP esporádica.

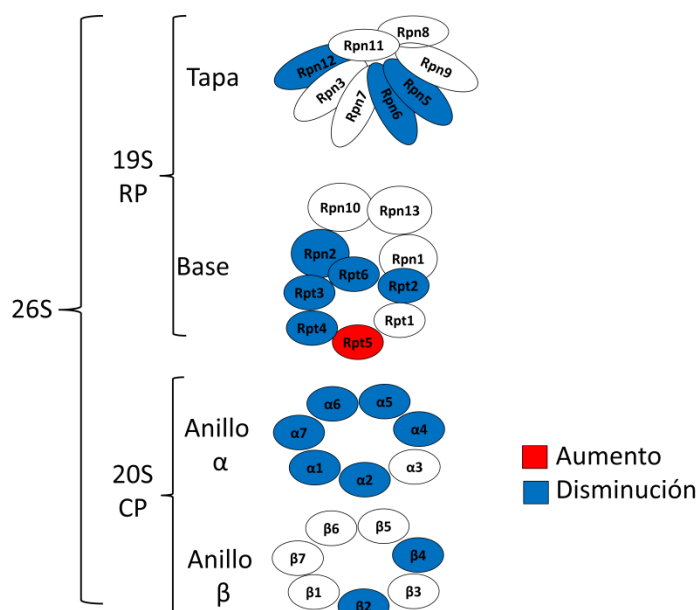


Figura 9. Alteración en la expresión de subunidades del proteasoma 26. Los colores indican si su expresión se ha visto disminuida o aumentada en cerebros de pacientes *post mortem* de la EP esporádica.

Con la finalidad de determinar el papel de las distintas subunidades del proteasoma en la aparición de las enfermedades neurodegenerativas se han realizado distintos trabajos en cultivo celular y en ratones “knock-out”. Droggiti y colaboradores (2011) realizaron un análisis en líneas celulares de neuroblastoma en donde expresaron dominantes negativos de los genes Rpn10 y Rpn11 con la finalidad de ensamblar correctamente al proteasoma, pero dejándolo funcionalmente inactivo, y en este contexto observaron la formación de cuerpos de inclusión. Posteriormente, cuando expresaron los dominantes negativos en una línea celular primaria de neuronas corticales observaron la formación de cuerpos de inclusión que contenían fibrillas tipo amiloides, α -sinucleína, Hsp70 y p53 (Droggiti et al. 2011). Por otro lado, Tashiro y colaboradores (2012) utilizando ratones “knockout” condicionales para causar la pérdida de función de la subunidad Rpt3 del proteasoma de manera específica en motoneuronas y observaron disfunciones locomotrices acompañados de una pérdida progresiva de las motoneuronas y gliosis, los cuales son síntomas distintivos de la enfermedad neurodegenerativa conocida como esclerosis lateral amiotrófica (Tashiro et al. 2012). La delección específica de la subunidad Rpt2 en neuronas dopaminérgicas genera inclusiones de ubiquitina y α -sinucleína que resultan en muerte neuronal, y las cuales son características distintivas de la EP (Bedford et al. 2008; Paine et al. 2013). Adicionalmente, variaciones en el gen Rpt3 correlacionan con la edad de aparición de la EP en pacientes (Wahl et al. 2008). Estas evidencias sugieren que la pérdida de función del proteasoma genera la aparición de síntomas de las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, falta determinar si la reducción en la cantidad de alguna subunidad del proteasoma en un modelo animal es capaz de causar o estimular la aparición de los síntomas de la EP, lo cual ha sido sugerido en varios estudios (Bilen y Bonini 2005; Dantuma y Bott 2014).

Recientemente, Martínez BA. Y colaboradores (2015), utilizaron a *C. elegans* para determinar el papel de distintas subunidades del proteasoma en la neurodegeneración. Utilizando diversos RNAi para disminuir de manera independiente los niveles de las subunidades: Rpn4, Rpn2, Rpt1, Rpt4, α 4 y β 3 en un modelo de la EP en donde expresaron a la proteína α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas, observaron que ocurre neurodegeneración en las neuronas dopaminérgicas. En las 6 subunidades probadas en ese trabajo no hubo

diferencia en el grado de neurodegeneración entre ellas (Martinez et al. 2015). Sin embargo, aún falta determinar el papel de cada subunidades que conforman el proteasoma ya que se ha visto que pueden tener más relevancia en la EP. Además, falta determinar si en un organismo de comportamientos más complejos aparecen síntomas similares a los de pacientes con la EP.

Inhibición del proteasoma en *Drosophila melanogaster*

La inhibición de alguna de las enzimas de la vía de ubiquitinación en *Drosophila*, tal como la E1 y la E3 ubiquitín ligasa (Parkina), genera efectos neurodegenerativos similares a las de la EP, como son: la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas acompañada de defectos motrices progresivos (Martin et al. 2014; Sang et al. 2007). En trabajos realizados por Martin y colaboradores (2014), en donde se dirigió por separado la expresión de mutantes dominantes negativas de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 6$ en neuronas dopaminérgicas, no detectaron la pérdida de neuronas dopaminérgicas en moscas adultas envejecidas (4 semanas). Aunque cabe señalar, que ellos mismos hacen énfasis en que su sistema de expresión pudo no haber sido suficientemente activo (Martin et al. 2014). Por otra parte, al dirigir la expresión de éstas dominantes negativas en el ojo, observaron defectos en las omatidias (Belote y Fortier 2002), lo que podría indicar que algunas subunidades tienen más relevancia en ciertas neuronas y en la aparición de síntomas particulares de ciertas enfermedades neurodegenerativas. La delección de la subunidad Rpn10 en *Drosophila* causa semiletalidad en larvas y pupas, múltiples defectos mitóticos, la acumulación de proteínas poliubiquitinadas y la acumulación de partículas del proteasomas 26S defectuosas. Sin embargo, la delección de Rpn10 no desestabiliza el complejo regulatorio ni el ensamblaje del complejo catalítico (T. Szlanka 2003).

En trabajos realizados por Valentzas y colaboradores (2013), en donde disminuyeron la expresión por separado de las subunidades: Rpn1, Rpn2, $\alpha 5$, $\beta 5$ y $\beta 6$ usando RNAi dirigidas al ojo, mostraron defectos en la morfología externa, fotorreceptores degenerados y carencia de ciertos rabdómeros. Además, observaron distintos fenotipos al comparar a Rpn1 y Rpn2, lo que puede sugerir que estas subunidades tengan la capacidad de reconocer a diferentes grupos de sustratos ubiquitinados. De manera similar, al dirigir la expresión de éstos RNAi al ala de la mosca, éstas presentaron distintos defectos morfológicos, lo que sugiere que el proteasoma es necesario para la morfogénesis del ala (Valentzas et al. 2013). Sin embargo, les faltó dar seguimientos al fenotipo degenerativo del ojo a lo largo del tiempo para determinar si presentaban un efecto neurodegenerativo más severo.

Estudios *in vitro* en células S2 de *Drosophila* utilizando RNAi, mostraron que la disminución de las subunidades: $\beta 5$, Rpt1, Rpt2, Rpt5, Rpn2, Rpn11 y Rpn12, causó un decremento en la actividad del proteasoma, incremento en la apoptosis, disminución en la proliferación celular sin arresto del ciclo celular y la acumulación de proteínas celulares ubiquitinadas (Lundgren et al. 2003; Wójcickb et al. 2002). La disminución de la expresión de la mayoría de las subunidades mostró una disrupción del proteasoma 26S. La disminución de la subunidad Rpn10 mostró un incremento en la actividad hidrolítica del proteasoma 26S, pero con la acumulación de proteínas ubiquitinadas (Wójcickb et al. 2002).

Modelo de la enfermedad de Parkinson en *Drosophila melanogaster*

Al expresar la α -sinucleína humana únicamente en el sistema nervioso central (SNC) de *Drosophila*, se ha observado la acumulación de agregados proteicos en las omatidias y fotorreceptores del ojo, reducción en el número de neuronas dopaminérgicas del cerebro, reducción en la capacidad motriz y muerte prematura en las moscas, que son características similares a las de los pacientes con la enfermedad de Parkinson

(Hernández-Vargas et al. 2011). Trabajos anteriores realizados por Feany y Bender (2000) utilizando a *Drosophila* para expresar la α -sinucleína humana en el SNC, generaron fenotipos muy similares a los de la enfermedad de Parkinson, lo que refuerza la ventaja de utilizar a *Drosophila* como modelo de estudio para entender la enfermedad del Parkinson (Feany y Bender 2000).

Relación entre el SUP y α -sinucleína

Existe una relación muy estrecha entre los niveles de expresión de α -sinucleína y la actividad del SUP, el ejemplo más claro está en la ubiquitinación de α -sinucleína por la E3 ubiquitín ligasa Parkina, la cual ubiquitina a la α -sinucleína para su degradación y su pérdida de función se relacionan con la enfermedad del Parkinson juvenil autosómico recesivo (Ciechanover y Brundin 2003), mientras que su sobreexpresión en moscas incrementa la vida media y reduce la cantidad de proteínas ubiquitinadas (Rana, Rera, y Walker 2013). Por otro lado, la sobreexpresión tanto de Parkina como de ubiquitinación en moscas que expresan α -sinucleína rescata los defectos en las ommatidias de las moscas y mejoran la capacidad motriz de moscas seniles (Haywood y Staveley 2004; Lee et al. 2009). Otro ejemplo está en interacción física entre la α -sinucleína con diversas subunidades del proteasoma. Entre las cuales se han identificado a la $\beta 5$, $\alpha 7$ y Rpt5. Sin embargo, aún falta validar si la pérdida de función de subunidades específicas del proteasoma es suficiente para inducir enfermedades neurodegenerativas y el efecto que causarán en un modelo de Parkinson, en donde se esperaría que la disfunción del proteasoma incremente los síntomas motrices y neurodegenerativos de la EP.

Justificación

La concentración de distintas subunidades del proteasoma 26S se ha visto reducida en la *sustancia nigra* de cerebros de pacientes con la EP. A la fecha no se ha realizado un estudio en un modelo animal en el que se disminuya la expresión de las distintas subunidades del proteasoma para caracterizar los efectos motrices y no motrices que se observan en la EP, con la finalidad de evaluar el papel de las subunidades del proteasoma en el contexto de la aparición y desarrollo de los síntomas a lo largo del tiempo en la EP.

Hipótesis

La disminución de la expresión de subunidades del proteasoma causará la inducción de síntomas asociados a la EP.

Objetivo general

Identificar y caracterizar la participación de las subunidades del proteasoma en la inducción y desarrollo de los síntomas motrices y no motrices característicos de la EP usando a *Drosophila* como modelo.

Objetivos particulares

1. Identificar mediante un tamizaje genético la subunidad que genere mayor neurodegeneración del ojo al disminuir las distintas subunidades del proteasoma 26S
2. Caracterizar el efecto de la disminución de las distintas subunidades del proteasoma 26S en el sistema nervioso de larvas para evaluar su locomoción.
3. Comparar supervivencia, neurodegeneración en protocerebros, capacidad motriz, y sueño de *Drosophila* al disminuir la expresión de ciertas subunidades del proteasoma 26S en neuronas dopaminérgicas.
4. Determinar si existe un aumento en los síntomas relacionados a la EP causados por la disminución de subunidades del proteasoma 26S y expresando α -sinucleína humana.

Materiales y Métodos

Líneas de moscas

En este trabajo se utilizaron líneas de moscas con inserciones de elementos P que permiten la expresión de diferentes RNAi y en la tabla 2 se resumen las características de estas líneas que se pidieron al “*Bloomington Drosophila Stock Center*” (BDSC):

Subunidad del proteasoma	Número en BDSC	Genotipo	Nombre del Alelo
$\alpha 3$	55217	$y^1 v^1; P\{TRiP.GLC01834\}attP2$	Prosa3 ^{GLC01834}
$\alpha 4$	36063	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.GL00341\}attP2$	Prosa4 ^{GL00341}
$\alpha 5$	34786	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.HMS00095\}attP2$	Prosa5 ^{HMS00095}
$\alpha 7$	33660	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.HMS00068\}attP2$	Prosa7 ^{HMS00068}
$\beta 1$	34824	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.HMS00139\}attP2/TM3, Sb^1$	Prosb1 ^{HMS00139}
$\beta 5$	34810	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.HMS00119\}attP2$	Prosb5 ^{HMS00119}
$\beta 6$	34801	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.HMS00110\}attP2$	Prosb6 ^{HMS00110}
Rpt2	34795	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.HMS00104\}attP2$	Rpt2 ^{HMS00104}
Rpt3	34917	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.HMS01265\}attP2$	Rpt3 ^{HMS01265}
Rpt5	53886	$y^1 v^1; P\{TRiP.HMJ21204\}attP40$	Rpt5 ^{HMJ21204}
Rpn1	34348	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.HMS01337\}attP2$	Rpn1 ^{HMS01337}
Rpn7	34787	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.HMS00096\}attP2$	Rpn7 ^{HMS00096}
Rpn8	31567	$y^1 v^1; P\{TRiP.JF01140\}attP2$	Rpn8 ^{JF01140}
Rpn10	34566	$y^1 sc^* v^1 sev^{21}; P\{TRiP.HMS01039\}attP2$	Rpn10 ^{HMS01039}

Tabla 2. Genotipo de las líneas de RNAi contra las subunidades del proteasoma. Proteasome subunit (Pros)

La línea de moscas que posee la α -sinucleína humana es la del laboratorio de Feany y Bender, y es homocigótica viable (Feany y Bender 2000). La línea que posee la α -sinucleína humana con codones optimizados para *Drosophila* (SNCA.J) se pidió de BDSC #51374. Los “drivers” o “GAL4” para dirigir la expresión fueron: ninaE.GMR-Gal4 (DBSC #1104) para el sistema visual, Elav-Gal4 para el todo sistema nervioso (panneuronal) y TH-Gal4 para neuronas dopaminérgicas.

Microscopía de luz

Las imágenes de los ojos se adquirieron por microscopía de luz utilizando un microscopio estereoscópico en moscas adultas anestesiadas con CO₂ a 1 y 30 días de edad. Para la adquisición de imágenes se utilizó una cámara digital industrial de 5.1MP adaptada a un microscopio estereoscópico Zeiss y el software de adquisición utilizado fue el *ToupView* ©.

Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Se extrajo la proteína total de 30 cabezas de machos adultos de *Drosophila* de 2 días de edad utilizando el buffer de extracción (250 mM de sacarosa, 50 mM de Tris pH 7.5, 25 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 5 mM de EDTA, 1% de SDS, 2 mM de PMSF y 1X de cComplete™). Se centrifugó a 10,000 rcf a 4°C durante 20 minutos y se separó el sobrenadante clarificado. Se cuantificó la proteína mediante Bradford. 60 μ g de la extracción total se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 12% (Acrilamida-Bisacrilamida, 37.5:1). Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) en una cámara de transferencia utilizando el buffer

de transferencia (25 mM Tris, 192 mM de Glicina, 20% (v/v) de metanol, pH = 8.3) a 300 mA por cuatro horas.

Electroforesis nativa

Se extrajo la proteína total de 30 cabezas de machos adultos de *Drosophila* de 2 días de edad utilizando el buffer de extracción (250 mM de sacarosa, 20 mM de Tris pH 7.5, 100 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 1mM de ATP y 1mM de DTT). Se centrifugó a 20,100 rcf a 4°C durante 10 minutos. Se cuantificó la proteína mediante la técnica de Bradford. 60 µg de la extracción total se resolvieron en un gel de una sola capa de poliacrilamida al 4% (Acrilamida-Bisacrilamida, 37.5:1) suplementado con TBE 1X, 5 mM de MgCl₂, 1mM de ATP y 1mM de DTT. Posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad) en una cámara de transferencia utilizando el buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM de Glicina, 20% (v/v) de metanol, pH = 8.3) a 300 mA por cuatro horas.

Western blot

Las membranas se bloquearon durante toda la noche utilizando PBST (PBS con 0.1% Tween-20) suplementado con 20% de leche reducida en grasa (Carnation). Posteriormente se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente utilizando la siguiente dilución de cada anticuerpo: 1:2000 anti-Rpt2 (Abcam 21882), 1:1000 anti-Ubiquitin (Santa Cruz technologies Ub Antibody (P4D1), sc-8017), 1:10000 Anti-Proteasome 20S alpha + beta antibody (Abcam 22673). Posteriormente se lavaron 3 veces las membranas utilizando PBST suplementado con 5% de leche. Se dejaron incubar durante dos horas a temperatura ambiente utilizando el anticuerpo secundario “anti-mouse-HRP” (Jackson Immuno Research) a 1:3000. Se lavaron otras tres veces en PBST. La señal se detectó usando “films” Kodak® BioMax® MS y “Supersignal West Pico Chemiluminescent Kit (Thermo Scientific)”. Se les aplicó un “stripping” a las membranas a 55°C utilizando el buffer de “stripping” (62 mM de Tris pH = 6.8, SDS al 2% y 0.1 M de β-mercaptoetanol, se revelaron nuevamente basándose en el procedimiento antes descrito y utilizando el anticuerpo primario anti-actina 1:3000 (Developmental Hybridoma Bank). Finalmente se realizó un análisis por densitometría mediante la herramienta de cuantificación de geles del programa FIJI (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>).

Análisis de proteínas ubiquitinadas insolubles

El análisis mediante Western blot de proteínas ubiquitinadas insolubles se realizó conforme al protocolo de (Zhou et al. 2015). Se homogenizaron cabezas de *Drosophila* adultas en el buffer de homogenización (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% (w/v) SDS) adicionado con PMSF e inhibidores de proteasas (Roche Applied Science) y se dejaron incubando durante 30 minutos en hielo. El tejido homogenizado fue sonificado y centrifugado a 13,200 rpm durante 30 minutos para obtener el sobrenadante soluble y la fracción insoluble precipitada (*pellet*). El *pellet* se solubilizó utilizando 30 µl de 4X SDS BIO-RAD Laemmli buffer de carga, y se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación continua. Se hirvió la muestra durante 5 minutos y se cargó al gel de electroforesis utilizando la técnica de SDS-PAGE y el análisis de western blot antes mencionados.

Inmunofluorescencia

Seis cerebros de machos de *Drosophila* de cada edad y genotipo se disecaron en PBS, se fijaron en 4% de paraformaldehído en PBS durante 15 minutos y se lavaron 3 veces durante 15 minutos con PBST (PBS con Tritón X-100 al 0.2%). Los cerebros se bloquearon utilizando suero de chivo al 4% en PBST durante 30

minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-TH (Immuno Star 22941) a 1:1000 suero de chivo al 4% en PBST a 4°C durante toda la noche. Después, se lavaron tres veces en PBS durante 15 minutos. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-TH (Immuno Star 22941) a una dilución de 1:1000 en suero de chivo al 4% en PBST a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se lavaron tres veces en PBST durante 15 minutos y se montaron utilizando Citifluor (Ted Pella Inc. Redding Ca). Se tomaron imágenes de los cerebros en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) mediante el microscopio confocal invertido Olympus FV1000, utilizando un objetivo 20X.

qRT-PCR

Los experimentos de “quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)” se realizaron utilizando SYBR™ Green siguiendo las instrucciones del proveedor. Se realizó la extracción del RNA total de cabezas de machos *Drosophila* adultas de 2 días de edad utilizando el reactivo TRizol™ siguiendo las instrucciones del proveedor. Se sintetizó cDNA a partir de 1 µg del RNA extraído utilizando la enzima transcriptasa reversa. Se realizó la cuantificación de los transcritos del gen *cap-n-collar (cnc)* utilizando los cebadores y las condiciones reportadas por (Tsakiri et al. 2013). El gene endógeno de *rp49* se utilizó como el control genético de expresión interno. Los valores del doble delta Ct obtenidos se utilizaron para comparar la expresión del transcrito entre grupos.

Ensayos de locomoción en larvas

Los ensayos de locomoción se realizaron utilizando larvas de tercer instar sobre una caja Petri de 14 cm de diámetro. La caja de Petri se llenó con agarosa al 2% y debajo se colocó una cuadrícula de 0.2 cm² con fondo negro. Se colocó una larva en el centro de la caja Petri y se gravó su locomoción durante 1 minuto en presencia de luz artificial. Las larvas silvestres presentaron locomoción espontánea bajo estas condiciones y se cuantificó el número de líneas atravesadas durante 1 minuto.

Curvas de supervivencia

Se utilizaron 200 machos y se agruparon en 20 individuos por vial con comida. Se cambiaron a viales con comida nueva cada 3 días y se registró el número de individuos muertos, atorados y escapados. Se graficaron las curvas de supervivencia Kaplan-Meier utilizando *GraphPad Prism 6*. Se compararon las curvas mediante una prueba Log-rank (Mantel-cox).

Geotaxis negativa

Los ensayos de geotaxis negativa consistieron en colocar dentro un vial diez machos de la misma edad y dar tres pequeños golpes del vial sobre la mesa para inducir el escalamiento como respuesta natural de los individuos. El ensayo se repite diez veces con intervalos de un minuto. El vial se marcó con una línea a los ocho centímetros de altura y mediante el análisis en video se determina el porcentaje de individuos que logra superar la marca en los primeros diez segundos después de dar el estímulo. Para cada ensayo se realizaron mínimo 5 repeticiones, obteniendo un total de $n \geq 50$.

Locomoción espontánea

Se utilizó el Monitor de Actividad para *Drosophila* “TriKinetics”, el cual es un sistema para cuantificar el movimiento de moscas individuales a través del tiempo. En cada monitor se colocaron 32 machos en tubos de policarbonato a los cuales se les colocó en un extremo comida y en el otro extremo algodón para permitir la entrada de aire. Se colocaron en una incubadora a 28°C con ciclos de luz/oscuridad cada 12 horas

durante un máximo de 6 días, el primer día se utilizó para darles un periodo de adaptación a los ciclos de luz/oscuridad. Se programó el registro de actividad cada minuto y utilizando el “DAMSystem3Data” se agruparon los registros en periodos de 30 minutos. Se graficó la actividad espontánea utilizando el programa *GraphPad Prism 6*.

Cuantificación de periodos de sueño

Se ha estipulado que 5 minutos o más de inactividad en *Drosophila* equivale a un periodo de sueño/reposo. Se utilizaron los datos crudos obtenidos del Monitor de Actividad para *Drosophila TriKinetics*, descritos anteriormente, pero los registros se agruparon en periodos de 5 minutos. Se graficaron los actogramas del tiempo acumulado de sueño por intervalos de 30 minutos utilizando el programa *GraphPad Prism 6*.

Locomoción en arena circular

Los ensayos se realizaron colocando un macho sobre una placa blanca de acrílico cubierto por una tapa transparente de 4 centímetros de diámetro y 4 milímetros de alto para impedir su escape. Alrededor de la arena se colocó un foco circular de luz blanca y entre el foco y la arena se colocó una cartulina blanca circular para homogenizar la iluminación. Utilizando el programa *BuridanTracker* se grabó mediante una cámara digital a cada individuo durante 3 minutos y se analizaron los datos sobre la distancia recorrida, velocidad y tiempo de actividad utilizando el paquete de programación CeTrAn4 para R.

Cuantificación de dopamina y serotonina mediante HPLC

Se disecaron 5 cerebros en *buffer* de fosfatos. Se pasaron a solución de HClO₄ 0.2N y se congelaron a -20°C hasta su uso, que no pasó de dos días. Se les añadió un volumen igual de HClO₄ 0.02N, se les aplicó el proceso de sonicación a los cerebros por 5 segundos y se aseguró de que no quedara tejido visible. Se filtraron usando unidades de filtración de 0.22 µm. Se inyectaron 5 µL en el equipo de HPLC. Se cuantificaron los femtomoles (fmol) por µL. Se realizó por triplicado el procedimiento.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa *GraphPad Prism 6*. El valor de significancia utilizado fue de $p < 0.05$. Los valores de significancia corresponden a la siguiente nomenclatura: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. Cada prueba estadística se menciona en el pie de figura.

Resultados

Reducción de distintas subunidades del proteasoma 26S en el sistema visual

La expresión dirigida de proteínas amiloides humanas, tales como la β -amiloide, la α -sinucleína y la huntingtina, en el sistema visual de *Drosophila*, se ha utilizado para identificar modificadores genéticos asociados a este tipo de enfermedades neurodegenerativas. Su expresión en este tejido neuronal puede causar defectos en la estructura externa del ojo, lo cual involucra internamente la degeneración de fotorreceptores, disrupción de las omatidias, y neurodegeneración (E. Rincon-Limas, Jensen, y Fernandez-Funez 2012). Se ha demostrado que la reducción de manera independiente de las subunidades del proteasoma: Rpn1, Rpn2, α 5, β 5 y β 6, genera un fenotipo neurodegenerativo (Velentzas et al. 2013).

En este trabajo se realizó la reducción de manera independiente y sistemática de 13 subunidades del proteasoma 26S mediante la expresión de RNAi dirigidos al sistema visual de *Drosophila*, para identificar cuales tienen un mayor efecto neurodegenerativo. Se compararon a 1 y 30 días de edad, ya que el proceso neurodegenerativo ocurre a lo largo del tiempo. Para esto se utilizó el “driver” *ninaE.GMR-Gal4*, para dirigir los RNAi de manera específica a los fotorreceptores del ojo. El control que se utilizó (*ninaE.GMR-Gal4/+*) tiene un fenotipo silvestre en la estructura externa del ojo (Figura 10), en la cual puede apreciarse la distribución regular de las omatidias. A los 30 días de envejecimiento los ojos del control se oscurecen debido a la acumulación de pigmentos endógenos tales como la drosopterina.

Drosophila no posee un gen homólogo de la α -sinucleína en su genoma, pero una de las maneras de obtener un modelo de la EP en *Drosophila* es a través de la expresión de α -sinucleína humana (Feany y Bender 2000). En los experimentos de interacción se coexpresó la proteína humana α -sinucleína en los ojos usando el driver *ninaE.GMR-Gal4* en conjunto con cada uno de los RNAi contra las subunidades del proteasoma para determinar si existía interacción genética entre ellas. La expresión única de α -sinucleína no induce daño externo en el ojo ni a 1 día ni a los 30 días de edad (Figura 10).

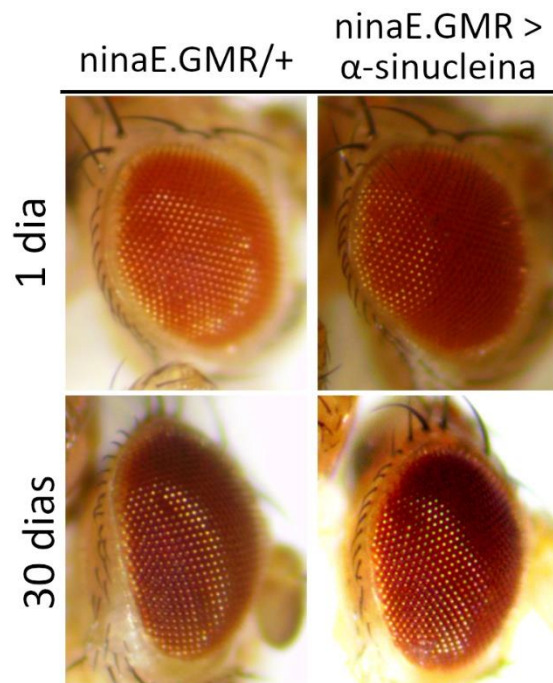


Figura 10. Estructura del ojo de tipo silvestre. Se muestra el ojo de mosca adulta de 1 y 30 día de edad. Las moscas de la línea *ninaE.GMR-Gal4* en su forma heterocigótica (*ninaE.GMR/+*) presenta fenotipo de tipo silvestre en los ojos. La expresión de α -sinucleína humana utilizando el “driver” *ninaE.GMR-Gal4* (*ninaE.GMR/+* + α -sinucleína) presentan fenotipo de tipo silvestre.

La reducción de la subunidad $\alpha 3$ generó despigmentación en los ojos a los 30 días de edad. Sin embargo, no se apreció un aumento evidente del fenotipo con la presencia de α -sinucleína. Así mismo, la reducción de la subunidad $\alpha 4$ no generó un fenotipo neurodegenerativo aparente ni a los 30 días de edad ni con la presencia de α -sinucleína. En el caso de la reducción de las subunidades $\alpha 5$ y $\alpha 7$ en el ojo se generó necrosis y despigmentación a 1 día de edad, con un aumento en la despigmentación a los 30 días de edad. No se observó un aumento aparente en el fenotipo neurodegenerativo con la presencia de α -sinucleína y la reducción de las subunidades $\alpha 5$ y $\alpha 7$ en el ojo (Figura 11).

La reducción de la subunidad $\beta 1$ generó necrosis y despigmentación prominente en los ojos. Sorprendentemente, en presencia de α -sinucleína disminuyó la necrosis. No fue posible evaluar el fenotipo a los 30 días de edad debido a su baja viabilidad. En el caso de la reducción de la subunidad $\beta 5$ también se observó necrosis y despigmentación prominente en los ojos. Sin embargo, este fenotipo no se aumentó con la presencia de α -sinucleína. La reducción de la subunidad $\beta 6$ causó necrosis y despigmentación con una penetrancia menor al 30%. Al evaluar el fenotipo a los 30 días, solo fue posible observar a los individuos con la morfología del ojo de tipo silvestre y aquellas que habían presentado necrosis no sobrevivieron hasta esta edad. La coexpresión con α -sinucleína presentó un fenotipo similar al mostrado por la sola reducción de la subunidad $\beta 6$ (Figura 12).

La reducción de la subunidad Rpt2 causó necrosis en los ojos de individuos de 1 día de edad. Se observó que con la coexpresión de α -sinucleína aumentó de manera muy pronunciada la necrosis. La reducción de Rpt2 no permitió evaluar el fenotipo a los 30 días debido a que los individuos que expresaban el RNAi no lograron sobrevivir hasta esa edad. La reducción de la subunidad Rpt3 no generó ningún fenotipo aparente, ni a los 30 días de envejecimiento ni con la coexpresión de α -sinucleína. La reducción de la subunidad Rpt5 causó despigmentación de los ojos de los individuos. Y, eventualmente se detectó la aparición de necrosis a los 30 días de envejecimiento. Sin embargo, la presencia de α -sinucleína aparentemente no modificó la expresividad del fenotipo (Figura 13).

La reducción de la subunidad Rpn1 causó la despigmentación de los ojos a 1 día de edad; y su coexpresión con α -sinucleína causó necrosis a 1 día de edad. En ambas condiciones los individuos no sobrevivieron hasta los 30 días. La reducción de la subunidad Rpn7 causó necrosis en los ojos a 1 día de edad, con la expresión de α -sinucleína también se generó necrosis a 1 día de edad. A los 30 días de edad se observó una mayor despigmentación en los ojos, pero sin diferencias aparentes entre ambas condiciones. La reducción de la subunidad Rpn10 no generó ningún fenotipo aparente, ni a los 30 días de envejecimiento ni con la coexpresión de α -sinucleína (Figura 14).

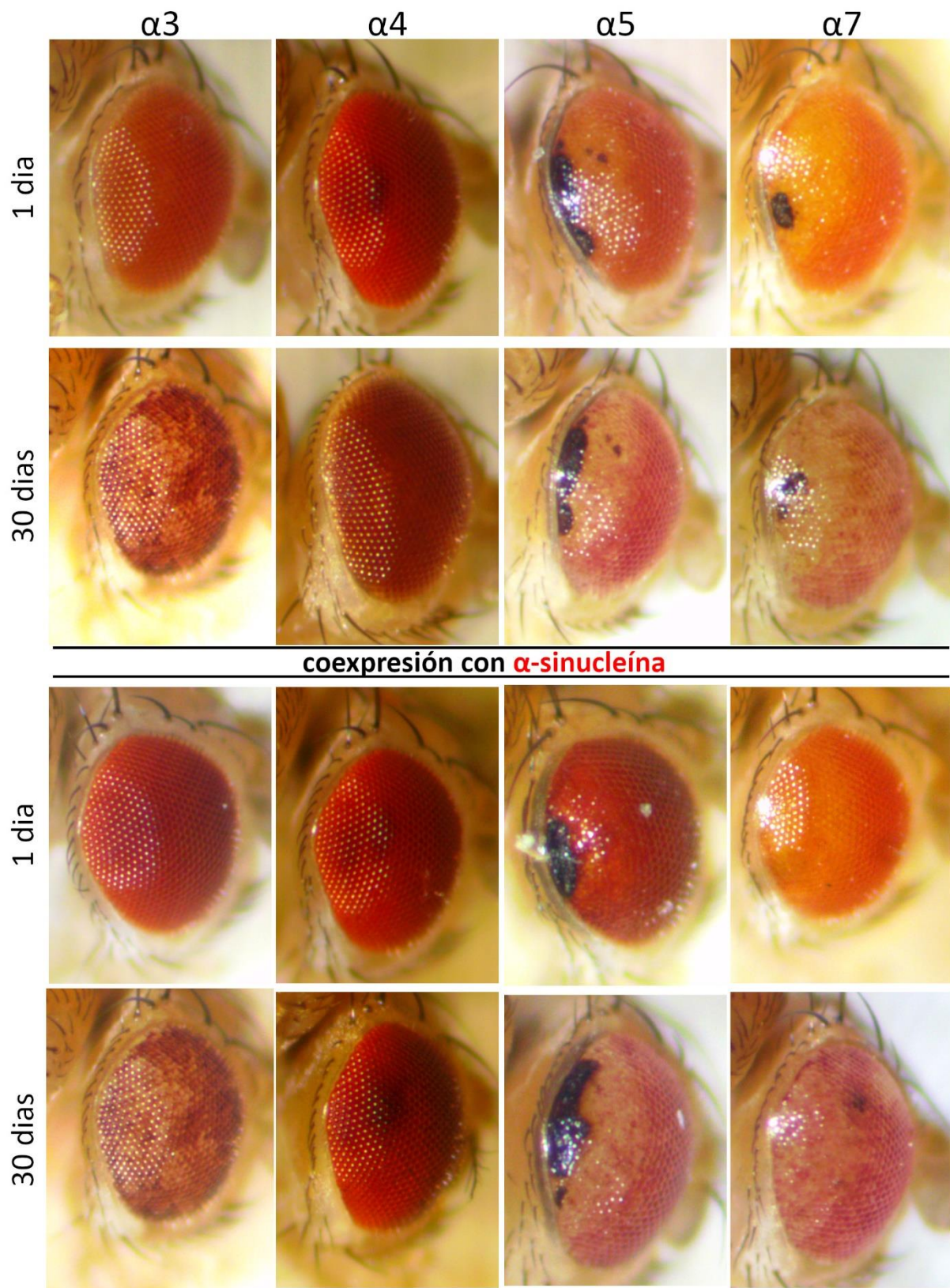


Figura 11. Reducción en el ojo de subunidades α . Comparación en los fenotipos de despigmentación y necrosis, a 1 y 30 día de edad, y en presencia de α -sinucleína de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 7$.

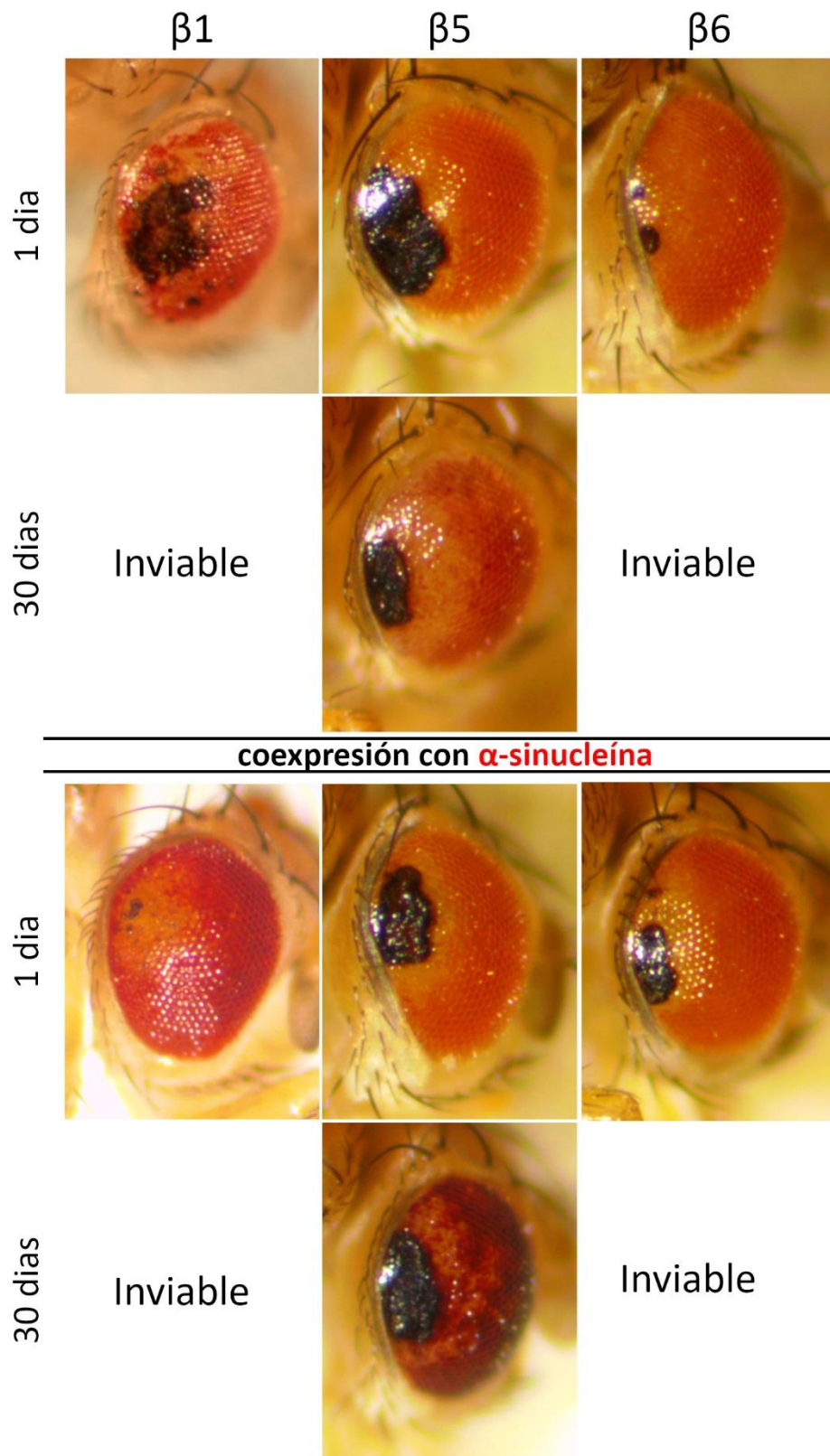


Figura 12. Reducción en el ojo de subunidades β . Comparación en los fenotipos de despigmentación y necrosis, a 1 y 30 día de edad, y en presencia de α -sinucleína de las subunidades $\beta 1$, $\beta 5$ y $\beta 6$.

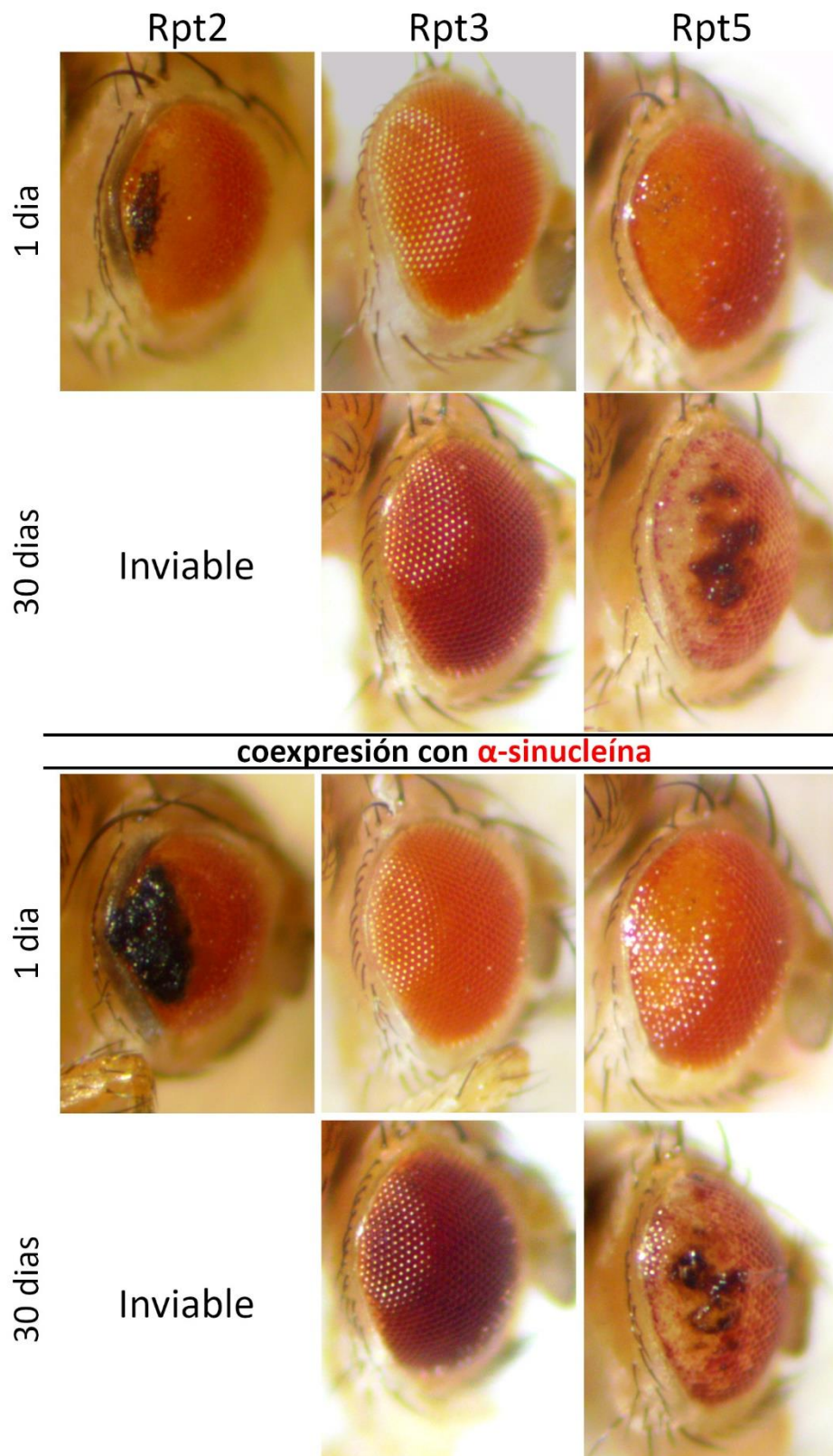


Figura 13. Reducción en el ojo de subunidades regulatorias con actividad ATPasa. Comparación en los fenotipos de despigmentación y necrosis, a 1 y 30 día de edad, y en presencia de α -sinucleína de las subunidades Rpt2, Rpt3 y Rpt5.

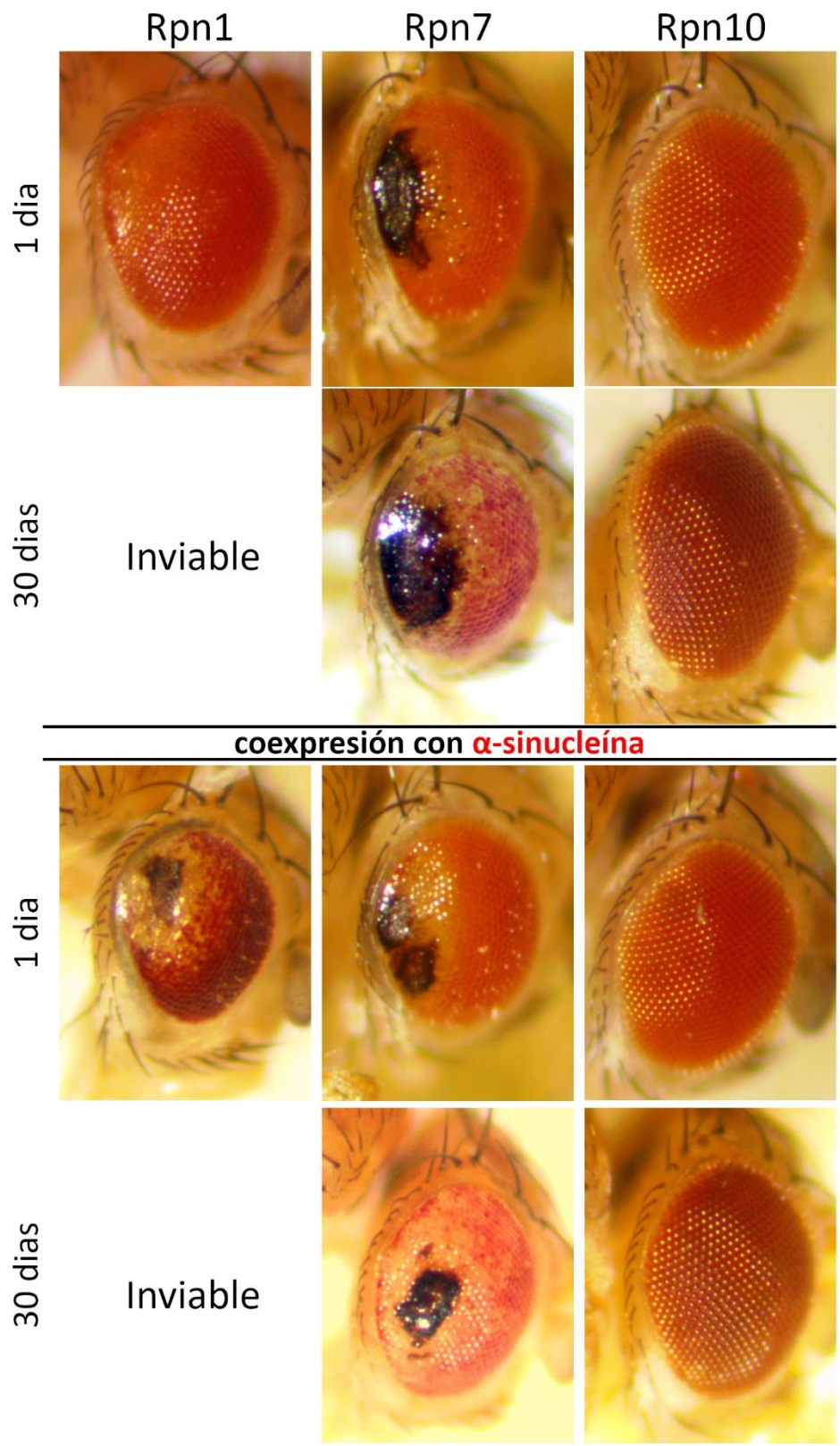


Figura 14. Reducción en el ojo de subunidades regulatorias sin actividad ATPasa. Comparación en los fenotipos de despigmentación y necrosis, a 1 y 30 día de edad, y en presencia de α -sinucleína de las subunidades Rpn1, Rpn7 y Rpn10

En la tabla 3 se resumen la penetrancia del fenotipo observado al disminuir las distintas subunidades del proteasoma 26S en el ojo. Además, se muestra el grado de severidad (expresividad) de los distintos fenotipos distinguibles asociados a la neurodegeneración, así como su interacción genética con α -sinucleína.

	Subunidad	Individuos (n)	Penetrancia	Necrosis	Despigmentación	Aumento con la edad	Interacción genética con SNCA
20S	α3	93	0 %	No	No	Si	No
	α4	100	0 %	No	No	No	No
	α5	39	100 %	++	++	Si	No
	α7	100	100 %	+	+	Si	No
	β1	10	100 %	+++	+++	Letal	Disminuye
	β5	100	100 %	+	++	Si	No
	β6	12	25 %	++	++	Letal	No
19S	Rpt2	31	100 %	++	++	Letal	Aumenta
	Rpt3	100	0 %	No	No	No	No
	Rpt5	100	100 %	+	++	Si	No
	Rpn1	100	100 %	+	++	Letal	Aumenta
	Rpn7	81	100 %	+	++	Si	No
	Rpn10	100	0 %	No	No	No	No

Tabla 3. Penetrancia y expresividad de la morfología externa del ojo. * (signo + es fenotipo leve; ++ es fenotipo moderado; +++ es fenotipo severo)

Cuando se expresó α -sinucleína y se disminuyó la subunidad reguladora Rpt2 se observó un aumento en el fenotipo neurodegenerativo al presentar una mayor área de necrosis y despigmentación a 1 día de edad en comparación cuando solo se disminuyó la subunidad Rpt2. Incluso se llegaron a formar en algunos individuos una secreción que rodea al área necrosada a la cual llamamos coloquialmente “lagaña” (Figura 15). Lo que demuestra que α -sinucleína y la subunidad Rpt2 están interaccionando genéticamente. Por esta razón se decidió caracterizar la participación de la subunidad Rpt2 en la aparición de los síntomas motrices y no motrices relacionados a la EP.



Figura 15. Fenotipo tipo "lagaña". Disminución de la subunidad Rpt2 y expresión de SNCA en el ojo de Drosophila de 1 día de edad.

Defectos en la locomoción en larvas causada por la disminución de distintas subunidades del proteasoma

Los problemas motrices son los síntomas más característicos de la EP y son causados por el deterioro de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* (Olanow y Tatton 1999). Se ha reportado que la expresión de α -sinucleína en neuronas dopaminérgicas genera defectos locomotrices tanto en larvas como en adultos de *Drosophila* y correlaciona con la pérdida de neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso (Yin et al. 2014; Varga et al. 2014), lo que permite tener un modelo que recapitula algunos de los síntomas característicos de la EP.

Uno de los métodos más rápidos que se utiliza para analizar la capacidad de locomoción en *Drosophila*, consiste en cuantificar la velocidad de movimiento de las larvas. En este trabajo se colocaron individualmente larvas de tercer instar sobre una caja de Petri con agar sobre una hoja cuadrículada por 0.2 cm² y se cuantificaron las líneas que cruzó cada individuo durante un minuto. La distancia en promedio reportada para larvas de tipo silvestres de tercer instar es de 13 líneas cruzadas, lo que equivale a ~ 3 cm/min de manera espontánea en presencia de luz (Nichols, Becnel, y Pandey 2012).

Se expresaron de manera independiente los 13 distintos RNAi para las distintas subunidades del proteasoma 26S en todo el sistema nervioso de la mosca utilizando el "driver" de Elav-Gal4. El genotipo control (ELAV-Gal4/+) cruzó 7 líneas en 1 minuto (Figura 16). La reducción de las subunidades del proteasoma 26S generaron la disminución de funcionalidad motriz en larvas de tercer instar expresando los RNAi de manera panneural. El grado de daño de menor a mayor entre las subunidades del proteasoma que se cuantificó fue el siguiente: $\alpha 4 < \text{Rpn}10 < \text{Rpt}3 < \beta 6 < \text{Rpt}2 < \alpha 5 < \beta 5 < \alpha 7 < \text{Rpn}1 < \text{Rpn}7$. Solamente la reducción de la subunidad $\alpha 3$ no presentó diferencia significativa con respecto al control.

Hasta el momento, no se ha reportado si existe una letalidad al disminuir los niveles de expresión de las distintas subunidades del proteasoma en el sistema nervioso de *Drosophila*, excepto por dos reportes de las subunidades Rpn8 y Rpn11, los cuales presentan letalidad en el estadio de pupa y larva respectivamente (www.flybase.org).

La reducción de las subunidades $\alpha 7$, $\beta 1$, $\beta 5$, Rpt2, Rpt5 y Rpn1 de manera panneural generó letalidad en pupa. La reducción de las subunidades $\alpha 5$ y Rpn7 generó letalidad en larvas de 3er instar. La reducción de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 6$, Rpt3 y Rpn10 no generó ningún efecto de letalidad, llegaron a desarrollarse hasta adultos (Tabla 4).

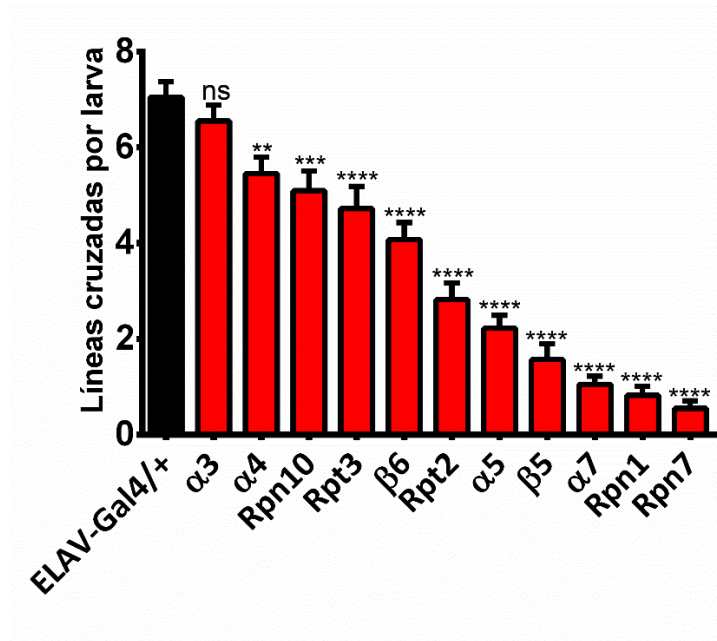


Figura 16. Ensayos de locomoción en larvas de tercer instar. Larvas de tercer instar con la expresión de RNAi contra las distintas subunidades del proteasoma de manera panneuronal usando el “driver” Ealv-Gal4. El control que se utilizó fue ELAV-Gal4/+ que cruzaron en promedio 7 líneas en un minuto. Para todos los ensayos n = 40 larvas y se graficó la media con el error estándar. Se realizó un ANOVA de un factor ajustada con una prueba de Dunnett para comparar con respecto al control.

	Subunidad	Letalidad ELAV-Gal4
20S	$\alpha 3$	No
	$\alpha 4$	No
	$\alpha 5$	3er instar
	$\alpha 7$	Pupa
	$\beta 1$	Pupa
	$\beta 5$	Pupa
	$\beta 6$	No
19S	Rpt2	Pupa
	Rpt3	No
	Rpt5	Pupa
	Rpn1	Pupa
	Rpn7	3er instar
	Rpn10	No

Tabla 4. Viabilidad de *Drosophila* al disminuir subunidades del proteasoma en todo el sistema nervioso.

Cuantificación de la subunidad Rpt2 y de la ubiquitina al disminuir Rpt2 en adultos de manera panneural.

La expresión del RNAi contra Rpt2 en todo el sistema nervioso de la mosca utilizando el *driver* Elav-Gal4 causó letalidad durante el desarrollo. Utilizando a la tubulina-Gal80^{ts}, un represor genético termosensible de Gal4 expresado en todo el organismo, fue posible reprimir la expresión del RNAi-Rpt2 durante el desarrollo de la mosca mientras se mantuviera a 18°C. Una vez alcanzada su etapa adulta, se pasaron los individuos a una incubadora a 28°C para inducir la expresión del RNAi-Rpt2 en todo el sistema nervioso (Figura 17).

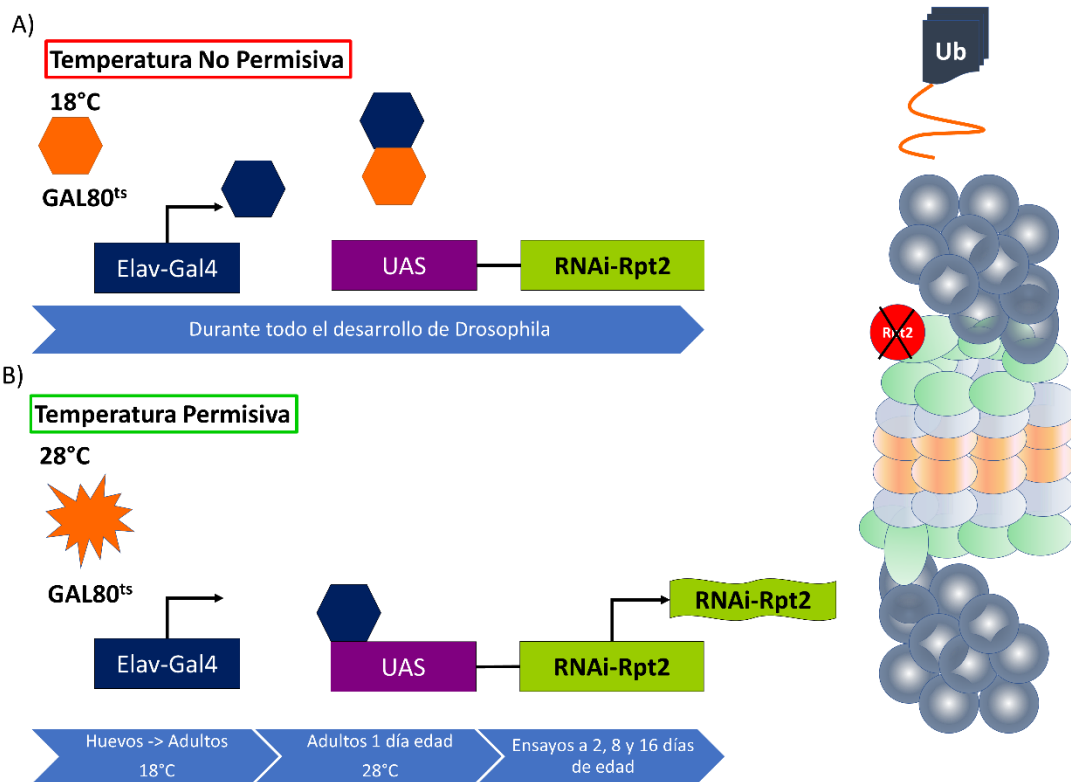


Figura 17. Sistema termosensible Gal4-UAS acoplado con Gal80^{ts}. A) A la temperatura permisiva de 18°C se mantiene estable al factor Gal80^{ts}, el cual reconoce y se une al factor transcripcional Gal4, impidiendo así la transcripción del gen que se encuentra río debajo de la secuencia UAS. B) Una vez que se cambian los individuos a la temperatura no permisiva de 28°C el factor Gal80^{ts} se desnaturaliza, liberando al Gal4 y permitiendo la transcripción del RNAi.

La disminución de Rpt2 en todo el sistema nervioso mediante un RNAi al mantener a los individuos a 28°C durante 48 horas fue suficiente para causar una disminución significativa ($p < 0.001$) (Figura 18A). La relación en la cantidad de proteasoma 26S con respecto al 20S utilizando el anticuerpo anti- $\alpha+\beta$, no cambia de manera significativa al reducir la expresión de Rpt2 en el gel nativo, aunque se observa una tendencia hacia una menor cantidad del proteasoma 26S (Figura 18B). Al analizar de manera independiente la cantidad del proteasoma 26S y 20S con los anticuerpos anti- $\alpha+\beta$ y anti-Rpt2 en el gel nativo, se observó un aumento significativo del proteasoma 26S en los individuos con Rpt2 disminuida ($p < 0.05$) (Figura 18C).

Se cuantificó la cantidad de proteínas ubiquitinadas en extractos totales de proteína proveniente de cabezas de *Drosophila* adulta para determinar la funcionalidad del proteasoma 26S. La disminución de Rpt2 en el sistema nervioso causó un aumento en la acumulación de proteínas ubiquitinadas de alto peso molecular ($p < 0.001$) (Figura 18D). Posteriormente se analizó la cantidad de proteínas ubiquitinadas insolubles como indicador de la desregulación funcional del proteasoma 26S. Cuando se analizó por separado la cantidad de proteínas ubiquitinadas correspondientes a la fracción insoluble con respecto a la soluble, se observó un aumento significativo en la cantidad de proteínas ubiquitinadas provenientes de la fracción insoluble ($p < 0.01$) (Figura 18 E, F y G). Estas evidencias sugieren una disfunción o desregulación del proteasoma 26S.

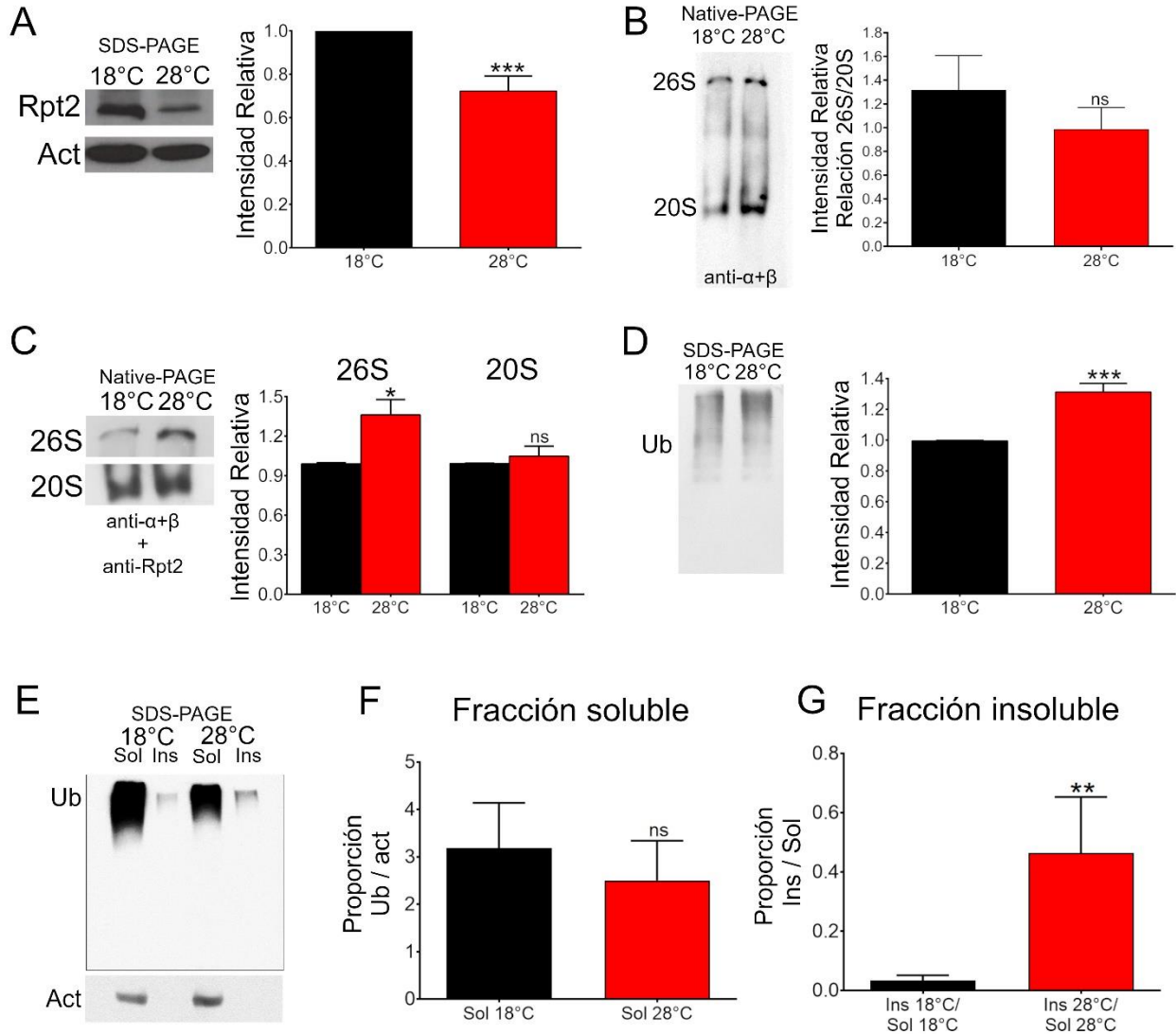


Figura 18. Western Blots de cerebros con Rpt2 disminuida. A 18°C se reprime la expresión del RNAi-Rpt2 y a 28° se induce la expresión del RNAi-Rpt2. **A)** Identificación y cuantificación de Rpt2 mediante SDS-PAGE y un anticuerpo anti-Rpt2, como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-actina. **B)** Identificación y cuantificación del proteasoma 26S y 20S mediante un gel nativo y utilizando el anticuerpo anti- $\alpha+\beta$. **C)** Caracterización del proteasoma 26S y 20S mediante un gel nativo y utilizando el anticuerpo anti-Rpt2 para identificar al 26S y un anticuerpo anti $\alpha+\beta$ para identificar al 20S. **D)** Identificación y cuantificación de proteínas ubiquitinadas mediante SDS-PAGE y el anticuerpo anti-Ubiquitina. **E)** Identificación de fracciones insolubles y solubles mediante SDS-PAGE y un anticuerpo anti-ubiquitina, como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-actina. **F)** Comparación de la cantidad de proteínas ubiquitinadas de la fracción soluble. **G)** Comparación de la cantidad de proteínas ubiquitinadas de la fracción insoluble con respecto a la fracción soluble. Cada panel posee su densitometría que muestra la media con el error estándar, N >3, se realizaron pruebas de t, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

Expresión de α -sinucleína y el RNAi contra la subunidad Rpt2 bajo el promotor de la tirosina hidroxilasa

La EP se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas y la acumulación de agregados proteicos en la *sustancia nigra pars compacta*. La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima que convierte la tirosina a L-DOPA, y es el paso limitante para la síntesis de dopamina dentro de las neuronas dopaminérgicas. Se dirigió la expresión del RNAi contra la subunidad del proteasoma Rpt2 en las neuronas dopaminérgicas de *Drosophila* utilizando el promotor de la TH. La reducción de Rpt2 en el patrón de TH causó letalidad en larvas de segundo estadio, debido a que en insectos la dopamina es utilizada para el endurecimiento de la cutícula, un fenómeno conocido como esclerotización, que es requerido para el crecimiento del organismo en sus etapas larvárias. Para evitar este efecto se utilizó el sistema Tubulina-Gal80^{ts} para controlar de manera temporal la expresión del RNAi contra Rpt2 de manera que se expresara solo en adultos a partir de 1 día de edad. La α -sinucleína humana que se utilizó (SNCA.J) es una versión que posee codones optimizados para su traducción y se expresó por separado y en conjunto con el RNAi contra Rpt2 usando el *driver* TH-Gal4.

Curva de supervivencia

La curva de supervivencia entre los distintos grupos se realizó partiendo de 200 machos para cada genotipo a una temperatura constante de 28°C. Se cuantificó el número de moscas muertas cada 3 días. Se realizó un análisis de la mediana de supervivencia, que es un parámetro que mide el tiempo en el cual la mitad de los individuos con una condición todavía permanecen vivos. Los individuos controles (Tubulina-Gal80^{ts}/+; TH-Gal4/+) poseen una vida máxima de 45 días y una mediana de supervivencia de 27 días. De manera similar, los individuos con la expresión de α -sinucleína (Tubulina-Gal80^{ts}/UAS-SNCA.J; TH-Gal4/+) poseen una vida máxima de 48 días y una mediana de supervivencia de 27 días. Entre estas dos condiciones no se observaron diferencias significativas.

Los individuos con la expresión del RNAi contra Rpt2 (Tubulina-Gal80^{ts}/+; TH-Gal4/UAS-RNAi-Rpt2) presentaron una vida máxima de 21 días y una mediana de supervivencia de 18 días. Los individuos con la condición doble, expresión de α -sinucleína y el RNAi contra Rpt2 (Tubulina-Gal80^{ts}/UAS-SNCA.J; TH-Gal4/UAS-RNAi-Rpt2), también presentaron una vida máxima de 21 días, pero su mediana de supervivencia fue de 15 días, lo cual fue significativamente menor con respecto a la sola expresión del RNAi contra Rpt2 (Figura 19).

A partir de los datos obtenidos en la curva de supervivencia se decidió analizar los fenotipos motores, no motores y celulares de las 4 condiciones tomando 3 puntos diferentes en las edades (2, 8 y 16 días) basados en la vida máxima de la condición doble.

Curva de supervivencia

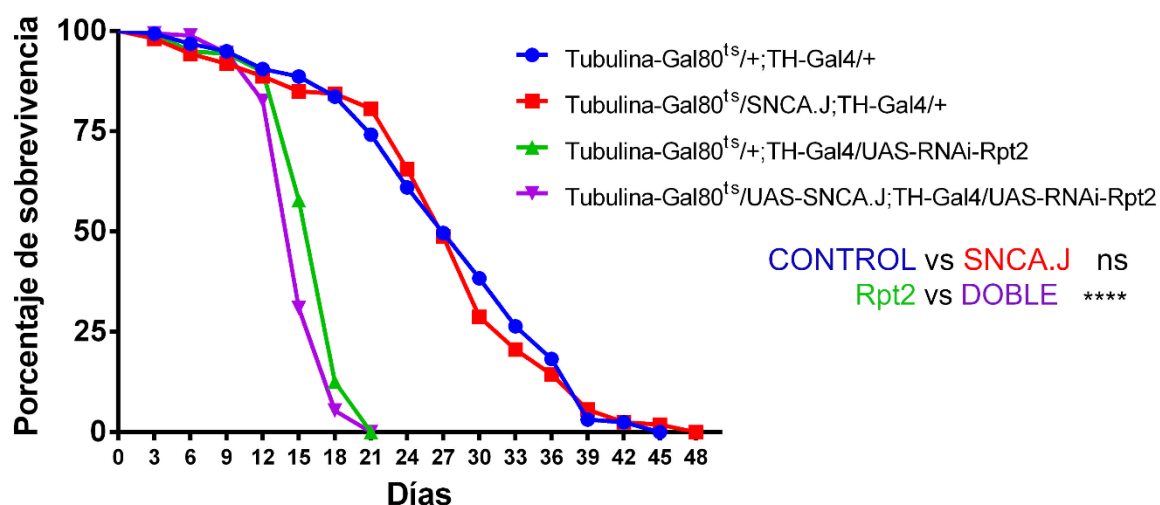


Figura 19. Curva supervivencia en días. Se utilizaron 200 machos y se mantuvieron a 28°C. Prueba estadística de Long-Rank (Mantel-Cox).

Colocalización de neuronas dopaminérgicas utilizando el promotor TH y el anticuerpo anti-TH

Se expresó la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando el *driver* de TH-Gal4 y se realizó una inmunotinción contra la enzima de TH en protocerebros de adultos de *Drosophila* para visualizar los grupos neuronales en que colocalizan (Figura 20). Se corroboró que el *driver* de TH-Gal4 es capaz de dirigir la expresión de GFP en la mayoría de los grupos dopaminérgico excepto en el grupo *Medial Anterior del Protocerebro (PAM)*, tal como se ha reportado.

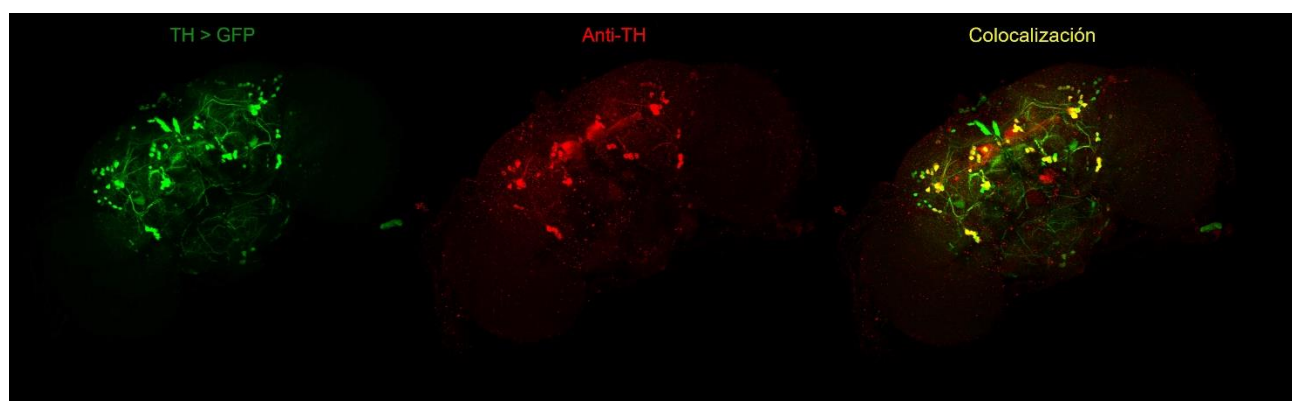


Figura 20. Proyección de imágenes confocales de cerebro de adulto de 1 día de edad. En canal verde la expresión de GFP usando el *driver* TH-Gal4, en canal rojo la inmunotinción anti-TH y en amarillo la colocalización de ambos componentes. Las neuronas que se ubican en la parte medial anterior del protocerebro corresponden al grupo PAM, las cuales solo se observan al realizar la inmunotinción contra TH.

Expresión de la GFP en neuronas dopaminérgicas de manera espacio-temporal

Se realizó la expresión de la GFP en las neuronas dopaminérgicas de mosca adulta utilizando el *driver* TH-Gal4 de manera temporal al utilizar Tubulina-Gal80^{ts} para corroborar que el sistema Gal80^{ts}-Gal4 funcionara. Se disecaron 6 cerebros de machos adultos de 8 días de edad que estuvieron desde 1 día de edad en la temperatura permisiva de 28°C. Todos los cerebros disecados mostraron expresión de GFP en las neuronas dopaminérgicas (Figura 21). Por el contrario, la progenie que se dejó crecer en la temperatura no permisiva de 18°C no mostró la presencia de GFP.

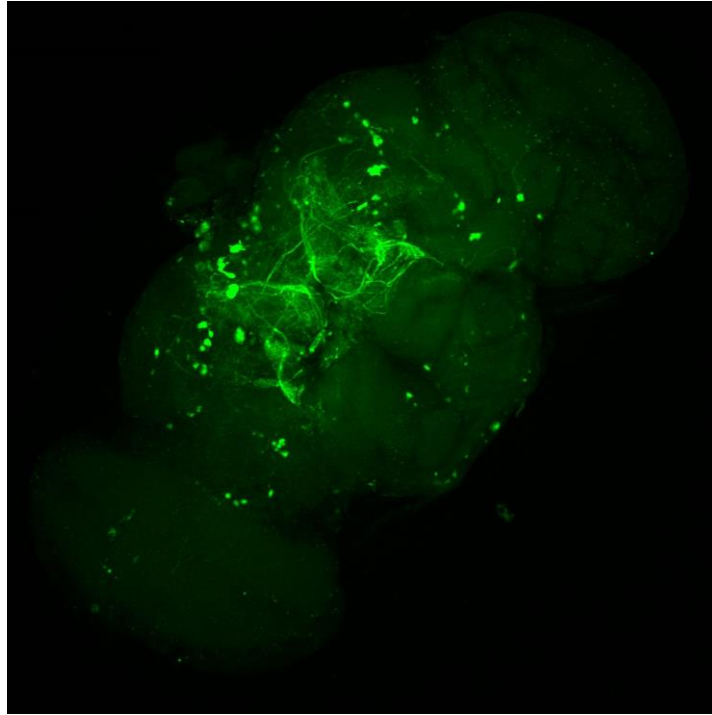


Figura 21. Proyección en z de imágenes obtenidas por microscopía confocal representativa de cerebro de adulto de 8 días de edad. Se observa la expresión de GFP en neuronas dopaminérgicas al mantener a 28°C moscas con el genotipo *Tubulina-Gal80/UAS-GFP; TH-Gal4/+*.

Cuantificación neuronal de grupos dopaminérgicos

El protocerebro de *Drosophila* posee 8 grupos distinguibles de neuronas dopaminérgicas con base en su posición anatómica. En la mayoría de los estudios de neurodegeneración en el modelo de *Drosophila* se enfocan en el estudio de cinco principales grupos (Figura 22). Por lo tanto, los grupos dopaminérgicos que se analizaron fueron: *Lateral Posterior del Protocerebro 1 y 2 (PPL1 y PPL2)*, *Medial Posterior del Protocerebro 1 y 2 (PPM1/2)*, *Medial Posterior del Protocerebro 3 (PPM3)* y *Lateral Anterior del Protocerebro (PAL)* (Figura 22).

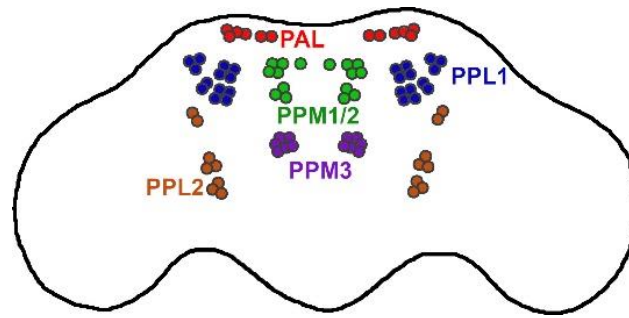


Figura 22. Esquema de la distribución simétrica de los grupos dopaminérgicos analizados en el protocerebro del adulto de *Drosophila*. Azul: Lateral Posterior del Protocerebro 1 (PPL1), Naranja: Lateral Posterior del Protocerebro 2 (PPL2) Verde: Medial Posterior del Protocerebro 1 y 2 (PPM1/2), Morado: Medial Posterior del Protocerebro 3 (PPM3) y Rojo: Lateral Anterior del Protocerebro (PAL).

Con base en el tiempo de vida máxima de las moscas que expresaron α -sinucleína y con la disminución de la subunidad Rpt2, que fue de 21 días de edad, se disecaron cerebros a 2, 8 y 16 de edad en los cuatro genotipos y se les realizó una inmunotinción anti-TH (Figura 23). Se cuantificaron las neuronas de los grupos dopaminérgicos de interés.

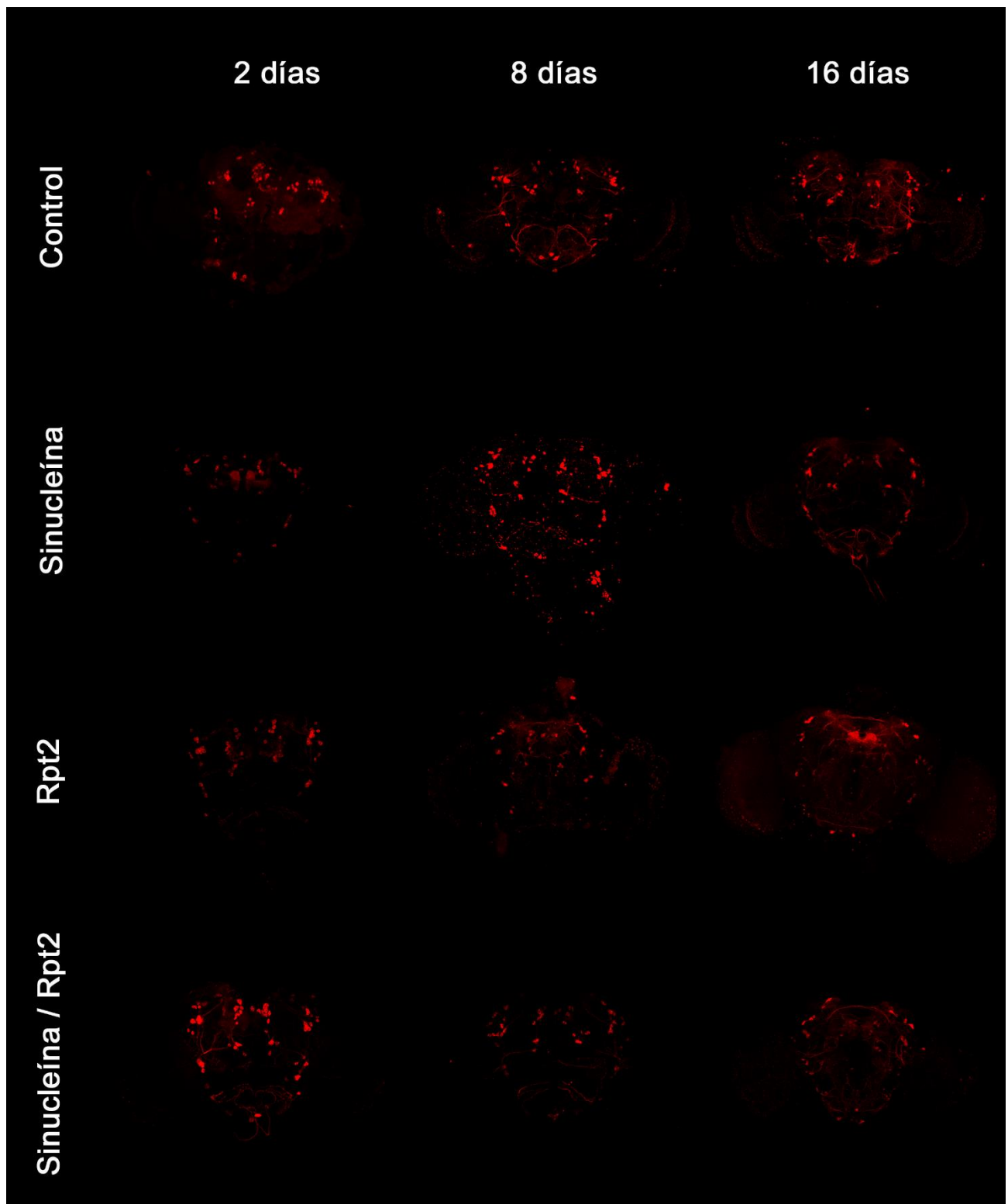


Figura 23. Proyecciones en Z de imágenes obtenidas por microscopía confocal de inmunotinciones utilizando anti-TH en protocerebros. Disección de cerebros de individuos de 2, 8 y 16 días de edad a los que se les realizó una inmunotinción usando el anticuerpo anti-TH.

A pesar de que la cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas del grupo *PPL1* mostró variabilidad a los 2 días edad, la disminución de Rpt2 causó la disminución significativa de neuronas dopaminérgicas desde los 8 hasta los 16 días de edad con respecto al control. La expresión de α -sinucleína o la condición doble no causó disminución de neuronas dopaminérgicas del grupo *PPL1* (Figura 24).

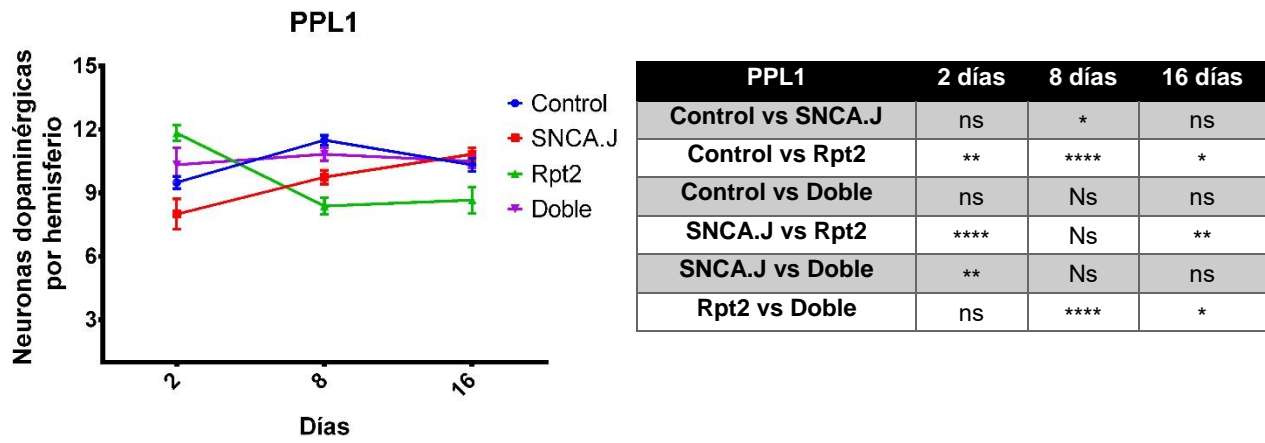


Figura 24. Cuantificación del número de neuronas de los grupos dopaminérgicos *PPL1*. Se disecaron 6 cerebros y se cuantificaron ambos hemisferios, dando así una $n = 12$. La gráfica muestra la media con el error estándar. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

El número de neuronas del grupo dopaminérgico *PPL2* no mostró diferencias significativas entre el control con respecto a la expresión de α -sinucleína, la expresión del RNAi contra Rpt2 y la condición doble. Sin embargo, la disminución de Rpt2 muestra una tendencia a causar neurodegeneración del grupo *PPL2* (Figura 25).

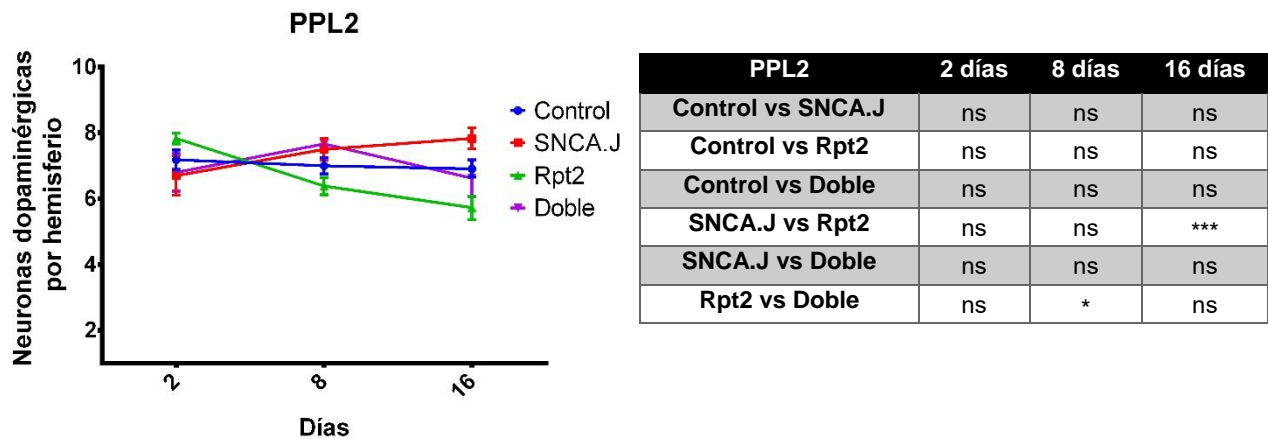
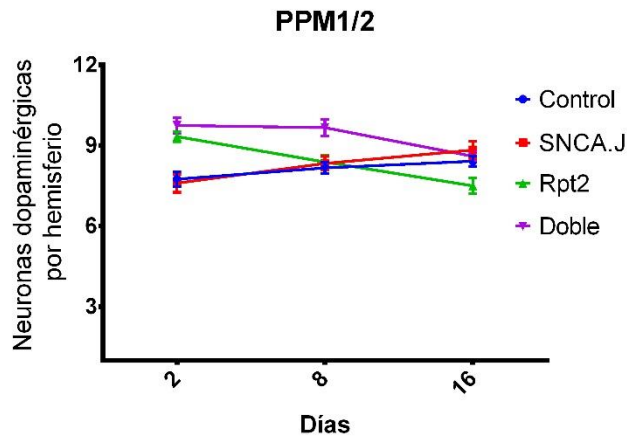


Figura 25. Cuantificación del número de neuronas de los grupos dopaminérgicos *PPL2*. Se disecaron 6 cerebros y se cuantificaron ambos hemisferios, dando así una $n = 12$. La gráfica muestra la media con el error estándar. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

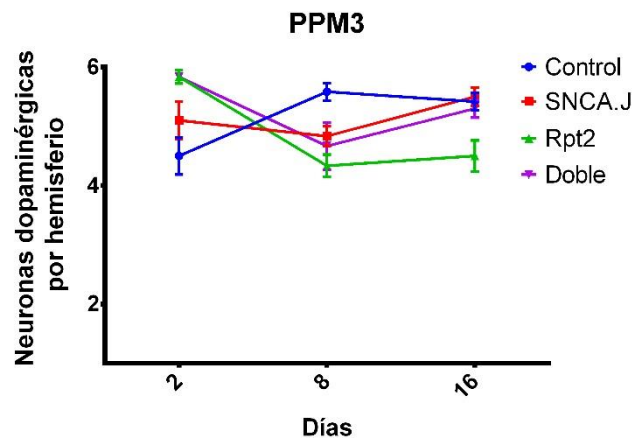
El número de neuronas del grupo *PPM1/2* no difiere entre los individuos control y los individuos con la expresión de α -sinucleína. El número de neuronas entre los individuos con la subunidad Rpt2 disminuida y los individuos con la condición doble es significativamente diferente entre ellos, desde los 8 hasta los 16 días de edad, pero no son diferentes con respecto al control. La disminución del número de neuronas se observa cuando se expresa el RNAi contra Rpt2 y tiende a ser diferente con respecto al control (Figura 26).



PPM1/2	2 días	8 días	16 días
Control vs SNCA.J	ns	ns	ns
Control vs Rpt2	***	ns	ns
Control vs Doble	****	***	ns
SNCA.J vs Rpt2	****	ns	**
SNCA.J vs Doble	****	**	ns
Rpt2 vs Doble	ns	**	*

Figura 26. Cuantificación del número de neuronas de los grupos dopaminérgicos PPM1/2. Se diseccionaron 6 cerebros y se cuantificaron ambos hemisferios, dando así una n = 12. La gráfica muestra la media con el error estándar. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

La disminución de la subunidad Rpt2 causó la pérdida de neuronas dopaminérgicas del grupo PPM3 y es significativamente menor con respecto al control desde los 8 hasta los 16 días de edad. La expresión de α -sinucleína no causó la disminución de neuronas, así como la condición doble no mostró diferencia entre el número de neuronas a los 16 días de edad (Figura 27).



PPM1/2	2 días	8 días	16 días
Control vs SNCA.J	ns	ns	ns
Control vs Rpt2	***	****	*
Control vs Doble	***	*	ns
SNCA.J vs Rpt2	ns	ns	**
SNCA.J vs Doble	ns	ns	ns
Rpt2 vs Doble	ns	ns	ns

Figura 27. Cuantificación del número de neuronas de los grupos dopaminérgicos PPM3. Se diseccionaron 6 cerebros y se cuantificaron ambos hemisferios, dando así una n = 12. La gráfica muestra la media con el error estándar. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

El número de neuronas del grupo PAL no mostró la pérdida de neuronas bajo ninguna condición (Figura 28).

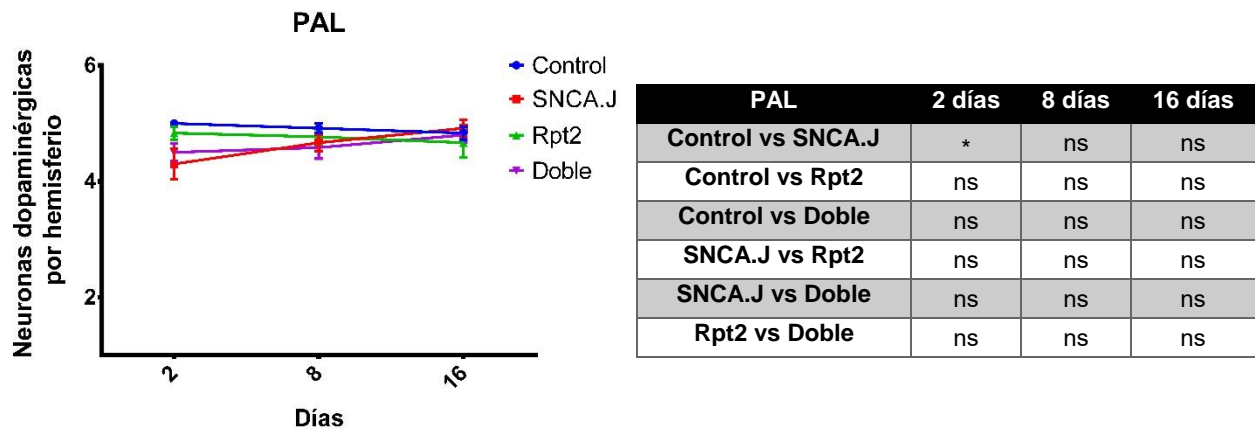
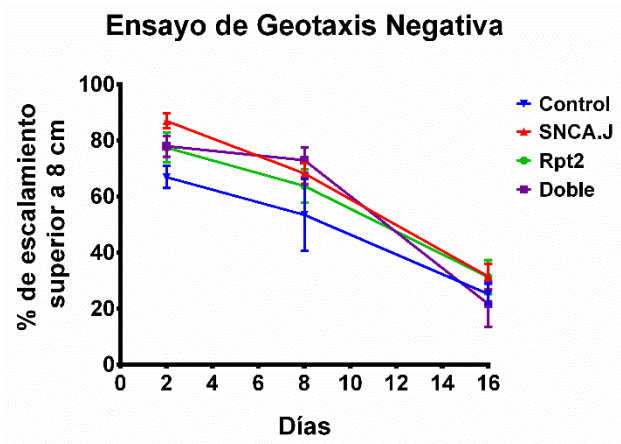


Figura 28. Cuantificación del número de neuronas de los grupos dopaminérgicos PAL. Se disecaron 6 cerebros y se cuantificaron ambos hemisferios, dando así una n = 12. La gráfica muestra la media con el error estándar. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey

En resumen, la disminución de Rpt2 en neuronas dopaminérgicas causó neurodegeneración en los grupos *PPL1* y *PPM3*. En los grupos *PPL2* y *PPM1/2* se observó una tendencia de pérdida de neuronas, y en el grupo *PAL* no se observó neurodegeneración. La expresión de α -sinucleína no causó neurodegeneración, interesantemente tampoco se observó en la condición doble, lo que sugiere una posible interacción genética entre Rpt2 y α -sinucleína, donde α -sinucleína podría retrasar el efecto de neurodegenerativo en las neuronas dopaminérgicas causado por Rpt2.

Locomoción inducida mediante ensayos de geotaxis negativa

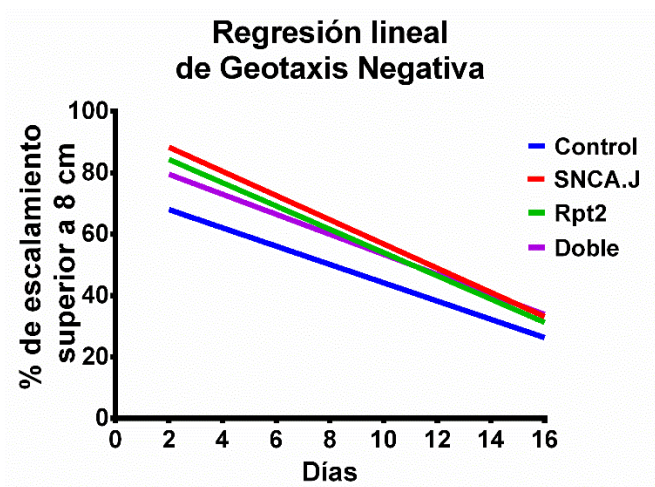
El síntoma más característico en la EP es la pérdida del control del movimiento, y para evaluarlo en el modelo se utilizó una prueba de actividad inducida conocida como geotaxis negativa, en la cual se cuantifica el porcentaje de un grupo de 10 moscas que logran escalar ocho centímetros en diez segundos después de realizar un pequeño golpe del vial sobre una superficie, repitiendo el procedimiento diez veces (n > 50). Se realizó el ensayo de geotaxis negativa a los 2, 8 y 16 días de edad y se observó que la capacidad de escalamiento de los individuos se reduce conforme envejecen, como se ha reportado anteriormente. Solamente se observó una mayor capacidad de locomoción en los individuos que expresaron α -sinucleína en comparación con el control a los 2 días de edad (Figura 29). La disminución de Rpt2 no causó problemas motrices en la actividad inducida.



	2 días	8 días	16 días
Control vs SNCA.J	*	ns	ns
Control vs Rpt2	ns	ns	ns
Control vs Doble	ns	ns	ns
SNCA.J vs Rpt2	ns	ns	ns
SNCA.J vs Doble	ns	ns	ns
Rpt2 vs Doble	ns	ns	ns

Figura 29. Actividad inducida por ensayo de geotaxis negativa. Se realizaron ensayos a 2, 8 y 16 días de edad, se graficó la media con el error estándar, n > 50. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey

Debido a que el decaimiento en la geotaxis negativa podría estar más pronunciadas en los individuos experimentales se realizó una regresión lineal tomando los 3 puntos de edad evaluados (2, 8 y 16), para comparar el decaimiento en la actividad inducida (Figura 30). Mediante un análisis de comparación entre las pendientes no se identificaron diferencias significativas. A los dos días de edad se observó que los individuos experimentales presentaron mejor rendimiento que el control en la prueba de geotaxis negativa, que podría sugerir una tendencia de mayor actividad. Se realizó un análisis de comparación en el punto de intercepción en Y de las rectas para identificar diferencias en su capacidad de escalamiento inicial, la cual no mostró diferencias significativas.



	Pendiente (media)	Intercepción en Y (media)
Control vs SNCA.J	ns	ns
Control vs Rpt2	ns	ns
Control vs Doble	ns	ns
SNCA.J vs Rpt2	ns	ns
SNCA.J vs Doble	ns	ns
Rpt2 vs Doble	ns	ns

Figura 30. Regresión lineal de la locomoción inducida. Se realizó una regresión lineal usando los días 2, 8 y 16 en los que se realizó el ensayo. Control ($Y = -2.979 \cdot X + 73.99$), SNCA.J ($Y = -3.941 \cdot X + 96.24$), Rpt2 ($Y = -3.791 \cdot X + 91.93$), Doble ($Y = -3.262 \cdot X + 86.06$). Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

Locomoción espontánea mediante el monitor de actividad: “Trikinetics”

Los ensayos de locomoción espontánea permitieron analizar la cantidad de actividad por individuo que se mantienen en tubos individuales durante varios días consecutivos. Se registraron su actividad durante días de manera automatizada empleando el Monitor de Actividad para *Drosophila* “Trikinetics”. Se registró la actividad espontánea en tres periodos de su vida: 3 a 5 (juveniles), 8 a 10 (mediana edad) y 15 a 17 (seniles). Los datos obtenidos se graficaron en actogramas mostrando el número de veces que atravesaron las moscas el tubo de un lado a otro, generando los dos picos de actividad típicos en un ciclo de 24 horas (Figura 31). Se separó el registro de actividad del día y de la noche para detallar el análisis del comportamiento, y se compararon los genotipos de la misma edad para detectar diferencias significativas entre ellas.

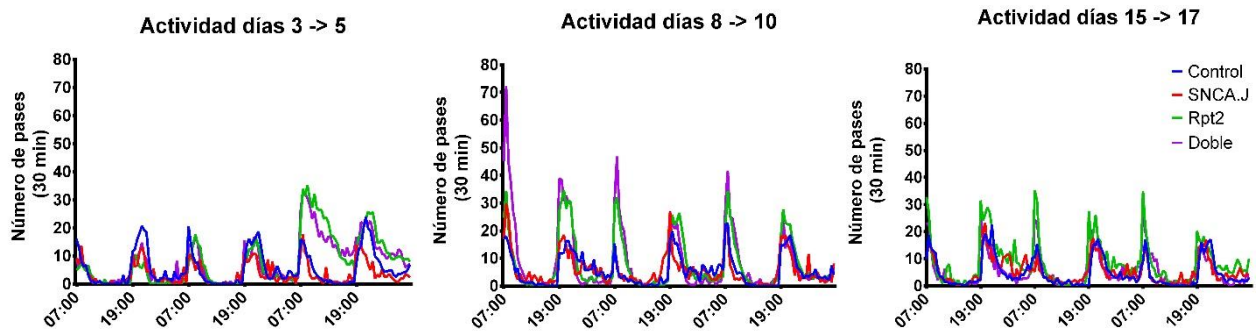
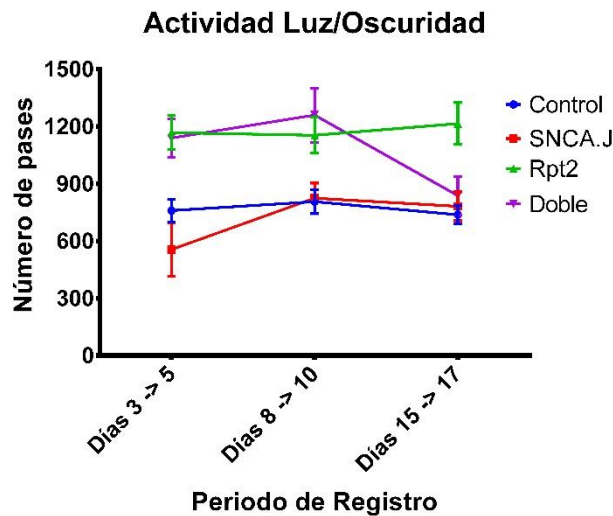


Figura 31. Actogramas de actividad espontánea usando el monitor de actividad “Trikinetics”. Datos agrupados en número de pases cada 30 minutos. Los periodos de registro se realizaron de: 3 a 5, 8 a 10 y 15 a 17. La gráfica muestra la media, N > 16.

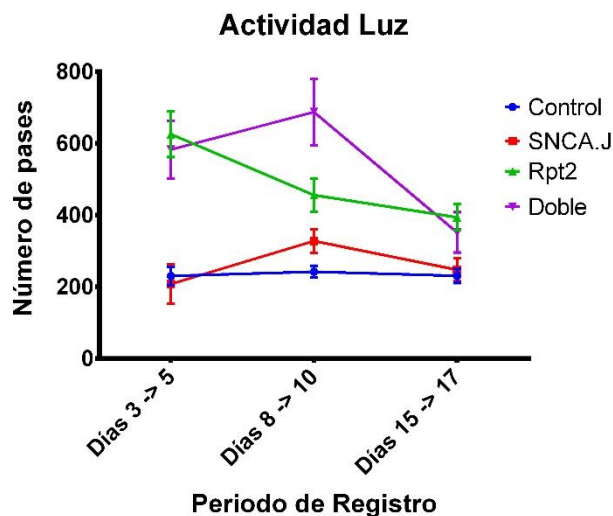
Al analizar el periodo de luz/oscuridad se encontró que la disminución de Rpt2 en neuronas dopaminérgicas causa hiperactividad que se mantiene a lo largo de su vida (Figura 32). Con la disminución de Rpt2 y la expresión de α -sinucleína los individuos seniles pierden la hiperactividad. La actividad de los individuos con la sola expresión de α -sinucleína no difiere significativamente con respecto a los individuos control a lo largo de los periodos registrados.



Luz/Oscuridad	3 a 5	8 a 10	15 a 17
Control vs SNCA.J	ns	ns	ns
Control vs Rpt2	*	*	**
Control vs Doble	*	**	ns
SNCA.J vs Rpt2	****	*	*
SNCA.J vs Doble	***	**	ns
Rpt2 vs Doble	ns	ns	ns

Figura 32. Actividad espontánea en ciclos de Luz/Oscuridad. Se registró el número de veces que los individuos pasaron de un lado a otro en un periodo de 3 días continuos. Los registros se tomaron en tres periodos: de 3 a 5, de 8 a 10 y de 15 a 17 días de edad. La gráfica muestra la media con el error estándar, N > 16. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

Al analizar solo el periodo de luz se encontró que la disminución de Rpt2 causa hiperactividad en etapa juvenil y a medida que envejecen se pierde progresivamente hasta tener una actividad que no difiere con respecto al control (Figura 33). Con la disminución de Rpt2 y la expresión de α -sinucleína los individuos de mediana edad tienen un aumento de hiperactividad significativamente mayor con respecto a los individuos con la disminución de Rpt2, pero en su etapa senil pierden la hiperactividad. Los individuos con la expresión de α -sinucleína no difiere significativamente con respecto a los individuos control.



Luz	3 a 5	8 a 10	15 a 17
Control vs SNCA.J	ns	ns	ns
Control vs Rpt2	****	**	ns
Control vs Doble	****	****	ns
SNCA.J vs Rpt2	****	ns	ns
SNCA.J vs Doble	****	****	ns
Rpt2 vs Doble	ns	**	ns

Figura 33. Actividad espontánea solo en el periodo de Luz. Se registró el número de veces que los individuos pasaron de un lado a otro en un periodo de 3 días continuos. Los registros se tomaron en tres periodos: de 3 a 5, de 8 a 10 y de 15 a 17 días de edad. La gráfica muestra la media con el error estándar, N > 16. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

Al analizar solo el periodo de oscuridad se encontró que la disminución de Rpt2 causó un aumento progresivo de hiperactividad, que solo resultó significativamente mayor en los individuos seniles con respecto al control y a la condición doble (Figura 34). Los individuos con la disminución de Rpt2 y la

expresión de α -sinucleína se mantuvieron igual que los individuos control. Los individuos con la expresión de α -sinucleína solo tienen una menor actividad significativa durante la oscuridad en etapas juveniles con respecto al control.

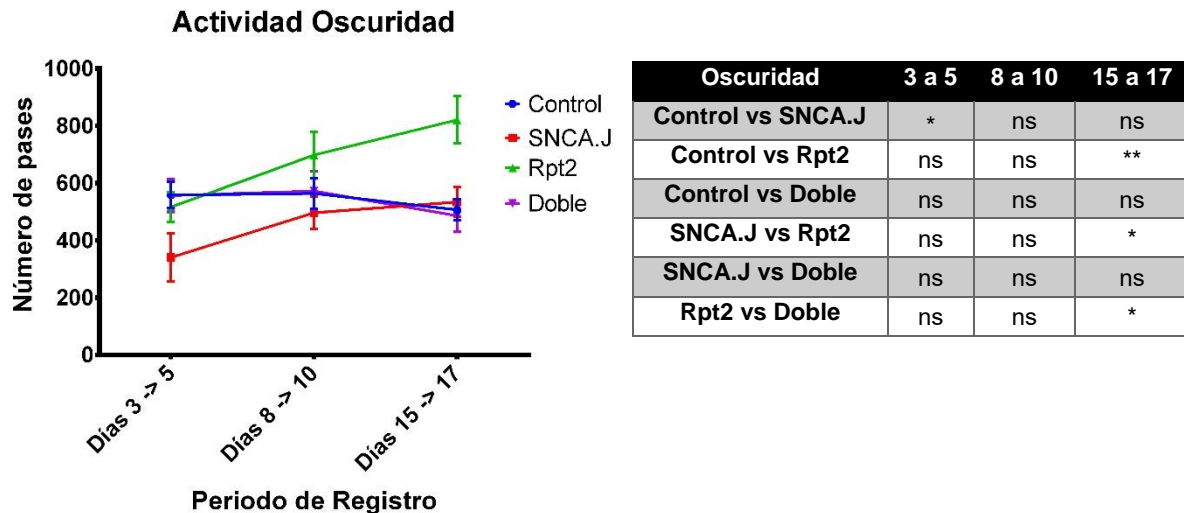


Figura 34. Actividad espontánea en el periodo de oscuridad. Se registró el número de veces que los individuos pasaron de un lado a otro en un periodo de 3 días continuos. Los registros se tomaron en tres periodos: de 3 a 5, de 8 a 10 y de 15 a 17 días de edad. La gráfica muestra la media con el error estándar, N > 16. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

Tomando en cuenta lo anterior, la disminución de Rpt2 causó hiperactividad que permanece hasta la etapa senil, causada por una mayor actividad en etapa juvenil en el periodo de luz y un aumento en la actividad en la etapa senil en el periodo de oscuridad. La expresión de α -sinucleína no generó defectos en el comportamiento con respecto a los individuos control, salvo una menor actividad en la etapa juvenil. Los individuos juveniles y de mediana edad con la condición doble son hiperactivos, posteriormente pierden la hiperactividad sugiriendo una interacción genética entre Rpt2 y α -sinucleína, que parece estabilizar la actividad espontánea en la etapa senil.

Análisis de sueño

Los desórdenes del sueño son un síntoma no motriz común en pacientes con la EP, los cuales se pueden manifestar varios años antes de que los síntomas motrices aparezcan. En *Drosophila*, se ha definido que un periodo de inactividad de 5 minutos es equivalente a un periodo de sueño y la cantidad de sueño se define como el total de estos periodos de 5 minutos de inactividad. Procesando los datos crudos anteriores obtenidos mediante el *Trikinetics*, se obtuvo el tiempo de sueño en los mismos periodos que se analizó la actividad espontánea. Los actogramas de sueño obtenidos mostraron los dos periodos de sueño típicos de *Drosophila* en periodos de 24 horas (Figura 35). Se separó el registro de sueño durante el periodo de luz y oscuridad y se compararon los genotipos de la misma edad para detectar diferencias entre ellas.

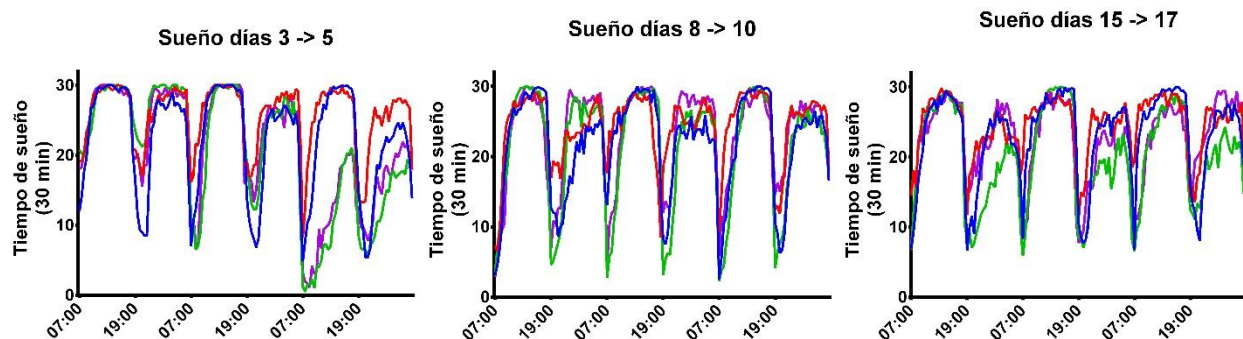


Figura 35. Actogramas de la cantidad de sueño. Los datos se adquirieron utilizando el monitor de actividad *Trikinetics*, posteriormente se procesaron los datos para graficar cantidad de sueño en minutos de sueño por cada 30 minutos de registro. Los periodos de registro se realizaron de: 3 a 5, 8 a 10 y 15 a 17. La gráfica muestra la media, N > 16.

Al analizar el periodo de luz/oscuridad se observó una disminución significativa en la cantidad de sueño en los individuos con la subunidad Rpt2 disminuida en las etapas juveniles y seniles con respecto al control. Los individuos con la expresión de α -sinucleína presentaron un aumento significativo en la cantidad de sueño con respecto al control en todas las edades analizadas. Los individuos con la condición doble no difieren significativamente con respecto al control, pero es significativamente menor en la edad juvenil con respecto a los que solo expresan α -sinucleína, y significativamente mayor con respecto a los que solo tienen Rpt2 disminuida en los individuos de mediana edad y seniles (Figura 36).

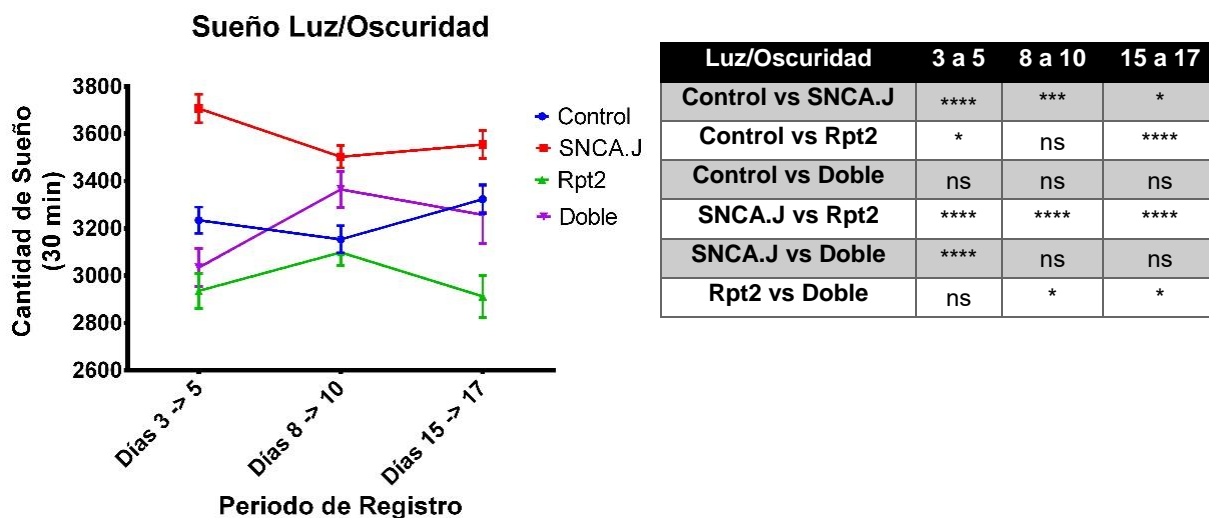
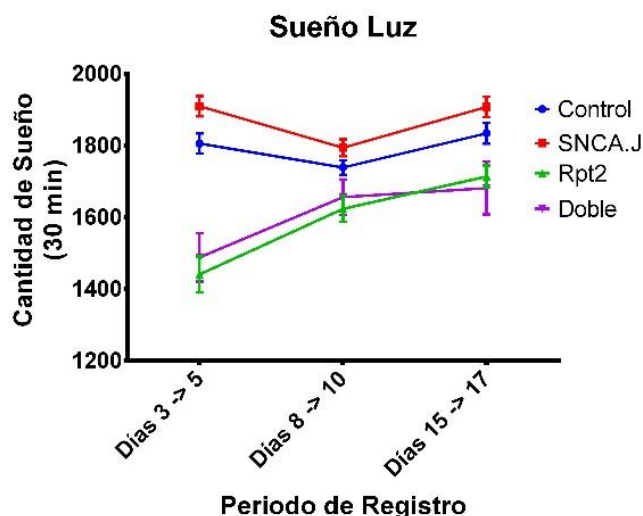


Figura 36. Sueño en el periodo de luz/oscuridad. Se graficó el tiempo de sueño (min). Los registros se tomaron en tres periodos: de 3 a 5, de 8 a 10 y de 15 a 17 días de edad. La gráfica muestra la media con el error estándar, N > 16. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

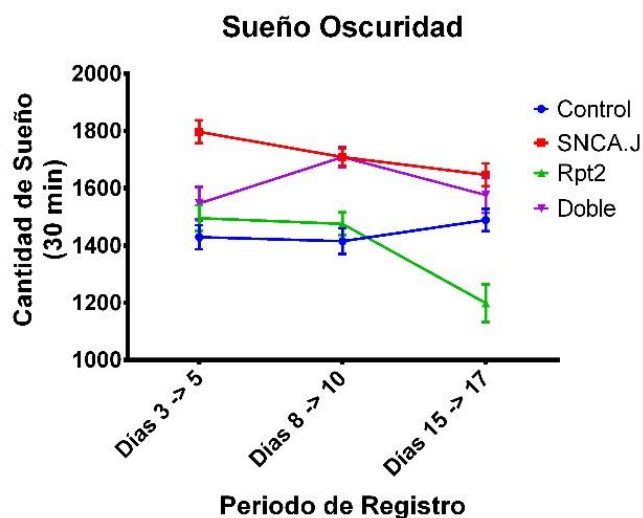
Al analizar solo el periodo de luz, se observó una disminución significativa en la cantidad de sueño en los individuos con la subunidad Rpt2 disminuida solo en la edad juvenil con respecto al control. Los individuos con la expresión de α -sinucleína no presentaron diferencias significativas en la cantidad de sueño con respecto al control en todas las edades analizadas. Los individuos con la condición doble presentaron un comportamiento igual que los individuos con la subunidad Rpt2 disminuida (Figura 37).



Luz	3 a 5	8 a 10	15 a 17
Control vs SNCA.J	ns	ns	ns
Control vs Rpt2	****	ns	ns
Control vs Doble	****	ns	ns
SNCA.J vs Rpt2	****	**	***
SNCA.J vs Doble	****	*	**
Rpt2 vs Doble	ns	ns	ns

Figura 37. Sueño en el periodo de luz. Se graficó el tiempo de sueño (min). Los registros se tomaron en tres periodos: de 3 a 5, de 8 a 10 y de 15 a 17 días de edad. La gráfica muestra la media con el error estándar, N > 16. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

Al analizar solo el periodo de oscuridad, se observó una disminución significativa en la cantidad de sueño en los individuos con la subunidad Rpt2 disminuida solo en la edad senil con respecto al control y a la condición doble. Los individuos con la expresión de α -sinucleína presentaron una mayor cantidad de sueño estadísticamente significativa con respecto al control en todas las edades analizadas, y esta tiende a disminuir progresivamente conforme los individuos envejecen. Los individuos con la condición doble presentaron un aumento significativo en la cantidad de sueño solamente en el periodo correspondiente a la mitad de su vida (Figura 38).



Oscuridad	3 a 5	8 a 10	15 a 17
Control vs SNCA.J	****	****	*
Control vs Rpt2	ns	ns	****
Control vs Doble	ns	****	ns
SNCA.J vs Rpt2	****	***	****
SNCA.J vs Doble	**	ns	ns
Rpt2 vs Doble	ns	**	***

Figura 38. Sueño en el periodo de Oscuridad. Se graficó el tiempo de sueño (min). Los registros se tomaron en tres periodos: de 3 a 5, de 8 a 10 y de 15 a 17 días de edad. La gráfica muestra la media con el error estándar, N > 16. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

En resumen, los datos obtenidos del análisis de la cantidad de sueño mostraron que la disminución de Rpt2 causó disminución en la cantidad de sueño. Interesantemente, la expresión de α -sinucleína causó un aumento en la cantidad de sueño. Ambos efectos implican una desregulación del sueño. En la condición

doble no se presentó un cambio significativo en la cantidad de sueño con respecto al control, sugiriendo la interacción de Rpt2 y α -sinucleína, la cual podría favorecer la estabilización de los periodos de sueño al tener efectos contrarios.

Caracterización específica de individuos con la reducción de Rpt2

Debido a que en este trabajo la expresión de α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de *Drosophila* generó datos aparentemente contradictorios con lo que se ha reportado en la mayoría de los trabajos publicados, se decidió continuar únicamente con la caracterización de fenotipos celulares y conductuales en los individuos con la reducción de Rpt2. Los siguientes experimentos se realizaron en una estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Jorge Campusano en Santiago de Chile, por tal motivo fue necesario demostrar que los fenotipos antes observados se pudieran reproducir en los individuos experimentales en las condiciones del laboratorio del Dr. Campusano.

Repetición de curva de supervivencia

Nuevamente se realizó una curva de supervivencia en los individuos control y los de la subunidad Rpt2 disminuida bajo las mismas condiciones, excepto que la temperatura no permisiva de 18° utilizada anteriormente para evitar la letalidad en larvas, se cambió a 21° por motivos de cambios en la infraestructura. Los individuos con la subunidad Rpt2 disminuida bajo estas condiciones evitaron la letalidad durante el desarrollo y lograron desarrollarse hasta adultos. Se realizó nuevamente una curva de supervivencia bajo las mismas condiciones anteriormente descritas para corroborar que los individuos obtenidos presentaran nuevamente el tiempo de vida media disminuida.

Nuevamente la mediana de supervivencia fue significativamente menor en los individuos con la subunidad del proteasoma Rpt2 disminuida (12 días) en comparación con el control (34 días) (Figura 39). Los datos de la mediana de supervivencia obtenidos de la primera curva fueron de 18 y 27 días, para Rpt2 y el control respectivamente. Las curvas de supervivencia entre los primeros controles y la repetición fueron significativamente diferentes entre ellas, al igual que las curvas de supervivencias de los individuos con Rpt2 disminuida de los primeros individuos y los de la repetición. Se decidió definir como población senil a los individuos con la subunidad Rpt2 de diez días de edad, debido a que en ese punto se encontraban por arriba de su mediana de supervivencia y la alta tasa de muerte no permitió contar con suficiente número de individuos para los experimentos subsecuentes.

Curva de supervivencia

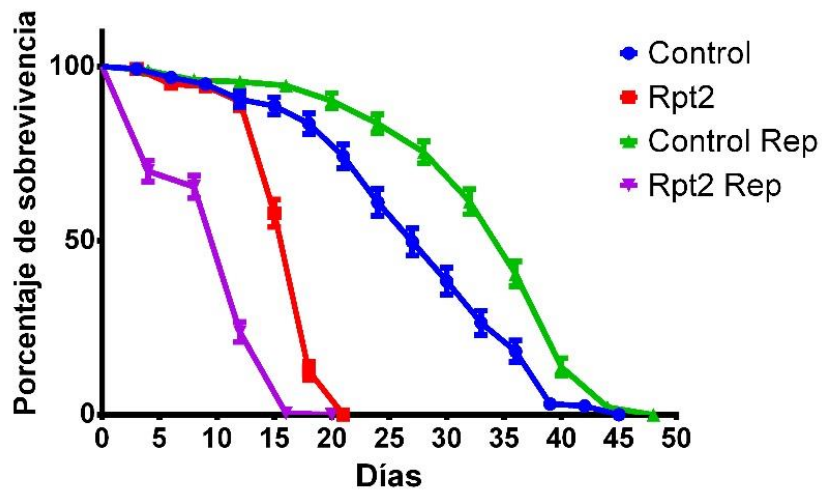


Figura 39. Repetición de la curva de supervivencia. Se mantuvieron a 28°C constantes. N = 200 individuos. Prueba estadística de Long-Rank (Mantel-Cox).

Análisis de la locomoción en arena circular

El ensayo de locomoción en arena circular consistió en colocar un solo individuo dentro de una caja circular de ocho centímetros de diámetro y grabar durante tres minutos mediante el programa *Buridan Tracker*. Posteriormente se procesó de manera automatizada el tiempo de actividad, la distancia recorrida y la velocidad media utilizando el programa *CeTrAn4*.

No se detectaron diferencias significativas entre los individuos control y los individuos con Rpt2 disminuida a 2, 8 o 10 días de edad en el ensayo de actividad espontánea al analizar los parámetros de velocidad, distancia y tiempo de actividad (Figura 40).

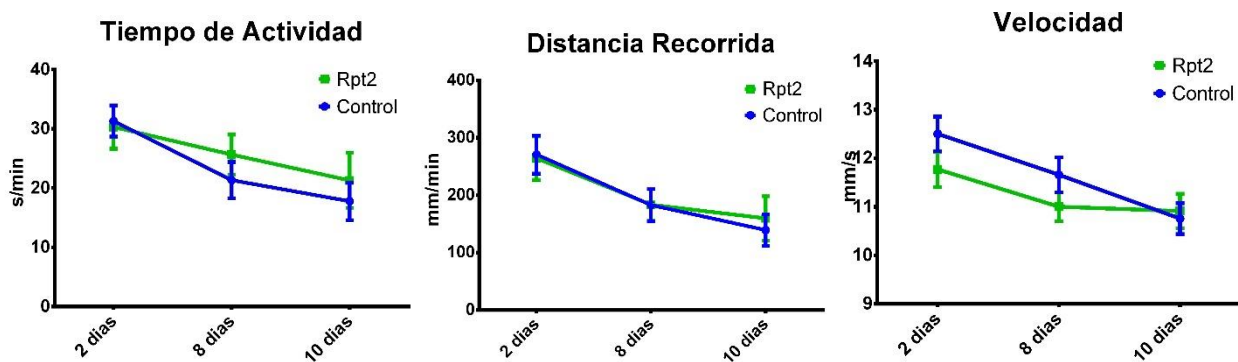


Figura 40. Ensayos de locomoción en arena circular. Se utilizó un solo macho adulto por ensayo con duración de 3 minutos. Las gráficas muestran la media con el error estándar, N = 30 individuos por punto. Análisis de ANOVA de dos factores con prueba de comparación múltiple de Tukey.

Cuantificación dopamina y serotonina

Los comportamientos de hiperactividad causados por la disminución de Rpt2 en neuronas dopaminérgicas podrían explicarse por una alteración en los niveles de dopamina antes de que ocurra la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Se cuantificaron los niveles de dopamina en cerebros de individuos adultos por medio de HPLC. Sabiendo que el circuito serotoninérgico también juega un papel importante en la EP, y

debido a que los parámetros del HPLC se encontraban optimizados para detectar dopamina y serotonina usando la misma muestra, también se analizaron los niveles de serotonina.

La cantidad de dopamina total en cerebros de adultos no difiere entre controles y experimentales a lo largo del envejecimiento. En cambio, los individuos con la subunidad Rpt2 disminuida presentan un aumento significativo en los niveles de serotonina a los 10 días de edad, que podría indicar un sistema compensatorio para mantener la homeóstasis o una consecuencia de la alteración del circuito dopaminérgico provocando la desregulación serotoninérgica (Figura 41).

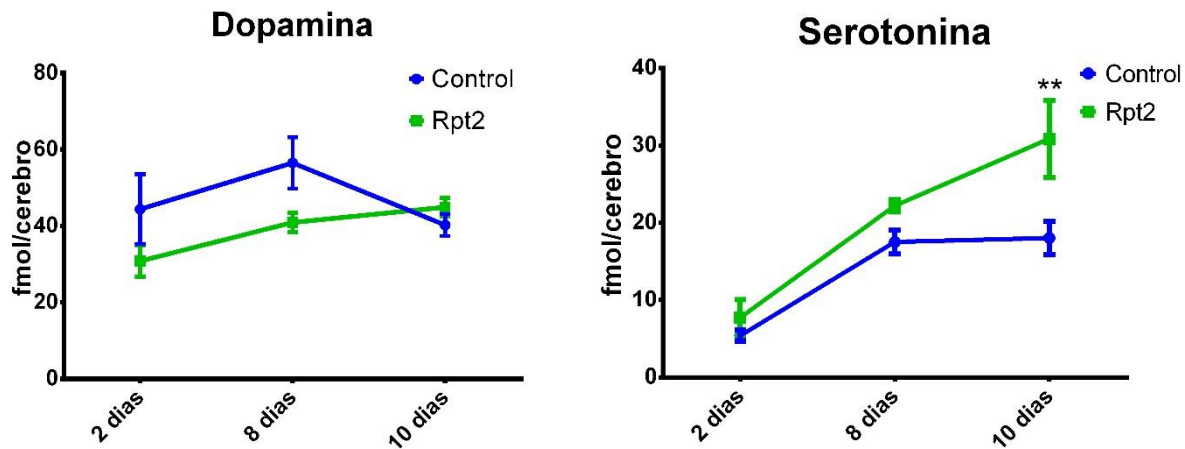


Figura 41. Cuantificación de dopamina y serotonina mediante HPLC. La gráfica muestra la media con la desviación estándar. N > 3 por cada punto.

Se ha determinado que la dopamina regula de manera negativa la inervación serotoninérgica en el cerebro de individuos adultos de *Drosophila*, entre más dopamina liberada, menos inervaciones serotoninérgicas se producen en regiones del cerebro donde ambas proyectan, y viceversa, por ello se realizó un análisis de regresión lineal para explorar su relación.

Los individuos con la subunidad Rpt2 disminuida presentaron una relación lineal positiva, a mayor dopamina generada con la edad, mayor es la cantidad de serotonina. En cambio, en los individuos control no se presentó ninguna correlación entre la dopamina y la serotonina a lo largo del envejecimiento (Figura 42). Por lo que la disminución de Rpt2 en neuronas dopaminérgicas induce un aumento en los niveles de serotonina.

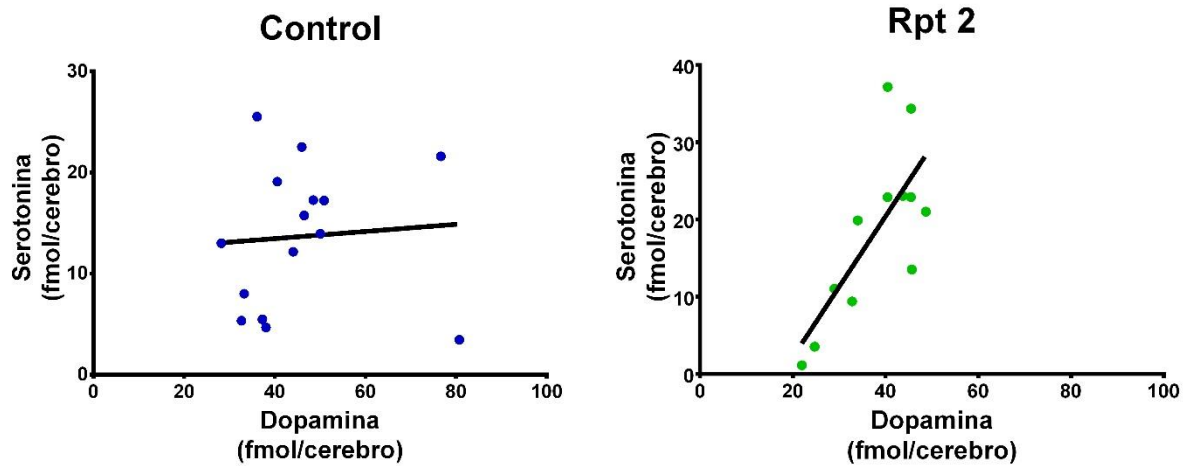


Figura 42. Correlación entre la dopamina y la serotonina. Análisis de correlación: Control (Pearson) $R^2 = 0.006$, $p = 0.79$, $N > 15$; Rpt2 (Pearson) $R^2 = 0.55$, $p = 0.006$, $N > 12$.

Cuantificación *cnc*/Nrf2

La disminución de ciertas subunidades del proteasoma mediante RNAi en *Drosophila* puede causar la inducción de un aumento en la cantidad del proteasoma 26S mediante un sistema compensatorio desencadenado por la expresión del factor transcripcional *cnc*/Nrf2. Se realizó un análisis de qRT-PCR para identificar si la disminución de Rpt2 causa un aumento en *cnc*. La disminución de Rpt2 en el sistema nervioso de machos *Drosophila* adultos durante 28 horas no causó un aumento en la cantidad de *cnc* (Figura 43).

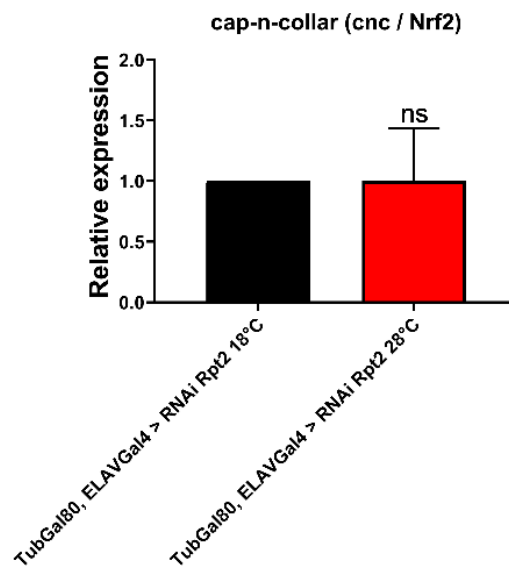


Figura 43. Cuantificación de *cnc*. Cuantificación de *cnc*. Comparación entre la doble delta Ct de la expresión de *cnc*. $p = 0.6$, $N = 3$

Discusión

La disminución de ciertas subunidades del proteasoma está asociada con una disminución en la actividad del proteasoma, ocasionando la acumulación de proteínas, entre ellas proteínas con potencial amiloidogénico (Im y Chung 2016). A pesar de que en varios estudios se ha analizado los cerebros de pacientes *post mortem* en los que se ha encontrado la disminución de subunidades del proteasoma en muchas de las enfermedades neurodegenerativas más comunes como: Alzheimer (Orre et al. 2013; Wu et al. 2015), Parkinson (Grünblatt et al. 2004; Duke et al. 2006; Bukhatwa et al. 2010; Wills et al. 2010; Alghamdi et al. 2017) esclerosis lateral amiotrófica (Kabashi et al. 2012), Huntington (Ortega, Díaz-Hernández, y Lucas 2007) y ataxia espinocerebelosa (Matilla et al. 2001), no se ha investigado si la disminución de una sola subunidad del proteasoma en una región particular del cerebro es capaz de generar los síntomas típicos para cada enfermedad en un organismo vivo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar si la disminución de alguna subunidad del proteasoma 26S es capaz de generar los síntomas característicos de la EP en un modelo *in vivo*.

Reducción de diferentes subunidades del proteasoma 26S en sistema nervioso de *Drosophila*

El ojo compuesto de *Drosophila* se ha utilizado ampliamente para identificar genes, modificadores y supresores genéticos capaces de causar disrupción del tejido, el cual está compuesto por alrededor de 800 unidades prácticamente idénticas entre sí llamadas omatidias, con la finalidad de estudiar su función en un contexto neuronal de manera rápida y sistemática. En este trabajo se redujo la expresión de 13 distintas subunidades del proteasoma 26S utilizando diferentes RNAi, para identificar cuáles de ellas causaban daño en el tejido neuronal con la sola reducción de una subunidad. De las 33 subunidades que conforman el proteasoma 26S y que se encuentran conservadas entre humano y *Drosophila*, se experimentó con la reducción de trece subunidades, siete correspondientes al complejo catalítico 20S: $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 6$, y seis que pertenecen al complejo regulatorio 19S: Rpt2, Rpt3, Rpt5, Rpn1, Rpn7 y Rpn10. El *driver* utilizado fue *ninaE.GRM-Gal4*, el cual se expresa a lo largo del desarrollo en el disco imaginal de ojo-antena a partir del tercer instar, este driver se expresa en la parte posterior del disco y conforme progresa el desarrollo, la expresión del Gal4 avanza hacia la parte anterior conforme se van diferenciando las neuronas fotorreceptoras nuevas (Kumar 2001). Por esta razón los fenotipos de despigmentación y degeneración de fotorreceptores se observan inicialmente en la parte posterior del ojo de individuos adultos de un día de edad, pero a medida que envejecen, se extienden los fenotipos hacia la parte anterior.

Los fenotipos observados al reducir ciertas subunidades del proteasoma son similares a lo que se ha reportado al expresar proteínas humanas asociadas a las enfermedades neurodegenerativas más comunes, como la Tau y la β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer, Lrrk2 en la enfermedad de Parkinson, la huntingtina en la enfermedad de Huntington, y la ataxina 1 y 3 en la enfermedad de ataxia espinocerebelosa. Se ha reportado que la expresión de α -sinucleína en el ojo de *Drosophila* no causa despigmentación, pero causa un leve desarreglo de las omatidias observado solo por microscopía electrónica (Todd y Staveley 2008). En un trabajo por Valentzas et al. (2013) donde redujo de manera independiente las subunidades Rpn1, Rpn2, $\alpha 5$, $\beta 5$, $\beta 6$ en *Drosophila* mediante RNAi específicos, observó distintos grados de despigmentación y degeneración, argumentando que el proteasoma participa en la formación correcta del ojo, pero no caracterizó el fenotipo en individuos envejecidos (Valentzas et al. 2013).

Aún más relevantes resulta que con el envejecimiento de los individuos realizado hasta los 30 días, todas las subunidades aquí caracterizadas que presentaron fenotipo a 1 día de edad, se les aumentaron el grado de daño, lo que involucra un proceso neurodegenerativo.

Se ha reportado que una de las vías de degradación de α -sinucleína es a través del proteasoma (Stefanis et al. 2019). Además de que se ha reportado que α -sinucleína interacciona físicamente con las subunidades $\alpha 7$ y Rpt5 (Alvarez-Castelao et al. 2014) (Grünblatt et al. 2010), y que posiblemente es necesaria esta interacción para la degradación de α -sinucleína; en este trabajo no se observó que la disminución de estas subunidades generase un aumento en el daño al ojo compuesto al expresar α -sinucleína. Esto puede sugerir dos interpretaciones, uno que la reducción $\alpha 7$ y Rpt5 mediante el RNAi utilizado, no haya sido lo suficientemente grande como para observar un aumento evidente en el fenotipo. La segunda es que ni $\alpha 7$ ni Rpt5 son necesarias para la degradación de α -sinucleína.

La expresión de α -sinucleína con la reducción de las subunidades Rpn1 y Rpt2 generaron un aumento evidente en el daño al ojo compuesto de *Drosophila*. Ambas subunidades pertenecen a la base del proteasoma 19S y participan en la apertura del proteasoma 20S para la degradación de proteínas ubiquitinadas (Rabl et al. 2008). Hasta el momento, no se ha reportado la participación de la subunidad Rpn1 en alguna de las enfermedades neurodegenerativas más comunes. En cambio, se ha reportado una disminución en los niveles de Rpt2 en la *sustancia nigra* de pacientes *post mortem* con la enfermedad de Parkinson esporádica (Duke et al. 2006). Además, en un modelo “knockout” de Rpt2 condicional en la *sustancia nigra* de ratón, se observó la aparición de los síntomas característicos de la EP, como neurodegeneración, formación de agregados proteicos y daños en la locomoción (Bedford et al. 2008; Paine et al. 2013). La interacción genética de α -sinucleína con Rpn1 o Rpt2 podría sugerir que son necesarias ambas subunidades para la degradación de α -sinucleína.

En este trabajo expresamos los mismos RNAi contra las subunidades del proteasoma 26S mencionados anteriormente de manera panneuronal en larvas de tercer instar, para caracterizar los defectos en la locomoción causados por la disminución de las subunidades del proteasoma, se encontró que todas las subunidades disminuidas generaron defectos en la locomoción, excepto la disminución de $\alpha 3$ que tampoco generó defectos en la morfología externa del ojo compuesto. La disminución de las subunidades $\alpha 4$, Rpt3 y Rpn10 en el ojo no generaron fenotipo visible, pero al reducir las de manera panneuronal generaron defectos en la locomoción de las larvas, sugiriendo que tienen una mayor participación en el control motor. Los distintos grados de defectos locomotrices indica que cada subunidad puede afectar en distinto grado y, por tanto, la participación en la locomoción difiere para cada subunidad, donde la disminución de las subunidades Rpn1 y Rpn7 del complejo regulador 19S juegan un papel más relevante. La cuantificación de cada subunidad podría revelar si los niveles de expresión de cada subunidad son los causantes del fenotipo observado.

Con base a los dos tamizajes realizados, donde la subunidad Rpt2 mostró interacción genética con α -sinucleína y mostró defectos en la locomoción en larvas, se decidió caracterizar la participación de la subunidad Rpt2 al reducir su expresión en neuronas dopaminérgicas y determinar si con la expresión de α -sinucleína se genera un aumento en los síntomas similares al de la EP.

Se tiene reportado que el 78% de pacientes con la EP pueden presentar trastornos en su sistema visual, entre los cuales están: dificultad para leer, visión doble, alucinaciones, discriminación de colores,

sensibilidad espacial al contraste, control oculomotor, dificultades con tareas visuales complejas como la rotación mental de objetos tridimensionales y reconocimiento emocional. Los mecanismos subyacentes permanecen desconocidos, pero estos problemas parecen ser causados por disfunción en ganglios basales, como el del córtex parietal posterior, que puede causar depleción de dopamina en estructuras visuales periféricas (Davidsdottir, Cronin-Golomb, y Lee 2005), o bien, por una reducción de inervaciones dopaminérgicas en la retina (Rodnitzky 2012). En la capa interna de la retina se ha identificado la presencia de α -sinucleína mal plegada en pacientes con la EP, por lo que puede representar un síntoma característico poco explorado de la enfermedad, que podría explicar los problemas visuales (Bodis-Wollner et al. 2014). En *Drosophila*, la dopamina participa en el sistema visual y se encuentra también en el ojo, por lo que los daños observados en el tamizaje se asemejan con los problemas visuales reportados por los pacientes con la EP. Sin embargo, realizar ensayos visuoespaciales en las moscas podría indicar de manera más específica si se reproducen los problemas visuoespaciales de los pacientes con la EP.

Disminución de Rpt2 usando el promotor de tirosina hidroxilasa

La disminución de Rpt2 usando el *driver* panneural Elav-Gal4 o de TH-Gal4 resultaron causar letalidad, por lo que se utilizó el sistema termosensible Gal80^{ts} para reprimir la expresión del RNAi durante el desarrollo de la mosca y obtener individuos adultos. La cantidad de Rpt2 que se redujo fue de $28\% \pm 3.4\%$ expresando el RNAi contra Rpt2 en Elav-Gal4 en individuos de 2 días de edad. Por otro lado, hubo un aumento del 26S en los organismos donde se redujo Rpt2; éste es un fenómeno similar al que se ha reportado en *Drosophila* al remover la subunidad Rpn10 (Tamás Szlanka et al. 2003), sugiriendo que el desbalance estequiométrico de las subunidades causa una desregulación en el ensamblaje del proteasoma. El aumento en la cantidad de proteínas ubiquitinadas refuerza la idea de que la disminución de Rpt2 induce una pérdida de la actividad del proteasoma 26S probablemente debida a la presencia de proteasomas mal ensamblados.

El primer modelo de la enfermedad de Parkinson en *Drosophila* se realizó en el año 2000, cuando Feany y Bender expresaron α -sinucleína humana en neuronas dopaminérgicas y observaron síntomas similares a los pacientes con la enfermedad. En el laboratorio del Dr. Enrique Reynaud, Hernandez-Vargas et al. (2007) también expresaron α -sinucleína humana silvestre y dos versiones con mutaciones asociadas a Parkinson de herencia autosómica dominante (A53T y A30P), usando el promotor de la tirosina hidroxilasa (TH-Gal4) para dirigir la expresión a neuronas dopaminérgicas, y observaron problemas de locomoción en moscas adultas, pérdida de neuronas dopaminérgicas cuantificadas mediante la señal de GFP y una menor supervivencia.

La disminución de Rpt2 usando el promotor de la tirosina hidroxilasa fue suficiente para causar letalidad en larvas de segundo instar, debido a que el gene que codifica para la enzima tirosina hidroxilasa posee una isoforma que se expresa en la cutícula y está involucrada en la producción de melanina en la epidermis durante el desarrollo de larvas de *Drosophila*, este fenómeno se denomina esclerotización de la cutícula, esta isoforma no tiene función neuronal y es necesaria para el desarrollo y supervivencia de las larvas. Para evitar el efecto letal durante el desarrollo de la disminución de Rpt2, se utilizó el sistema Gal80 termosensible, con el que se puede reprimir la expresión de Gal4 al mantener a los individuos a 18°C, lo que permitió obtener individuos adultos que se mantuvieron a 28°C a partir de 1 día de edad para expresar el RNAi contra Rpt2 y observar su efecto en las neuronas dopaminérgicas.

Análisis de la supervivencia

La expectativa de vida de pacientes con la EP es ligeramente menor a las personas sin la enfermedad (Bäckström et al. 2018), siendo la neumonía por aspiración pulmonar la principal causa de muerte prematura en los pacientes (Simons 2017). La disminución de Rpt2 en neuronas dopaminérgicas de *Drosophila* a partir de adultos causa una disminución en la supervivencia de los individuos. Se ha reportado la muerte prematura en *Drosophila* al expresar genes que causan formas hereditarias de la EP en neuronas dopaminérgicas, éstos genes son: LRRK1 (Xiong y Yu 2018), α -sinucleína, GBA1a, VPS35, sinfilina-1 (Hernández-Vargas et al. 2011) y Dj-1 β (Paricio y Muñoz-Soriano 2011). Sin embargo, las causas de una disminución en la supervivencia en *Drosophila* al afectar el sistema dopaminérgico no han sido identificadas, y resulta más controversial que las moscas carentes de dopamina generadas por *knockout* para la TH que se expresa solo en sistema nervioso no afecte su supervivencia (Riemensperger et al. 2011). Posiblemente la desregulación específica del circuito dopaminérgico tenga un efecto perjudicial en la supervivencia del individuo al afectar la regulación energética en el cerebro, como se ha demostrado en individuos a los que se les activan dos pares de neuronas dopaminérgica para favoreces su aprendizaje en condiciones de hambruna, pero causando disminución en su supervivencia (Plaçais y Preat 2013).

Circuito dopaminérgico y neurodegeneración

La dopamina es un neurotransmisor presente en *Drosophila* que realiza funciones semejantes a las que ocurren en los mamíferos, entre las cuales están: locomoción, ritmos circadianos, agresión, atención, recompensa, aprendizaje y memoria (Karam, Jones, y Javitch 2019). La principal neuropatología de la EP es la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra* observada mediante inmunocitoquímica usando el anticuerpo anti-TH. De igual forma se utilizó el anticuerpo anti-TH para visualizar y cuantificar grupos de neuronas dopaminérgicas en el cerebro de *Drosophila*. El cerebro de *Drosophila* posee aproximadamente 130 neuronas dopaminérgicas, distribuidas en grupos, los cuales se han determinado varias de sus funciones en los últimos años gracias a las herramientas genéticas para activarlas o inhibirlas de manera específica y temporal.

La disminución de Rpt2 en usando el *driver* TH-Gal4 causa neurodegeneración en el grupo *PPL1* y *PPM3* de neuronas dopaminérgicas en individuos de 16 días de edad. El grupo dopaminérgico *PPL1* está involucrado en el reforzamiento de la memoria aversiva olfativa (Aso et al. 2012), recompensa por azúcar, geotaxis negativa, modulación del sueño e inhibe la preferencia de ovoposición (Kasture et al. 2018). El grupo dopaminérgico *PPM3* está involucrado en la modulación del sueño, agresión y promueve la preferencia de ovoposición (Kasture et al. 2018). Por lo que se esperaría que cualquiera de estos comportamientos estuviese afectado con la disminución de Rpt2. Considerando que la regulación del sueño y la locomoción están relacionadas con síntomas en la EP, se discutirá más adelante estos resultados.

Hernández-Vargas et al. (2011) utilizaron la expresión de GFP para cuantificar neuronas dopaminérgicas totales en cerebros de moscas adultas de distintas edades que expresaban α -sinucleína utilizando TH-Gal4, e identificaron la pérdida de señal de GFP correlacionando con la pérdida de neuronas dopaminérgicas. En contraste, la expresión de α -sinucleína utilizando TH-Gal4 y cuantificando grupos dopaminérgicos usando el anticuerpo anti-TH en este trabajo no se observó neurodegeneración en la ventana de tiempo establecida. Existen varias controversias en distintos grupos de investigación en este punto, aunque la mayoría reportan que se genera neurodegeneración, y es posible que estas diferencias dependen en la metodología y edad a la cual son cuantificadas las neuronas dopaminérgicas (Xiong y Yu 2018). Una de las principales diferencias

con la expresión de α -sinucleína es que en este trabajo solamente se indujo a partir de individuos adultos, mientras que en los trabajos anteriores se ha expresado desde etapas embrionarias y a lo largo del desarrollo, lo cual podría modificar los fenotipos observados. Debido a que se analizaron los cerebros hasta los 16 días de edad, posiblemente a edades más avanzadas se podría observar neurodegeneración al expresar α -sinucleína.

La expresión de α -sinucleína con la disminución de Rpt2 sorprendentemente no generó neurodegeneración en ninguno de los grupos dopaminérgicos. Incluso la pérdida de neuronas observada en el grupo *PPL1* causada por la sola disminución de Rpt2 se logra proteger en la condición doble. Lo que sugiere una interacción genética entre Rpt2 y α -sinucleína, en donde la neurona pudiera activar, bajo esta condición en particular, un mecanismo de protección para contender contra ambos factores.

Los otros grupos dopaminérgicos analizados no presentaron neurodegeneración. El grupo dopaminérgico *PPL2* está involucrado en aumentar la capacidad de la memoria asociativa. El grupo dopaminérgico *PAL* está involucrado en el comportamiento de apareamiento (Kasture et al. 2018). En la EP varias regiones cerebrales se ven afectadas, siendo la *sustancia nigra* la más susceptible y sólo hasta que se pierde el 70% de la población de las neuronas dopaminérgicas aparecen los síntomas motrices. De forma similar, el grupo *PPL1* y *PPM3* resultaron ser los grupos dopaminérgicos que son más susceptibles a la neurodegeneración por la disminución de Rpt2.

El principal mecanismo de muerte neuronal implicado en la EP es por la vía intrínseca de la apoptosis. En cerebros *post mortem* de pacientes con la EP se ha observado un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden causar la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. La oxidación de la dopamina y sus metabolitos producen especies reactivas de oxígeno y es una de razones por la cual las neuronas dopaminérgicas son más susceptibles que otros tipos de neuronas a la neurodegeneración en la EP. La acumulación de α -sinucleína disminuye la actividad del complejo I mitocondrial e incrementa la concentración de especies reactivas de oxígeno, además es capaz de unirse a la membrana mitocondrial, provocando la susceptibilidad de activar la vía intrínseca de la apoptosis en las neuronas dopaminérgicas (Erekat 2018). La disfunción del proteasoma y el aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno se relacionan con un ciclo de retroalimentación positiva, en el cual la disfunción del proteasoma aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno y estas a su vez causan la disfunción del proteasoma (Yaribeygi et al. 2018).

Se ha sugerido que la inhibición de la apoptosis podría funcionar como terapia para evitar la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la EP. Sin embargo, en varios modelos *in vitro* e *in vivo* de la EP usando inhibidores de caspasas, sigue ocurriendo neurodegeneración, pero por la vía de la necrosis. Además, los síntomas motrices en los modelos animales no se mejoran, lo que sugiere que intracelularmente las neuronas dopaminérgicas se encuentran en desbalances homeostático ocasionando su disfuncionalidad. Favorecer la homeostasis celular a través de la contención de la producción de especies reactivas de oxígeno y la degradación oportuna de proteínas oxidadas a través de la activación del proteasoma podría funcionar como una terapia efectiva para retrasar o mejorar los síntomas de la EP.

Locomoción inducida

La mayoría de los genes asociados a la EP que se han modelado en *Drosophila* causan disminución en la locomoción inducida analizada por ensayos de geotaxis negativa (Xiong y Yu 2018). En este trabajo no se

observó ningún defecto en la locomoción inducida ni al disminuir Rpt2, ni con la expresión de α -sinucleína o con la condición doble. Hernández-Vargas et al. (2011) observaron la pérdida de locomoción inducida expresando α -sinucleína usando el *driver* TH-Gal4, siendo a partir de individuos de 30 días de edad donde se aprecia más marcado este fenotipo, lo que sugiere que se podría observar los fenotipos a edades más avanzadas. Otra posible explicación es que el *driver* TH-Gal4 utilizado no expresa Gal4 en el grupo dopaminérgico *PAM*, el cual es un grupo que posee alrededor de 80 neuronas dopaminérgicas y es el principal grupo que controla la locomoción inducida en el ensayo de geotaxis negativa, entre otras funciones (Riemensperger et al. 2013).

Locomoción espontánea

Los actogramas generados muestran la actividad espontánea de *Drosophila*, la cual está regulada por el ciclo circadiano y éste a su vez por los ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. La mayoría de las drogas de abuso, como el alcohol y la cocaína, incrementan los niveles de dopamina en las regiones mesolímbicas del cerebro en humanos. En *Drosophila*, la exposición aguda en bajas dosis al etanol o cocaína inducen hiperactividad (Kong et al. 2010), por lo que la hiperactividad observada en los individuos cuando se reduce Rpt2 podrían deberse a una desregulación en la cantidad de dopamina liberada. Esta desregulación en la cantidad de la dopamina podría ser consecuencia de un aumento en los niveles de la enzima TH, que al no poder degradarse mediante el proteasoma (Nakashima et al. 2018), conllevaría a una mayor producción de dopamina y posiblemente una mayor liberación desregulada.

Se ha reportado que la activación de neuronas dopaminérgicas usando el *driver* de TH induce hiperactividad en moscas adultas (Sun et al. 2018), contrariamente, la deficiencia de dopamina genera hipoactividad en la actividad espontánea (Riemensperger et al. 2011). Específicamente, la activación del grupo dopaminérgico *PPM3* promueve la actividad locomotriz espontánea (Kong et al. 2010). Debido a que la disminución de Rpt2 causó neurodegeneración del grupo *PPM3*, es posible que las neuronas sobrevivientes se encuentren en un estado más afectado, ocasionando una mayor liberación dopaminérgica como mecanismo de compensación que podría causar la hiperactividad observada, tal como se ha reportado en ratones al inyectarles un inhibidor del proteasoma (epoximicina) (Subramaniam et al. 2014). O bien, que debido a una mayor actividad sostenida de las neuronas ocasione su muerte.

Durante el periodo de oscuridad, los individuos con la disminución de Rpt2 aumentan su actividad a medida que envejecen, pero en la condición doble la actividad es igual con respecto al control, lo que sugiere que la expresión de α -sinucleína es suficiente para contrarrestar al menos en parte, la hiperactividad causada por la disminución de Rpt2. Debido a que α -sinucleína podría estar involucrada en la liberación de vesículas cargadas de dopamina, una posible liberación desmedida de dopamina como consecuencia de la disminución de Rpt2, estaría contrarrestada por un impedimento en la fusión vesicular causada por α -sinucleína durante el periodo de oscuridad, y para corroborarlo se podría realizar la cuantificación de la dopamina liberada en cada genotipo bajo la condición de movimiento espontáneo.

Durante el periodo de luz, los individuos con la disminución de Rpt2 poseen mayor actividad, pero se reduce a medida que envejecen. Por el contrario, en la condición doble los individuos de mediana edad tienen más actividad que todos los demás grupos, lo que sugiere que hay una interacción genética entre Rpt2 y α -sinucleína que podría ocasionar una mayor liberación de dopamina durante el periodo de luz. Por otro lado, al analizar a los individuos envejecidos no existen diferencias significativas entre los grupos, lo que sugiere

que la hiperactividad es un fenómeno juvenil que depende de que las neuronas dopaminérgicas sean funcionales y que posiblemente en edades más tardías se observe una menor actividad debido al deterioro metabólico y funcional de estas células causado por la disminución de Rpt2 y/o la expresión de α -sinucleína.

Locomoción en arena circular

El tiempo de actividad, la distancia recorrida y la velocidad fueron los parámetros que se analizaron en los ensayos de locomoción de los adultos en la arena circular. La disminución de Rpt2 no causó un cambio estadísticamente significativo con respecto al control, lo mismo que se observó en los ensayos de geotaxis negativa. Cabe resaltar que los síntomas motrices son observables en las personas con la EP sólo cuando las neuronas dopaminérgicas se han reducido en un 70% y por tanto la cantidad de dopamina es mínima. Posiblemente en individuos más envejecidos sea posible observar una reducción en la locomoción usando el ensayo de la arena circular, como se ha reportado en mutantes de *pink1* endógena de *Drosophila* de 21 días en adelante (Molina-Mateo et al. 2017). La depleción panneuronal de la dopamina en *Drosophila* disminuye la velocidad y distancia recorrida en arena abierta (Riemensperger et al. 2011), pero, en nuestro caso, la disminución de Rpt2 hasta el día 10 post inducción no generó una disminución en la cantidad de dopamina.

Sueño

Entre el 65 y 95 por ciento de personas con la EP reportan trastornos relacionados con el sueño. Es uno de los principales síntomas que disminuye la calidad de vida en los pacientes. Entre los trastornos del sueño se ha reportado la fragmentación del sueño, somnolencia excesiva durante el día y desórdenes en la fase REM del sueño (Prudon et al. 2014). Los modelos animales han tratado de explicar las causas de la desregulación del sueño en la EP. Recientemente, en *Drosophila* se han caracterizado los genes y circuitos neuronales involucrados en la regulación del sueño, y se ha logrado determinar que mutantes de pérdida de función de *parkina* y *pink1* endógenas de *Drosophila* generan defectos en los patrones de sueño, mediante la desregulación sináptica en neuronas dopaminérgicas, así como en la retención de neuropéptidos en neuronas involucradas en el ciclo circadiano denominadas LNvs (Valadas et al. 2018) (Potdar y Sheeba 2018).

La expresión de α -sinucleína causó una mayor cantidad en el tiempo de sueño total en los tres periodos de vida analizados. Resultados similares se han observado al analizar solo individuos de 3 días edad al expresar α -sinucleína humana en neuronas dopaminérgicas de *Drosophila* (Gajula Balija et al. 2011). Sin embargo, Gajula y colaboradores encontraron que es en el periodo de luz donde se genera el incremento del sueño, mientras que en este trabajo se observó que el incremento se generó en el periodo de oscuridad. Esta diferencia puede deberse a que Gajula y colaboradores utilizaron el *driver* Ddc-Gal4, el cual dirige el Gal4 a neuronas dopaminérgicas incluidas el grupo PAM, el cual participa en la modulación de los ciclos del sueño (Kasture et al. 2018), mientras que el *driver* TH-Gal4 utilizado en este trabajo no dirige la expresión de Gal4 al grupo PAM. A pesar de esta diferencia, la regulación del sueño se afecta con la expresión de α -sinucleína, pero no genera un síntoma similar a los pacientes con la EP donde se reduce la cantidad de sueño. La α -sinucleína humana prefibrilar, generada a partir de 3 mutaciones que impiden su conformación fibrilar, expresada en neuronas dopaminérgicas de *Drosophila*, genera disminución en el tiempo de sueño, observando una disminución más drástica durante los periodos de oscuridad (Gajula Balija et al. 2011). Lo que sugiere que la α -sinucleína silvestre pueda no ser responsable de la disminución del sueño.

Los individuos jóvenes con la disminución de Rpt2 presentaron menor cantidad de sueño solo en el periodo de luz, este mismo comportamiento ha sido reportado en moscas deficientes de dopamina analizadas a los 5 días de edad (Riemensperger et al. 2011). Individuos con la mutación en *parkina* endógena de *Drosophila* (*park*²⁵) de uno a tres días de edad poseen aumento en la actividad nocturna, reflejando una menor cantidad de sueño (Julienne et al. 2017). La inhibición del proteasoma mediante la administración de lactacistina en ratas causa problemas de sueño al presentar episodios de somnolencia en su fase activa, reflejando el síntoma preclínico reportado en los pacientes con la EP (Simonova et al. 2018). La desregulación en SUP indica que está relacionada con los problemas de sueño en los pacientes con la EP, y en particular la disminución de Rpt2 es capaz de generar este síntoma preclínico no motor de la EP.

Los individuos con la doble condición no mostraron diferencia significativa con respecto al control en la cantidad de sueño. El aumento de sueño generado por la expresión de α -sinucleína y la disminución de sueño por la disminución de Rpt2 parecen anularse, causando un comportamiento de sueño más similar al control, lo que indica que α -sinucleína y Rpt2 interactúan genéticamente. En los individuos jóvenes con la condición doble poseen una cantidad de sueño más similar a los individuos que poseen Rpt2 disminuida, pero en individuos de mediana edad y envejecidos, se asemejan a los individuos con la sola expresión de α -sinucleína, sugiriendo que la posible acumulación de α -sinucleína genere un aumento en la cantidad de sueño.

Relación entre hiperactividad y sueño

El neurólogo Oliver Sacks, publicó en su libro “Despertares” (1973) varios de los síntomas de las personas con la EP, entre los cuales podemos destacar que los pacientes diagnosticados tempranamente con la enfermedad presentaban episodios de hiperactividad, definiéndolo como “impaciencia motora” (acatsia). En pacientes con la enfermedad en etapas más avanzadas, reportó los síntomas clásicos de la enfermedad como la lentitud en los movimientos. En un estudio de pacientes con la EP idiopática diagnosticados tempranamente, se demostró que el 68% de ellos presentaban episodios de acatsia (Lang y Johnson 1987). Interesantemente, en este trabajo demostramos que los individuos con la subunidad Rpt2 disminuida presentaban hiperactividad durante el día y a medida que envejecieron se iba perdiendo, que, a su vez, estos individuos empezaron a tener desregulación del sueño en el periodo de oscuridad. Por lo que posiblemente, en etapas tempranas de nuestro modelo de la EP, la hiperactividad sea un síntoma temprano análogo al que se observa en humanos que a medida que progresa la enfermedad, se presentan los episodios de somnolencia diurna y desregulación del sueño nocturno.

Relación entre dopamina y serotonina

Los niveles de dopamina no difieren significativamente entre los individuos con Rpt2 disminuida y los individuos control a pesar de que se observa neurodegeneración en los individuos con Rpt2 disminuida. Una vía de degradación de la enzima TH es a través del proteasoma, por lo tanto, se esperaría que la disminución del proteasoma 26S a través de la disminución de Rpt2 causaría una acumulación TH y por ende un aumento de dopamina. Esto puede explicar porque los niveles de dopamina se mantienen en niveles basales a pesar de la neurodegeneración causada por la disminución de Rpt2. Esto no involucra necesariamente que la regulación sináptica de la vía dopaminérgica se mantenga en un estado basal, sino que un desbalance de dopamina liberada ocasione los síntomas relacionados a la EP antes descritos. La tendencia de un aumento de dopamina en los individuos con Rpt2 disminuida y la disminución de dopamina en los individuos control también se ha observado en mutantes para *pink1* endógena de *Drosophila*

(Molina-Mateo et al. 2017), sugiriendo que el aumento en la liberación de dopamina es un mecanismo común en la fase preclínica del modelo de la EP. Este conocimiento permite proponer analizar los niveles de dopamina como un marcador para el diagnóstico temprano de la EP, ya que actualmente no se utilizan marcadores de dopamina o sus metabolitos para diagnosticar la EP.

Los niveles de serotonina aumentan significativamente en moscas envejecidas con la subunidad Rpt2 disminuida. Estudios *post mortem* en humanos han identificado que el sistema serotoninérgico se encuentra dañado en pacientes con la EP (Pagano y Politis 2018). La disfunción de este sistema puede ocurrir desde etapas muy tempranas de la enfermedad, contribuyendo al deterioro progresivo motriz y no motriz. *Drosophila* posee aproximadamente 80 neuronas serotoninérgicas distribuidas en diferentes grupos (Kasture et al. 2018). El sistema serotoninérgico de *Drosophila* regula una serie de funciones similares a las que regula en humanos, tales como: sueño, memoria y ciclo circadiano. La activación selectiva de neuronas serotoninérgicas en moscas adultas causa la reducción en su locomoción en un ensayo de arena circular, pero no afecta su locomoción inducida en los ensayos de geotaxis negativa (Majeed et al. 2016). Son pocos los modelos y trabajos que se han realizado para determinar la contribución del sistema serotoninérgico en la progresión de la EP, pero es un campo que al explorarse podría abrir vías para el mejoramiento de los síntomas de las personas con la EP (Huot y Fox 2013).

El análisis de correlación entre los niveles de dopamina y serotonina mostró que solo en los individuos con la disminución de Rpt2 se observa una correlación positiva. Recientemente, se ha demostrado que el sistema dopaminérgico en el cerebro de *Drosophila* modula la inervación serotoninérgica (Niens et al. 2017). Cuando se induce la retención de la dopamina, las proyecciones serotoninérgicas aumentan, por el contrario, cuando se induce la sobre liberación de la dopamina, las proyecciones serotoninérgicas se retraen. Este sistema compensatorio puede explicar el aumento de la serotonina observada en los individuos con la disminución de Rpt2, en donde por causa de la neurodegeneración dopaminérgica, las proyecciones serotoninérgicas se extienden, pero a la par se incrementa la cantidad de dopamina en las neuronas sobrevivientes. La dinámica entre el sistema dopaminérgico y el serotoninérgico es compleja y la cantidad de aminas biogénicas producidas o liberadas puede fluctuar dependiendo del estado neurodegenerativo en el que se encuentren los individuos. La caracterización del sistema serotoninérgico en modelos de la EP puede ayudar a explicar los cambios celulares o de circuitos neuronales que producen los síntomas motores y no motores. En este estudio se demostró que la disminución de Rpt2 induce aumento en la cantidad de serotonina que puede deberse por efecto de la desregulación de la dopamina.

Desregulación del proteasoma

El análisis molecular indicó que la disminución de Rpt2 en el sistema nervioso de machos adultos de *Drosophila* causa un incremento de proteínas ubiquitinadas insolubles de alto peso molecular, lo que sugiere la disfunción del proteasoma 26S. Se ha reportado que la supresión de la subunidad del proteasoma Rpn10 en *Drosophila* causa un incremento en la cantidad total de proteasoma 26S y 20S, sugiriendo un sistema de retroalimentación positiva (Tamás Szlanka et al. 2003). En los mamíferos, la inactivación del proteasoma causa la activación genética de NRF1 y NRF2, los cuales son factores de transcripción que funcionan como elementos de regulación positiva para inducir la sobreexpresión de diversas subunidades del proteasoma (Rousseau y Bertolotti 2018). La reducción de Rpt2 no incrementó la cantidad de los ortólogos de NRF2 (*cnc*) bajo estas condiciones. El incremento de la cantidad del proteasoma 26S al reducir la subunidad Rpt2 debe ser causada por otra vía por explorar. Sin embargo, el incremento en la cantidad del

proteasoma 26S puede indicar la acumulación de proteasomas 26S defectuoso, tal como ha sido propuesto por Szlanka (Tamás Szlanka et al. 2003). Una posible consecuencia de la constante síntesis de subunidades del proteasoma y su ensamblaje defectuoso es un costo energético alto y constante para la célula, causando estrés celular que podría desencadenar en la progresiva disfunción y muerte neuronal (Rousseau y Bertolotti 2018).

Conclusiones

La disminución de diferentes subunidades del proteasoma 26S puede inducir distinta expresividad de fenotipos neurodegenerativos al dirigir la expresión de RNAi en el sistema visual de *Drosophila*, entre las cuales se presentan: despigmentación, desorganización y muerte neuronal.

La expresión dirigida de los RNAi contra las subunidades del proteasoma 26S en el sistema nervioso de *Drosophila* causa defectos de locomoción en larvas.

La disminución de la subunidad Rpt2 en el sistema visual de *Drosophila* genera un fenotipo neurodegenerativo pronunciado al observarse un área extensa de muerte neuronal, la cual se incrementa aún más con la coexpresión de α -sinucleína humana.

La disminución de la subunidad Rpt2 usando el "driver" TH-Gal4 causa letalidad en el segundo estadio larvario. Al controlar la expresión del RNAi a partir de un día de adultos, la supervivencia se ve severamente reducida.

La locomoción inducida analizada a través de los ensayos de geotaxis negativa no se ve afectada con la disminución de Rpt2 bajo el promotor de TH. Tampoco la velocidad, tiempo de actividad y distancia recorrida analizadas usando el ensayo de arena circular mostró afectaciones al reducir Rpt2 en neuronas dopaminérgicas.

La expresión de α -sinucleína a partir de individuos adultos en *Drosophila* no genera defectos en la locomoción inducida analizada hasta los 16 días de edad.

La locomoción espontánea analizada reveló un comportamiento de hiperactividad en los individuos con la disminución de Rpt2. La cual es más marcada durante el periodo de luz.

La cantidad de sueño se encuentra disminuida en los individuos con la subunidad Rpt2 disminuida en neuronas dopaminérgicas.

La cantidad de sueño se aumenta en los individuos con la expresión de α -sinucleína bajo el promotor de TH.

La cantidad de dopamina no cambian en los cerebros de *Drosophila* con la subunidad Rpt2 disminuida, pero la cantidad de serotonina aumenta significativamente en los individuos envejecidos, generando una correlación positiva entre los niveles de dopamina y serotonina.

Perspectivas

- Ensayos de locomoción en larvas de tercer instar en individuos con la expresión de α -sinucleína y la reducción de cada una de las 13 subunidades estudiadas
- Análisis de la estructura interna de los ojos para identificar daños a nivel celular
- Análisis del funcionamiento del ojo para mediante registros electrofisiológicos para evaluar el funcionamiento del sistema visual
- Cuantificación de α -sinucleína por western blot para cada condición para determinar si aumenta progresivamente a medida que envejecen
- Cuantificación de la actividad del proteasoma por ensayos de fluorescencia para cada condición para determinar si disminuye a medida que envejecen
- Rescate del fenotipo al regresar a los individuos a la temperatura no permisiva (18°C)
- Caracterizar la liberación de dopamina para cada condición
- Caracterización de las subunidades $\beta 1$ y Rpn1, las cuales mostraron interacción genética con α -sinucleína
- Determinar la actividad del proteasoma 26S para corroborar su funcionalidad

Financiamiento

No. De Beca de CONACyT: 404427

Agradecimientos

Al Dr. Ivan Sánchez Díaz por los experimentos de western blot y el apoyo técnico. Al M. en C. René Hernández Vargas por el apoyo técnico. A la unidad de secuenciación del IBt. Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del IBt.

Bibliografía

- Alghamdi, Amani, Julie Vallortigara, David R. Howlett, Martin Broadstock, Tibor Hortobágyi, Clive Ballard, Alan J. Thomas, et al. 2017. "Reduction of RPT6/S8 (a Proteasome Component) and Proteasome Activity in the Cortex is Associated with Cognitive Impairment in Lewy Body Dementia". Editado por Steffany Bennett. *Journal of Alzheimer's Disease* 57 (2): 373–86. <https://doi.org/10.3233/JAD-160946>.
- Alvarez-Castelao, Beatriz, Marc Goethals, Joël Vandekerckhove, y José G Castaño. 2014. "Mechanism of cleavage of alpha-synuclein by the 20S proteasome and modulation of its degradation by the RedOx state of the N-terminal methionines." *Biochimica et biophysica acta* 1843 (2): 352–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.018>.
- Ascherio, Alberto, y Michael A. Schwarzschild. 2016. "The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention". *The Lancet Neurology* 15 (12): 1257–72. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7).
- Aso, Yoshinori, Andrea Herb, Maite Ogueta, Igor Siwanowicz, Thomas Templier, Anja B. Friedrich, Kei Ito, Henrike Scholz, y Hiromu Tanimoto. 2012. "Three Dopamine pathways induce aversive odor memories with different stability". *PLoS Genetics* 8 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002768>.
- Atkin, Graham, y Henry Paulson. 2014. "Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease." *Frontiers in molecular neuroscience* 7 (enero): 63. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00063>.
- Bäckström, David, Gabriel Granåsen, Magdalena Eriksson Domellöf, Jan Linder, Susanna Jakobson Mo, Katrine Riklund, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow, y Lars Forsgren. 2018. "Early predictors of mortality in parkinsonism and Parkinson disease". *Neurology* 91 (22): e2045–56. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000006576>.
- Bedford, Lynn, David Hay, Anny Devoy, Simon Paine, Des G Powe, Rashmi Seth, Trevor Gray, et al. 2008. "Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (33): 8189–98. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2218-08.2008>.
- Belote, John M, y Eric Fortier. 2002. "Targeted expression of dominant negative proteasome mutants in Drosophila melanogaster." *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 34 (1–2): 80–82. <https://doi.org/10.1002/gene.10131>.
- Ben-Nissan, Gili, y Michal Sharon. 2014. "Regulating the 20S Proteasome Ubiquitin-Independent Degradation Pathway." *Biomolecules* 4 (3): 862–84. <https://doi.org/10.3390/biom4030862>.
- Benabid, Alim Louis, Stephan Chabardes, John Mitrofanis, y Pierre Pollak. 2009. "Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease". *The Lancet Neurology* 8 (1): 67–81. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70291-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70291-6).
- Bentea, Eduard, Anke Van der Perren, Joeri Van Liefveringe, Anissa El Arfani, Giulia Albertini, Thomas Demuyser, Ellen Merckx, et al. 2015. "Nigral Proteasome Inhibition in Mice Leads to Motor and Non-Motor Deficits and Increased Expression of Ser129 Phosphorylated α -Synuclein." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9 (enero): 68. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00068>.
- Bilen, Julide, y Nancy M Bonini. 2005. "Drosophila as a Model for Human Neurodegenerative Disease." *Annual Review of Genetics* 39 (enero): 153–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095804>.
- Bodis-Wollner, Ivan, Piotr B. Kozlowski, Sofya Glazman, y Shahnaz Miri. 2014. "A-Synuclein in the Inner Retina in Parkinson Disease". *Annals of Neurology* 75 (6): 964–66. <https://doi.org/10.1002/ana.24182>.
- Bukhatwa, Salma, Bai-Yun Zeng, Sarah Rose, y Peter Jenner. 2010. "A comparison of changes in proteasomal subunit expression in the substantia nigra in Parkinson's disease, multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy." *Brain research* 1326 (abril): 174–83. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.045>.
- Cascales-Angosto, María. 2005. "Vía de la ubiquitina-proteosoma". *Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia* 71: 45–82.
- Choi, P, N Ostrerova-Golts, D Sparkman, E Cochran, J M Lee, y B Wolozin. 2000. "Parkin is metabolized by the ubiquitin/proteasome system." *Neuroreport* 11 (12): 2635–38. <https://doi.org/10.1097/00001756-200008210-00006>.
- Chondroganni, Niki, Marianthi Sakellari, Maria Lefaki, Nikoletta Papaevgeniou, y Efstathios S Gonos. 2014. "Proteasome activation delays aging in vitro and in vivo." *Free radical biology & medicine* 71 (junio): 303–20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.031>.

- Ciechanover, Aaron, y Patrik Brundin. 2003. "The Ubiquitin Proteasome System in Neurodegenerative Diseases". *Neuron* 40 (2): 427–46. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00606-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00606-8).
- Connolly, Barbara S., y Anthony E. Lang. 2014. "Pharmacological Treatment of Parkinson Disease". *JAMA* 311 (16): 1670. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>.
- Dantuma, Nico P, y Laura C Bott. 2014. "The Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegenerative Diseases: Precipitating Factor, yet Part of the Solution." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7 (enero): 70. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00070>.
- Davidson, Sigurros, Alice Cronin-Golomb, y Alison Lee. 2005. "Visual and spatial symptoms in Parkinson's disease". *Vision Research* 45 (10): 1285–96. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2004.11.006>.
- Dorsey, E. Ray, Todd Sherer, Michael S. Okun, y Bastiaan R. Bloem. 2018. "The emerging evidence of the Parkinson pandemic". *Journal of Parkinson's Disease* 8 (s1): S3–8. <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>.
- Droggiti, Anna, Cherry Chen-Ying Ho, Leonidas Stefanis, William T Dauer, y Hardy J Rideout. 2011. "Targeted disruption of neuronal 19S proteasome subunits induces the formation of ubiquitinated inclusions in the absence of cell death." *Journal of neurochemistry* 119 (3): 630–43. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07444.x>.
- Duke, D. C., L. B. Moran, M. E. Kalaitzakis, M. Deprez, D. T. Dexter, R. K B Pearce, y M. B. Graeber. 2006. "Transcriptome analysis reveals link between proteasomal and mitochondrial pathways in Parkinson's disease". *Neurogenetics* 7 (3): 139–48. <https://doi.org/10.1007/s10048-006-0033-5>.
- Dyllick-Brenzinger, Melanie, Cheryl A D'Souza, Burkhardt Dahlmann, Peter-Michael Kloetzel, y Anurag Tandon. 2010. "Reciprocal effects of alpha-synuclein overexpression and proteasome inhibition in neuronal cells and tissue." *Neurotoxicity research* 17 (3): 215–27. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9094-1>.
- E. Rincon-Limas, Diego, Kurt Jensen, y Pedro Fernandez-Funez. 2012. "Drosophila Models of Proteinopathies: the Little Fly that Could". *Current Pharmaceutical Design* 18 (8): 1108–22. <https://doi.org/10.2174/138161212799315894>.
- Erekat, Nour S. 2018. "Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease". En *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, 65–82. Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch4>.
- Feany, M B, y W W Bender. 2000. "A Drosophila model of Parkinson's disease." *Nature* 404 (6776): 394–98. <https://doi.org/10.1038/35006074>.
- Forno, Lysia S. 1996. "Neuropathology of Parkinson's Disease". *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55 (3): 259–72. <https://doi.org/10.1097/00005072-199603000-00001>.
- Gajula Balija, Madhu Babu, Christian Griesinger, Alf Herzig, Markus Zweckstetter, y Herbert Jäckle. 2011. "Pre-fibrillar α -synuclein mutants cause Parkinson's disease-like non-motor symptoms in Drosophila." Editado por Ralf Krahe. *PLoS one* 6 (9): e24701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024701>.
- Glickman, Michael H., y Aaron Ciechanover. 2002. "The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction". *Physiol Rev* 82 (2): 373–428.
- Grünblatt, E., S Mandel, J Jacob-Hirsch, S Zeligson, N Amariglio, G Rechavi, J Li, et al. 2004. "Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes". *Journal of Neural Transmission* 111 (12): 1543–73. <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0212-1>.
- Grünblatt, E., Sonja Zehetmayer, Christian P. Jacob, Thomas Müller, Wolfgang H. Jost, y Peter Riederer. 2010. "Pilot study: Peripheral biomarkers for diagnosing sporadic Parkinson's disease". *Journal of Neural Transmission* 117 (12): 1387–93. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0509-1>.
- Hansen, Christian, y Jia-Yi Li. 2012. "Beyond α -synuclein transfer: pathology propagation in Parkinson's disease." *Trends in molecular medicine* 18 (5): 248–55. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.002>.
- Haywood, Annika F M, y Brian E Staveley. 2004. "Parkin counteracts symptoms in a Drosophila model of Parkinson's disease." *BMC neuroscience* 5 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-5-14>.
- Hernández-Vargas, René, Luis Fonseca-Ornelas, Ignacio López-González, Juan Riesgo-Escovar, Mario Zurita, y Enrique Reynaud. 2011. "Synphilin suppresses α -synuclein neurotoxicity in a Parkinson's disease Drosophila model." *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 49 (5): 392–402. <https://doi.org/10.1002/dvg.20740>.
- Huot, Philippe, y Susan H. Fox. 2013. "The serotonergic system in motor and non-motor manifestations of Parkinson's disease". *Experimental Brain Research* 230 (4): 463–76. <https://doi.org/10.1007/s00221-013-3621-2>.
- Im, Eunju, y Kwang Chul Chung. 2016. "Precise assembly and regulation of 26S proteasome and correlation between proteasome dysfunction and neurodegenerative diseases". *BMB Reports* 49 (9): 459–73. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.9.094>.
- Jansen, Anne H. P., Eric A. J. Reits, y Elly M. Hol. 2014. "The Ubiquitin Proteasome System in Glia and Its Role in Neurodegenerative Diseases". *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7 (agosto). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00073>.
- Jellinger, Kurt A. 2017. *Neuropathology of Nonmotor Symptoms of Parkinson's Disease. International Review of Neurobiology*. 1a ed. Vol. 133. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2017.05.005>.
- Julienne, Hannah, Edgar Buhl, David S Leslie, y James J.L. Hodge. 2017. "Drosophila PINK1 and parkin loss-of-function mutants display a range of non-motor Parkinson's disease phenotypes". *Neurobiology of Disease* 104 (agosto): 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.014>.

- Kabashi, Edor, Jeffrey N. Agar, Michael J. Strong, y Heather D. Durham. 2012. "Impaired proteasome function in sporadic amyotrophic lateral sclerosis". *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 13 (4): 367–71. <https://doi.org/10.3109/17482968.2012.686511>.
- Karam, Caline S., Sandra K. Jones, y Jonathan A. Javitch. 2019. "Come Fly with Me: An overview of dopamine receptors in *Drosophila melanogaster*". *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 1 (March): 1–10. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13277>.
- Kasture, Ameya Sanjay, Thomas Hummel, Sonja Sucic, y Michael Freissmuth. 2018. "Big lessons from tiny flies: *Drosophila melanogaster* as a model to explore dysfunction of dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems". *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061788>.
- Kniepert, Andrea, y Marcus Groettrup. 2014. "The unique functions of tissue-specific proteasomes." *Trends in biochemical sciences* 39 (1): 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.10.004>.
- Kong, Eric C, Katherine Woo, Haiyan Li, Tim Lebestky, Nasima Mayer, Melissa R Sniffen, Ulrike Heberlein, Roland J Bainton, Jay Hirsh, y Fred W Wolf. 2010. "A pair of dopamine neurons target the D1-like dopamine receptor *dopr* in the central complex to promote ethanol-stimulated locomotion in *drosophila*". *PLoS ONE* 5 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009954>.
- Kumar, J P. 2001. "Signalling pathways in *Drosophila* and vertebrate retinal development." *Nature reviews. Genetics* 2 (11): 846–57. <https://doi.org/10.1038/35098564>.
- Lang, A E, y K Johnson. 1987. "Akathisia in idiopathic Parkinson's disease." *Neurology* 37 (3): 477–81. <https://doi.org/10.1212/wnl.37.3.477>.
- Lee, Francesca K M, Azaria K Y Wong, Yuk Wa Lee, Oi Wan Wan, H Y Edwin Chan, y Kenny K K Chung. 2009. "The role of ubiquitin linkages on alpha-synuclein induced-toxicity in a *Drosophila* model of Parkinson's disease." *Journal of neurochemistry* 110 (1): 208–19. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06124.x>.
- Lilienbaum, Alain. 2013. "Relationship between the proteasomal system and autophagy." *International journal of biochemistry and molecular biology* 4 (1): 1–26. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3627065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lorenc-Koci, Elżbieta, Tomasz Lenda, Lucyna Antkiewicz-Michaluk, Jadwiga Wardas, Helena Domin, Maria Smiałowska, y Jolanta Konieczny. 2011. "Different effects of intranigral and intrastriatal administration of the proteasome inhibitor lactacystin on typical neurochemical and histological markers of Parkinson's disease in rats." *Neurochemistry international* 58 (7): 839–49. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.03.013>.
- Lorraine V Kalia, Anthony E Lang, y Lancet. 2015. "Parkinson's disease Lorraine". *Lancet* 24 (1): 92–98. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).
- Lu, Bingwei. 2005. "Understanding and treating neurodegeneration: insights from the flies." *Age (Dordrecht, Netherlands)* 27 (3): 225–39. <https://doi.org/10.1007/s11357-005-2917-y>.
- Lundgren, Josefin, Patrick Masson, Claudio A Realini, y Patrick Young. 2003. "Use of RNA interference and complementation to study the function of the *Drosophila* and human 26S proteasome subunit S13." *Molecular and cellular biology* 23 (15): 5320–30. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=165711&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- MacInnes, Nicholas, Mahmoud M. Iravani, Elaine Perry, Margaret Piggott, Robert Perry, Peter Jenner, y Clive Ballard. 2008. "Proteasomal abnormalities in cortical Lewy body disease and the impact of proteasomal inhibition within cortical and cholinergic systems". *Journal of Neural Transmission* 115 (6): 869–78. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0027-6>.
- Majeed, Zana R., Esraa Abdeljaber, Robin Soveland, Kristin Cornwell, Aubrey Bankemper, Felicitas Koch, y Robin L. Cooper. 2016. "Modulatory Action by the Serotonergic System: Behavior and Neurophysiology in *Drosophila melanogaster*". *Neural Plasticity* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7291438>.
- Martin, Ciara A, Angel Barajas, George Lawless, Hakeem O Lawal, Khadij Assani, Yosephine P Lumintang, Vanessa Nunez, y David E Krantz. 2014. "Synergistic effects on dopamine cell death in a *Drosophila* model of chronic toxin exposure." *Neurotoxicology* 44 (septiembre): 344–51. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.08.005>.
- Martinez, B A, H Kim, A Ray, G A Caldwell, y K A Caldwell. 2015. "A bacterial metabolite induces glutathione-tractable proteostatic damage, proteasomal disturbances, and PINK1-dependent autophagy in *C. elegans*". *Cell Death and Disease* 6 (10): e1908. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.270>.
- Matilla, A., C Gorbea, D D Einum, J Townsend, A Michalik, C van Broeckhoven, C C Jensen, K J Murphy, L J Ptáček, y Y H Fu. 2001. "Association of ataxin-7 with the proteasome subunit S4 of the 19S regulatory complex." *Human molecular genetics* 10 (24): 2821–31. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.24.2821>.
- Metropolitan, Tokyo, Geriatric Hospital, S. Kuzuhara, H. Mori, N. Izumiyama, M. Yoshimura, y Y. Ihara. 1988. "Lewy bodies are ubiquitinated". *Acta Neuropathologica* 75 (4): 345–53. <https://doi.org/10.1007/BF00687787>.
- Miller, Richard J., y Scott M. Wilson. 2003. "Neurological disease: UPS stops delivering!" *Trends in Pharmacological Sciences* 24 (1): 18–23. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)00011-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)00011-1).
- Molina-Mateo, Daniela, Nicolás Fuenzalida-Urbe, Sergio Hidalgo, Claudia Molina-Fernández, Jorge Abarca, Rafaella V Zárate, Marcela Escandón, Reinaldo Figueroa, María Florencia Tevy, y Jorge M Campusano. 2017. "Characterization of a presymptomatic stage in a *Drosophila* Parkinson's disease model: Unveiling dopaminergic compensatory mechanisms". *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1863 (11): 2882–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2017.07.013>.

- Nakashima, Akira, Yu Kodani, Yoko S. Kaneko, Hiroshi Nagasaki, y Akira Ota. 2018. "Proteasome-mediated degradation of tyrosine hydroxylase triggered by its phosphorylation: a new question as to the intracellular location at which the degradation occurs". *Journal of Neural Transmission* 125 (1): 9–15. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1653-z>.
- Nichols, Charles D., Jaime Becnel, y Udai B. Pandey. 2012. "Methods to Assay &Drosophila& Behavior". *Journal of Visualized Experiments*, núm. 61: 2–6. <https://doi.org/10.3791/3795>.
- Niens, Janna, Fabienne Reh, Büşra Çoban, Karol Cichewicz, Julia Eckardt, Yi-Ting Liu, Jay Hirsh, y Thomas D. Riemensperger. 2017. "Dopamine Modulates Serotonin Innervation in the Drosophila Brain". *Frontiers in Systems Neuroscience* 11 (October): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00076>.
- Olanow, C. W., y W. G. Tatton. 1999. "ETIOLOGY AND PATHOGENESIS OF PARKINSON'S DISEASE". *Annual Review of Neuroscience* 22 (1): 123–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.123>.
- Orre, Marie, Willem Kamphuis, Stephanie Dooves, Lieneke Kooijman, Elena T. Chan, Christopher J. Kirk, Vanessa Dimayuga Smith, et al. 2013. "Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease". *Brain* 136 (5): 1415–31. <https://doi.org/10.1093/brain/awt083>.
- Ortega, Z., M. Díaz-Hernández, y J. J. Lucas. 2007. "Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington's disease?" *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (17): 2245–57. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7222-8>.
- Ottolini, Denis, Tito Calí, Ildikò Szabò, y Marisa Brini. 2017. "Alpha-synuclein at the intracellular and the extracellular side: Functional and dysfunctional implications". *Biological Chemistry* 398 (1): 77–100. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0201>.
- P. McNaught, Kevin St., Roger Belzair, Ole Isacson, Peter Jenner, y C. Warren Olanow. 2003. "Altered Proteasomal Function in Sporadic Parkinson's Disease". *Experimental Neurology* 179 (1): 38–46. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8050>.
- Pagano, Gennaro, y Marios Politis. 2018. "Molecular Imaging of the Serotonergic System in Parkinson's Disease". En *Imaging in Movement Disorders*, 1a ed., 141:173–210. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2018.08.002>.
- Paine, Simon M L, Glenn Anderson, Karen Bedford, Karen Lawler, R John Mayer, James Lowe, y Lynn Bedford. 2013. "Pale body-like inclusion formation and neurodegeneration following depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurones are independent of α -synuclein." Editado por Ted M. Dawson. *PLoS one* 8 (1): e54711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054711>.
- Pang, Shirley Yin Yu, Philip Wing Lok Ho, Hui Fang Liu, Chi Ting Leung, Lingfei Li, Eunice Eun Seo Chang, David Boyer Ramsden, y Shu Leong Ho. 2019. "The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease". *Translational Neurodegeneration* 8 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40035-019-0165-9>.
- Paricio, Nuria, y Verónica Muñoz-Soriano. 2011. "Drosophila models of Parkinson's disease: Discovering relevant pathways and novel therapeutic strategies". *Parkinson's Disease* 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/520640>.
- Plaçais, Pierre Yves, y Thomas Preat. 2013. "To favor survival under food shortage, the brain disables costly memory". *Science* 339 (6118): 440–42. <https://doi.org/10.1126/science.1226018>.
- Polymeropoulos, Mihael H, Christian Lavedan, Elisabeth Leroy, Susan E Ide, Anindya Dehejia, Amalia Dutra, Brian Pike, et al. 1997. "Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease". *Science* 276 (June): 2045–47. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>.
- Potdar, Sheetal, y Vasu Sheeba. 2018. "Wakefulness is promoted during day time by PDFR signalling to dopaminergic neurons in Drosophila melanogaster". *eNeuro* 5 (4): 1–17. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0129-18.2018>.
- Prudon, Benjamin, Gordon W. Duncan, Tien K. Khoo, Alison J. Yarnall, David J. Burn, y Kirstie N. Anderson. 2014. "Primary sleep disorder prevalence in patients with newly diagnosed Parkinson's disease". *Movement Disorders* 29 (2): 259–62. <https://doi.org/10.1002/mds.25730>.
- Prüßing, Katja, Aaron Voigt, y Jörg B Schulz. 2013. "Drosophila melanogaster as a model organism for Alzheimer's disease." *Molecular neurodegeneration* 8 (1): 35. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-35>.
- Rabl, Julius, David M. Smith, Yadong Yu, Shih-Chung Chang, Alfred L. Goldberg, y Yifan Cheng. 2008. "Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases." *Molecular cell* 30 (3): 360–68. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.004>.
- Rana, Anil, Michael Rera, y David W Walker. 2013. "Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (21): 8638–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216197110>.
- Riemensperger, Thomas, Guillaume Isabel, H. Coulom, K. Neuser, L. Seugnet, K. Kume, M. Iche-Torres, et al. 2011. "Behavioral consequences of dopamine deficiency in the Drosophila central nervous system". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (2): 834–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010930108>.
- Riemensperger, Thomas, Abdul Raouf Issa, Ulrike Pech, Hélène Coulom, Mĩ-Và Vãn Nguyễn, Marlène Cassar, Mélanie Jacquet, André Fiala, y Serge Birman. 2013. "A Single Dopamine Pathway Underlies Progressive Locomotor Deficits in a Drosophila Model of Parkinson Disease". *Cell Reports* 5 (4): 952–60. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.032>.
- Rodnitzky, Robert L. 2012. "Visual dysfunction in Parkinson's disease". *Parkinson's Disease, Second Edition*, 257–63. <https://doi.org/10.1201/b12948>.

- Rodríguez-Violante, Mayela, Leora Velásquez-Pérez, y Amin Cervantes-Arriaga. 2019. "Incidence rates of Parkinson's disease in Mexico: Analysis of 2014-2017 statistics". *Revista Mexicana de Neurociencia* 20 (3): 136–40. <https://doi.org/10.24875/rmn.m19000043>.
- Ross, Christopher A, y Michelle A Poirier. 2004. "Protein aggregation and neurodegenerative disease", julio.
- Rousseau, Adrien, y Anne Bertolotti. 2018. "Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0040-z>.
- Sang, Tzu-Kang, Hui-Yun Chang, George M Lawless, Anuradha Ratnaparkhi, Lisa Mee, Larry C Ackerson, Nigel T Maidment, David E Krantz, y George R Jackson. 2007. "A Drosophila model of mutant human parkin-induced toxicity demonstrates selective loss of dopaminergic neurons and dependence on cellular dopamine." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (5): 981–92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4810-06.2007>.
- Setsuie, Rieko, y Keiji Wada. 2007. "The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases". *Neurochemistry International* 51 (2-4 SPEC. ISS.): 105–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.05.007>.
- Sharon, Michal, Thomas Taverner, Xavier I Ambroggio, Raymond J Deshaies, y Carol V Robinson. 2006. "Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes." *PLoS biology* 4 (8): e267. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040267>.
- Simonova, V. V., M. A. Guzeev, M. N. Karpenko, T. S. Shemyakova, I. V. Ekimova, y Yu. F. Pastukhov. 2018. "Changes in characteristics of sleep-wake cycle and motor activity at the preclinical stage of Parkinson's disease in old rats". *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova* 118 (4): 14. <https://doi.org/10.17116/jnevro20181184214>.
- Simons, Janine A. 2017. *Swallowing Dysfunctions in Parkinson's Disease. International Review of Neurobiology*. 1a ed. Vol. 134. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2017.05.026>.
- Sorokin, A. V., E. R. Kim, y L. P. Ovchinnikov. 2010. "Proteasome system of protein degradation and processing". *Biochemistry (Moscow)* 74 (13): 1411–42. <https://doi.org/10.1134/S000629790913001X>.
- Stacy, Mark, y Andrew Galbreath DO. 2008. "Optimizing Long-Term Therapy for Parkinson Disease". *Clinical Neuropharmacology* 31 (1): 51–56. <https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e318065b088>.
- Stefanis, Leonidas, Evangelia Emmanouilidou, Marina Pantazopoulou, Deniz Kirik, Kostas Vekrellis, y George K. Tofaris. 2019. "How is alpha-synuclein cleared from the cell?" *Journal of Neurochemistry*, 1–14. <https://doi.org/10.1111/jnc.14704>.
- Subramaniam, Mahalakshmi, Beatrice Kern, Simone Vogel, Verena Klose, Gaby Schneider, y Jochen Roeper. 2014. "Selective increase of in vivo firing frequencies in DA SN neurons after proteasome inhibition in the ventral midbrain". *European Journal of Neuroscience* 40 (6): 2898–2909. <https://doi.org/10.1111/ejn.12660>.
- Sun, Jun, An Qi Xu, Julia Giraud, Haiko Poppinga, Thomas Riemensperger, André Fiala, y Serge Birman. 2018. "Neural Control of Startle-Induced Locomotion by the Mushroom Bodies and Associated Neurons in Drosophila". *Frontiers in Systems Neuroscience* 12 (March): 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2018.00006>.
- Szlanka, T. 2003. "Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in Drosophila melanogaster". *Journal of Cell Science* 116 (6): 1023–33. <https://doi.org/10.1242/jcs.00332>.
- Szlanka, Tamás, Lajos Haracska, István Kiss, Péter Deák, Eva Kurucz, István Andó, Erika Virágh, y Andor Udvardy. 2003. "Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in Drosophila melanogaster." *Journal of cell science* 116 (Pt 6): 1023–33. <https://doi.org/10.1242/jcs.00332>.
- Tanaka, Keiji, y Noriyuki Matsuda. 2014. "Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy." *Biochimica et biophysica acta* 1843 (1): 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.012>.
- Tapia-Núñez, J, y P Chaná-Cuevas. 2004. "Diagnóstico de la enfermedad de Parkinson". *Revista de Neurología* 38 (1): 61–67.
- Tashiro, Yoshitaka, Makoto Urushitani, Haruhisa Inoue, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, et al. 2012. "Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis." *The Journal of biological chemistry* 287 (51): 42984–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.417600>.
- Taylor, J Paul, John Hardy, y Kenneth H Fischbeck. 2002. "Toxic proteins in neurodegenerative disease." *Science (New York, N.Y.)* 296 (5575): 1991–95. <https://doi.org/10.1126/science.1067122>.
- Todd, Amy M., y Brian E. Staveley. 2008. "Pink1 suppresses α -synuclein -induced phenotypes in a Drosophila model of Parkinson's disease". *Genome* 51 (12): 1040–46. <https://doi.org/10.1139/G08-085>.
- Tsakiri, Eleni N, Gerasimos P Sykiotis, Issidora S Papassideri, Evangelos Terpos, Meletios A Dimopoulos, Vassilis G Gorgoulis, Dirk Bohmann, y Ioannis P. Trougakos. 2013. "Proteasome dysfunction in Drosophila signals to an Nrf2-dependent regulatory circuit aiming to restore proteostasis and prevent premature aging". *Aging Cell* 12 (5): 802–13. <https://doi.org/10.1111/acel.12111>.
- Tysnes, Ole Bjørn, y Anette Storstein. 2017. "Epidemiology of Parkinson's disease". *Journal of Neural Transmission* 124 (8): 901–5. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>.
- Valadas, Jorge S., Giovanni Esposito, Dirk Vandekerckhove, Katarzyna Miskiewicz, Liesbeth Deaulmerie, Susanna Raitano, Philip Seibler, Christine Klein, y Patrik Verstreken. 2018. "ER Lipid Defects in Neuropeptidergic Neurons Impair Sleep Patterns in Parkinson's Disease". *Neuron* 98 (6): 1155-1169.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.022>.

- Varga, Scott J, Cheng Qi, Eric Podolsky, y Daewoo Lee. 2014. "A new drosophila model to study the interaction between genetic and environmental factors in Parkinson's disease." *Brain research* 1583: 277–86. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.08.021>.
- Velentzas, Panagiotis D, Athanassios D Velentzas, Asimina D Pantazi, Vassiliki E Mpakou, Christos G Zervas, Issidora S Papassideri, y Dimitrios J Stravopodis. 2013. "Proteasome, but not autophagy, disruption results in severe eye and wing dysmorphia: a subunit- and regulator-dependent process in Drosophila." Editado por Kostas Vekrellis. *PLoS one* 8 (11): e80530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080530>.
- Wahl, Claudia, Sabine Kautzmann, Guido Krebiehl, Karsten Strauss, Dirk Voitalla, Thomas Müller, Peter Bauer, Olaf Riess, y Rejko Krüger. 2008. "A comprehensive genetic study of the proteasomal subunit S6 ATPase in German Parkinson's disease patients." *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 115 (8): 1141–48. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0054-3>.
- Wakabayashi, Koichi, Kunikazu Tanji, Saori Odagiri, Yasuo Miki, Fumiaki Mori, y Hitoshi Takahashi. 2013. "The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders." *Molecular neurobiology* 47 (2): 495–508. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8280-y>.
- Wills, Jonathan, Jessica Jones, Thomas Haggerty, Valeriy Duka, Jeffrey N Joyce, y Anita Sidhu. 2010. "Elevated tauopathy and alpha-synuclein pathology in postmortem Parkinson's disease brains with and without dementia." *Experimental neurology* 225 (1): 210–18. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.06.017>.
- Woelk, Tanja, Sara Sigismund, Lorenza Penengo, y Simona Polo. 2007. "The ubiquitination code: a signalling problem." *Cell division* 2 (1): 11. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-11>.
- Wójcicki, Cezary, George N. DeMartino, Cezary Wójcicki, y George N. DeMartino. 2002. "Analysis of Drosophila 26 S proteasome using RNA interference." *The Journal of biological chemistry* 277 (8): 6188–97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109996200>.
- Wu, Yili, Yu Deng, Shuting Zhang, Yawen Luo, Fang Cai, Zhuohua Zhang, Weihui Zhou, Tingyu Li, y Weihong Song. 2015. "Amyloid- β precursor protein facilitates the regulator of calcineurin 1-mediated apoptosis by downregulating proteasome subunit α type-5 and proteasome subunit β type-7." *Neurobiology of aging* 36 (1): 169–77. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.029>.
- Xie, Wenjie, Xuping Li, Chao Li, Wen Zhu, Joseph Jankovic, y Weidong Le. 2010. "Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson's disease". *Journal of Neurochemistry* 115: 188–99. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06914.x>.
- Xiong, Yulan, y Jianzhong Yu. 2018. "Modeling Parkinson's Disease in Drosophila: What Have We Learned for Dominant Traits?" *Frontiers in Neurology* 9 (APR). <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00228>.
- Yaribeygi, Habib, Yunes Panahi, Behjat Javadi, y Amirhossein Sahebkar. 2018. "The Underlying Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: A Mechanistic Review". *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 17 (3): 207–15. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180425122557>.
- Yeh, Chun-Hung, Marlon Jansen, y Thomas Schmidt-Glenewinkel. 2011. "Role of the proteasome in fly models of neurodegeneration." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 793 (enero): 149–65. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-328-8_10.
- Yin, Guowei, Tomas Lopes da Fonseca, Sibylle E. Eisbach, Ane Martín Anduaga, Carlo Breda, Maria L. Orcellet, Éva M. Szego, et al. 2014. " α -Synuclein interacts with the switch region of Rab8a in a Ser129 phosphorylation-dependent manner". *Neurobiology of Disease* 70: 149–61. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.06.018>.
- Zhou, Zhi Dong, Shao Ping Xie, Sushmitha Sathiyamoorthy, Wuan Ting Saw, Tan Ye Sing, Shin Hui Ng, Heidi Pek Hup Chua, et al. 2015. "F-box protein 7 mutations promote protein aggregation in mitochondria and inhibit mitophagy". *Human Molecular Genetics* 24 (22): 6314–30. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv340>.