



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Efecto de la expresión de α -sinucleína en sistema olfativo
de *Drosophila melanogaster*.**

Tesis que para optar por el grado de maestría en ciencias

PRESENTA:

Estefanía De Allende Becerra

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique A. Reynaud Garza
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Leonor Pérez Martínez
Dra. Rosa María Uribe Villegas
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos, Noviembre, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Cuando suene nuestra última hora, será grande e inefable
nuestro gozo al ver a Quien en todo nuestro
quehacer sólo hemos podido columbrar”

-K. F. Gauss

Agradecimientos

Quiero agradecer muy especial y cariñosamente al Dr. Enrique Reynaud por todo su apoyo, paciencia, tiempo, comprensión, por su amistad y todas sus enseñanzas. Porque estoy segura de que no pude haber tenido un mejor tutor que él y sé que como él existen pocos. Dr. Reynaud, gracias por darme la gran oportunidad de formar parte de su laboratorio, me siento muy afortunada y siempre estaré agradecida con usted, porque tanto en lo académico e intelectual, como en lo personal pude aprender muchísimo de usted. Es un ejemplo a seguir para mí, admiro mucho el gran corazón que tiene y su gran ingenio. Gracias por haber sido como un papá para mí durante estos años en Cuernavaca, gracias por ser mentor y amigo al mismo tiempo. Por permitirme explorar y tener la libertad de innovar e incursionar en lo experimental que he notado que no es algo que todos los tutores permitan. No terminaría de decirle todo lo que siento y pienso en este momento pero en resumen gracias por todo.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por toda su generosidad, por todo lo que me ha brindado, por permitirme crecer y desarrollarme en ella, por darme todos los recursos necesarios para poder formarme como bióloga y ahora como maestra en ciencias bioquímicas, por darme mucho más que conocimiento académico. Espero pronto poder retribuir aunque sea un poco de lo mucho que me ha dado. Y al Instituto de Biotecnología (IBt) por ser ese gran lugar en él que durante los últimos años he podido aprender tanto y conocer gente maravillosa.

Agradezco a la Dra. Leonor Pérez y a la Dra. Rosa María Uribe, por formar parte de mi comité tutorial, por su tiempo y sus enriquecedoras sugerencias durante cada tutorial. Gracias por todo su apoyo y por confiar en mí, las admiro.

Gracias a los miembros de mi comité sinodal, el Dr. Gustavo Pedraza, el Dr. Takuya Shimizu, la Dra. María Rosa Ávila, el Dr. Paul Rosas y la Dra. Lorraine Jaimes. Muchas gracias por su enorme comprensión, su apoyo, tiempo, por todas sus sugerencias y por enseñarme con el ejemplo.

Quiero agradecer con cariño y admiración a los técnicos académicos, al Dr. Iván Sánchez Díaz y al M.B. René Hernández Vargas por todo su apoyo profesional, por haberme ayudado mucho siempre y por su amistad y compañerismo, porque siempre que necesité un consejo estuvieron ahí.

Agradezco al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del IBt por todo su apoyo y el excelente trabajo que desempeñan, especialmente a Xóchitl Alvarado, a Arturo Pimentel, a Andrés Saralegui y al Dr. Christopher Wood, sin ellos este trabajo no podría haberse llevado a cabo.

Gracias a Antonio Bolaños por ser tan eficiente en su trabajo, por ayudarnos tanto a todos los alumnos, por hacer nuestra vida y poco más fácil. Y a Gloria Villa por todo el apoyo brindado, porque sin ustedes todo habría sido más difícil.

También agradezco a la unidad de cómputo del IBt, a Arturo Ocádiz, David Castañeda, Juan Manuel Hurtado, Roberto Pablo Rodríguez y a Leonel Linares por su apoyo cada vez que se necesitó y por su constante disposición.

A la Dra. Verónica Narváez, por su apoyo y valiosos consejos.

A María del Carmen Muñoz por todo su apoyo, por ser una parte tan importante del laboratorio.

Agradezco también al Dr. Fernando Rosales por todos sus consejos, por ser un gran amigo y compañero de laboratorio. Gracias por siempre escucharme por darme consejos técnicos e intelectuales y por siempre estar dispuesto a discutir resultados y ayudarme a buscarles la lógica.

A mis demás compañeros y amigos del laboratorio, a Ángel Carvajal, a Iván Fernández, a Diego Zambrano, a Sayuri Hernández, a Andrés Nieto y a Aldo Pérez, porque quiero mucho a cada uno de ellos y con todos he compartido momentos especiales, gracias por su compañerismo y su apoyo siempre que lo necesité.

A mis amigos del IBt, Miguel Ángel Jiménez, Mauro Magaña, Eduardo Martínez Terrazas, Silvia Meyer, Eduardo Calvario y Arihel Hernández por todos los momentos que vivimos juntos y por su apoyo.

A Nadia Rodríguez, Mariana Bernal, y Cecilia Garcilazo por aún en la distancia siempre estar conmigo y ser un gran apoyo en mi vida, las quiero muchísimo.

A Roberto Ponce, por todo tu amor, comprensión y apoyo. Por siempre estar conmigo cuando lo necesite, por ser mi compañero durante esta travesía, mi cómplice, mi amigo, mi amor, mi colega, psicólogo, etc. Por los años juntos, por cada sonrisa y cada lágrima, porque sin ti nada de esto hubiese sido igual por aprender conmigo y dejarme aprender de ti, porque aprender junto a ti sigue siendo de mis cosas preferidas. Te amo.

Gracias a mis papás Consuelo Becerra y Bernardo De Allende, porque nunca han dejado de apoyarme, por todo su amor y todas sus enseñanzas, porque sino fuese por ellos yo no sería quien soy. Los amo y admiro.

Gracias a mis hermanas Ximena y Priscila De Allende porque siempre me han apoyado, por ser mis mejores porristas, porque se que morirían por mí y yo lo haría por ellas. Gracias por darme a la sobrinas más hermosas, las amo.

Quiero agradecer a todas las *Drosophilas* que sirvieron para que este proyecto pudiera llevarse a cabo.

Y sobre todo doy gracias a Dios por está maravillosa maestría que disfrute muchísimo, durante la cual aprendí y crecí mucho, gracias por permitirme todos los triunfos y satisfacciones vividas y por todo lo que falta, sin Él yo no sería quien soy y nada de esto sería posible, a Él toda la gloria, todo esto es gracias a Él y por Él.

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

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

- DGAPA/UNAM PAPIIT-IN204214**
- PAPIIT-IN206517**
- CONACyT 255478**
- Beca de maestría CONACyT No. 925577**
- Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)**

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 α -Sinucleína	1
1.2 Sinucleinopatías.....	3
1.2.1 Enfermedad de Parkinson	4
a) Epidemiología y generalidades	4
b) Dopamina.....	7
1.2.2 Demencia con cuerpos de Lewy (DCL)	9
1.2.3 Atrofia Sistémica múltiple (MSA)	11
1.3 El olfato y su relación con las enfermedades neurodegenerativas	12
1.4 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	14
1.4.1. Modelo de estudio para la enfermedad de Parkinson	14
1.4.2. Modelo de estudio para sistema olfativo	16
II. ANTECEDENTES	21
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Stocks y cruzas de líneas transgénicas	26
5.2 Pruebas motoras	26
5.3 Pruebas olfativas.....	27
5.4 Disecciones e inmunotinciones	27
5.5 Análisis estadísticos y procesamiento de datos.....	27
VI. RESULTADOS	29
6.1 Distribución de SNCA ^{wt} y SNCA ^{A30P} a lo largo del envejecimiento a partir de sistema olfativo.....	29
6.2 Efecto de la expresión de SNCA ^{wt} y SNCA ^{A30P} en neuronas olfativas sobre la capacidad motriz.....	34
6.3 Capacidad olfativa de moscas de 5 días que expresan SNCA ^{wt} y SNCA ^{A30P} en neuronas olfativas	36
6.4 Capacidad olfativa de moscas de 15 días que expresan SNCA ^{wt} y SNCA ^{A30P} en neuronas olfativas	37

6.5 Capacidad olfativa de moscas de 30 días que expresan SNCA ^{wt} y SNCA ^{A30P} en neuronas olfativas	39
6.6 Capacidad olfativa de moscas de 45 días que expresan SNCA ^{wt} y SNCA ^{A30P} en neuronas olfativas	40
VII. DISCUSIÓN	42
7.1 Ausencia de propagación a partir de neuronas olfativas de SNCA ^{wt} y SNCA ^{A30P}	42
7.2 Efecto olfativo y motor de la expresión de SNCA ^{wt} y SNCA ^{A30P} en neuronas olfativas	44
VIII. CONCLUSIONES	48
LITERATURA CITADA	50
REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	60
ANEXOS	61
ANEXO I. Genoma de <i>Drosophila melanogaster</i>	61
ANEXO II. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	61
ANEXO III. Prueba olfativa esquematizada	62

RESUMEN

A pesar de su gran abundancia en el sistema nervioso, la función de la proteína presináptica α -sinucleína (SNCA) aún no se ha definido. Sin embargo, existe evidencia de que una de sus principales funciones es la de participar en procesos de transporte y reciclaje vesicular, y en la liberación de neurotransmisores mediante exocitosis. Desde el punto de vista patogénico, esta proteína ha sido asociada con un grupo de enfermedades neurodegenerativas conocidas como sinucleinopatías, dentro de las cuales la más representativa es la enfermedad de Parkinson (PD).

La PD es el desorden neurodegenerativo motriz más común, además de la muerte de neuronas dopaminérgicas, el indicador clásico de esta enfermedad es la presencia de inclusiones o agregados proteicos llamados cuerpos de Lewy (LBs), compuestos principalmente por SNCA. De hecho, se ha propuesto que un indicador de la progresión de la PD es la aparición de LBs en distintas áreas del sistema nervioso (periférico y central), sugiriendo que el daño neuronal no se desarrolla de manera aleatoria, sino siguiendo patrones específicos que coinciden con la distribución de esta proteína a lo largo del sistema. Uno de los efectos de éstos patrones de neurodegeneración consiste en provocar disfunción olfativa la cual, relevantemente, es uno de los síntomas más tempranos de la PD, presentándose incluso décadas antes de que se manifiesten los síntomas motores característicamente asociados a esta enfermedad. Interesantemente, se ha observado que en las etapas iniciales de la enfermedad, los LBs se observan principalmente en el bulbo olfatorio pero conforme progresa la enfermedad, éstos comienzan a aparecer en otras regiones del sistema nervioso. Debido a esto, se ha sugerido que la SNCA puede propagarse a través de mecanismos similares al de los priones, desde la región olfativa hacia otras estructuras del sistema nervioso.

Es por esto que el objetivo principal de esta investigación fue evaluar el efecto de la expresión de SNCA en el sistema olfativo *D. melanogaster* y corroborar si esta proteína tiene la capacidad para propagarse trans-sinápticamente desde el sistema olfativo hacia otras regiones del sistema nervioso.

Para abordar estos objetivos, se expresó de manera transgénica a la SNCA^{wt} y la SNCA^{A30P} en neuronas olfativas de *D. melanogaster* bajo la dirección del promotor del correceptor olfativo Or83b que se expresa en la mayor parte de las neuronas olfativas. Posteriormente, moscas de 5, 15, 30 y 45 días fueron disectadas e inmunoteñidas contra SNCA para analizar mediante microscopía confocal la distribución de esta proteína y, a manera de control, la distribución de mCD8::GFP que fue dirigida de la misma manera en neuronas olfativas. En paralelo, se realizaron evaluaciones olfativas y motrices.

Se pudo determinar que la distribución de SNCA^{wt} y SNCA^{A30P} se mantuvo dentro del patrón de expresión inicial, por lo que aparentemente estas proteínas no cuentan con la capacidad intrínseca para propagarse desde las estructuras olfativas de *D. melanogaster*. Por otro lado, la expresión transgénica de estas proteínas en las neuronas ya mencionadas, no parece estar generando un impacto significativo en función de la capacidad motriz. Además, las moscas que expresan SNCA^{wt} en neuronas olfativas no presentan hiposmia en etapas juveniles. Sin embargo, sí se observa un decaimiento progresivo de la capacidad olfativa que a los 45 días de edad se

registra como una posible anosmia. La expresión transgénica de la SNCA^{A30P} en neuronas olfativas genera alteraciones olfatorias fluctuantes, provocando a los 15 y 45 días de edad un desempeño olfativo estadísticamente inferior respecto al de los organismos control (white).

ABSTRACT

Despite its high abundance in the nervous system, the function of the presynaptic protein α -synuclein (SNCA) is not well defined. Nevertheless, there is evidence that one of its main functions is to participate in vesicular fusion processes and neurotransmitter exocytosis. From the pathogenical point of view, it has been related to neurodegenerative diseases called α -synucleinopathies, being the most representative of them Parkinson's disease (PD).

PD is the most common motor neurodegenerative disorder and one of its main cellular features is the presence of cytoplasmic protein inclusions or aggregates, known as Lewy bodies (LBs), which are mainly composed of SNCA. Actually, it has been proposed that progression of PD can be tracked by looking at the emergence of LBs in different parts of the nervous system, suggesting that the neuronal damage is not random, instead it follows specific patterns that overlap with the distribution of SNCA in the nervous system. During the neurodegenerative process, olfactory disfunction often precedes the characteristic motor symptoms associated to PD by several years. Interestingly, it has been observed that also at the initial stages of this disease (pre-motor stages), LBs are mainly localized in the olfactory bulb, however, as the disease progresses, the distribution of the LBs also seems to expand to other regions of the nervous system. Due to this, it has been proposed that SNCA might spread through the nervous system from the olfactory regions to the rest of the brain, as time goes by.

For these reasons, the main objective of this research was to evaluate the effect of SNCA's expression using as model *D. melanogaster* olfactory system, and to corroborate if SNCA can actually propagate trans-synaptically *in vivo*. We were also interested to determine if ectopic distribution of SNCA correlated with parkinsonian symptoms, and if these depend of the presence of SNCA.

In order to achieve this, SNCA^{wt} and SNCA^{A30P} expressions were transgenetically driven to the olfactory neurons using the promoter of the fly olfactory coreceptor Or83b. Once obtained, 5, 15, 30 and 45 day old flies were dissected and immunofluorostained against SNCA. Samples were observed using confocal microscopy and the distribution of both proteins and mCD8::GFP (control), also driven by Or83b, were analyzed. In parallel, olfactory and motor test were performed to assess the effect of the expression of this protein in the olfactory system.

Our work showed that SNCA^{wt} and SNCA^{A30P} distribution stayed where they were initially expressed, that is, in the olfactory neurons and its projections; suggesting that apparently these proteins do not have the intrinsic ability to propagate from the olfactory system of *D. melanogaster*. Also, the transgenic expression of these proteins in olfactory neurons, did not seem to have a significant negative impact in the *D. melanogaster* motor ability. Additionally, flies transgenically expressing SNCA^{wt} in their olfactory neurons were not hyposmic at juvenile stages. However, a progressive olfactory decay was observed during aging and at 45 days of age they apparently

became anosmic. Regarding SNCA^{A30P} transgenic expression, it looks like it induced fluctuant olfactory alterations resulting in a lower olfactory performance compared to healthy flies (white) at the 15 and 45 days. The expression SNCA^{wt} and SNCA^{A30P} olfactory effects seems to be stochastic.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 α -Sinucleína

La α -sinucleína (Fig. 1), perteneciente a la familia de las sinucleínas (α , β , γ), es una proteína pre-sináptica de 140 aminoácidos y aproximadamente 14.5 kDa, codificada por el gen *PARK1* (o *SNCA*). Esta proteína cuenta con tres dominios: el extremo N-terminal que se ha reportado que es un dominio de unión a lípidos a través de sus motivos KTKEGV en α -hélice (residuos 1-87), el segmento hidrofóbico central o componente no-amiloideo (NAC) (residuos 61-95), y la cola ácida del extremo C-terminal (residuos 96-140) (Emamzadeh, 2016).

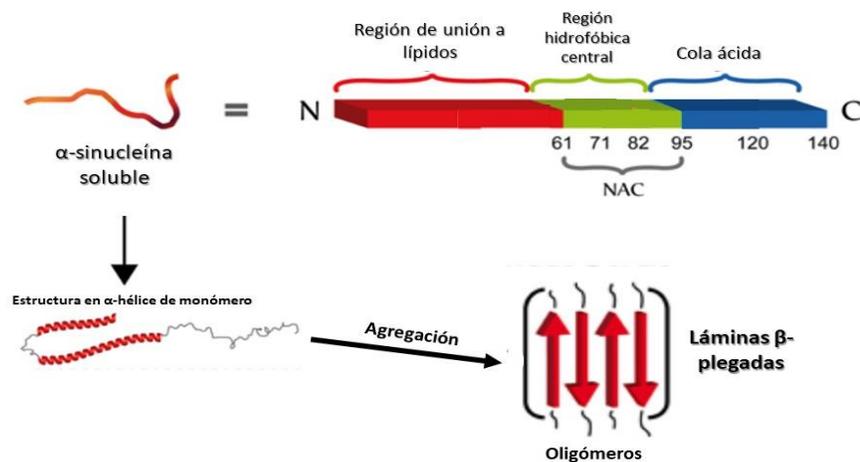


Figura 1.- Estructura de α -sinucleína. NAC: componente no-amiloideo. (Modificado de: Pacheco *et al.*, 2012).

A pesar de su gran abundancia en el sistema nervioso, su función celular aún no está clara. Existe evidencia que permite atribuirle ciertas posibles funciones, la más probable de ellas, es su papel en los procesos de transporte y reciclaje vesicular, y en la exocitosis para la liberación de neurotransmisores, principalmente de dopamina (Villegas *et al.*, 2014); esto se ha inferido gracias a que se ha observado la interacción de la SNCA con el complejo SNARE, que participa en la fusión vesicular, y se cree que la SNCA promueve su ensamblaje (Lou *et al.*, 2017). Además, en levadura, la sobreexpresión de α -sinucleína

humana parece interferir con la ruta secretoria temprana y parece inhibir la fusión membranal (Willingham *et al.*, 2003).

Por otro lado, también se sospecha que participa en la plasticidad sináptica, pues en estudios realizados en aves, se ha observado transcriptómicamente que sus niveles de expresión cambian de manera específica en regiones cerebrales involucradas en el aprendizaje de nuevos patrones de canto, sin embargo, aún no se sabe exactamente de qué manera esta proteína podría verse implicada y cuál sería su regulación (George *et al.*, 1995).

Finalmente, debido a que cuenta con un dominio de unión a lípidos, se ha propuesto que interacciona con ácidos grasos; además se ha observado que cuenta con la capacidad de unirse a fosfolípidos de membrana (Goedert, 2001; Emamzadeh, 2016; Koprach *et al.*, 2017; Lou *et al.*, 2017), de hecho, estudios estructurales *in vitro* y estudios *in vivo*, han reportado que al unirse a las membranas puede remodelarlas, y se ha sugerido que interviene en la curvatura de las mismas y en su posible tubulación (Bodner *et al.*, 2009; Middleton y Rhoades, 2010). Al respecto, se ha visto que tanto la α - como la β -sinucleína, son capaces de inhibir selectivamente a la fosfolipasa D2, ubicada en la membrana plasmática que se sabe está involucrada en señalización para regular el citoesqueleto, por lo que se propuso que estas sinucleínas podrían tener implicaciones en dicha regulación (Jenco *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2004); esto se comprobó de manera parcial, al encontrar evidencia que indica que la α -sinucleína puede interaccionar con espectrina y modular así el citoesqueleto de actina (Ordonez *et al.*, 2018).

En el contexto patogénico, el papel de esta proteína ha sido elucidado gracias al efecto que tiene su acumulación y/o mutación. Hasta el momento se han descrito seis mutaciones puntuales (A53T, E46P, A30P, H50Q, G51D y A53E) que provocan neurotoxicidad (Delamarre y Meissner, 2017) (Figura 2). Además, se ha demostrado que la sola sobreexpresión de *SNCA* silvestre (*SNCA^{wt}*), debido a un aumento de la dosis génica, es suficiente para desencadenar ciertas enfermedades neurodegenerativas, aún en ausencia de mutaciones que afecten su secuencia de aminoácidos; lo cual sugiere, que el simple incremento de la concentración de esta proteína, incluso sin cambios conformacionales, genera neurotoxicidad y un efecto dosis-respuesta. La duplicación del

gen induce una forma dominante de la enfermedad de Parkinson (PD) similar a la forma esporádica, mientras que la triplicación de este gen causa una aparición temprana y más agresiva de la enfermedad (Singleton *et al.*, 2003; Chartier-Harlin *et al.*, 2004).

También se ha observado que el exceso de SNCA induce disfunción mitocondrial causando daño oxidativo, el cual se ve agravado por la acumulación de dopamina no liberada, pudiendo provocar la inhibición del proteosoma (Hodara *et al.*, 2004), generando un círculo vicioso que promueve que ésta y otras proteínas defectuosas se acumulen exacerbando el daño. Al verse relacionada con distintas enfermedades neurodegenerativas, el estudio de esta proteína se vuelve muy importante desde el punto de vista clínico y de investigación básica y aplicada.

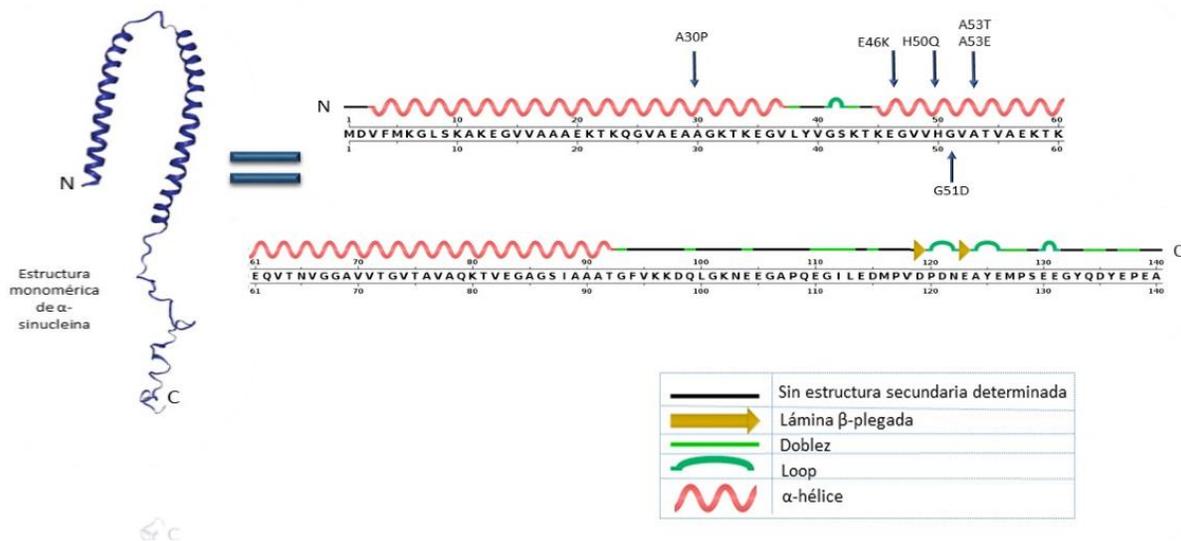


Figura 2.- Estructura secundaria de α-sinucleína, en donde se señalan las seis mutaciones puntuales asociadas a la enfermedad de Parkinson. (Basada en la estructura reportada por Ulmer *et al.*, 2005 y resultados predichos por RCSB PDB (Kabsch y Sander, 1983; Murzin *et al.*, 1995)).

1.2 Sinucleinopatías

En conjunto, las enfermedades en las que la SNCA se ve involucrada han sido llamadas sinucleinopatías, dentro de las cuales destacan: la demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la atrofia sistémica múltiple (MSA), esclerosis amiotrófica lateral, demencia frontotemporal, el Alzheimer derivado de enfermedad de Parkinson (AD-PD), enfermedad

de Parkinson (PD), entre otras. La disfunción autonómica es un aspecto en común y característico de las sinucleinopatías (Orimo, 2017).

La más representativa de estas enfermedades es la PD, pues es la de mayor incidencia y la más estudiada; además en ella se forman agregados proteicos, cuyo principal componente es la SNCA. Dichas acumulaciones son conocidas como cuerpos de Lewy (LB) y neuritas de Lewy (LN), que si bien, no son exclusivas de esta enfermedad, si son una de sus características celulares más representativas.

1.2.1 Enfermedad de Parkinson

a) Epidemiología y generalidades

La enfermedad de Parkinson es el desorden neurodegenerativo motriz más común, afectando entre el 1-2% de la población mundial. Aunque existen casos en los que se desarrolla a edades tempranas, la mayoría de las veces ocurre en personas mayores de 60 años (Pickrell y Youle, 2015).

Sus principales síntomas son las afecciones motoras, tales como la bradicinesia, rigidez, dificultad para mantener una postura y temblor en las extremidades. Sin embargo, también se presentan otro tipo de alteraciones no motoras (Figura 3), como déficits olfativos y problemas gastrointestinales, —que se llegan a manifestar incluso décadas antes de desarrollar los síntomas motores característicos de esta neurodegeneración— trastornos del sueño, depresión, ansiedad, problemas cardíacos, disfunción eréctil, entre otros (Calderón Alvarez-Tostado *et al.*, 2010; Martínez-Fernández *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2017; Schapira *et al.*, 2017).

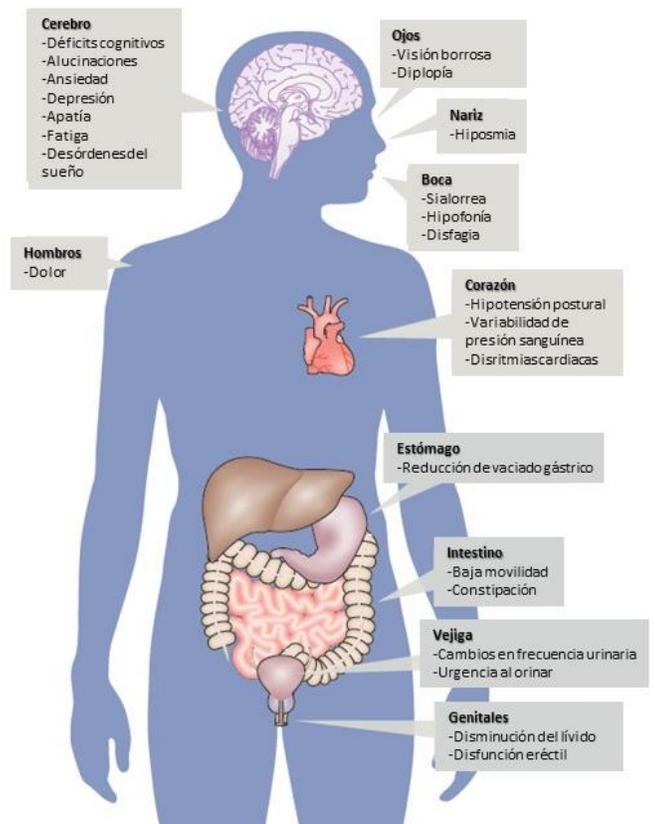


Figura 3.- Principales síntomas no motores de la enfermedad de Parkinson (Modificada de: Schapira *et al.*, 2017).

A nivel histológico, además de la muerte de neuronas dopaminérgicas, los indicadores cardinales de esta enfermedad son sin duda, los ya mencionados cuerpos de Lewy, que se localizan principalmente en la sustancia nigra pars compacta (SNpc), mas no se limitan exclusivamente a ella, hallándose también en el núcleo motor del nervio vago, el hipotálamo, en la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, etc. (Goedert, 2001).

Se ha observado que existe una relación directamente proporcional entre la edad y su incidencia demográfica, estimándose, en la población de 60-69 años de edad en Norte América, una incidencia de 540 personas afectadas por cada 100 000 habitantes, mientras que en la población de mayores de 80 años, la incidencia es de 2 953 personas por cada 100 000 (Pringsheim *et al.*, 2014). Sin embargo, no existe ningún dato concreto y actualizado sobre la incidencia o prevalencia nacional en México aunque existen inferencias que sugieren que los datos recaudados en ciertas áreas del país (v.g. Monterrey), son comparables a otros registros internacionales (Cervantes-Arriaga *et al.*, 2013).

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

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad cuya incidencia va en aumento, y aunque se dice lo mismo de otras enfermedades neurodegenerativas, Dorsey *et al.*, (2018) se dieron cuenta de que de todos los desórdenes neurológicos reportados por la Global Burden Disease 2015, la enfermedad de Parkinson es el desorden cuya incidencia ha tenido un crecimiento más rápido (GBD, 2017). Tan sólo de 1990 a 2016, el número de personas con esta enfermedad incremento 2.9 veces, pasando de un total de 2.1 millones de individuos a nivel mundial, a 6.1 millones. De esta última cifra, 2.9 millones eran mujeres y 3.2 millones eran hombres (Dorsey *et al.*, 2018).

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

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

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

dopaminérgicos (pramipexol o rotigotina) y el 18.1% reciben algún inhibidor de la monoaminoxidasa (selegilina o rasagilina) (Cervantes-Arriaga *et al.*, 2013; Martínez-Fernández *et al.*, 2016).

Los tratamientos disponibles pueden y deben ir cambiando conforme la enfermedad progresa, pues tienen que ir acorde al tiempo de evolución, fase de la enfermedad, tipo de sintomatología presente y las discapacidades que conlleve (motora y no motora). Además de los tratamientos farmacológicos, existen otras alternativas, como es la estimulación cerebral profunda, las bombas de perfusión de apomorfina, de levodopa/carbidopa enteral, y algunos otros que aún están en fase de estudio clínico, como la subtalantomía y la talantomía, pero generalmente todas estas técnicas son utilizadas en etapas más avanzadas de la enfermedad o en pacientes que no responden a los tratamientos con medicamento (Martínez-Fernández *et al.*, 2016).

b) Dopamina

La dopamina es un neurotransmisor que, junto con la adrenalina y la noradrenalina, pertenece al grupo de las catecolaminas. Las funciones que este neurotransmisor desempeña, son variadas, por un lado se ha observado que su déficit cerebral trae consecuencias en la planeación y control de los movimientos, en cuestiones cognitivas y de memoria, e incluso en cuestiones emocionales; por otro lado, también se sabe que se ve involucrado en comportamientos de condicionamiento a base de recompensa y en mecanismos de adicción. En el sistema nervioso periférico, la dopamina es un modulador de la función cardíaca y renal, del tono vascular y de la motilidad gastrointestinal (Schultz, 2002; Daubner *et al.*, 2011).

La neuronas dopaminérgicas se distribuyen en diferentes partes del sistema nervioso, como el bulbo olfatorio, el hipotálamo, la hipófisis, el nervio vago; pero principalmente, la mayoría de sus somas se localizan en la región ventroanterior del cerebro medio (sustancia nigra y área tegmental ventral), desde el área caudo-lateral hasta la rostro-medial.

A partir de estas regiones se establecen distintas vías de proyección axonal. Aquellas que proyectan del área tegmental ventral hacia la amígdala, el sistema límbico o la

corteza frontal, se denominan vía tuberoinfundibular, vía mesolímbica y vía mesocortical, respectivamente. Por otro lado, en la vía nigro-estriatal, los axones de las neuronas dopaminérgicas se proyectan de manera diferencial desde la SNpc hacia el núcleo caudado y el putamen (Fig. 4) (Schultz, 2002).

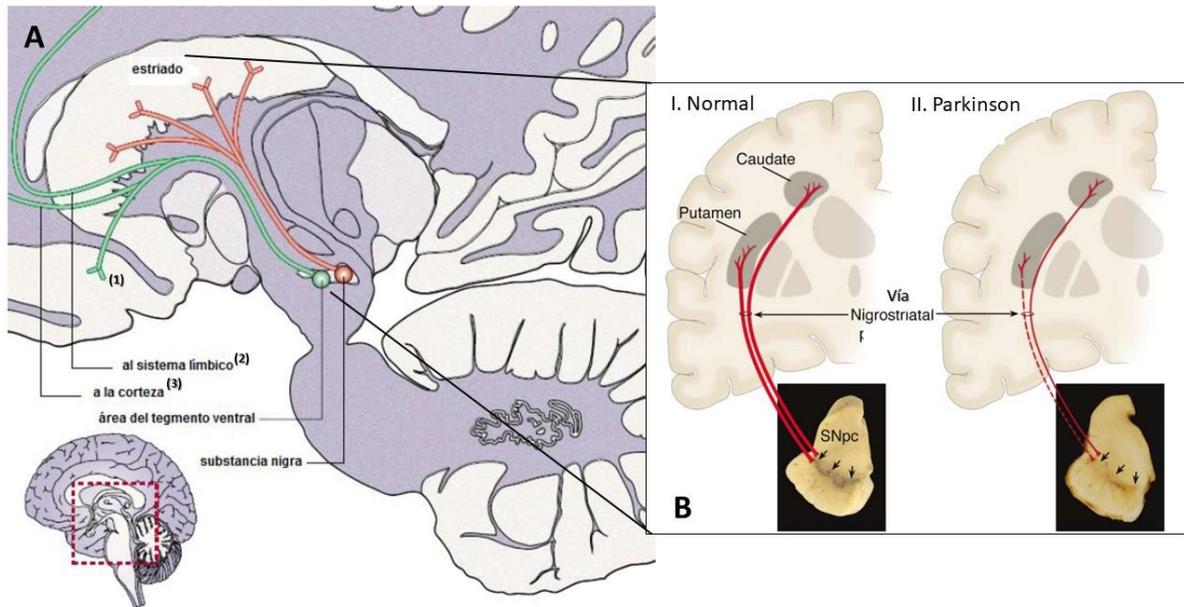


Figura 4.- Vías dopaminérgicas en cerebro humano. A) Esquemización de las vías tuberoinfundibular (1), mesolímbica (2) y mesocortical (3) (Verde) y de la vía nigro-estriatal (Rojo). **B)** Vía nigro-estriatal. I. Funcionamiento de la vía en una persona sana. II. Funcionamiento en paciente con PD. El grosor de las líneas rojas denota la pérdida de proyecciones hacia los núcleos, representando que hay una pérdida muy marcada de neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el putamen (línea punteada) y una disminución menos abrupta de las que proyectan hacia el núcleo caudado (línea continua delgada). Flechas: somas de neuronas dopaminérgicas. SNpc: sustancia nigra pars compacta. (Modificada de: Goedert, 2001 y Dauer y Przedborski, 2003).

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

La síntesis de este neurotransmisor se lleva a cabo en las terminales nerviosas dopaminérgicas, donde se encuentra una alta concentración de enzimas. Esta biosíntesis inicia a partir de la L-tirosina, que es el sustrato de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima encargada de catalizar la primera reacción, la cual consiste en la adición de un grupo hidroxilo para transformar el sustrato en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA).

Posteriormente, gracias a la enzima dopamina descarboxilasa, un grupo carboxilo es eliminado de este producto, en forma de CO₂, dando como resultado a la dopamina (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000; Schwaerzel *et al.*, 2003).

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

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

Cuando la dopamina no es recapturada, puede ser metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAOA, o bien, puede autooxidarse formando peróxido de hidrógeno y dopamina-quinona, los cuales son productos citotóxicos. Se ha propuesto que ciertas mutaciones de la SNCA impiden el correcto almacenamiento de la dopamina en vesículas sinápticas permitiéndole acumularse en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas donde existe una alta concentración de especies reactivas de oxígeno, lo que promovería a su vez la oxidación de la dopamina causando un mayor estrés oxidativo y la producción de moléculas neurotóxicas, causando daño neuronal, como sucede en el caso de la PD (Lotharius y Brundin, 2002).

1.2.2 Demencia con cuerpos de Lewy (DCL)

La demencia afecta principalmente a personas de edad avanzada, sin embargo no es parte normal del envejecimiento, sino que es un síndrome generalmente crónico

degenerativo, causado por enfermedades cerebrales, y suele afectar principalmente la memoria, la cognición, el comportamiento y en general la capacidad para realizar actividades cotidianas (Organización Mundial de la Salud, 2013).

Existen distintos tipos de demencias, dependiendo de cuál sea la enfermedad o el agente causal que las origine. La DCL es la segunda causa más común de demencia, representa aproximadamente el 20% de todos los casos y tiene una mayor prevalencia en hombres que en mujeres. Se puede definir como un desorden neuropsiquiátrico crónico progresivo caracterizado por alteraciones en la percepción visual, en las funciones visio-espaciales, ansiedad, depresión, alucinaciones visuales, y otros síntomas psiquiátricos, frecuentemente seguidos o acompañados de síntomas parkinsonianos, y en ocasiones por ciertos grados de Alzheimer (Simard *et al.*, 2015; Kosaka, 2017).

Como su nombre lo dice, en esta patología también se presentan los ya mencionados cuerpos de Lewy; además de pérdida neuronal en el sistema nervioso central y autónomo, y déficit de acetilcolina cortical. Dicho déficit es debido a una disminución de la enzima acetiltransferasa de colina, lo cual se ve más pronunciado en individuos que presentan alucinaciones (80%-85%) respecto a los que no las presentan (50%-55%). Además de esta marcada reducción de acetil colina, también se ha reportado una disminución de dopamina en los ganglios basales debido a la pérdida neuronal en la sustancia nigra (Simard *et al.*, 2015). Comparativamente, en la PD suele presentarse una pérdida dopaminérgica de hasta el 80% en el cerebro, mientras que en DCL la pérdida oscila entre el 40% y 60% (Perry *et al.*, 1993).

Los síntomas iniciales de esta enfermedad, al igual que en la PD, son principalmente autonómicos; entre ellos están los problemas gastrointestinales como la constipación, problemas del sueño, alteraciones olfativas, entre otros. En la DCL, aunque existen pocos estudios, se ha reportado que la prevalencia de hiposmia es del 65%, mientras que en la PD oscila entre el 55% y 94% (Mizuno, 2017).

El tratamiento farmacológico de esta enfermedad suele ser complicado, dado que el manejo de ciertos síntomas suele empeorar otros, sin embargo se intenta ayudar a los pacientes buscando la combinación farmacológica más adecuada para su condición. Uno

de las mejores opciones que se ha encontrado hasta ahora, es el uso de inhibidores de colinesterasa (Taylor *et al.*, 2017), mientras que para síntomas cognitivos y psiquiátricos, el donepezil y la rivastigmina han resultado ser efectivos por más de un año (Ikeda, 2017). Por otro lado, la levodopa también suele utilizarse para tratar síntomas parkinsonianos, sin embargo una desventaja de este medicamento es que se ha reportado que puede agravar las alucinaciones visuales que se presentan en esta enfermedad (Mizuno, 2017).

1.2.3 Atrofia Sistémica múltiple (MSA)

La MSA es otro desorden neurodegenerativo en el que la SNCA juega un papel importante. Sus características principales son las ya mencionadas alteraciones autonómicas (como problemas gastrointestinales), el parkinsonismo, ataxia cerebelosa, disfunción de la vía piramidal (corticoespinal) de la médula espinal, que en conjunto generan síntomas motores muy pronunciados pero distintos y adicionales a los que se observan en la PD (Chiba *et al.*, 2012; Low *et al.*, 2015). En pacientes con esta enfermedad, también se han observado problemas en los movimientos del ojo, como nistagmo y movimientos sacádicos (Wenning *et al.*, 1994).

Esta enfermedad tiene una incidencia de 3 casos por cada 100 000 pacientes por año, y suele darse en personas de más de 50 años (Low *et al.*, 2015). Se puede decir que, exceptuando aquellos casos de PD de desarrollo juvenil, es una de las sinucleinopatías que se presenta a una edad más temprana.

A nivel celular, los pacientes con esta enfermedad presentan degeneración estriatonigral, por lo que también presentan déficit dopaminérgico; y atrofia olivopontocerebelosa. Una de sus características más distintivas es la presencia de agregados proteicos en células gliales, cuya composición difiere respecto a los agregados observados en neuronas de pacientes con PD o DCL, por lo que son llamados inclusiones citoplásmicas gliales, y no LBs como en las enfermedades anteriormente mencionadas. En la comunidad científica está aceptado que el componente más importante de dichas inclusiones es también la SNCA, y aunque estos pueden presentarse también en las neuronas, su frecuencia es mucho más baja comparada con la presencia en células gliales (Chiba *et al.*, 2012).

Un aspecto interesante, aunque no extraño, respecto a los intentos de tratamiento para esta enfermedad, es que los pacientes con MSA no responden positivamente a la levodopa, agonista dopaminérgico que ha sido muy útil para aliviar síntomas motores de la PD (Wenning *et al.*, 1994).

1.3 El olfato y su relación con las enfermedades neurodegenerativas

El olfato ha sido llamado “el sentido olvidado”, pues se le ha dado mayor importancia a la vista, al gusto, al tacto, y al oído; y frecuentemente es ignorado por la medicina en general, y por la investigación biomédica. También es raro que los pacientes se quejen de trastornos olfativos y acudan a consulta (Montes de Oca y Montes de Oca, 2005). Sin embargo, los desórdenes olfativos causan problemas en diversas áreas de la vida cotidiana, tales como la higiene personal, la seguridad, la salud emocional, la ingesta alimenticia, el comportamiento y desempeño sexual, entre muchas otras cosas (Masala *et al.*, 2017).

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

Hasta cierto punto, estos desórdenes llegan a ser un síntoma que se presenta con frecuencia, inducido por diversas causas, y puede ser temporales o definitivos. Por ejemplo, la función olfativa disminuye naturalmente conforme las personas envejecen (presbiosmia) y se ha reportado que esta disminución es más severa en hombres que en mujeres, siendo esta la causa más común del decline olfativo en adultos sanos (Godoy *et al.*, 2015). Este cambio es tan notable que, en estadounidenses menores de 65 años, se ha reportado que tan sólo un 2% presentan anosmia, mientras que contrastantemente el 75% de los estadounidenses mayores de 80 años la presentan (Nordin *et al.*, 2012). De igual manera, en México la situación no es muy diferente, pues, aunque no se tienen datos exactos, también se registra un alto porcentaje de personas anósmicas o con problemas olfativos, especialmente a partir de los 50 años de edad (Guarneros *et al.*, 2015).

Aunque existen casos de anosmia congénita, la mayoría de los trastornos olfativos son adquiridos; el epitelio olfatorio sólo está separado del exterior por una delgada capa de moco, lo cual lo hace vulnerable a las agresiones ambientales, agentes infecciosos, traumas y tóxicos, haciendo a el sistema olfativo una vía muy directa hacia el cerebro. Está comprobado que incluso el resfriado común puede ser causa de anosmia permanente, sobre todo en aquellos casos en donde el epitelio olfatorio ya ha acumulado daños (Montes de Oca y Montes de Oca, 2005; Doty y Mishra, 2001). Por otro lado, diversas patologías como los pólipos nasales, la rinitis, sinusitis, algunas alergias, epilepsia, la presencia de tumores y ciertas enfermedades neurológicas y psiquiátricas, también son factores que provocan trastornos olfativos (Chacón *et al.*, 2008; Nazar y Pardo, 2011; Masala *et al.*, 2017).

Recientemente, se han registrado una amplia gama de enfermedades neurológicas como, el Alzheimer (AD), la esclerosis múltiple (MS), la enfermedad de Huntington (HD), PD, DCL, MSA, entre otras; cuyos síntomas incluyen a los desórdenes olfativos (Passali *et al.*, 2015). La hiposmia y la anosmia, correlacionan con la etiología de algunas de estas neurodegeneraciones, y se han propuesto como síntomas diagnósticos de la mismas, ya que suelen presentarse incluso décadas antes de desarrollar síntomas motores o conductuales. En paralelo, se asocia con la aparición de biomarcadores de dichas enfermedades, por ejemplo: elevados niveles de placas amiloides en el cerebro o la formación de cuerpos de Lewy. Se ha observado que en ciertos casos la anosmia se debe principalmente a una reducción del hipocampo y adelgazamiento de la corteza entorrinal (Miranda *et al.*, 2006; Growdon *et al.*, 2015), sin embargo aún se sabe muy poco de las causas reales y concretas que provocan estos padecimientos en cada enfermedad y en las neurodegeneraciones en general.

De hecho, ha sido propuesto lo que se conoce como la “hipótesis del vector olfativo” (Roberts, 1986), idea que sugiere que el origen de ciertas enfermedades neurodegenerativas se encuentra vinculado con las vías olfativas, es decir, que el sistema olfativo brinda a los xenobióticos y/o patógenos una ruta directa al cerebro para desencadenar enfermedades. No obstante, la información en este ámbito sigue siendo

escasa, por lo que resultan indispensables investigaciones en las cuales se indague en la relación de este quimiosentido con las enfermedades de este tipo.

1.4 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Drosophila melanogaster, conocida coloquialmente como la mosca de la fruta, es un artrópodo perteneciente a la clase de los insectos, particularmente al orden díptera. Es un organismo que ha sido ampliamente estudiado, pues su homología genética y similitudes a nivel molecular, celular y del desarrollo, con respecto a otros metazoarios, han permitido avanzar enormemente en la comprensión de los mecanismos genéticos, bioquímicos y moleculares que regulan el desarrollo animal (Martin *et al.*, 2013; Wilson, 2013).

Para estudiar distintos fenómenos biológicos, tradicionalmente se han utilizado organismos modelo como el ratón (*Mus musculus*), el nematodo (*Caenorhabditis elegans*), y la mosca (*D. melanogaster*). Estos modelos comparten características fisiológicas y moleculares similares, sin embargo, *D. melanogaster* ofrece ciertas ventajas, tales como el hecho de que posee solamente cuatro pares de cromosomas (Anexo I), lo que simplifica el uso de las diferentes técnicas genéticas que se conocen hasta el momento, además de que su mantenimiento es de bajo costo y su ciclo de vida (Anexo II) relativamente corto (10-15 días a 25 °C).

1.4.1. Modelo de estudio para la enfermedad de Parkinson

D. melanogaster cuenta con un sistema nervioso bien caracterizado, relativamente simple, y su genoma se encuentra completamente secuenciado, lo que ha dado origen a distintos centros donde se tienen colecciones de líneas de moscas con mutaciones en genes específicos, o inserciones genéticas que permiten obtener los genotipos deseados para estudiar fenómenos específicos (Grueber *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2000).

En diferentes áreas de investigación en donde este organismo es utilizado, el sistema *UAS/GAL4* (Fig. 10), ha resultado ser de gran ayuda, pues permite controlar *in vivo* y espacio temporalmente la expresión génica de cualquier gen, ya sea endógeno de la mosca o de algún otro organismo.

GAL4 es un factor de transcripción, originario de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuya función es activar la expresión de los genes encargados del metabolismo de la galactosa. Este factor requiere que los genes que va a activar, cuenten con una secuencia reguladora, que se denomina “Upstream Activating Sequence” (*UAS*). La unión de GAL4 con las *UAS* es altamente específica, por lo que este factor no puede activar a ningún gen que no la contenga.

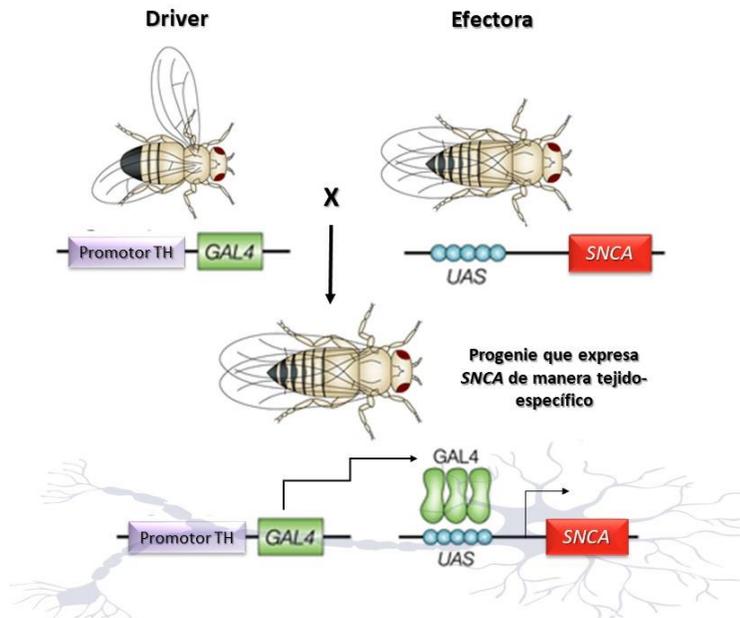


Figura 10.- Sistema GAL4/UAS. TH: tirosina hidroxilasa. SNCA: α -sinucleína. (Modificado de: Johnston, 2002).

En *D. melanogaster* no existen genes homólogos a *GAL4* y ningún gen de la mosca contiene secuencias *UAS* endógenas, lo que ha permitido el diseño de moscas transgénicas que contengan genes de interés (gen efector) downstream a secuencias *UAS*, y moscas transgénicas que expresen *GAL4* bajo promotores endógenos de la mosca (moscas driver), para que dirijan de manera específica la expresión tisular de este factor. Este sistema bipartito permite realizar cruces tradicionales entre ambas líneas de moscas, de manera que la progenie que herede ambos transgenes exprese el gen efector en el mismo patrón espacio temporal del driver, mientras que los progenitores y la progenie que sólo hereden el factor de transcripción o la secuencia *UAS*, permanezcan como moscas normales, es decir, sin la expresión del gen efector (Duffy, 2002).

En *Drosophila*, no existe un gen que codifique para la SNCA, por lo que se han desarrollado líneas de moscas transgénicas que, gracias al sistema *UAS/GAL4*, expresan

esta proteína en las neuronas dopaminérgicas (bajo el control de las secuencias reguladoras de la enzima TH). Estas moscas recapitulan síntomas y aspectos fisiológicos, celulares y etológicos característicos de la PD (Chartier-Harlin *et al.*, 2004), por lo que se utilizan como modelos de esta enfermedad. Los primeros en desarrollar el modelo de la mosca de la fruta para el estudio de PD, fueron Feany y Bender en el 2000, quienes demostraron por primera vez que estos organismos recapitulaban diversos aspectos de dicha patología, tales como la muerte de neuronas dopaminérgicas, cuerpos de inclusión tipo LBs y problemas motrices.

1.4.2. Modelo de estudio para sistema olfativo

El sistema olfativo de la mosca de la fruta también ha despertado interés, pues los procesos que en él ocurren parecen ser extrapolables a lo que sucede en el ser humano. La mosca cuenta con un sistema olfativo de alta sensibilidad que, de manera externa, está compuesto por dos apéndices pareados: los palpos maxilares y el tercer segmento de las antenas (Fig. 11 A). Estos se encuentran recubiertos por numerosas microvellosidades sensoriales que se denominan sensilias, en cuyo interior se encuentran las dendritas de hasta cuatro neuronas receptoras olfativas (ORNs), cuyos somas y otras células auxiliares o accesorias se encuentran en la parte basal de la sensilia (Ebbs y Amrein, 2007; Kaupp, 2010).

La cutícula que constituye las sensilias olfativas presenta múltiples poros que permiten el paso de los odorantes. Existen diferentes tipos morfológicos de sensilias que pueden clasificarse en tres grupos: las basicónicas, las tricoideas y las coelocónicas (Fig. 11B). Las primeras se localizan tanto en las antenas como en los palpos maxilares, y se ha visto que son responsables de la detección de olores relacionados con la alimentación, incluyendo ésteres, alcoholes y aldehídos; mientras que los otros dos tipos, únicamente se localizan en las antenas y detectan olores relacionados con el propio organismo o el de sus semejantes (v.g., feromonas); y distintos ácidos y aminos, respectivamente (Joseph y Carlson, 2015).

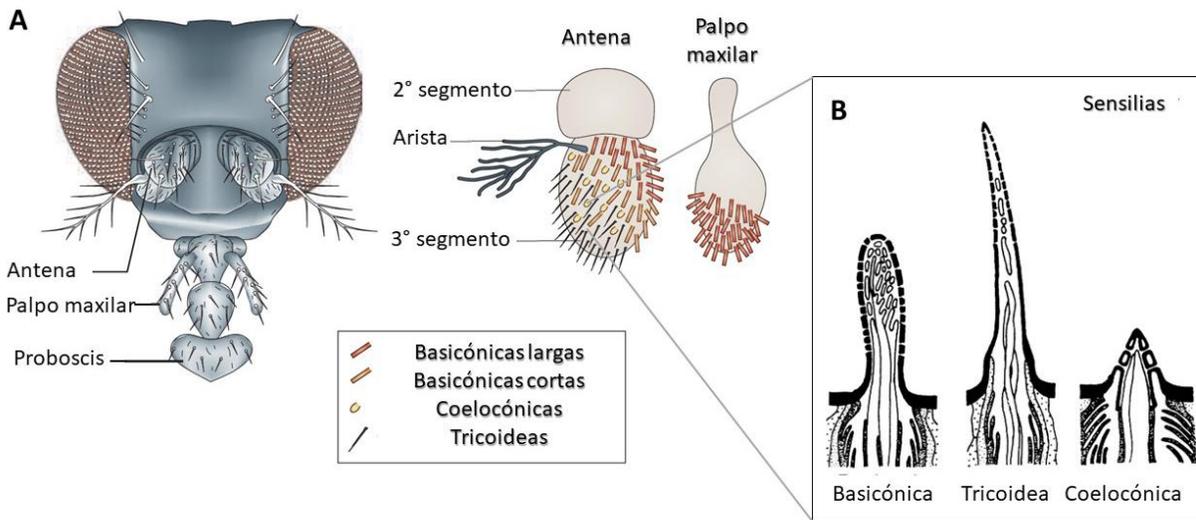


Figura 11.- Sistema olfatorio de *Drosophila melanogaster*. A) Organización macroscópica, en donde se resalta los apéndices olfativos (antenas y palpos maxilares), recubiertas con sus respectivas sensilias sensoriales. B) Estructura y organización de los distintos tipos de sensilias olfativas. (Modificado de: Vosshall, 2000; Kaupp, 2010).

Como ya se mencionó, las ORNs a diferencia de las de los vertebrados, pueden presentar de una a cuatro dendritas, aunque lo más común en este organismo es que sean dos (Wilson, 2013), y en éstas es donde se localizan los receptores olfativos (ORs). La gran mayoría de las ORNs expresan dos tipos de receptores de manera conjunta: el correceptor Or83b (Orco) que se considera “universal”, ya que se expresa en casi todas las ORNs y se encuentra altamente conservado entre todos los insectos; y un OR variable y específico (OrX), que interacciona con Orco, formando así, una unidad funcional heteromérica con especificidad para un agente odorante definido (Kain *et al.*, 2008; Kaupp, 2010).

La presencia de esta unidad funcional, ha dado pie a la búsqueda de posibles vías de señalización y la naturaleza de los receptores involucrados (Fig. 12), tema que actualmente sigue siendo controvertido, pues hay quienes afirman que los ORs de insectos son receptores ionotrópicos heteroméricos (Sato *et al.*, 2008) mientras que otros afirman que son tanto ionotrópicos, como metabotrópicos (CNGCs y dependientes de proteínas G); es decir, que altas concentraciones de odorante activan la vía ionotrópica directa, considerándose esta vía de corta duración, mientras que a bajas

concentraciones, la unión de un odorante a OrX activa a una proteína G que a su vez promueve la síntesis de AMPc al unirse a la adenilato ciclasa (AC) y como resultado, el AMPc se une a Or83b activándolo, quien finalmente toma el papel de un canal iónico regulado por AMPc. Este mecanismo es de duración prolongada (Wicher *et al.*, 2008). Por otro lado, también se ha reportado que la actividad de Or83b es regulada por fosforilación, a través de la proteína cinasa C (PKC), que es activada por la cascada de transducción de IP3/DAG (Sargsyan *et al.*, 2011).

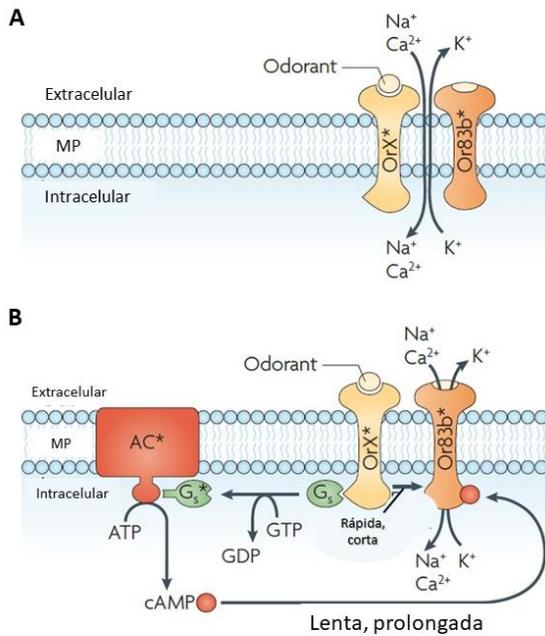


Figura 12.- Modelos de vías de señalización para la transducción olfativa en insectos. A) Modelo ionotrópico, en el que el canal iónico se abre directamente en respuesta a la unión del odorante. **B)** Modelo metabotrópico, en el que existen dos posibles mecanismos: la vía rápida y corta, donde Or83b es activado de manera directa abriendo el canal iónico; y la vía lenta y prolongada, donde Or83b es activado de manera indirecta y se promueve la síntesis de AMPc, el cual se une a Or83b, abriendo el canal y generando corrientes de despolarización lentas y prolongadas. MP: membrana plasmática., G_s : Proteína G., AC: Adenilato ciclasa., cAMP: AMP cíclico, * indica la forma activa de la molécula. (Modificado de: Kaupp, 2010.)

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

Los axones de las ORNs que expresan los mismos receptores, convergen en uno o varios glomérulos olfativos de lo que en conjunto se conoce como lóbulo antenal (AL), que es el homólogo del bulbo olfatorio en vertebrados, que es considerado la primera unidad de procesamiento olfativo del sistema nervioso central. En el AL, las ORNs hacen sinápsis con neuronas de segundo orden, es decir neuronas de proyección (PN), que serían las homólogas a las células mitrales y de penacho en vertebrados, quienes transmiten la información a centros cerebrales de procesamiento superior (Fig. 13) (Ramdya y Benton, 2010; Martin *et al.*, 2013; Wicher, 2015).

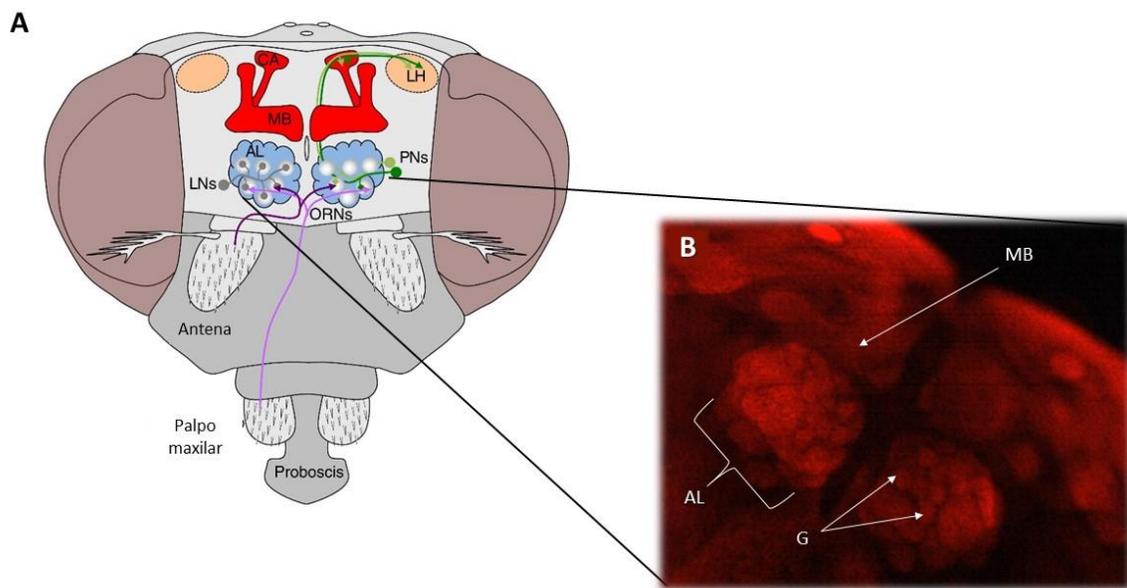


Figura 13.- Estructuras y centros olfatorios de *Drosophila melanogaster*. **A)** Vía olfativa. Los palpos maxilares y el tercer segmento de las antenas proyectan las dendritas de sus ORNs hacia los glomérulos (G) del lóbulo antenal (AL), en donde las señales eléctricas son integradas por interneuronas locales (LNs). La información una vez procesada es transmitida hacia el cáliz (CA) de los cuerpos fungiformes (MB) y las astas laterales (LH) gracias a las neuronas de proyección (PNs). (Modificado de: Perisse *et al.*, 2013). **B)** Acercamiento de centros cerebrales de procesamiento superior. Inmunotinción contra neuropilo de lóbulos antenales y cuerpos fungiformes. (Fotografía: Estefanía De Allende-Becerra).

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

Los mecanismos en la cascada de transducción y procesamiento olfativo en humano y en mosca, son muy semejantes y se consideran muy homólogos. A nivel estructural, la organización de ambos sistemas olfativos coincide entre sí, ya que ambos se distribuyen en un eje dorso-ventral a través de la cabeza y, aunque las estructuras anatómicas (nariz/palpos maxilares y antenas) encargadas de la captación primaria de odorantes son bastante disímiles, la organización celular del epitelio olfatorio humano, es semejante a la organización interna de las sensilias olfativas, teniendo tipos celulares homólogos y soluciones acuosas que cumplen funciones similares en la percepción olfativa, como son el moco y la linfa. Por otro lado, en cuanto a las ORNs bipolares de ambos organismos se refiere, existe variación por ejemplo en el número de dendritas con las que éstas cuentan, pues, mientras las ORNs humanas cuentan con una dendrita, las ORNs de mosca regularmente presentan dos; aunque si se considera que las dendritas humanas exhiben múltiples cilios, la extensión abarcada y la eficacia de las dendritas de ambos organismos, podría ser equivalente.

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

Además, se sabe que en humano se expresa un receptor por cada neurona, mientras que en mosca generalmente son dos ORs (Or83b y OrX) por cada ORN, sin embargo considerando que la mayoría de las veces los ORs de mosca se ensamblan en complejo para formar una unidad funcional, la regla OR-ORN 1:1 es válida en sentido funcional (Kaupp, 2010). Sin embargo, la secuencia y topología membranal de los ORs humanos y los ORs de mosca, difieren entre sí.

Entrando en el ámbito de los receptores olfativos, otro punto que se puede contrastar, es la dirección de la señal que se desencadena. En ambas especies, las ORNs que expresan el mismo OR, envían sus axones hacia glomérulos específicos del bulbo olfatorio o el lóbulo antenal, generando patrones de actividad glomerular únicos para cada

olor. Estos centros primarios de procesamiento olfativo tienen una organización muy parecida entre sí, y en ellos los axones de las ORNs convergen con dendritas de, ya sea células mitrales y de penacho en humano, o interneuronas locales y neuronas de proyección en mosca.

En ambas especies, las señales en el sistema olfativo en general, son transportadas y mediadas de la misma manera, siguiendo etapas semejantes y en centros de procesamiento similares (Morrison y Constanzo, 1990).

Gracias a todo esto y a su relativa simpleza, *D. melanogaster* ha resultado ser un buen modelo para estudios de sistema olfativo, tal es así, que Linda Buck y Richard Axel, estudiando el sistema olfativo de la mosca de la fruta, ganaron el premio Nobel en 2004, por sus descubrimientos acerca de la organización de este sistema, de cómo cientos de genes codifican para receptores olfativos y cómo es que se genera un potencial eléctrico al darse la unión de un odorante (Buck y Axel, 1991; Nobel media, 2014).

II. ANTECEDENTES

Se ha propuesto que un indicador de la progresión de la PD es la aparición de agregados de α -sinucleína (LBs) en distintas áreas del sistema nervioso (periférico y central), sugiriendo que el daño neuronal no se desarrolla de manera aleatoria, sino siguiendo patrones específicos, que de acuerdo con Braak *et al.*, 2003, coinciden con la distribución de esta proteína a lo largo del sistema.

Con base en lo anterior, estos mismos autores propusieron lo que ahora se conoce como “estadios de Braak”, que se refieren a la división de esta enfermedad en seis etapas de acuerdo a su progresión, siendo las fases I y II, la parte inicial (o premotora) de esta patología, que se caracteriza por alteraciones autónomas como problemas digestivos y olfativos; las III y IV que son las etapas más características, es decir, cuando se presentan los síntomas motores debido al déficit dopaminérgico en la sustancia nigra; y las V y VI, aquellas etapas en donde se presentan daños cognitivos y emocionales severos. Debido a la localización de los LB en las etapas I y II, este mismo grupo sugirió que el inicio de esta enfermedad podía estar relacionada con algún patógeno que, como ruta de acceso

al cerebro, utilizara precisamente las vías olfativas y/o entéricas, a esto se le conoce como hipótesis del vector olfativo o del vector dual.

Por otro lado, Kosaka reportó en 2017 que, a diferencia de la enfermedad de Parkinson y contrario a los estadios de Braak, en la DCL el desarrollo y distribución de los LBs puede empezar desde la corteza cerebral hacia las partes más internas del cerebro (como los ganglios basales).

En cuanto a la distribución y el desarrollo de los LBs, en 2008 dos laboratorios reportaron de manera independiente que, cerebros *post-mortem* de pacientes con PD a los que se les había trasplantado neuronas dopaminérgicas fetales, después de un tiempo, presentaban LBs aún en aquellas neuronas injertadas; lo que generó la idea de que probablemente la SNCA es capaz de propagarse de una célula a otra, e incluso de una región distante a otra (Li *et al.*, 2008; Kordower *et al.*, 2008).

Posterior a esto, empezaron a surgir diversos estudios cuya finalidad era la de observar la propagación de esta proteína, tales como el realizado por Masuda-Suzukake *et al.*, en 2013, quienes inyectaron homogenizados de cerebro de un paciente que había sido diagnosticado con DCL en la sustancia nigra de ratones, y detectaron que 15 meses después de la inyección, esto desencadenaba α -sinucleinopatía en el 50% de los ratones, no sólo en el sitio de inyección, sino también en regiones como la amígdala, el estriado, la corteza motora, el hipotálamo, la corteza piriforme, el área somatosensorial y el colliculus superior. Con estos experimentos, ellos fueron los primeros en demostrar que la inoculación de extractos de cerebros humanos patológicos en cerebros de ratones, podía desencadenar sinucleinopatías (Recasens *et al.*, 2018).

Aunado a lo anterior, se ha comprobado que homogenizados de cerebros de pacientes con otras sinucleinopatías (además de DCL), como MSA y PD, también inducen patologías cerebrales en ratones y monos (Watts *et al.*, 2013; Recasens *et al.*, 2014; Bernis *et al.*, 2015). Además, la inyección de SNCA recombinante en diferentes conformaciones y en ciertas zonas del sistema nervioso, también puede desencadenar sinucleinopatías que, en algunos casos, incluyen la propagación de esta proteína. Un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Rey *et al.*, en 2013, quienes inyectaron

monómeros, oligómeros y fibrillas recombinantes de SNCA en el bulbo olfatorio de ratones y observaron propagación de estas dos últimas conformaciones a regiones aledañas, pero no de las fibrillas. En contra parte a este y otros estudios de inyecciones intracerebrales, en el estudio antes mencionado de Masuda-Suzukake, además de inyectada en sustancia nigra, se administró la SNCA proveniente de pacientes con DCL vía intranasal, y en este caso no se observó el desarrollo de sinucleinopatía incluso a los 21 meses post-administración (Masuda-Suzukake *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha propuesto recientemente que existe un eje intestino-cerebro y que existe una intensa comunicación entre estos dos órganos, lo que aunado a la hipótesis del vector dual sobre el posible origen de estas neuropatologías, ha generado el aumento de estudios que buscan detectar la propagación de la SNCA desde el sistema entérico hacia el cerebro. Al respecto, existen diversas investigaciones, dos de las que destacan fueron realizadas por Ulusoy *et al.*, en 2017 y Kim *et al.*, en 2019.

En el estudio de Ulusoy se utilizaron vectores virales adeno-asociados recombinantes (rVAA) para la expresión transgénica de SNCA humana, los cuales fueron inyectados a ratas unilateralmente, ya sea en el nervio vago o en el mesencéfalo ventral adyacente a la sustancia nigra. Una de las cosas interesantes que reportan en esta investigación, es que la transmisión de SNCA no fibrilar del cerebro al estómago de las ratas y su acumulación en las terminales pre-gangliónicas vagales, además sugieren que esta transmisión es ruta-específica en donde primeramente llega a la médula oblonga, después pasa a las neuronas colinérgicas del núcleo motor dorsal del nervio vago y finalmente se transfiere a través de fibras eferentes de estas neuronas hacia tejidos periféricos como los nervios gástricos víscero-motores (Ulusoy *et al.*, 2017).

En la investigación de Kim, se inyectaron fibrillas patológicas de SNCA en las capas musculares del duodeno y del píloro de ratones, y se observó la propagación de SNCA patogénica (fosforilada en el residuo Ser129) hacia el núcleo motor dorsal, después a regiones más caudales del cerebro como el locus coeruleus y finalmente, a la amígdala basolateral, el núcleo dorsal del rafe y a la sustancia nigra pars compacta. Interesantemente, su estudio da a entender que no son en sí las fibrillas de SNCA exógenas las que se transportan, sino que al parecer estas provocan que las moléculas

de SNCA endógenas se vuelvan patológicas y éstas son las que se propagan. Al realizar el mismo experimento en ratones nulos para SNCA (*Snca*^{-/-}) se dieron cuenta de que la propagación no ocurría, y lo mismo pasaba cuando se practicaba una vagotomía a los ratones silvestres. Este último dato demuestra que el nervio vago es un componente elemental en la propagación entérica-cerebral de esta proteína.

En términos de propagación de la SNCA, este resulta un estudio importante igualmente en el sentido de modelos animales para la enfermedad de Parkinson, pues existen modelos de mamíferos que logran recapitular las alteraciones motoras o periféricas de esta enfermedad, pero es difícil encontrar modelos que recapitulen ambas, lo cual se logró en este estudio al analizar la etología de dichos animales (Kim *et al.*, 2019).

Ambos trabajos brindan evidencia de la capacidad de propagación con la que cuenta la SNCA, al menos vía inyección o de fuentes exógenas, sin embargo son contrarios en el sentido de que el primero representa una transmisión de sistema nervioso central a periférico, y el más reciente de periférico a central, acorde a la hipótesis del vector dual. Esto nos indica que la propagación de esta proteína probablemente puede ocurrir en ambos sentidos y quizás puede variar entre pacientes.

A pesar de que existen evidencias de que la SNCA puede tener la capacidad de propagarse, no existe ninguna investigación en la que se haya podido observar la propagación de esta proteína de manera endógena, es decir, no existe ningún modelo transgénico en el que se puedan realizar estudios sobre los mecanismos de propagación *in vivo* de esta proteína, ya que la propagación que se ha observado ha sido solamente cuando existen fuentes externas de SNCA. Lo que ha dado pie para hipotetizar que la propagación de esta proteína pueda estarse llevando a cabo mediante mecanismos tipo prion (Rey *et al.*, 2016; Brundin y Melki, 2017).

Estos y otros estudios derivados, originan una serie de preguntas interesantes para ser investigadas, las más evidentes y quizá las primeras que deben abordarse serían: el hecho de si realmente la SNCA endógena (silvestre y/o mutante) por si sola tiene la capacidad para propagarse de una región a otra, si esto contribuiría a la progresión de la

PD, y si su propagación realmente correlaciona con la sintomatología del avance de esta enfermedad.

III. HIPÓTESIS

Si la α -sinucleína humana tiene la capacidad de propagarse trans-sinápticamente y si se controla su expresión, dirigiéndola únicamente a regiones específicas (olfativas) en un modelo como *D. melanogaster*, entonces a lo largo del envejecimiento se observará su presencia en regiones donde la expresión no fue inducida y probablemente esto correlacione con alteraciones fisiológicas y/o de comportamiento dependiendo de la localización de esta proteína.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto de la expresión de α -sinucleína humana silvestre (SNCA^{wt}) y su variante patogénica A30P (SNCA^{A30P}) en sistema olfativo de *D. melanogaster*.

En tanto que los objetivos particulares derivados del anterior fueron los siguientes:

- Comprobar si la SNCA^{wt} expresada de manera transgénica en neuronas olfativas de *D. melanogaster* cuenta con capacidad de propagación, a partir del sistema olfativo hacia otras regiones del sistema nervioso.
- Comprobar si la SNCA^{A30P} expresada de manera transgénica en neuronas olfativas de *D. melanogaster* cuenta con capacidad de propagación, a partir del sistema olfativo hacia otras regiones del sistema nervioso.
- Determinar el impacto de la expresión de SNCA^{wt} bajo la dirección de Or83b en función de alteraciones olfativas en *D. melanogaster*.
- Determinar el impacto de la expresión de SNCA^{A30P} bajo la dirección de Or83b en función de alteraciones olfativas en *D. melanogaster*.
- Determinar el impacto de la expresión de SNCA^{wt} bajo la dirección de Or83b en función de alteraciones motoras en *D. melanogaster*.
- Determinar el impacto de la expresión de SNCA^{A30P} bajo la dirección de Or83b en función de alteraciones motoras en *D. melanogaster*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Stocks y cruzas de líneas transgénicas

Los organismos se mantuvieron en condiciones óptimas para su desarrollo, es decir, medio estándar de levadura a 25°C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Las líneas de moscas fueron obtenidas del banco de moscas *Drosophila* (<http://flystocks.bio.indiana.edu>) de Bloomington, en la Universidad de Indiana, Estados Unidos.

Las moscas de las líneas efectoras P[UAS-SNCA^{wt}], P[UAS-SNCA^{A30P}], P[UAS-mCD8::GFP], son aquellas que, a través de la inserción simple de un elemento P, contienen el gen para α -sinucleína silvestre, α -sinucleína con la mutación A30P, y el gen para GFP acoplada a membrana, respectivamente; cuya expresión es regulada gracias a la presencia de las secuencias UAS. Mientras que la línea driver P[Or83b-GAL4], es aquella que expresa la proteína GAL4, necesaria para la activación de este sistema, bajo la dirección del promotor del receptor olfativo universal de insectos (Or83b u OrCo), por lo que se utilizó como driver de la expresión de las proteínas de interés (SNCA y mCD8::GFP).

Para la obtención de las poblaciones experimentales, se realizaron las cruzas de las líneas efectoras con los drivers, para obtener como resultado los genotipos siguientes:

- 1) $w^{1118}; +; Or83b-GAL4/UAS-SNCA^{wt}, +$
- 2) $w^{1118}; +; Or83b-GAL4/UAS-SNCA^{A30P}, +$

Como controles se utilizaron las líneas:

- 3) $w^{1118}; +; Or83b-GAL4 / UAS-mCD8::GFP, +$
- 4) $w^{1118}; +; +, +$

5.2 Pruebas motoras

Para evaluar la actividad motriz voluntaria de 32 moscas macho de cada genotipo de 5, 15, 30 y 45 días de edad adulta, se utilizó el dispositivo Trikinetics *Drosophila* Activity Monitor (T-DAM), que detecta la actividad de las moscas por cada pase; ya que cuenta con un haz de luz infrarroja en cada uno de los 32 orificios de cada monitor, lo que sirve de sensor para medir el movimiento de estos organismos de manera individual, dado que en cada uno de estos orificios se coloca un pequeño vial transparente y dentro de éste una mosca. Este dispositivo se conecta a una computadora, para registrar el número de veces que pasa la mosca por el sensor en determinado periodo de tiempo.

Estos dispositivos se mantuvieron en una incubadora a 25 °C durante cinco horas. Antes de comenzar el registro, se les dio a las moscas un periodo de adecuación.

5.3 Pruebas olfativas

De igual manera, se midió la respuesta olfativa de los distintos genotipos utilizando el dispositivo T-DAM, mediante el uso de dos de sus monitores y la unión de cada uno de sus viales entre sí, de tal manera que cada uno de estos monitores se localizara a cada extremo de dichos viales, es decir, cercanos a donde se localizaban los odorantes (representación gráfica en Anexo III). En cada uno de los 32 viales se colocó, en un extremo un algodón con 50 µL de agua, y en el extremo contrario un algodón con 50 µL de benzaldehído (Bz) en agua al 0.5%. Se evaluó la actividad olfativa de 16 machos de 5, 15, 30 y 45 días de edad adulta, analizando el número de pases en cada uno de los monitores, es decir analizando qué tan aversivo había resultado el Bz para cada genotipo a las distintas edades y si la capacidad olfativa se mantenía a lo largo del tiempo y/o si resultaba equivalente entre estos grupos.

5.4 Disecciones e inmunotinciones

Para la disección de tejidos, se utilizaron moscas macho de 5, 15, 30 y 45 días de edad adulta de los diferentes genotipos. Estos se disecaron en PBS 1X y una vez obtenidos los cerebros, se fijaron usando paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos, después se realizaron 5 lavados de 15 min cada uno con PBST en agitación constante. Posteriormente, se bloqueó durante 30 min utilizando BSA al 0.1% / NaCl 250 mM o suero de chivo al 5% (dependiendo del anticuerpo) en PBST, para su posterior incubación con el anticuerpo primario (anti-SNCA ratón 1:500 o anti-GFP conejo 1:1000) en solución de bloqueo a 4° C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se lavó cinco veces durante 15 minutos en PBST y se incubó con el anticuerpo secundario (CY5 anti-mouse 1:500 o CY2 anti-rabbit 1:300) en solución de bloqueo durante 18 horas a 4°C. Finalmente, se lavó cinco veces durante 15 min en PBST.

Se montaron en 15 µl de citifluor (Ted Pella Inc.) sobre un cubreobjetos de 75 x 20 X 1 mm, colocándoles encima un cubreobjetos circular. Finalmente, se observaron en los microscopios confocales: Olympus FV100 invertido y confocal de disco giratorio 3l Marianas Zeiss Observer Z.1 invertido, ambos del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se tomaron cortes usando los objetivos y láseres convenientes. Todas las fotografías se tomaron con las mismas condiciones de intensidad y voltaje del láser.

5.5 Análisis estadísticos y procesamiento de datos

Para recuperar los datos registrados mediante los dispositivos T-DAM, se utilizó el software DAM FileScan111 y los datos obtenidos se procesaron utilizando R-studio para posteriormente graficarse usando el programa GraphPad Prism® 8.2.1.

Se examinó la normalidad de las muestras mediante las pruebas de Anderson-Darling y D'Agostino-Pearson. Cuando los datos resultaron ajustarse a la normalidad, se analizaron mediante ANOVA dos vías y comparación múltiple de Tukey y, dado que algunos datos no se ajustaron a la normalidad, para determinar la significancia estadística entre las medias se aplicó la alternativa no paramétrica a la prueba de ANOVA que es la prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente, para establecer las medias altamente significativas entre genotipos y entre los diferentes tiempos, se realizaron análisis de comparación múltiple utilizando la prueba de U de Mann-Whitney.

El nivel de aversión olfativa de los individuos hacia el benzaldehído fue determinado mediante el siguiente Índice de Aversión (IA):

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

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

Las fotografías obtenidas mediante microscopía confocal, fueron analizadas utilizando el programa ImageJ® y a partir de máximas proyecciones en Z, se comparó la distribución de SNCA y GFP, así como la integridad del tejido entre los diferentes genotipos y tiempos.

VI. RESULTADOS

6.1 Distribución de SNCA^{wt} y SNCA^{A30P} a lo largo del envejecimiento a partir de sistema olfativo

Con el fin de determinar si la distribución de SNCA^{wt} y SNCA^{A30P} en el cerebro de *D. melanogaster* se mantiene constante a través del tiempo o si existe una propagación, estas proteínas fueron expresadas de manera independiente en neuronas olfativas de antenas, bajo la dirección del promotor del receptor olfativo universal en insectos: Or83b. Como control de distribución proteica constante, se expresó mCD8::GFP en el mismo tipo neuronal y bajo la dirección del promotor del mismo receptor olfativo.

En la figura 14 se observa la expresión de ambas proteínas en cerebros de moscas de 5 días. En B y C, mediante la expresión de mCD8::GFP, se puede observar el patrón de expresión de Or83b en cerebro de mosca adulta, denotando que este receptor no se expresa en ningún lugar del cerebro y que los axones de las neuronas que expresan este receptor olfativo convergen exclusivamente en los lóbulos antenales, por lo que es un driver útil para la dirección específica de otras proteínas. También se pueden apreciar las proyecciones de ambos lóbulos hacia las regiones receptoras de odorantes. De igual manera en B' y C' se puede observar que, aparentemente, en esta etapa juvenil la SNCA^{wt} se mantiene localizada en el área del patrón de expresión de Or83b.

Lo mismo parece estar ocurriendo en estadios más avanzados, dado que las inmunotinciones contra SNCA en moscas de 15, 30 y 45 días de edad adulta que expresan la SNCA^{wt} (Fig. 15-17 B' y C') revelan que su presencia se mantiene exclusivamente en los lóbulos antenales, lo cual indica que esta proteína permanece en los sitios donde fue expresada originalmente y por lo tanto, que no se está propagando.

Para el caso de la SNCA^{A30P}, la situación no parece ser muy diferente. Tanto en etapas juveniles (Fig. 14 B'' y C''), como en estadios más avanzados (Fig 15-17 B'' y C''), se mantuvo la presencia de esta proteína dentro del patrón de expresión de Or83b.

5 días

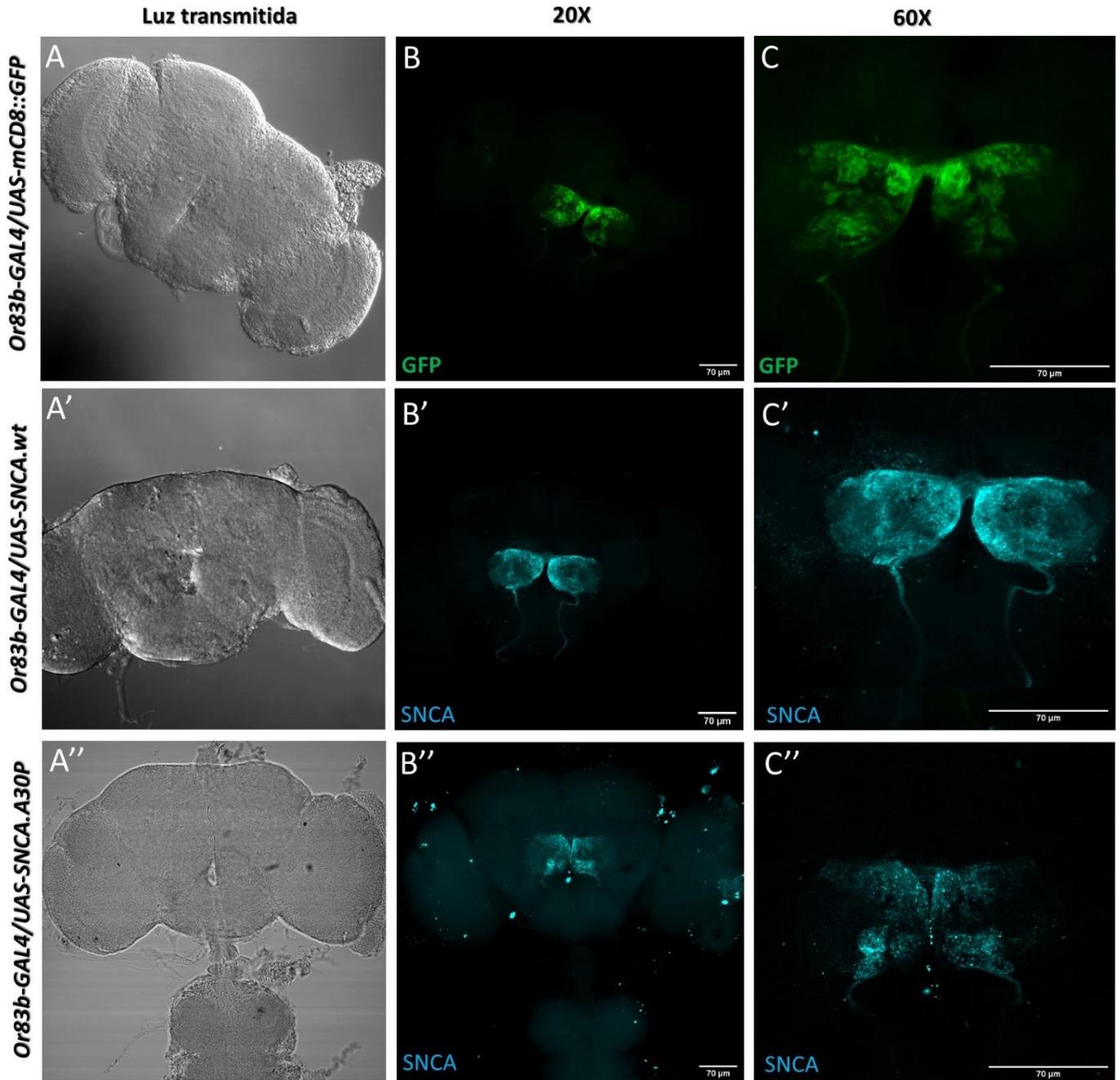


Figura 14.- Distribución proteica en cerebro de *D. melanogaster* de 5 días de edad adulta.
A-A'') Cerebros en campo claro. B-B'') mCD8::GFP, SNCA^{wt} y SNCA^{A30P}, respectivamente, bajo la dirección del receptor olfativo Or83b en cerebro de adulto de 5 días. C-C'') mCD8::GFP, SNCA^{wt} y SNCA^{A30P}, respectivamente, en lóbulos antenales de adulto de 5 días.

15 días

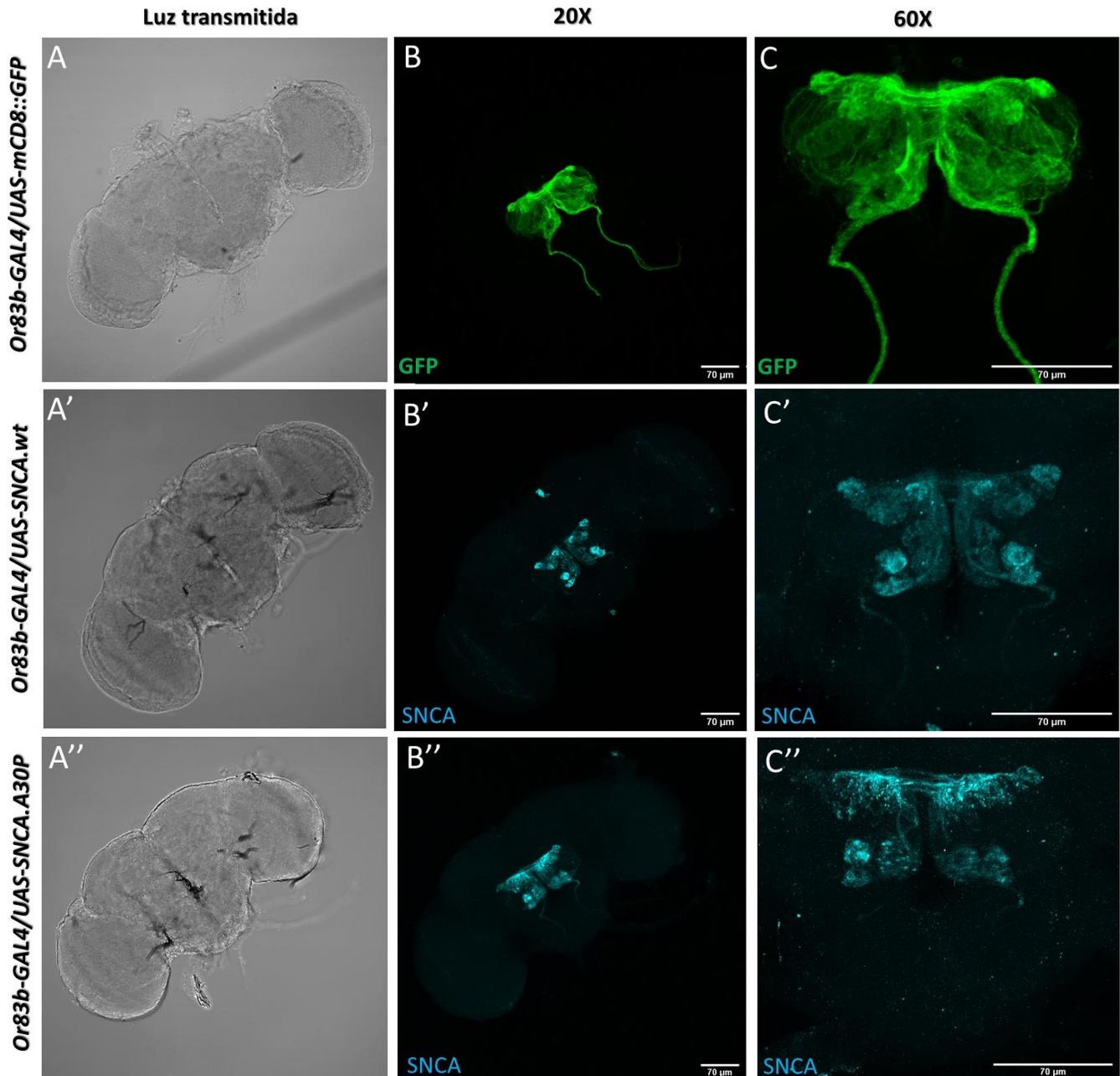


Figura 15.- Distribución proteica en cerebro de *D. melanogaster* de 15 días de edad adulta.
A-A'') Cerebros en campo claro. B-B'') mCD8::GFP, SNCA^{wt} y SNCA^{A30P}, respectivamente, bajo la dirección del receptor olfativo Or83b en cerebro de adulto de 15 días. C-C'') mCD8::GFP, SNCA^{wt} y SNCA^{A30P}, respectivamente, en lóbulos antenales de adulto de 15 días

30 días

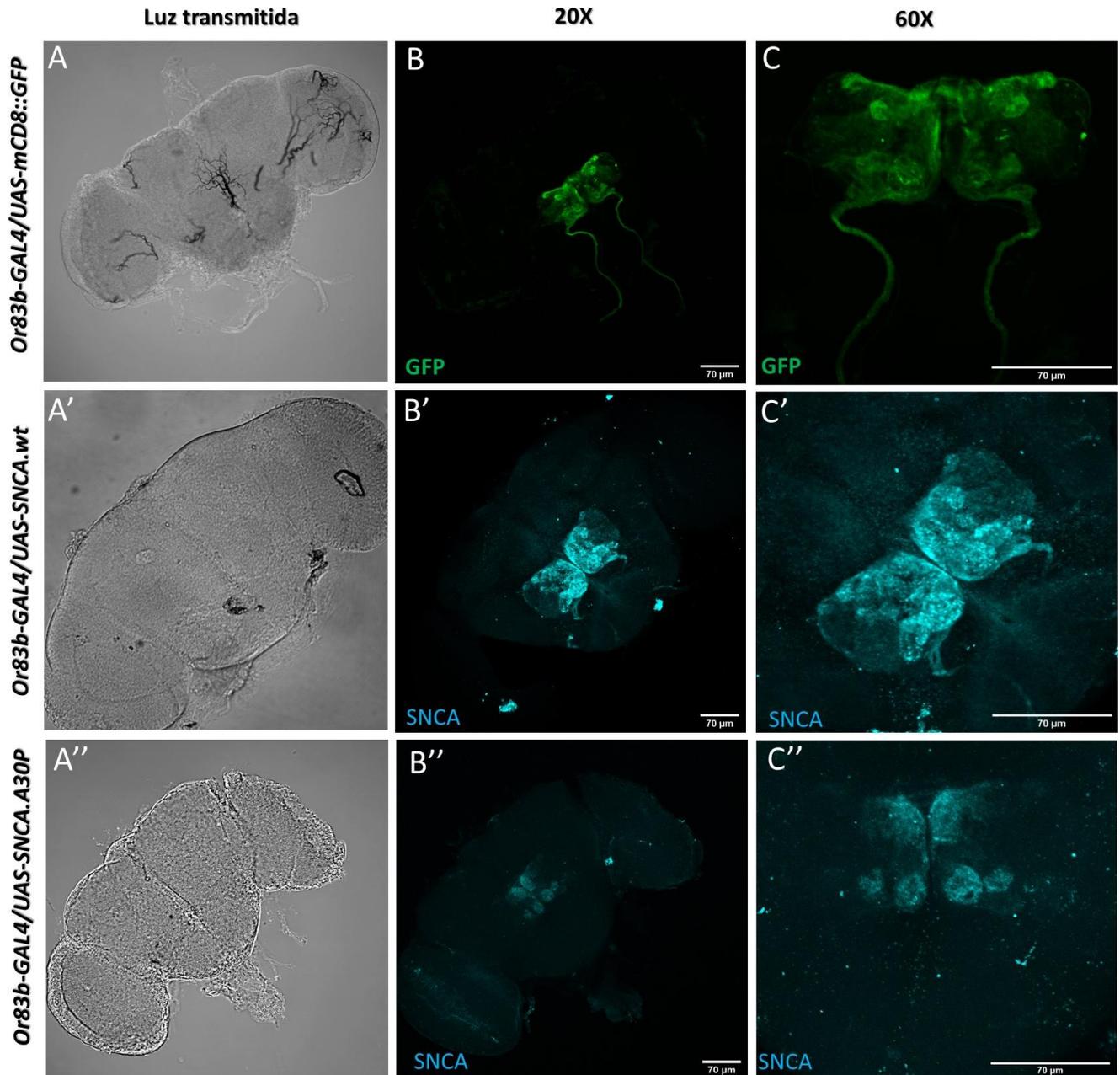


Figura 16.- Distribución proteica en cerebro de *D. melanogaster* de 30 días de edad adulta.
A-A'') Cerebros en campo claro. **B-B'')** mCD8::GFP, SNCA^{wt} y SNCA^{A30P}, respectivamente, bajo la dirección del receptor olfativo Or83b en cerebro de adulto de 30 días. **C-C'')** mCD8::GFP, SNCA^{wt} y SNCA^{A30P}, respectivamente, en lóbulos antenales de adulto de 30 días

45 días

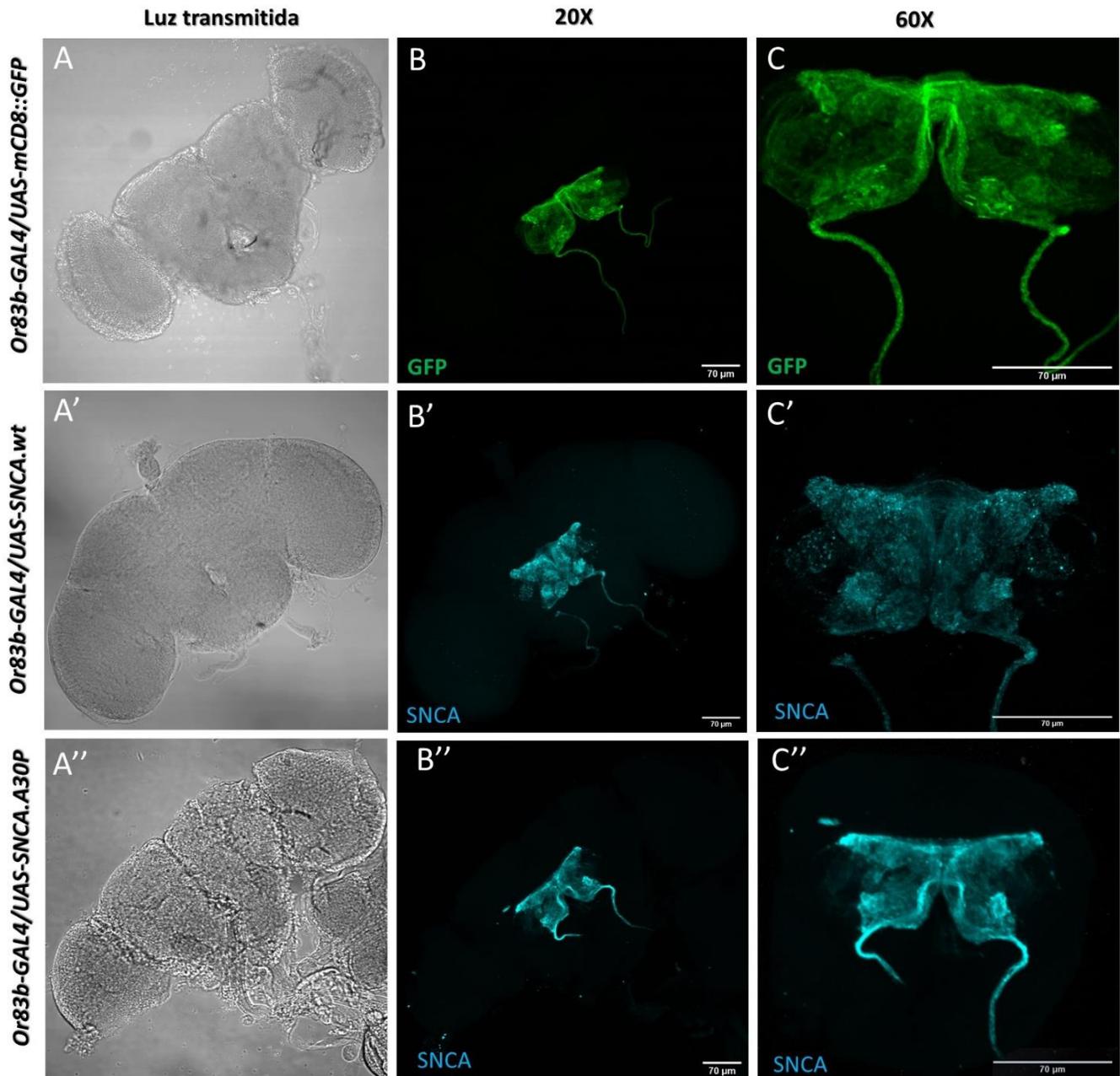


Figura 17.- Distribución proteica en cerebro de *D. melanogaster* de 45 días de edad adulta.
A-A'') Cerebros en campo claro. B-B'') mCD8::GFP, SNCA^{wt} y SNCA^{A30P}, respectivamente, bajo la dirección del receptor olfativo Or83b en cerebro de adulto de 45 días. C-C'') mCD8::GFP, SNCA^{wt} y SNCA^{A30P}, respectivamente, en lóbulos antenales de adulto de 45 días.

6.2 Efecto de la expresión de SNCA^{wt} y SNCA^{A30P} en neuronas olfativas sobre la capacidad motriz

Para comparar la actividad motriz espontánea entre genotipos y determinar si alguna de las SNCAs al expresarse en sistema olfativo tenía efecto sobre este comportamiento, se evaluaron 16 moscas de cada uno de los siguientes grupos de días de edad: 5, 15, 30 y 45 que expresaban SNCA^{wt} o SNCA^{A30P} bajo la dirección de Or83b. En la figura 18 se puede apreciar el comportamiento de dichas moscas en donde se puede observar en todas las edades evaluadas un patrón en el que la mayor parte del tiempo la actividad de las moscas control (White) fue más alta, es decir, son moscas más activas respecto a los individuos Or83b > SNCA^{wt} y Or83b > SNCA^{A30P}. Esto también se puede observar, quizá más evidentemente, en los análisis del promedio de pases en las pruebas olfativas a partir de los 15 días, ya que reflejan que el grupo control es el que tiene mayor número de pases (Fig. 21 A – 23 A).

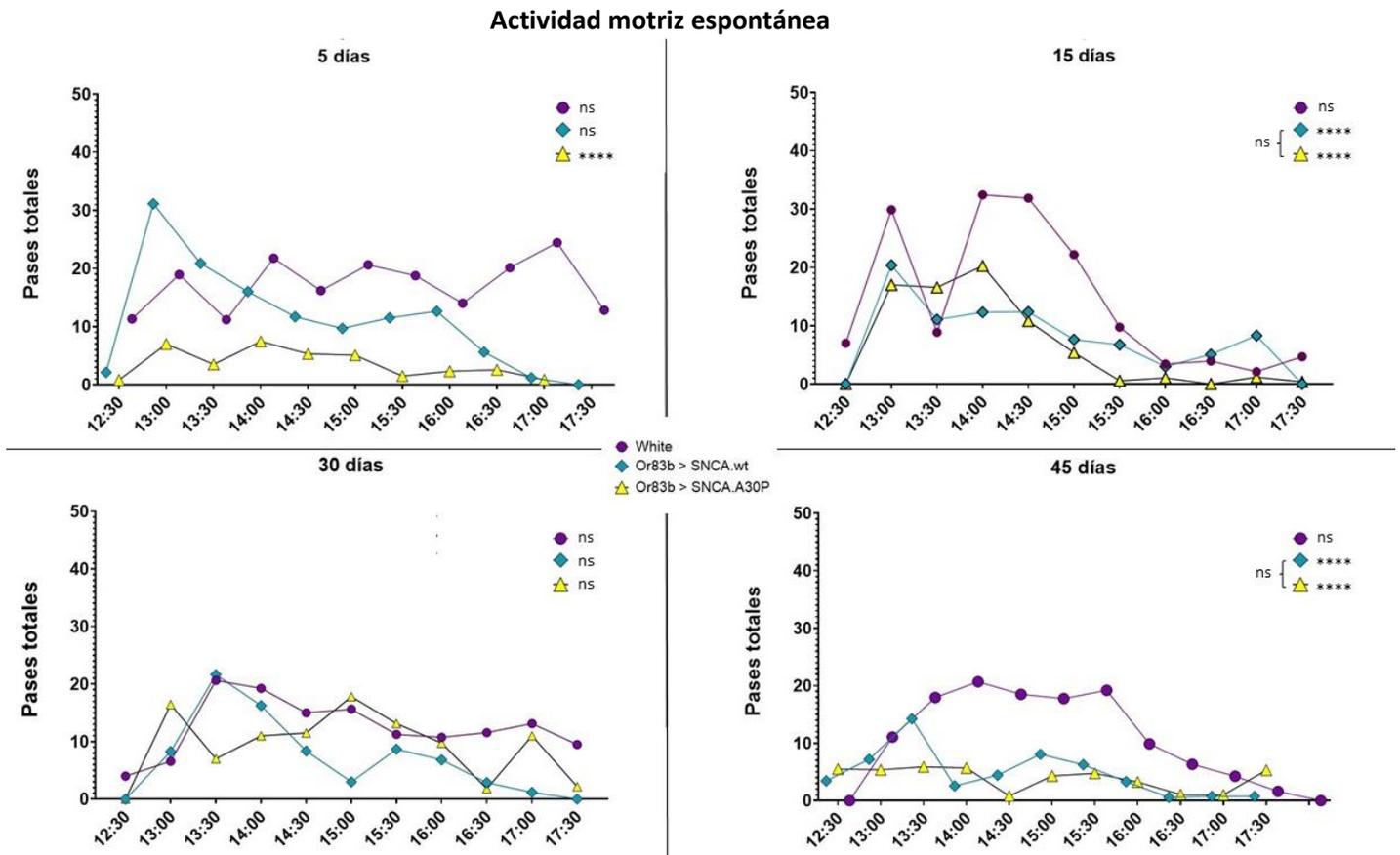


Figura 18.- Actividad motriz espontánea por hora de moscas White, Or83b-Gal4/UAS-SNCA^{wt} y Or83b-Gal4/UAS-SNCA^{A30P} de 5, 15, 30 y 45 días de edad. Diferencias significativas de acuerdo a ANOVA de dos vías y método de comparación múltiple de Tukey.

Por otro lado, al analizar la actividad global de cada genotipo (Fig. 19), se confirma que a lo largo de toda su vida las moscas control tuvieron mayor actividad respecto a las moscas de los genotipos experimentales, siendo más significativa la diferencia entre las moscas Or83b > SNCA^{A30P} y el control. Las moscas Or83b > SNCA^{A30P} y las Or83b > SNCA^{wt} también presentaron diferencias entre ellas en los niveles de actividad a lo largo de su vida.

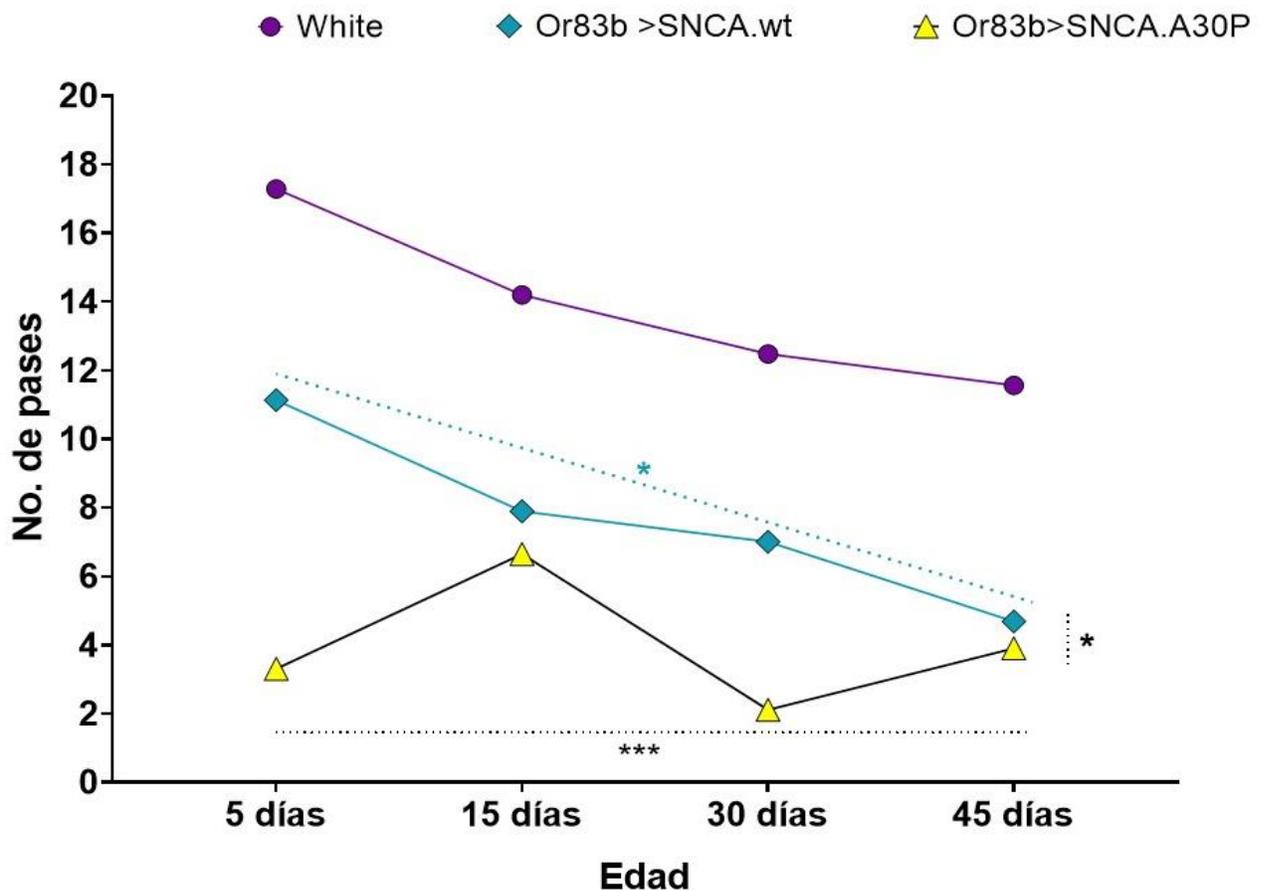


Figura 19.- Capacidad motriz espontánea global a lo largo del tiempo de moscas White, Or83b-Gal4/UAS-SNCA^{wt} y Or83b-Gal4/UAS-SNCA^{A30P}. * y ***: Diferencias significativas de acuerdo a ANOVA de dos vías y método de comparación múltiple de Tukey.

6.3 Capacidad olfativa de moscas de 5 días que expresan SNCA^{wt} y SNCA^{A30P} en neuronas olfativas

En cuanto a la capacidad olfativa de las moscas de 5 días de edad, en la figura 20 A se puede observar el número de pases promedio que se registraron hacia cada sustancia (Bz 0.5% y agua) para ambos genotipos experimentales y el control. Apreciándose que los individuos que tuvieron un mayor número de pases hacia el agua fueron las moscas que expresaban SNCA^{wt}, siendo su promedio de pases incluso mayor que el del control. Como resultado, al analizar el número de pases hacia dicha sustancia, existen diferencias significativas tanto del grupo que expresa SNCA^{wt}, como del grupo que expresa SNCA^{A30P} con respecto al control y entre ambos genotipos experimentales. La diferencia entre genotipos experimentales es mayor que la que presenta cada una de ellas respecto al control.

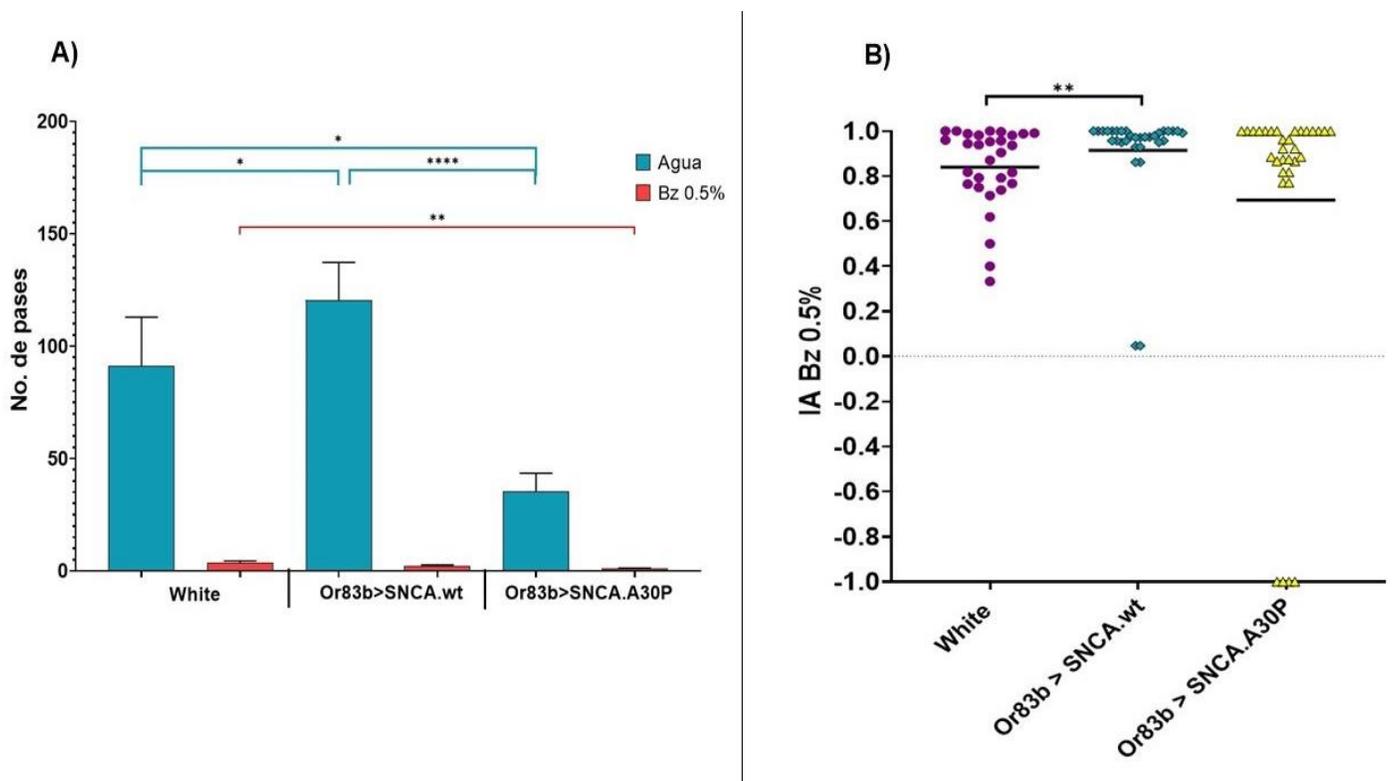


Figura 20.- Desempeño olfativo de moscas de 5 días de edad adulta.

A) Número de pases promedio hacia cada sustancia (agua y Bz 0.5%) para cada genotipo. Las líneas azules indican las diferencias significativas entre los pases hacia el agua de cada genotipo, mientras que las líneas rojas indican las diferencias significativas entre los pases hacia el Bz 0.5%. **B)** Índice de aversión por individuo de cada genotipo ante Bz 0.5%. 1 = extrema repulsión, -1 = extrema atracción.

Diferencias significativas: * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), **** ($P \leq 0.0001$) en la prueba de U de Mann-Whitney.

Al analizar los pases hacia la sustancia repelente (Bz 0.5%), se puede observar que el número de pases de las moscas que expresan SNCA^{wt} no fue significativamente diferente respecto al número de pases de las moscas control, lo que parece indicar que las moscas más jóvenes de este genotipo aparentemente no presentan alteraciones olfativas. Por otro lado, las moscas que expresan SNCA^{A30P} sí muestran diferencias significativas respecto al control (Fig. 20. A). Sin embargo, los datos más concluyentes en cuanto a la capacidad olfativa de las moscas de 5 días, son los del índice de aversión que se puede apreciar en el panel B de la figura 19, donde se observa que existe una diferencia significativa entre el control y las moscas que expresan SNCA^{wt}, más esto no parece ser indicio de una disfunción olfativa general de este genotipo, ya que la mayoría de los individuos (30 de 32) se encuentran cercanos a la extrema repulsión (IA=1), que es precisamente lo que se espera de aquellos cuya capacidad olfativa es adecuada, y este patrón parece ser muy homogéneo en este genotipo.

Por otro lado, aun cuando el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre las moscas de 5 días que expresan SNCA^{A30P} en neuronas olfativas y el control, es evidente que, comparado con el grupo control, existe un mayor número de individuos de este grupo cuya capacidad olfativa se ve drásticamente alterada, llegando incluso a presentar valores de extrema atracción hacia la sustancia que ha sido caracterizada como repelente. Esto podría ser indicio de que esta mutación de la proteína sí podría estar generando alteraciones olfativas en algunos individuos, sin embargo, la penetrancia de este fenómeno no era aún lo suficientemente alta como para verse reflejada en una diferencia estadísticamente significativa.

6.4 Capacidad olfativa de moscas de 15 días que expresan SNCA^{wt} y SNCA^{A30P} en neuronas olfativas

El desempeño olfativo de las moscas de 15 días de edad adulta de los diferentes genotipos evaluados se puede observar en la figura 21. Primeramente se analizó el número de pases promedio hacia cada sustancia y no se registró diferencia significativa entre el número de pases de Or83b > SNCA^{wt} y Or83b > SNCA^{A30P} hacia ninguna de las dos sustancias, pero sí se encontraron diferencias significativas entre el número de pases

promedio de cada uno de estos genotipos hacia ambas sustancias respecto al control (Fig. 21 A).

Considerando el promedio del índice de aversión en este estadio (Fig. 21 B), aparentemente, el grupo que expresa SNCA^{A30P} tiene alteraciones olfativas, ya que presenta diferencias estadísticamente significativas respecto al control y se puede observar claramente que su promedio es notablemente menor (white: 0.8002 ± 0.1098 , Or83b>SNCA^{wt}: 0.8518 ± 0.1959 , Or83b>SNCA.A30P: 0.6365 ± 0.3952), lo cual también se refleja en una diferencia significativa respecto al grupo que expresa SNCA^{wt}. Una vez más, esta aparente alteración parece ser estocástica, puesto que no todos los individuos con este genotipo muestran índices de aversión bajos.

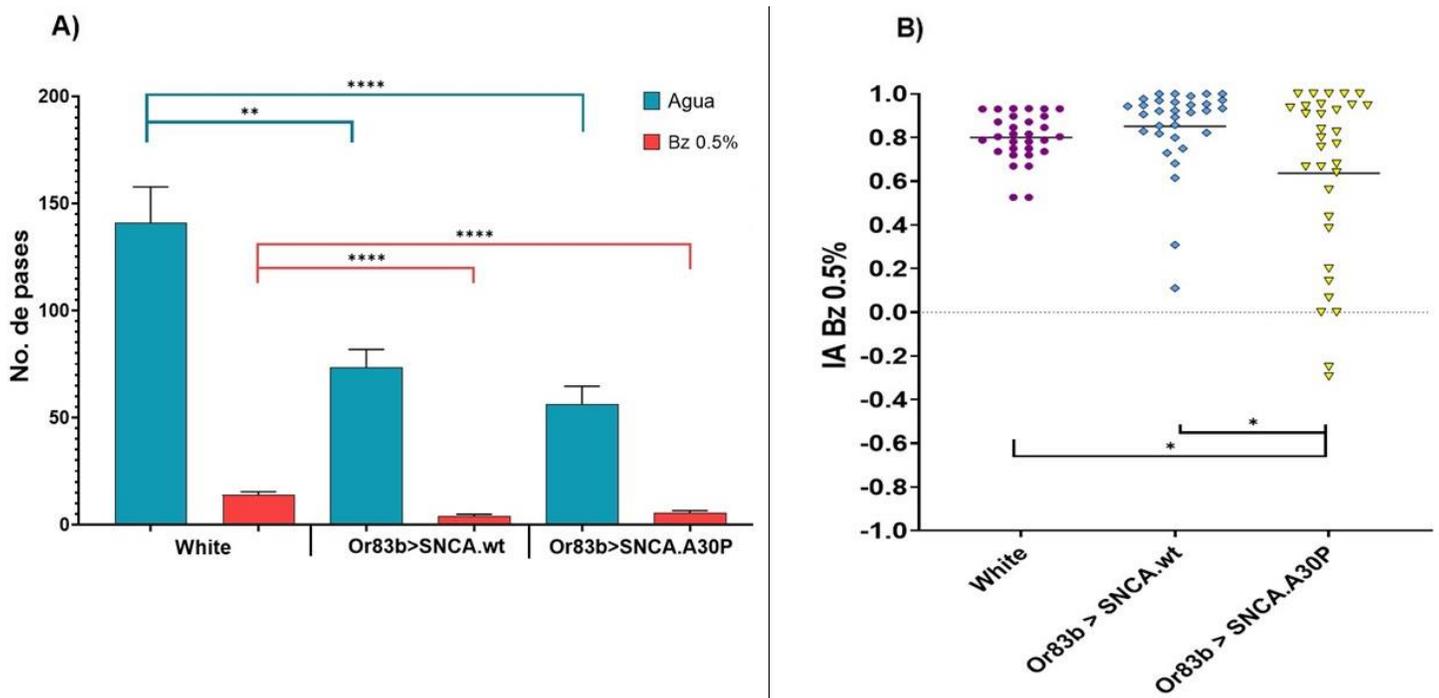


Figura 21.- Desempeño olfativo de moscas de 15 días de edad adulta.

A) Número de pases promedio hacia cada sustancia (agua y Bz 0.5%) para cada genotipo. Las líneas azules indican las diferencias significativas entre los pases hacia el agua de cada genotipo, mientras que las líneas rojas indican las diferencias significativas entre los pases hacia el Bz 0.5%. **B)** Índice de aversión por individuo de cada genotipo ante Bz 0.5%. 1 = extrema repulsión, -1 = extrema atracción.

Diferencias significativas: *($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), **** ($P \leq 0.0001$) en la prueba de U de Mann-Whitney.

6.5 Capacidad olfativa de moscas de 30 días que expresan SNCA^{wt} y SNCA^{A30P} en neuronas olfativas

En el caso de las moscas de 30 días de edad; los datos del análisis de la respuesta olfativa no mostraron diferencias significativas, ni en el número de pases hacia las sustancias evaluadas (Fig. 22 A), ni en el índice de aversión (Fig. 22 B). Sin embargo, se mantiene y exagera la tendencia de que los índices de aversión de los individuos que expresan SNCA, esta vez ambas isoformas, y los promedios de ambos genotipos son menores que los del grupo control (white: 0.8630 ± 0.1559 , Or83b>SNCA^{wt}: 0.7856 ± 0.3505 , Or83b>SNCA^{A30P}: 0.5409 ± 0.7356). Lo anterior no se refleja en una diferencia significativa entre promedios, probablemente debido a que la variación entre los individuos del mismo genotipo es muy grande y por lo tanto también sus desviaciones estándar; no obstante, es claro que, especialmente las moscas Or83b>SNCA^{A30P}, cuentan con una creciente cantidad de individuos que presentan índices de aversión cada vez más bajos; lo que podría estar indicando que en cierta parte de la población con este genotipo, la expresión de la SNCA mutada sí está ocasionando alteraciones olfativas graduales.

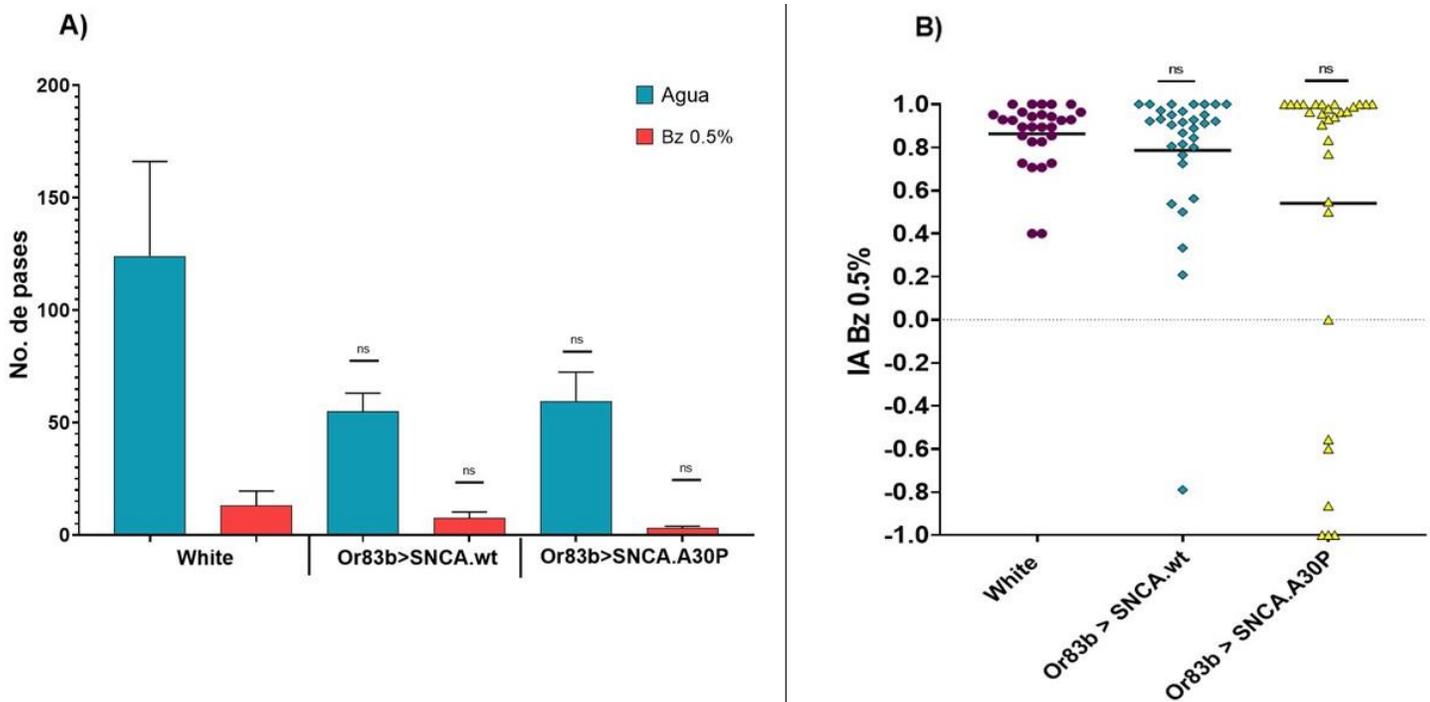


Figura 22.- Desempeño olfativo de moscas de 30 días de edad adulta.

A) Número de pases promedio hacia cada sustancia (agua y Bz 0.5%) para cada genotipo. **B)** Índice de aversión por individuo de cada genotipo ante Bz 0.5 %. 1 = extrema repulsión, -1 = extrema atracción. Diferencias no significativas de acuerdo a la prueba de U de Mann-Whitney.

6.6 Capacidad olfativa de moscas de 45 días que expresan SNCA^{wt} y SNCA^{A30P} en neuronas olfativas

Al analizar la capacidad olfativa de los individuos más viejos, se puede observar que no existe una diferencia significativa, ni entre el número de pases hacia las sustancias (Fig. 23 A), ni entre el índice de aversión de los genotipos experimentales (Or83b>SNCA^{wt} y Or83b>SNCA^{A30P}), es decir, la respuesta olfativa de las moscas que expresan SNCA^{A30P} es muy similar a la respuesta de las moscas que expresan SNCA^{wt}.

Sin embargo, ambos genotipos muestran diferencias significativas respecto al grupo control, tanto en el número de pases hacia el agua, como en el índice de aversión, siendo igualmente significativos.

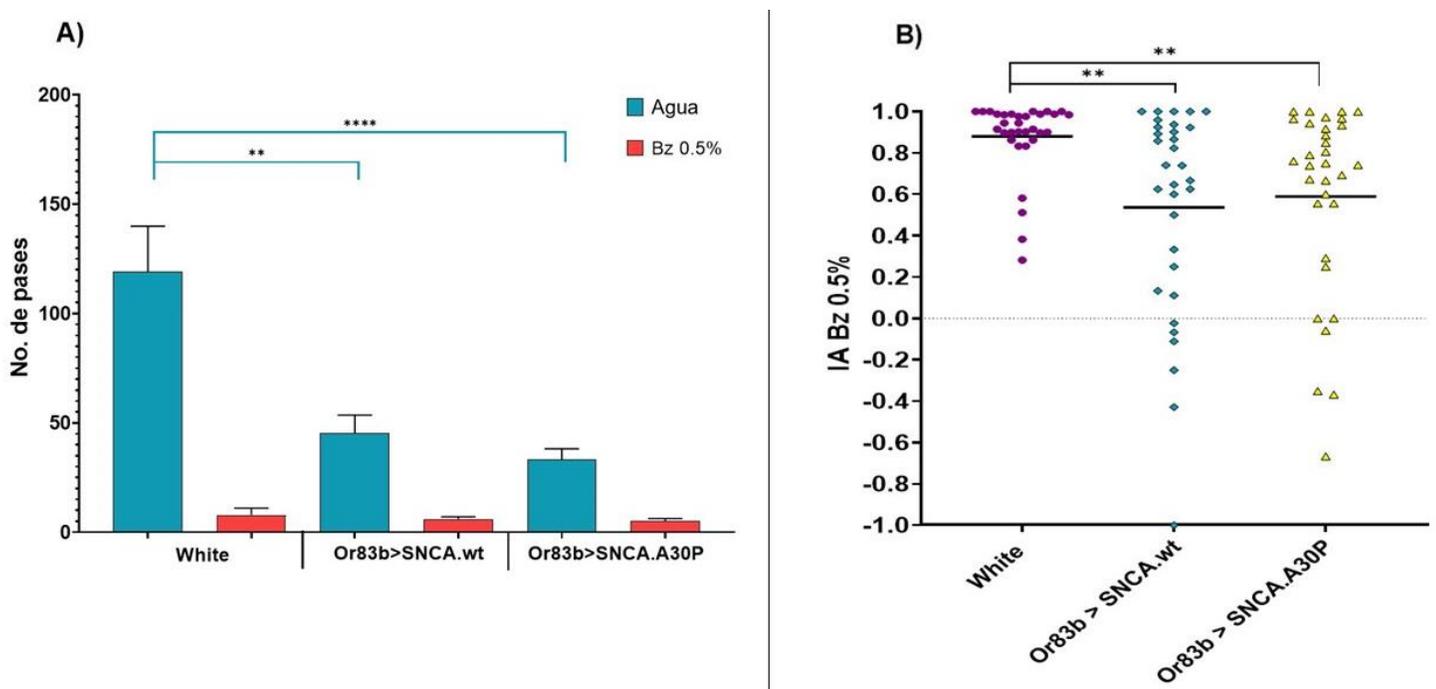


Figura 23.- Desempeño olfativo de moscas de 45 días de edad adulta.

A) Número de pases promedio hacia cada sustancia (agua y Bz 0.5%) para cada genotipo. Las líneas azules indican las diferencias significativas entre los pases hacia el agua de cada genotipo. **B)** Índice de aversión por individuo de cada genotipo ante Bz 0.5 %. 1 = extrema repulsión, -1 = extrema atracción.

Diferencias significativas: *($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), **** ($P \leq 0.0001$) en la prueba de U de Mann-Whitney.

Lo anterior va acorde a lo que se vino observando en las distintas evaluaciones a lo largo del envejecimiento de estos grupos, ya que al analizar los índices de aversión de todas las edades evaluadas en conjunto se puede apreciar que conforme los individuos experimentales envejecen, su respuesta olfativa decae, mas no así en el control.

Se puede observar que las moscas control mantienen un desempeño olfativo relativamente constante y en torno a los valores esperados de máxima repulsión, al igual que las moscas Or83b>SNCA^{wt}, excepto a los 45 días de edad cuando su índice de repulsión mengua drásticamente y es significativamente distinto al control. En contraste, las moscas Or83b>SNCA^{A30P} desde etapas juveniles presentan un índice de aversión bajo que va disminuyendo aún más conforme los individuos envejecen hasta volverse significativo igualmente a los 45 días de edad (Fig. 24).

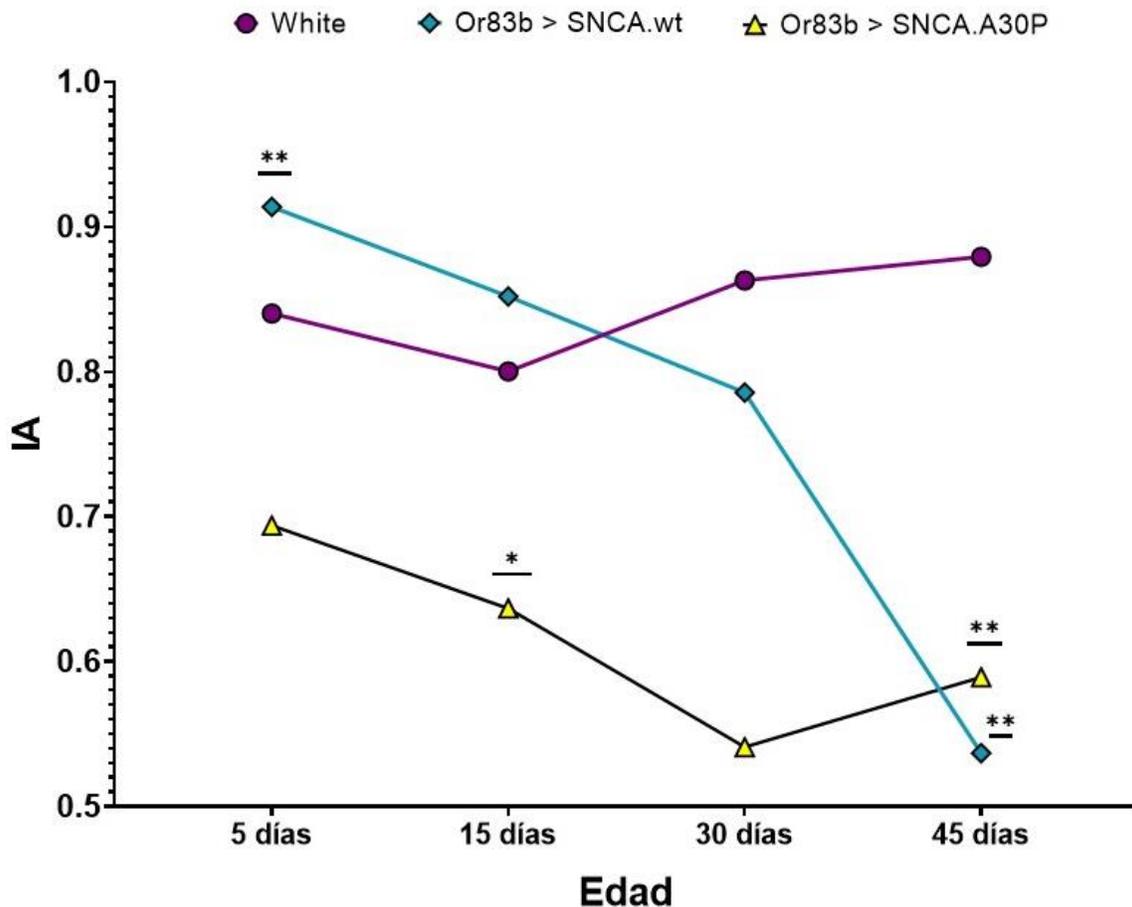


Figura 24.- Curva de percepción olfativa ante Bz 0.5% a distintas etapas de envejecimiento.
 IA: Índice de aversión. ** Diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.01$), respecto al control (white) en prueba de U de Mann-Whitney.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Ausencia de propagación a partir de neuronas olfativas de SNCA^{wt} y SNCA^{A30P}.

A pesar de que existen varias investigaciones en las que se ha sugerido que la SNCA cuenta con la capacidad para propagarse (Rey *et al.*, 2013, Ulusoy *et al.*, 2017, Kim *et al.*, en 2019, etc.), la realidad es que en ningún caso se ha podido observar la propagación de esta proteína de manera endógena, es decir, no existe ningún modelo transgénico en el que se puedan realizar estudios sobre los mecanismos de propagación de esta proteína al expresarse endógenamente en el organismo; ya que la propagación que se ha observado ha sido únicamente mediante la utilización de inyecciones estereotáxicas de SNCA.

Los resultados obtenidos de la distribución de SNCA^{wt} y SNCA^{A30P} a partir de sistema olfativo en el presente estudio, concuerdan con la falta de propagación que ha sido observada por otros autores como Sastry *et al.*, en 2015, quienes de manera transgénica expresaron esta misma proteína en neuronas dopaminérgicas en busca de propagación, sin embargo concluyeron que, en sus modelos, esta proteína no se propagaba desde este tipo neuronal.

Esta ausencia de propagación por parte de la SNCA quizá puede ser explicada por la evidencia existente que sugiere la posible dependencia de SNCA exógena, así como de posible necesidad de que exista una expresión basal de SNCA en otros tejidos, lo que podría promover mecanismos tipo prion para mediar esta propagación en pacientes y en modelos de inyección. El estudio publicado por Kim *et al.*, en 2019 presenta una evidencia muy fuerte de que probablemente sean mecanismos similares a los que suceden durante la propagación de los priones los que estén participando en este fenómeno, dado que estos autores observaron una propagación de SNCA desde el intestino hacia el cerebro. Esta propagación parece depender tanto de la proteína exógena (patogénica) que inyectaron en el sistema entérico de los ratones, como de la endógena (silvestre), puesto que al realizar los mismos experimentos en ratones nulos para SNCA (*Snca*^{-/-}) notaron

que la propagación ya no se llevaba a cabo, sugiriendo un proceso de conversión o de cambio conformacional de la SNCA endógena mediado por la SNCA inyectada.

En nuestro caso, es probable que la isoforma nativa de la SNCA y la que contiene la mutación A30P, no cuenten con la capacidad intrínseca para propagarse, sino que requieren de otros factores ya sean celulares, que no estén en nuestro modelo o algún tipo “insulto” externo que sean importantes para la inducción o la progresión este fenómeno.

Estos factores externos podrían ser fuentes exógenas de SNCA o xenobióticos químicos o biológicos que desencadenaran los mecanismos necesarios para que el proceso de propagación iniciase. Por un lado, en los modelos actuales la fuente exógena de SNCA se añade a través de inyecciones en el sitio de interés, sin embargo Killinger y Labrie en 2017, discutieron la posibilidad de que en la población humana ciertos alimentos de origen animal pudieran estar fungiendo como fuentes de SNCA exógena y propiciando mecanismos de propagación de la SNCA endógena similares a los que suceden con los priones. Por otro lado, se han asociado con la PD algunas clases de virus, un ejemplo reciente que busca incursionar en la causalidad de esta enfermedad es la propuesta de Chaná-Cuevas *et al.*, en 2020 que sugiere una relación causal entre los coronavirus, particularmente el SARS-COV-2, y la PD. Ellos argumentan que este tipo de virus puede estar desencadenando diversos procesos pro-inflamatorios que llevan, entre otras cosas, a la acumulación de la SNCA, el desarrollo y la progresión de la neurodegeneración, y posiblemente una reacción autoinmune contra la SNCA silvestre. Este tipo de propuestas abre la posibilidad de que alguno de estos factores (o varios) puedan estar desempeñando el papel de desencadenadores de un mal plegamiento de la SNCA y probablemente su propagación. Por lo que en mosca sería de utilidad realizar experimentos en los que de manera similar al presente estudio, se expresara SNCA en determinada región del sistema nervioso y los individuos se expusieran a, ya sea la ingestión de SNCA mutada a través del alimento, o a algún xenobiótico que pudiera desencadenar procesos pro-inflamatorios; para posteriormente analizar la distribución de la SNCA en sistema nervioso.

7.2 Efecto olfativo y motor de la expresión de SNCA^{wt} y SNCA^{A30P} en neuronas olfativas

La expresión de SNCA^{wt} bajo la dirección de Or83b parece generar un decaimiento olfativo dependiente de la edad, que llega a ser significativamente diferente respecto al control únicamente hasta los 45 días de edad. Por otro lado, las moscas que expresan SNCA^{A30P} aparentemente tienen alteraciones olfativas fluctuantes.

Contrario a lo que se esperaba, el índice de aversión promedio de los organismos jóvenes que expresan SNCA^{wt} no revela alteraciones olfativas y, dado que se ha reportado que la hiposmia y anosmia son síntomas tempranos en la PD y otras sinucleinopatías (Fullard, Morley y Duda, 2017) y dado que nuestro grupo ya había comprobado con anterioridad que el modelo de PD en *D. melanogaster*, utilizado por diversos laboratorios en el mundo, y originalmente ideado por Feany y Bender en el 2000, presentaba alteraciones olfativas desde edades tempranas, la hipótesis en este caso era que la expresión de esta proteína directamente en neuronas olfatorias generaría un déficit olfativo desde etapas juveniles. Esto quizá pueda explicarse considerando la diferencia fundamental entre el modelo empleado en la presente investigación y el modelo mencionado anteriormente en el que se encontraron dichas alteraciones juveniles, y en donde los organismos expresaban la isoforma silvestre de la SNCA en neuronas dopaminérgicas y no en neuronas olfativas sugiriendo que es la disfunción de las neuronas dopaminérgicas lo que causa indirectamente la pérdida de la función olfativa.

Hay estudios que sugieren que las alteraciones olfativas observadas en moscas que expresan SNCA^{A30P} en neuronas dopaminérgicas, se deben al efecto indirecto de la pérdida de función de dichas neuronas y no directamente a daños en el sistema de olfacción (Chen *et al.*, 2014), pues en la mosca las neuronas dopaminérgicas inervan los glomérulos olfativos posiblemente modulando indirectamente la salida (*output*) de las neuronas olfativas *ibidem*. Los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo apoyan dicha hipótesis, ya que igualmente se observaron alteraciones olfativas (tempranas y tardías) al expresarse la versión silvestre de esta proteína en neuronas dopaminérgicas (De Allende-Becerra, 2018).

Sin embargo, en el estudio de Chen *et al.* en 2014 previamente mencionado, no utilizaron moscas envejecidas, sino que únicamente evaluaron hasta los 15 días de edad, por lo que nuestra investigación sugiere que, cuando la proteína silvestre es expresada en neuronas olfativas, y se alcanza cierto nivel de envejecimiento, se puede afectar directamente, anómala y prematuramente, el desempeño de las neuronas olfativas, y por tanto el *output* de las mismas, aún cuando las neuronas dopaminérgicas se mantengan intactas. La expresión de SNCA probablemente causa alteraciones olfativas mediante una acumulación gradual de daños celulares que sólo se manifiestan cuando se cruza un umbral crítico.

El porqué la SNCA parecería estar afectando más a un tipo neuronal que a otro, es una pregunta fundamental para entender las sinucleinopatías y sus mecanismos. Se ha propuesto con anterioridad que las neuronas dopaminérgicas parecen ser especialmente susceptibles a la neurodegeneración debido al estrés oxidativo al que se encuentran expuestas debido a los productos de la oxidación de la dopamina, y que mutaciones o alteraciones de SNCA en las terminales sinápticas pueden resultar en la reducción del número de vesículas disponibles para el almacenaje y exportación de dopamina, lo cual provoca que este neurotransmisor se acumule en el citoplasma, se autooxide y como consecuencia incrementen los niveles de estrés oxidativo, llevando eventualmente a la muerte celular si dicho daño no puede ser reparado (Lotharius y Brundin, 2002).

En contraste, a pesar de que los órganos olfativos en general suelen estar expuestos al medio y por ello más vulnerables al daño por contaminantes y agentes externos, la región nerviosa olfativa se caracteriza por ser una de las zonas del sistema nervioso con mayor tasa de regeneración celular, tanto en vertebrados (Frontera *et al.*, 2016, Brann y Firestein, 2014) como en invertebrados (Stern *et al.*, 2011, Song *et al.*, 2012). Esto ocurre a lo largo de toda la vida del individuo y especialmente después de que ha ocurrido un daño o lesión, sin embargo, el envejecimiento, el daño progresivo, entre otras cosas, van provocando que la neurogénesis disminuya (Enwere *et al.*, 2004). Esto podría explicar el comportamiento observado al expresar las SNCAs en sistema olfativo, y por qué en este caso las alteraciones olfativas no son evidentes sino hasta que la neurogénesis de esta zona ha disminuido debido a la edad y posiblemente a la continua exposición al daño que

estas proteínas pudieron desencadenar. Probablemente en etapas juveniles los individuos cuentan con una mayor capacidad regenerativa en la zona olfatoria, por lo que podían contrarrestar la presencia de estas proteínas y su posible toxicidad al renovar las neuronas muertas a causa de los efectos de la SNCA, sin embargo, llegado el punto de declive en esta capacidad, el daño comenzó a reflejarse en un déficit olfativo (Figura 23). En cambio, los organismos que expresan la SNCA en las neuronas dopaminérgicas, de las cuales no se tiene evidencia de que en condiciones normales cuenten con capacidad regenerativa, no cuentan con un mecanismo semejante por lo que el daño se reflejó directamente en el desempeño olfativo desde etapas tempranas (De Allende-Becerra, 2018).

Por otra parte, en general el promedio del índice de aversión de la línea de moscas que expresa SNCA^{A30P} fue bajo desde un inicio comparado con el control, a pesar de no ser significativo, y se observa que conforme envejecen, este promedio disminuye pero no tan drásticamente como en la línea que expresa SNCA^{wt}. A lo largo del tiempo se puede observar que en cada una de las evaluaciones la variación del índice de aversión entre los individuos es grande, hallándose algunas moscas con capacidades olfativas comparables a las del control y otros individuos que podrían ser considerados hipósicos, especialmente dentro del grupo que expresa SNCA^{A30P}.

Esta variación podría ser indicador de que el efecto que la presencia de estas proteínas puede desencadenar es estocástico, pues en pacientes diagnosticados con alguna sinucleinopatía no siempre se presentan los mismos síntomas autónomos, por ejemplo; en pacientes con DCL, se ha reportado que la prevalencia de hiposmia es del 65%, mientras que en los pacientes con PD la prevalencia oscila entre el 55% y 94% (Mizuno, 2017).

Referente a la capacidad motriz, se puede apreciar que en las edades evaluadas hubieron diferencias significativas de los genotipos experimentales respecto al control, observándose que estas últimas moscas son más activas respecto a los individuos que expresan SNCA^{wt} o SNCA^{A30P} en las neuronas olfativas. Esto también se puede observar, quizá más evidentemente, en los análisis del promedio de pases en las pruebas olfativas

a partir de los 15 días, ya que reflejan que el grupo control es el que tiene mayor número de pases.

Es complicado discernir si la baja en la capacidad motriz espontánea de los individuos que expresan SNCA^{wt} o SNCA^{A30P} en las neuronas olfativas se debe a una alteración fisiológica relacionada al movimiento o a la falta de percepción de un estímulo, en este caso aversivo. Sin embargo, dado que al analizar las inmunotinciones contra SNCA no se observó la presencia de esta proteína en ninguna región cerebral involucrada en el desempeño motor, se puede inferir que lo más probable es que la falta de percepción del odorante presentado sea lo que esté propiciando esta diferencia.

En las moscas control la percepción de la sustancia aversiva y el instinto de huir de ella, puede estarse reflejando en una mayor actividad, mientras que las moscas que expresan alguna de las isoformas de SNCA, y que se observó presentaron deficiencias olfativas, no tienen la misma capacidad que el control para percibir la sustancia aversiva, por lo que no tienen tampoco la necesidad de huir de ésta y tienen períodos más largos de inactividad.

A pesar de que la SNCA se haya mantenido únicamente dentro del patrón de expresión de Or83b (región de percepción olfativa) y las inmunotinciones revelen que no tuvo contacto con regiones cerebrales involucradas en la capacidad motora, no se puede descartar totalmente la posibilidad de que las SNCAs puedan estar afectando indirectamente el desempeño motriz de estos individuos. Esta es una posibilidad menos clara y que tendría que estudiarse más a fondo, sin embargo, actualmente se sabe que la inflamación contribuye al desarrollo de las sinucleinopatías (Niu *et al.*, 2020) y en relación a esto, algunas ideas importantes que se han planteado actualmente para el inicio y la progresión de varias enfermedades neurodegenerativas, es que la región olfativa es la zona cerebral que inicialmente sufre neuroinflamación, y que esta inflamación se propaga o expande hacia otras regiones cerebrales, causando daño y alteraciones *Ibidem*.

Dado que se ha reportado que, bajo determinadas circunstancias de infección, la SNCA parece estar jugando un papel en el reclutamiento y maduración de células involucradas

en la respuesta inmune (células dendríticas) (Stolzenberg *et al.*, 2017) y en la activación de células secretoras de citocinas pro-inflamatorias (microglía) (Niu *et al.*, 2020) existe la posibilidad la sobreexpresión de las SNCAs en *D. melanogaster* esté desencadenando procesos inflamatorios en la zona olfativa, y que con el paso del tiempo y la acumulación de daño, esta neuroinflamación esté llegando a zonas aledañas o cercanas, propiciando así efectos adversos como podrían ser la disminución de la capacidad motriz.

Lo anterior por el momento se queda en una especulación y abre pie a nuevas perspectivas para realizar estudios enfocados a la posible relación de la SNCA con procesos inflamatorios que pudieran estar afectando estructuras cerebrales aún en ausencia de esta proteína.

VIII. CONCLUSIONES

- ✓ La distribución de la SNCA^{wt} y la SNCA^{A30P} se mantuvo dentro del patrón de expresión inicial, es decir, únicamente en las neuronas olfativas y sus proyecciones; por lo que aparentemente, en nuestro modelo, estas proteínas no cuentan con la capacidad intrínseca para propagarse a partir de neuronas olfativas de *D. melanogaster*.
- ✓ Las moscas que expresan SNCA^{wt} de manera transgénica en neuronas olfativas no presentan hiposmia en etapas juveniles. Sin embargo, se observa un decaimiento progresivo de su capacidad olfativa que a los 45 días de edad se registra como una posible anosmia.
- ✓ La expresión transgénica de la SNCA^{A30P} en neuronas olfativas de *D. melanogaster* genera alteraciones olfatorias fluctuantes, provocando a los 15 y 45 días de edad un desempeño olfativo estadísticamente inferior respecto al de los organismos sanos (white).
- ✓ El efecto olfativo generado por la expresión transgénica de la SNCA^{wt} y la SNCA^{A30P} en neuronas olfativas de *D. melanogaster*, parece ser estocástico.

- ✓ La expresión transgénica tanto de SNCA^{wt} como de SNCA^{A30P} en neuronas olfativas, parece estar teniendo un impacto significativo en función de la capacidad motriz de *D. melanogaster*.

IX. PERSPECTIVAS

Dado que en este estudio se pudo observar que aparentemente, ni la SNCA^{wt}, ni la SNCA^{A30P} cuentan con la capacidad intrínseca para propagarse a partir de sistema olfativo en *D. melanogaster*, y con base en la evidencia existente, una perspectiva es el realizar experimentos similares pero esta vez exponiendo a los individuos a agentes externos que probablemente pudieran propiciar la propagación de estas proteínas. Por ejemplo, la ingestión de alguna isoforma mutada de esta proteína o la exposición a algún químico como la rotenona.

Por otro lado, en esta investigación se planeaba analizar también el impacto que estas proteínas podían tener al ser expresadas en el intestino de nuestro modelo experimental, y determinar si bajo este panorama se llevaba a cabo la propagación hacia el sistema nervioso central. Los experimentos necesarios no pudieron llevarse a cabo por cuestiones de tiempo y circunstanciales, sin embargo, sería interesante determinar el efecto de la expresión de estas proteínas en dicha zona, para lo cual el experimento de la ingesta de SNCA propuesto en la perspectiva anterior también sería de utilidad.

Finalmente, hacen falta experimentos que ayuden a la comprobación de distintas ideas que son sugeridas en la discusión de esta tesis. Tales como la medición de la neurogénesis y regeneración celular a diferentes edades, tanto en individuos que expresen SNCAs en regiones olfativas, como en individuos que las expresen en neuronas dopaminérgicas, para determinar si este podría ser un factor influyente en la pérdida de la capacidad olfativa y así demostrar que la hiposmia presente en etapas tempranas de la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías es debido a un daño de las neuronas dopaminérgicas y no directamente de las neuronas olfativas.

LITERATURA CITADA

- Ascherio, A. y Schwarzschild, M., A. (2016). "The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention". *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd, 15(12): 1257–1272.
- Bahena-Trujillo, R.; Flores, G. y Arias-Montaña, J., A. (2000) "Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema". *Revista Biomédica*. 11(1): 39–60.
- Bernis, M., E.; Babila, J., T.; Breid, S.; Wusten, K., A.; Wullner, U. y Tamguney, G. (2015). "Prion-like propagation of human brain-derived alpha-synuclein in transgenic mice expressing human wild-type alpha-synuclein". *Acta Neuropathologica Communications*. 3: 75.
- Bodner, C., R.; Dobson, C., M. y Bax, A. (2009). "Multiple tight phospholipid-binding modes of α -synuclein revealed by solution NMR spectroscopy". *Journal of Molecular Biology*. 390 (4): 775-790.
- Braak, H.; Del Tredici, K.; Rüb, U.; de Vos, R., A., I.; Jansen, S., E., N., H. y Braak, E. (2003). "Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease". *Neurobiology of Aging*. 4580: 197–211.
- Brann, J., H. y Firestein, S., J. (2014). "A lifetime of neurogenesis in the olfactory system". *Frontiers in neuroscience*. 8 (182).
- Brundin, P. y Melki, R. (2017). "Prying into the prion hypothesis for Parkinson's disease". *The Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience. 37(41): 9808-9818.
- Buck, L. y Axel R. (1991). "A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition". *Cell*. 65(1):175-87.
- Busch, S.; Selcho, M.; Ito, K. y Tanimoto, H. (2009). "A map of octopaminergic neurons in the *Drosophila* brain". *The Journal of Comparative Neurology*. 513(6):643-667.
- Calderón Álvarez-Tostado, J., L.; Bolaños-Jiménez, R.; Carrillo-Ruiz, J., D. y Rivera-Silva, G. (2010) "Interpretación neuroanatómica de los principales síntomas motores y no-motores de la enfermedad de Parkinson", *Revista Mexicana de Neurociencias*, 11(3): 218–225.
- Certel, S., J.; Savella, M., G.; Schlegel, D., C. y Kravitz, E., A. (2007). « Modulation of *Drosophila* male behavioral choice". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(11): 4706-4711.

- Cervantes-Arriaga, A.; Rodríguez-Violante, M.; López-Ruiz, M.; Estrada-Bellmann, I.; Zuñiga-Ramírez, C.; Otero-Cerdeira, E.; Camacho-Ordoñez, A.; González-Latapi, P.; Morales-Briceño, H. y Martínez-Ramírez, D. (2013) “Caracterización de la enfermedad de Parkinson en México: estudio ReMePARK ARTÍCULO ORIGINAL”, *Gaceta Médica de México*, 149, pp. 497–501.
- Chacón, M., J.; Morales, P., J., M.; Jiménez, A., J., A. (2008) “Patología de la olfacción. Olfatometría. Manejo de los problemas olfativos”. *Hospital Virgen de la Salud, Toledo*:1–14.
- Chaná-Cuevas, P.; Salles-Gándara, P.; Rojas-Fernández, A.; Salinas-Rebolledo, C. y Milán-Solé, A. (2020). “The potential role of SARS-COV-2 in the pathogenesis of Parkinson’s disease”. *Frontiers in neurology*. 11 (1044): 1-8.
- Chang, D.; Nalls, M., A.; Hallgrímsdóttir, I., B.; Hunkapiller, J.; van der Brug, M.; Cai, F.; International Parkinson’s Disease Genomics Consortium; and Me Research Team; Kerchener, G., A.; Ayalon, G.; Bingol, B.; Sheng, M.; Hinds, D.; Behrens, T., W.; Singleton, A., W.; Bhangale, T., R. y Graham, R., R. (2017). “A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson’s disease risk loci”, *Nature Genetics*. Nature Publishing Group: 1-6.
- Chartier-Harlin, M.; Kachergus, J.; Roumier, C.; Mouroux, V.; Douay, X.; Lincoln, S.; Levecque, C. ; Larvor, L.; Andrieux, J. ; Hulihan, M. ; Waucquier, N.; Defebvre, L.; Amouyel, P.; Farrer, M. y Destée, A. (2004). “ α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson’s disease.” *Lancet*. 364; 1167-1169.
- Chen, A. Y.; Xia, S.; Wilburn, P.; y Tully, T. (2014). “Olfactory deficits in an alpha-synuclein fly model of Parkinson’s disease”. *PLoS one*. 9(5).
- Chiba, Y.; Takei, S.; Kawamura, N.; Kawaguchi, Y.; Sasaki, K.; Hasegawa-Ishii, S.; Furukawa, A.; Hosokawa, M. y Shimada, A. (2012). “Immunohistochemical localization of aggresomal proteins in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy.” *Neuropathology and applied neurobiology*. 38(6): 559-571
- Corti, O., Lesage, S. y Brice, A. (2011) “What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson’s Disease”, *Physiological Reviews*, 91(4): 1161–1218.
- Daubner, S., C.; Le, T. y Wang, S. (2011) “Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Elsevier Inc., 508(1): 1–12.
- Dauer, W. y Przedborski, S. (2003). “Parkinson’s Disease: Mechanisms and Models”. *Neuron*. 39: 889-909.

- De Allende-Becerra E. (2018). "Caracterización de alteraciones quimiosensoriales en un modelo para la enfermedad de Parkinson en *Drosophila melanogaster*." (Tesis Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.
- Delamarre, A. y Meissner, W., G. (2017). "Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease." *La Presse Médicale*. 46 (2):175-181.
- Dorsey, E. R.; Elbaz, A.; Nichols, E.; Abd-Allah, F.; Abdelalim, A.; Aduar, J. C., ... & Dahodwala, N. (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. 17(11): 939-953.
- Doty, R. y Mishra, A. (2001). "Olfaction and his alteration after nasal obstruction, rihinitis and rhinosinusitis". *Laryngoscope*. 111(3):409-23.
- Du, G., Huang, P., Liang, B., T., y Frohman, M., A. (2004). "Phospholipase D2 localizes to the plasma membrane and regulates angiotensin II receptor endocytosis". *Molecular biology of the cell*, 15(3):1024-1030.
- Duffy, J., B. (2002). "GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife". *Genesis*. 34(1–2): 1–15.
- Ebbs, M., L. y Amrein, H. (2007). "Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*". *Pflugers Archive European Journal of Physiology*. 454(5): 735–747.
- Emamzadeh, F. N. (2016) "Alpha-synuclein structure, functions, and interactions". *Journal of Research in Medical Sciences*. 21(2).
- Enwere, E.; Shingo, T.; Gregg, C.; Fujikawa, H.; Ohta, S. y Weiss, S. (2004). "Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination". *Journal of Neuroscience*, 24(38): 8354-8365.
- Feany, M., B. y Bender, W., W. (2000). "A *Drosophila* model of Parkinson's disease". *Nature*. 404 : 394 -398.
- Frontera, J., L.; Raices, M.; Cervino, A., S.; Pozzi, A., G. y Paz, D., A. (2016). "Neural regeneration dynamics of *Xenopus laevis* olfactory epithelium after zinc sulfate-induced damage". *Journal of chemical neuroanatomy*. 77: 1-9.
- Fullard, M., E.; Morley, J., F. y Duda, J., E. (2017). "Olfactory dysfunction as an early biomarker in Parkinson's disease". *Neuroscience bulletin*. 33 (5): 515-525.

- Fuyama, Y. (1976). "Behavior Genetics of Olfactory Responses in *Drosophila*. I. Olfactometry and Strain Differences in *Drosophila melanogaster*." *Behavior Genetics*. 6 (4): 407-420).
- GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group. (2017). "Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015". *Lancet Neurol*. 16: 877–897.
- George, J., M.; Jin, H.; Woods, W., S. y Clayton, D., F. (1995). "Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the Zebra Finch". *Neuron*. 15:361-372.
- Godoy, M., D., C., L.; Voegels, R., L.; de Rezende, P., F.; Imamura, R. y Farfel, J., M. (2015). "Olfaction in Neurologic and Neurodegenerative Diseases: A literature review". *International Archives of Otorhinolaryngology*. 19(2):176-179.
- Goedert, M. (2001). "Alpha-synuclein and neurodegenerative disease". *Nature rev. Neuroscience*. 2:492-501.
- Growdon, M. E.; Schultz, A. P.; Dagley, A. S.; Amariglio, R. E.; Hedden, T.; Rentz, D. M.; Johnson, K., A.; Sperling, R., A.; Albers, M., W. y Marshall, G. A. (2015). "Odor identification and Alzheimer disease biomarkers in clinically normal elderly." *Neurology*, 84(21): 2153–2160.
- Grueber, W., B.; Ye, B.; Yang, C., H.; Younger, S.; Borden, K.; Jan, L. Y. y Jan, Y., N. (2007). "Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous system: links with peripheral dendrite morphology." *Development*. 134(1): 55-64.
- Guarneros, M.; Hudson, R.; López-Palacios, M. y Drucker-Colín, R. (2015). "Reference values of Olfactory Function for Mexico City inhabitants." *Archives of Medical Research*. 46 : 84-90.
- Hales, K., G.; Korey, C., A.; Larracuenta, A., M. y Roberts, D., M. (2015). "Genetics on the fly: A primer on the *Drosophila* model system." *Genetics*. 201 (3): 815:842.
- Hodara, R.; Norris, E., H.; Giasson, B., I.; Mishizen-Eberz, A., J.; Lynch, D., R.; Lee, V., M. e Ischiropoulos, H. (2004). "Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: Diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation". *Journal of Biological Chemistry*. 279:47746–47753.
- Hussain, A.; Zhang, M.; Üçpunar, H., K. ; Svensson, T. ; Quillery, E. ; Gompel, N. ; Ignell, R. ; Grunwald-Kadow, I., C. (2016). "Ionotropic chemosensory receptor mediate the taste and smell of polyamines." *PLoS Biology*. 14 (5): 1-30.
- Ikeda, M. (2017). "Pharmacotherapy in dementia with Lewy bodies". En: Kosaka, K. *Dementia with Lewy bodies, clinical and biological aspects*. *Springer*. Japón. (2017).

- Jenco, J. M., Rawlingson, A., Daniels, B. & Morris, A. J. (1998). "Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by α - and β -synuclein." *Biochemistry*. 37: 4901–4909.
- Johnston, D., S. (2002). "The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*". *Nature Reviews Genetics*. 3:176-188.
- Joseph, R., M. y Carlson, J., R. (2015). "*Drosophila* Chemoreceptors: A Molecular Interface Between the Chemical World and the Brain", *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd. 31(12):683–695.
- Kain, P. ; Chakraborty, T., S.; Sundaram, S.; Siddiqi, O.; Rodrigues, V. y Hasan, G. (2008). "Reduced Odor Responses from Antennal Neurons of Gq α , Phospholipase C β , and *rdgA* Mutants in *Drosophila* Support a Role for a Phospholipid Intermediate in Insect Olfactory Transduction". *Journal of Neuroscience*. 28(18): 4745–4755.
- Kaufman, T., C. (2017). "A short history and description of *Drosophila melanogaster* classical genetics: Chromosome aberrations, forward genetic screens, and the nature of mutations." *Genetics*. 206 (2): 665-689.
- Kaupp, U., B. (2010). "Olfactory signalling in vertebrates and insects: Differences and commonalities". *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 11(3): 188–200.
- Killinger, B. A., y Labrie, V. (2017). "Vertebrate food products as a potential source of prion-like α -synuclein". *Nature partener journal. Parkinson's Disease*. 3(1): 1-11.
- Kim, S.; Kwon, S., H.; Kam, T., I.; Panicker, N.; Karuppagounder, S., S.; Lee, S.; Lee, J., H.; Kim, W., R.; Kook, M.; Foss, C., A.; Shen, C.; Lee, H.; Kulkarni, S.; Pasricha, P., J.; Lee, G.; Pomper, M., G.; Dawson, V., L.; Dawson, T., M. y Ko, H., S. (2019). "Transneuronal propagation of pathologic α -synuclein from the gut to the brain models Parkinson's disease". *Neuron*. 103(4): 627-641.
- Koprach, J., B.; Kalia, L., V. y Brotchie, J., M. (2017) "Animal models of α -synucleinopathy for Parkinson disease drug development". *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 18(9): 515–529.
- Kordower, J., H.; Chu, Y.; Hauser, R., A.; Freeman, T., B. y Olanow, C., W. (2008). "Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease". *Nature Medicine*. 14(5): 504–506.
- Kosaka, K. "Dementia with Lewy bodies. Clinical and biological aspects." *Springer*. Japón. (2017).

- Lee, G.; Foss, M.; Goodwin, S., F.; Carlo, T.; Taylor, B., J. y Hall, J., C. (2000). "Spatial, temporal, and sexually dimorphic expression patterns of the fruitless gene in the *Drosophila* central nervous system". *Journal of Neurobiology*. 43: 404-426.
- Li, J., Y.; Englund, E; Holton, J., L.; Soulet, D.; Hagell, P.; Lees, A., J.; Lashley, T.; Quinn, N., P.; Rehncrona, S.; Björklund, A.; Widner, H.; Revesz, T.; Lindvall, O; y Brundin, P. (2008). "Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation". *Nature Medicine*. 14 (5):501–503.
- Li, H., T. y Liberles, S., D. (2015). "Aversion and attraction through olfaction". *Current Biology*. 25(3):120–129.
- Lotharius, J. y Brundin, P. (2002) "Pathogenesis of parkinson's disease: Dopamine, vesicles and α -synuclein". *Nature Reviews Neuroscience*. 3(12): 932–942.
- Lou, X.; Kim, J.; Hawk, B., J. y Shin, Y., K. (2017). " α -Synuclein may cross-bridge v-SNARE and acidic phospholipids to facilitate SNARE-dependent vesicle docking." *Biochemical Journal*, 474(12): 2039-2049.
- Low, P., A.; Reich, S., G.; Jankovic, J.; Shults, C., W.; Stern, M., B.; Novak, P.; ... y Racette, B. (2015). "Natural history of multiple system atrophy in the USA: a prospective cohort study". *The Lancet Neurology*. 14(7): 710-719.
- Malik, B.; Elkaddi, N.; Turkistani, J.; Spielman, A., I. y Ozdener, M., H. (2019). "Mammalian Taste Cells Express Functional Olfactory Receptors". *Chemical Senses*. 44 (5): 289–301.
- Martin, F.; Boto, T.; Gómez-Díaz y Alcorta, E. (2013) "Elements of olfactory reception in adult *Drosophila melanogaster*". *Anatomical Record*. 296(9):1477–1488.
- Martínez-Fernández, R.; Gasca-Salas, C., C.; Sánchez-Ferro, A. y Obeso, J., A. (2016). "Actualización en la enfermedad de Parkinson. Parkinson's disease: A review." *Revista médica clínica Las Condes*. 27 (3): 363-379.
- Masala, C.; Saba, L.; Cecchini, M., P.; Solla, P. y Loy, F. (2017). "Olfactory function and age: a sniffin' sticks extended test study performed in Sardinia." *Chemosensory Perception*. <https://doi.org/10.1007/s12078-017-9233-7>.
- Masuda-Suzukake, M.; Nonaka, T.; Hosokawa, M.; Oikawa, T.; Arai, T.; Akiyama, H.; Mann, D., M. y Hasegawa, M. (2013) "Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain". *Brain*. 136:1128–1138
- Middleton, E., R. y Rhoades, E. (2010). "Effects of curvature and composition on α -synuclein binding to lipid vesicles." *Biophysical Journal*. 99: 2279–2288.

- Miranda, C., M.; Slachevsky, C. y Pérez, J., C. (2006). "Preliminary validation of a smelling test in a sample of Chilean population and its role in the differential diagnosis of Parkinson's disease." *Revista Médica Chile*. 134:1071-1072.
- Mizuno, Y. (2017). "Parkinson symptoms in dementia with Lewy bodies". En: Kosaka, K. *Dementia with Lewy bodies, clinical and biological aspects*. Springer. Japón. (2017).
- Montes de Oca, R., D. y Montes de Oca, F., E. (2005) "El olfato como problema de salud pública en México. Una propuesta de planteamiento". *Revista Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría*. 38(3):111-114.
- Morrison, E., E., y Constanzo, R., M. (1990). "Morphology of the human olfactory epithelium." *The Journal of Comparative Neurology*. 297: 1-13.
- Murzin, A., G.; Brenner, S., E.; Hubbard, T. y Chothia, C. (1995). "SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures". *Journal of Molecular Biology*. 247(4): 536-40.
- Nazar, R. y Pardo, J., J. (2011). "Patología nasosinusal benigna en el adulto mayor." *Revista- Hospital Clínico Universidad de Chile*. 22: 20-30.
- Niu, H.; Wang, Q.; Zhao, W.; Liu, J.; Wang, D.; Muhammad, B.; Liu, X.; Quan, N.; Zhang, H.; Zhang, F.; Wang, Y.; Li, H. y Yang, R. (2020). "IL-1 β /IL-1R1 signaling induced by intranasal lipopolysaccharide infusion regulates alpha-synuclein pathology in the olfactory bulb, substantia nigra and striatum". *Brain Pathology*. :1-17
- Nordin, S.; Almkvist, O. y Berglund, B. (2012). "Is loss in odor sensitivity inevitable to the aging individual? A study of "successfully aged" elderly". *Chemosensory Perception*. 5: 188-196.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). "Demencia: Una prioridad de salud pública". *Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud, World Health Organization*, 112.
- Ordóñez, D., G.; Lee, M., K., y Feany, M., B. (2018). "α-synuclein induces mitochondrial dysfunction through spectrin and the actin cytoskeleton". *Neuron*, 97(1): 108-124.
- Orimo, S. (2017). "Autonomic symptoms in dementia with Lewy bodies". En: Kosaka, K. *Dementia with Lewy bodies, clinical and biological aspects*. Springer. Japón. (2017).
- Pacheco, C.; Aguayo, L., G. y Opazo, C. (2012). "An extracellular mechanism that can explain the neurotoxic effects of α-synuclein aggregates in the brain". *Frontiers in Physiology*. 3 (297):1-10.

- Passali, G., C.; Politi, L. ; Crisanti, A. ; Loglisci, M.; Anzivino, R. y Passali, D. (2015). "Tau protein detection in anosmic Alzheimer's disease patient's nasal secretions". *Chemosensory Perception*. 8 (4): 201-206.
- Perisse, E.; Burke, C.; Huetteroth, W. y Waddell, S. (2013). "Shocking revelations and Saccharin sweetness in the study of *Drosophila* Olfactory memory." *Current Biology*. 23(17): 752-763.
- Perry, E., K.; Irving, D.; Kerwin, J., M.; McKeith, I., G.; Thompson, P.; Collerton, D.; Fairbairn, A., F.; Ince, P., G.; Morris, C., M. y Cheng, A., V. (1993). "Cholinergic transmitter and neurotrophic activities in Lewy body dementia: similarity to Parkinson's and distinction from Alzheimer disease." *Alzheimer disease and associated disorders*. 7(2): 69-79
- Pickrell, A., M. y Youle, R., J. (2015). "The roles of PINK1, Parkin, and Mitochondrial feidility in Parkinson's Disease." *Neuron*. 85: 257-273.
- Pringsheim, T.; Jette, N.; Frolkis, A. y Steeves, T., D., L. (2014) "The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis". *Movement Disorders*, 29(13): 1583–1590.
- Python, F. y Stocker, R., F. (2002). "Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *D. melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons". *The Journal of Comparative Neurology*. 445(4): 374-387.
- Ramdya, P. y Benton, R. (2010). "Evolving olfactory systems on the fly". *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd. 26(7): 307–316.
- Recasens ,A.; Dehay, B.; Bove, J.; Carballo-Carbajal, I.; Dovero, S.; Perez-Villalba, A.; Fernagut, P., O.; Blesa, J.; Parent, A.; Perier, C.; Farinas, I.; Obeso, J., A.; Bezard, E. y Vila, M. (2014) "Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys". *Annals of Neurology*. 75:351–362
- Recasens, A.; Ulusoy, A.; Kahle, P., J.; Di Monte, D., A. y Dehay, B. (2018). "In vivo models of alpha-synuclein transmission and propagation". *Cell and Tissue Research*. 373: 183-193.
- Rey, N., L. ; Petit, G., H. ; Bousset, L. ; Melki, R. y Brundin, P. (2013). "Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice". *Acta neuropathologica*. 126(4): 555-573.
- Rey, N., L.; George, S., y Brundin, P. (2016). "Spreading the word: precise animal models and validated methods are vital when evaluating prion-like behaviour of alpha-synuclein". *Neuropathology and applied neurobiology*. 42(1): 51-76.

- Roberts, E. (1986). "Alzheimer's disease may begin in the nose and may be caused by Aluminosilicates". *Neurobiology of Aging*. 7(6): 561–567.
- Sargsyan, V.; Negash, G., M.; Lavista, L., S.; Olsson, S., B.; Hansson, B., S. y Wicher, D. (2011) "Phosphorylation via PKC Regulates the Function of the *Drosophila* Odorant Co-Receptor", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 5(5):1–8.
- Sastry, N.; Zheng, W.; Liu, G.; Wang, H.; Chen, X.; Cai, M.; Contractor, P.; Sgobio, C.; Sun, L.; Xie, C. y Cai, H. (2015). "No apparent transmission of transgenic α -synuclein into nigrostriatal dopaminergic neurons in multiple mouse models". *Translational neurodegeneration*. 4(1), 23.
- Sato, K.; Pellegrino, M.; Nakagawa, T.; Nakagawa, T.; Vosshall, L., B. y Touhara, K. (2008) "Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels". *Nature*. 452(7190): 1002–1006.
- Schapira, A., H., V.; Chaudhuri, K., R. y Jenner, P. (2017) "Non-motor features of Parkinson disease". *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group. 18(7): 435–450.
- Schrag, A.; Quinn, N., P.; Irving, R., J.; Oram, S., H.; Boyd, J.; Rutledge, P. y Bloomfield, P. (2000). "Cross-sectional prevalence survey of idiopathic Parkinson's disease and parkinsonism in London. Ten year audit of secondary prevention in coronary bypass patients". *British Medical Journal*. 321:21–22.
- Schultz, W. (2002). "Getting formal with dopamine and reward". *Neuron*. 36(2): 241–263.
- Schultzhaus, J., N.; Saleem, S.; Iftikhar, H. y Carney, G., E. (2017) "The role of the *Drosophila* lateral horn in olfactory information processing and behavioral response". *Journal of Insect Physiology*. Elsevier Ltd. 98:29–37.
- Schwaerzel, M.; Monastirioti, M.; Scholz, H.; Friggi-Grelin, F.; Birman, S. y Heisenberg, M. (2003). "Dopamine and Octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*." *The Journal of Neuroscience*. 23(33):10495-10502.
- Simard, M.; van Reekum R. y Cohen, T. (2015). "A review of the cognitive and behavioral symptoms in dementia with Lewy bodies." *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 12(4): 425-450.
- Singleton, A., B.; Farrer, M.; Johnson, J.; Singleton, A.; Hague, S.; Kachergus, J.; Hulihan, M.; Peuralinna, T.; Dutra, A.; Nussbaum, R.; Lincoln, S.; Crawley, A.; Hanson, M.; Maraganore, D.; Adler, C.; Cookson, M., R.; Muenter, M.; Baptista, M.; Miller, D.; Blacato J.; Hardy, J.; Gwinn-Hardy, K. (2003). "a-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease." *Science*. 302 (5646): 841.

- Song, Y.; Ori-McKenney, K., M.; Zheng, Y.; Han, C.; Jan, L., Y. y Jan, Y., N. (2012). "Regeneration of *Drosophila* sensory neuron axons and dendrites is regulated by the Akt pathway involving Pten and microRNA bantam." *Genes & development*. 26(14): 1612-1625.
- Small, D., M. y Prescott, J. (2005). "Odor/taste integration and the perception of flavor." *Experimental Brain Research*. 166: 345-357.
- Stern, M.; Scheiblich, H.; Eickhoff, R.; Didwischus, N. y Bicker, G. (2012). "Regeneration of olfactory afferent axons in the locust brain". *Journal of Comparative Neurology*. 520(4): 679-693.
- Stolzenberg, E.; Berry, D.; Yang, D.; Lee, E., Y.; Kroemer, A.; Kaufman, S.; Wong, G., C., L.; Oppenheim, J., J.; Sen, S.; Fisbein, T.; Bax, A.; Harris, B.; Barbut, D. y Zasloff, M., A. (2017). "A role for neuronal alpha-synuclein in gastrointestinal immunity". *Journal of innate immunity*. 9(5):456-463.
- Taylor, J.; Collerton, D.; LeBeau, F. y Perry, E. (2017). "Cholinergic pathology in Dementia with Lewy bodies". En: Kosaka, K. Dementia with Lewy bodies, clinical and biological aspects. *Springer*. Japón. (2017).
- Ulmer, T., S; Bax, A.; Cole ,N., B. y Nussbaum, R., L. (2005). "Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein". *Journal of Biological Chemistry*. 280: 9595-9603.
- Ulusoy, A.; Phillips, R., J.; Helwig, M.; Klinkenberg, M.; Powley, T., L. y Di Monte, D., A. (2017). "Brain-to-stomach transfer of α -synuclein via vagal preganglionic projections." *Acta Neuropathologica*. 133: 381-393.
- Villegas, P., N., L.; Chávez, M., A.; Montiel, C., D. ; González, H., B. y González-Horta, A. (2014). "Análisis funcional de oligómeros de alfa-sinucleína en la permeabilidad de membranas." *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 48 (4): 437-445.
- Vosshall, L., B. (2000) "Olfaction in *Drosophila*". *Current opinion in neurobiology*. : 498–503.
- Vosshall, L., B. y Stocker, R., F. (2007). "Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*". *The Annual Review of Neuroscience*. 30: 505-533.
- Watts, J., C.; Giles, K.; Oehler, A.; Middleton, L.; Dexter, D., T.; Gentleman, S., M.; DeArmond, S., J. y Prusiner, S., B. (2013). "Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)*. 110:19555–19560.
- Wenning, G., K.; Shlomo, Y., B.; Magalhaes, M.; Danie, S., E. y Quinn, N., P. (1994). "Clinical features and natural history of multiple system atrophy: an analysis of 100

cases". *Brain*, 117(4): 835-845.

- Wicher, D.; Schäfer, R.; Bauernfeind, R.; Stensmyr, M., C.; Heller, R.; Heinemann, S., H. y Hansson, B., S. (2008). "Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide- activated cation channels", *Nature*. 452(7190): 1007–1011.
- Wicher, D. "Olfactory signaling in insects." 1a ed, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 1a ed. Elsevier Inc. (2015).
- Willingham, S.; Outeiro, T., F.; DeVit, M., J.; Lindquist, S., L. y Muchowski, P., J. (2003). "Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein." *Science*. 302:1769–1772.
- Wilson, R. I. (2013). "Early Olfactory Processing in *Drosophila*: Mechanisms and Principles". *Annual Review of Neuroscience*. 36(1): 217–241.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- Bloomington flystock center <http://flystocks.bio.indiana.edu> (Consultado el día 4 de diciembre de 2017)
- Kabsch W. y Sander C, Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 1983; 22(12): 2577-637. Consultado a través de RCSB PDB el 04 de Julio del 2018. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=1XQ8#DSSPRefAnchor>
- Nobel Media AB [Internet]. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2004". Nobelprize.org. 2014. [Consultado el 16 marzo del 2019]. Disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2004/

ANEXOS

ANEXO I. Genoma de *Drosophila melanogaster*

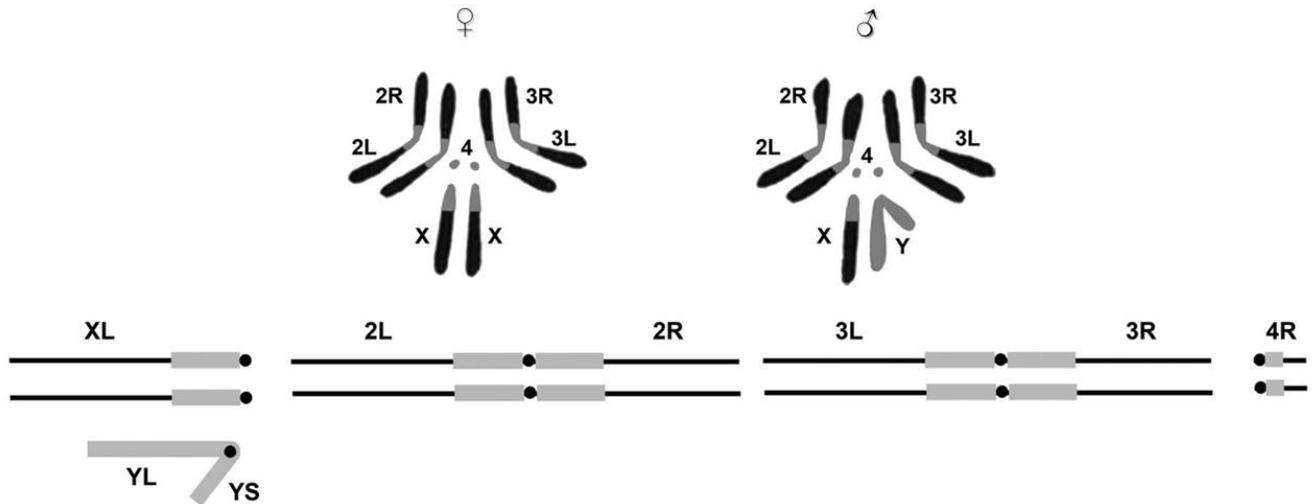


Figura 25.- Cariotipo de *Drosophila melanogaster* y esquematización de su genoma, indicando los brazos de los cromosomas. Las zonas de heterocromatina se muestran en gris. (Tomado de: Kaufman, 2017).

ANEXO II. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

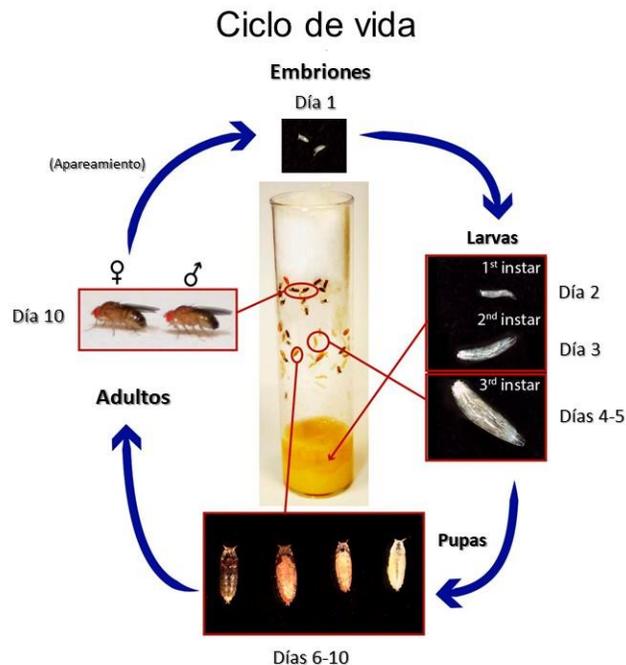


Figura 26.- Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. (Modificado de: Hales *et al.*, 2015).

ANEXO III. Prueba olfativa esquematizada

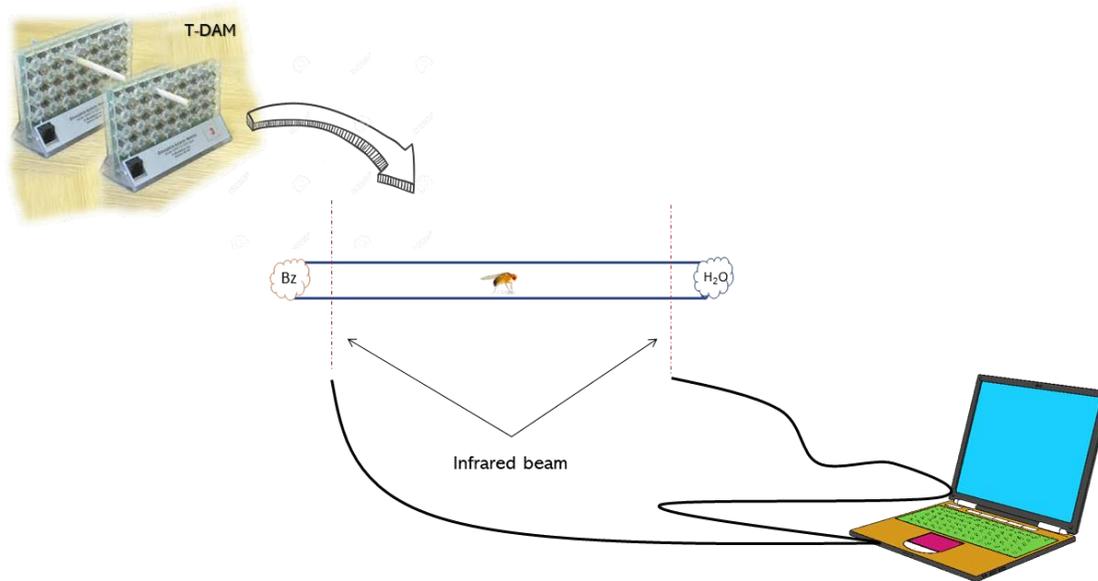


Figura 27.- Esquema de prueba olfativa utilizando el dispositivo Trikinetics Drosophila Activity Monitor (T-DAM). Los monitores de este dispositivo cuentan con un haz de luz infrarroja en cada uno de sus 32 orificios, lo que sirve de sensor para medir el movimiento de estos organismos de manera individual, dado que en cada uno de estos orificios se coloca un pequeño vial transparente y dentro de éste una mosca. Para las pruebas olfativas se acoplaron dos monitores T-DAM uniendo sus viales entre sí, de tal manera que cada uno de estos monitores se localizara a cada extremo de dichos viales. En cada vial se colocó en un extremo un algodón con 50 μ L de agua, y en el extremo contrario un algodón con 50 μ L de benzaldehído (Bz) en agua al 1%. Ambos monitores se conectan a una computadora para registrar el número de veces que pasa la mosca por el sensor en determinado periodo de tiempo, datos que posteriormente son analizados.

DATOS CRUDOS MOVIMIENTO

Actividad motriz espontánea de 5 días

White

Hora	No. Individuo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
12:30		20	5	5	8	11	10	6	12	25	50	7	5	2	9	3	3
13:00		10	12	2	157	9	14	2	2	4	19	7	56	2	1	3	3
13:30		0	43	0	83	0	0	0	13	0	12	0	6	0	3	0	19
14:00		0	152	0	46	0	3	2	107	0	17	0	0	0	3	0	18
14:30		0	108	0	28	0	12	0	24	0	16	0	11	0	24	0	36
15:00		0	91	0	96	0	13	0	15	0	29	0	16	0	19	0	51
15:30		0	106	0	26	0	0	0	16	0	0	0	29	0	68	0	55
16:00		0	89	0	7	0	0	0	14	0	23	0	28	0	23	0	40
16:30		0	157	0	35	0	8	0	0	0	4	0	72	0	44	0	2
17:00		0	190	0	26	0	28	0	3	0	0	0	43	0	75	0	26
17:30		0	78	0	16	0	15	0	12	0	2	0	47	0	19	0	16
Promedio		2.727272727	93.7272727	0.63636364	48	1.81818182	9.36363636	0.90909091	19.8181818	2.63636364	15.6363636	1.27272727	28.4545455	0.36363636	26.1818182	0.54545455	24.4545455

Or83b > SNCA.wt

12:30		1	1	19	0	0	0	1	0	0	2	5	2	0	1	2	0
13:00		41	1	101	3	36	1	131	11	43	2	61	2	53	1	11	0
13:30		0	0	29	0	42	0	67	0	43	0	68	0	55	0	30	0
14:00		10	0	21	0	0	0	61	0	23	0	25	0	108	0	8	0
14:30		3	0	14	0	53	0	43	0	11	0	10	0	48	0	5	0
15:00		0	0	10	0	7	0	47	0	10	0	32	0	47	0	2	0
15:30		0	0	77	0	16	0	9	0	43	0	25	0	11	0	3	0
16:00		0	6	11	0	1	0	15	0	20	0	40	0	50	0	59	0
16:30		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	1	0	62	0
17:00		2	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
17:30		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio		5.181818182	0.72727273	25.6363636	0.27272727	14.7272727	0.09090909	34	1	17.5454545	0.36363636	26.6363636	0.36363636	33.9090909	0.18181818	17.4545455	0

Or83b > SNCA.A30P

12:30		0	1	4	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	1	3
13:00		1	1	5	2	28	1	10	0	23	1	16	3	2	1	17	1
13:30		17	0	8	0	3	0	23	0	0	0	0	0	0	0	5	0
14:00		8	0	0	0	15	0	87	0	6	0	0	0	0	0	3	0
14:30		0	0	0	0	57	0	25	0	0	0	0	0	1	0	2	0
15:00		0	0	0	0	35	0	34	0	3	0	0	0	7	0	2	0
15:30		0	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0	0	0	11	0
16:00		0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	31	0
16:30		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	26	0	4	0
17:00		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	7	0	6	0
17:30		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio		2.363636364	0.18181818	1.54545455	0.27272727	13.0909091	0.09090909	16.2727273	0.09090909	4.18181818	0.09090909	2.63636364	0.27272727	3.90909091	0.09090909	7.45454545	0.36363636

Actividad motriz espontánea de 15 días

White

Hora No. Individuo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
12:30	8	4	6	3	17	3	2	2	2	28	0	0	1	33	2	1
13:00	24	46	13	49	31	27	15	21	26	88	16	42	8	25	6	41
13:30	0	17	0	21	0	7	1	16	0	22	0	24	0	18	0	16
14:00	0	41	0	214	8	25	0	17	0	47	0	81	0	36	0	50
14:30	0	58	0	79	0	26	0	109	0	58	0	56	3	44	0	77
15:00	0	60	1	12	3	15	1	100	0	50	7	22	0	22	0	62
15:30	0	11	0	28	0	0	3	46	21	20	0	18	0	0	6	3
16:00	0	14	0	2	0	1	0	24	0	10	0	0	0	0	4	0
16:30	12	4	0	0	0	12	0	22	0	6	0	0	0	0	7	0
17:00	0	1	0	0	0	0	4	15	0	12	0	0	0	0	2	0
17:30	4	0	0	0	0	0	0	65	0	4	0	0	0	0	2	0
Promedio	4.36363636	23.2727273	1.81818182	37.0909091	5.36363636	10.5454545	2.36363636	39.7272727	4.45454545	31.3636364	2.09090909	22.0909091	1.09090909	16.1818182	2.63636364	22.7272727
	SNCA.wt															
12:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13:00	22	44	14	13	3	33	19	69	10	41	4	6	2	8	2	36
13:30	0	45	0	9	0	8	3	39	0	17	0	35	0	19	0	2
14:00	0	45	0	17	0	23	3	10	0	10	0	43	0	38	0	8
14:30	0	8	0	6	0	13	1	21	0	16	0	56	0	76	0	1
15:00	0	24	0	7	0	0	0	16	0	0	0	26	0	43	0	6
15:30	0	9	0	0	0	0	0	18	0	10	0	8	0	51	0	12
16:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	0	6	0	7
16:30	0	21	0	0	0	16	0	0	0	0	0	18	0	20	0	6
17:00	0	16	0	0	0	0	0	5	0	0	0	56	0	0	0	56
17:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	2	19.2727273	1.27272727	4.72727273	0.27272727	8.45454545	2.36363636	16.1818182	0.90909091	8.54545455	0.36363636	25.7272727	0.18181818	23.7272727	0.18181818	12.1818182
	SNCA.A30P															
12:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13:00	4	28	2	3	30	10	12	68	8	15	1	21	6	31	4	29
13:30	0	35	0	0	0	39	0	55	0	3	0	36	0	42	0	55
14:00	0	40	0	16	0	49	0	78	0	11	0	24	0	29	0	77
14:30	0	4	0	14	0	88	0	15	0	11	0	26	0	9	0	6
15:00	0	5	0	41	0	17	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0
15:30	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0
16:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	16
16:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0
17:30	0	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	0.36363636	10.5454545	0.18181818	6.81818182	2.72727273	18.4545455	1.09090909	19.8181818	0.72727273	7.81818182	0.09090909	10.1818182	0.54545455	10.0909091	0.36363636	16.6363636

Actividad motriz espontánea de 30 días

White

Hora / No. Individuo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
12:30	2	15	4	2	1	2	3	2	4	3	3	3	1	7	2	10
13:00	1	50	1	3	1	8	2	4	4	4	1	2	1	9	0	14
13:30	0	2	0	12	0	137	0	3	0	62	0	0	0	19	0	95
14:00	0	0	0	30	0	71	0	39	0	124	0	15	0	26	0	3
14:30	0	0	0	0	0	77	0	0	0	133	0	0	0	14	0	16
15:00	0	3	0	2	0	45	0	11	0	124	0	0	0	10	0	55
15:30	0	0	0	2	0	45	0	5	0	66	0	2	0	2	13	45
16:00	0	0	10	2	0	69	0	1	0	39	0	0	0	0	7	44
16:30	0	0	35	0	0	55	0	0	2	24	0	0	0	0	9	60
17:00	0	34	29	0	0	38	0	0	17	22	0	0	0	0	6	64
17:30	0	4	15	0	0	34	0	0	32	19	0	0	0	1	5	42
Promedio	0.27272727	9.81818182	8.54545455	4.81818182	0.18181818	52.8181818	0.45454545	5.90909091	5.36363636	56.3636364	0.36363636	2	0.18181818	8	3.81818182	40.7272727

Or83b > SNCA.wt

12:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13:00	1	7	2	4	0	28	6	13	2	1	0	18	0	5	1	44
13:30	0	171	0	7	0	31	3	38	0	2	0	7	0	5	0	82
14:00	0	80	0	0	0	37	1	44	0	30	0	56	0	2	0	10
14:30	3	13	6	0	0	4	1	0	0	19	0	71	0	2	0	15
15:00	0	10	0	0	5	6	0	18	0	1	0	6	0	0	0	2
15:30	0	21	8	0	44	2	7	0	3	15	3	23	0	3	3	7
16:00	0	1	43	0	2	0	10	1	6	0	4	12	20	2	0	8
16:30	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	16	9	2	0	1
17:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	6	0	7	2	0
17:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	0.36363636	27.5454545	5.36363636	1	4.63636364	9.81818182	4.18181818	10.3636364	1	6.54545455	0.63636364	19.5454545	2.63636364	2.54545455	0.54545455	15.3636364

Or83b > SNCA.A30P

12:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13:00	11	6	3	45	5	1	0	1	3	3	0	0	3	0	0	1
13:30	0	0	0	35	0	1	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0
14:00	0	0	0	18	0	0	0	0	0	9	0	22	0	0	0	0
14:30	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5	0	6	0	0
15:00	0	16	0	0	0	8	0	0	0	1	0	9	1	3	0	0
15:30	0	35	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16:00	0	13	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16:30	0	4	0	0	0	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17:00	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	1.36363636	6.72727273	0.27272727	8.90909091	0.45454545	7.81818182	0	0.09090909	0.27272727	3.36363636	0	3.27272727	0.36363636	0.81818182	0	0.09090909

Actividad motriz espontánea de 45 días

White

Hora No. Individuo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
12:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13:00	5	11	3	21	8	18	6	12	17	49	1	5	4	7	0	10
13:30	0	28	0	47	0	55	0	12	0	82	0	17	0	0	0	46
14:00	0	17	0	116	0	45	0	58	0	65	0	11	0	0	0	19
14:30	0	35	0	0	0	42	0	46	26	76	0	7	0	0	0	64
15:00	0	27	0	0	0	111	0	34	28	58	0	24	0	0	0	2
15:30	0	73	0	8	0	90	0	34	0	48	0	16	0	6	32	0
16:00	0	19	0	5	0	43	0	37	0	54	0	0	0	0	0	0
16:30	0	26	0	3	0	4	0	3	0	50	0	15	0	0	0	0
17:00	0	6	0	0	0	9	0	0	0	46	0	2	0	3	0	2
17:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	1
Promedio	0.45454545	22	0.27272727	18.18181818	0.72727272	37.90909091	0.54545454	21.45454545	6.45454545	50.27272727	0.09090909	8.81818181	0.36363636	1.45454545	2.90909090	13.09090909

Or83b > SNCA.wt

12:30	7	3	7	5	1	2	6	2	3	1	0	1	5	3	5	4
13:00	0	15	1	24	5	7	3	12	0	3	0	0	1	26	0	18
13:30	0	0	0	5	0	165	0	19	0	1	0	1	0	22	0	15
14:00	0	0	0	4	0	23	0	3	0	0	0	0	0	9	0	2
14:30	0	1	0	0	0	27	0	3	0	4	0	0	0	14	0	22
15:00	0	0	0	0	0	40	0	10	0	19	0	0	0	29	0	31
15:30	0	9	0	0	0	28	0	13	0	23	0	0	0	9	0	18
16:00	0	2	0	8	0	0	0	5	0	20	0	0	0	6	0	12
16:30	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	2	0	0
17:00	0	0	0	0	0	0	0	5	0	3	0	0	0	4	0	0
17:30	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	1
Promedio	0.63636363	2.72727272	0.72727272	4.18181818	0.54545454	26.54545455	0.81818181	8.18181818	0.27272727	6.72727272	0	0.18181818	0.54545454	11.27272727	0.45454545	11.18181818

Or83b > SNCA.A30P

12:30	18	3	1	5	3	2	21	10	3	6	2	1	1	2	3	7
13:00	1	0	1	6	2	44	4	4	1	7	3	0	1	11	1	0
13:30	0	3	0	37	0	6	0	2	0	6	0	3	0	22	0	15
14:00	0	0	0	6	0	11	0	0	0	10	0	3	0	1	0	60
14:30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
15:00	0	6	0	0	0	0	0	11	0	2	0	0	0	1	0	49
15:30	0	12	0	0	0	0	0	11	0	26	0	0	0	0	0	27
16:00	0	13	0	0	0	0	0	0	0	20	0	15	0	0	0	4
16:30	0	9	0	0	0	0	0	0	0	6	0	2	0	0	0	0
17:00	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0
17:30	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0	0	29	0	1	0	0
Promedio	1.72727272	4.18181818	0.18181818	10.90909091	0.45454545	5.72727272	2.27272727	3.45454545	0.36363636	7.54545454	0.45454545	5.18181818	0.18181818	3.54545454	0.36363636	15.90909091

DATOS CRUDOS OLFATO

5 días	Índice de aversión		
	Individuo	White	Or83b>SNCA. wt
1	0.7142857	0.04761905	1
2	0.7391304	0.97333333	0.875
3	0.9371728	1	1
4	0.4	0.95020747	1
5	NA	1	1
6	0.9393939	1	1
7	0.9818182	0.99152542	0.8181818
8	0.9574468	1	0.8666667
9	0.9887006	0.97163121	0.9622642
10	0.7924528	0.92941176	0.9220779
11	0.5	1	1
12	0.75	0.95744681	-1
13	1	0.86206897	1
14	1	0.95744681	0.8857143
15	0.9887006	0.97905759	-1
16	0.7674419	1	0.7714286
17	0.8166667	0.04761905	1
18	0.8181818	0.97333333	0.875
19	0.9909091	1	1
20	0.9607843	0.95020747	1
21	0.9047619	1	1
22	NA	1	1
23	0.9813084	0.99152542	0.8181818
24	0.7931034	1	0.8666667
25	0.9967532	0.97163121	0.9622642
26	0.8709677	0.92941176	0.9220779
27	0.9444444	1	1
28	0.6190476	0.95744681	-1
29	0.3333333	0.86206897	1
30	0.9529412	0.95744681	0.8857143
31	0.7647059	0.97905759	-1
32	1	1	0.7714286

15 días	Índice de aversión		
	Individuo	White	Or83b>SNCA. wt
1	0.66942149	0.6818182	0.66942149
2	0.75	0.8545455	0.75
3	0.78798587	0.9148936	0.78798587
4	NA	0.9234973	NA
5	0.71962617	0.7297297	0.71962617
6	0.89808917	0.9493671	0.89808917
7	0.84615385	0.989899	0.84615385
8	0.81632653	0.9534884	0.81632653
9	0.93305439	0.3090909	0.93305439
10	0.7816092	0.75	0.7816092
11	0.80392157	0.6153846	0.80392157
12	0.87165775	0.8571429	0.87165775
13	0.93181818	0.9622642	0.93181818
14	0.93069307	0.9770115	0.93069307
15	0.52631579	1	0.52631579
16	0.73626374	0.9065421	0.73626374
17	0.66942149	1	0.66942149
18	0.75	0.8285714	0.75
19	0.78798587	0.9337017	0.78798587
20	0.71962617	0.8	0.71962617
21	0.89808917	0.1111111	0.89808917
22	0.84615385	0.9215686	0.84615385
23	0.81632653	0.969697	0.81632653
24	0.93305439	0.9230769	0.93305439
25	0.7816092	0.9714286	0.7816092
26	0.80392157	0.8222222	0.80392157
27	0.87165775	0.8181818	0.87165775
28	0.93181818	0.893617	0.93181818
29	0.93069307	0.9473684	0.93069307
30	0.52631579	1	0.52631579
31	0.73626374	1	0.73626374
32	NA	0.9433962	NA

30 días	Índice de aversión		
Individuo	White	Or83b>SNCA. wt	Or83b>SNCA.A30P
1	1	0.9220779	-0.6
2	0.7261905	1	1
3	0.9259259	-0.7894737	1
4	0.9633028	0.9047619	1
5	0.952	1	1
6	0.8947368	1	NA
7	0.826087	0.8441558	0.5
8	0.89375	0.8148148	1
9	NA	0.5375	NA
10	0.9285714	1	0
11	NA	0.2080537	-1
12	0.4	0.9512195	-1
13	0.8538012	0.9166667	1
14	1	0.7245509	0.8333333
15	0.9428571	0.5625	1
16	0.7068063	0.8053097	-1
17	0.7261905	0.5	-0.8644068
18	0.9259259	0.8888889	1
19	0.9633028	1	0.9555556
20	0.952	0.7647059	-0.5555556
21	0.8947368	0.9285714	0.9411765
22	0.826087	0.9215686	0.9636364
23	0.89375	0.9310345	0.9666667
24	0.9285714	1	0.9795918
25	0.4	0.9710145	1
26	0.8538012	0.8666667	0.7692308
27	1	0.9672131	0.5483871
28	0.9428571	1	0.9056604
29	0.7068063	0.3333333	0.9884393
30	1	0.8	1
31	1	0.9111111	0.9649123
32	NA	0.952	0.9298246

45 días	Índice de aversión		
Individuo	White	Or83b>SNCA. wt	Or83b>SNCA.A30P
1	0.9877301	0.9012346	0.5555556
2	0.9880597	0.9591837	0.9166667
3	0.902439	0.5	0.8490566
4	0.9847328	0.25	-0.3513514
5	0.9	1	0.9663866
6	0.8333333	1	0.7894737
7	0.862069	-0.4285714	0.962963
8	0.5814504	-0.25	0.8846154
9	0.9145299	0.7391304	1
10	1	0.9375	0.9722222
11	0.9764706	0.9230769	1
12	0.8974359	0.625	0.2916667
13	1	1	0.9428571
14	0.9444444	-1	0.6
15	1	1	0.76
16	0.2820513	0.925	0.9333333
17	0.9764706	0.1111111	0.67213115
18	0.8974359	-0.02325581	1
19	1	0.13333333	-0.05882353
20	0.9444444	0.6	0.75
21	1	0.64705882	-0.36842105
22	0.3830513	0.625	0.5555556
23	0.9877301	1	0
24	0.9880597	0.82352941	0.6666667
25	0.902439	-0.06666667	1
26	0.9847328	0.89189189	0.69230769
27	0.9	0.85840708	0.74193548
28	0.8333333	0.86538462	0.8055556
29	0.862069	0.33333333	0
30	0.5114504	-0.11111111	0.25
31	0.9145299	0.66666667	-0.6666667
32	1	0.74025974	0.73913043