



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Efecto de la nicotina sobre la neurodegeneración dopaminérgica inducida por la expresión de sinfilina humana”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Luis Angel Carvajal Oliveros

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leonor Pérez Martínez
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Magdalena Guerra Crespo
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Cuernavaca, Morelos, agosto, 2021.



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.

COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza¹
Dra. Leonor Pérez Martínez¹
Dra. Magdalena Guerra Crespo²

JURADO DE EXAMEN

Dr. Jean-Louis Charli Casalonga¹
Dra. Celina García Meléndrez¹
Dr. Iván Velasco Velázquez²
Dra. Karla Meza Sosa¹
Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez³

¹Instituto de Biotecnología (IBt), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

²Instituto de Fisiología Celular (IFC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

³Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), Secretaría de Salud.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique Reynaud. Parte de este trabajo se llevó a cabo en la Pontificia Universidad Católica de Chile dentro del laboratorio de Neurogenética de la conducta bajo la asesoría del Dr. Jorge Campusano. La Dra. Leonor Pérez Martínez y la Dra. Magdalena Guerra Crespo participaron como tutores invitados. Este trabajo se financió parcialmente con los donativos de CONACyT No. 255478 y PAPIIT/UNAM No. IN206517 concedidos al laboratorio del Dr. Enrique Reynaud. Durante la realización de este trabajo el M en C. Angel Carvajal Oliveros contó con una beca de doctorado de CONACyT (No. de becario: 330155, No. de beca: 446128) y con el apoyo para la asistencia a una estancia de investigación del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la UNAM. También contó con becas otorgadas por la International Brain Research Organization, Santander Universidades y la Alianza del Pacífico en conjunto con la Agencia Chilena de Cooperación Internacional para el Desarrollo.

¿Fue fácil? NO... ¿Valió la pena? ABSOLUTAMENTE...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, de la cual orgullosamente formo parte desde mis estudios de preparatoria, y que me ha brindado cada uno de los valores, principios y conocimientos que me han permitido formarme como el profesional que soy hoy en día.

Al Instituto de Biotecnología y a cada miembro que lo conforma, a sus investigadores, quienes me introdujeron al mundo del que hacer científico y a los cuales les agradezco cada una de las oportunidades que me han brindado, desde que llegue como tesista de licenciatura para posteriormente realizar mis estudios de posgrado. Gracias por enriquecer en mi el interés por la investigación científica, por cada conocimiento que me transmitieron a lo largo de mi formación y que sin duda alguna han formado y trazado el camino del científico que quiero ser.

Al Dr. Enrique Reynaud, mi tutor a lo largo de 9 años, siempre le estaré agradecido, por cada muestra de confianza que me ha brindado, gracias por creer en mi y por recordarme en muchas ocasiones que soy capaz de hacer lo que me proponga. Gracias por cada discusión, felicitación y regaño que me ha dado, sin duda alguna todo este trabajo y yo, no seríamos lo que somos hoy sin su magnífica dirección. De nuevo, muchas gracias.

A la Pontificia Universidad Católica de Chile y a las personas que colaboraron en la realización de este proyecto, a la Facultad de Ciencias Biológicas y a cada uno de los miembros del Laboratorio de Neurogenética de la Conducta especialmente al Dr. Jorge Campusano y a la Dra. Rafaella Zárate.

A todas las instituciones que han creído en este proyecto y que me han apoyado para la realización de este: International Brain Research Organization, Santander Universidades y a la Alianza del Pacífico en conjunto con la Agencia Chilena de Cooperación Internacional para el Desarrollo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM, así como a cada uno de los miembros de docencia del IBt.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca para realizar mis estudios de posgrado con número 446128 y número de becario 330155.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Leonor Pérez y Dra. Magdalena Guerra, por cada una de sus observaciones realizadas a este trabajo durante los 4 años que duro el desarrollo de este.

Al Dr. Iván Sánchez y al M. en C. René Hernández, técnicos académicos del laboratorio, gracias por todo el apoyo que me han brindado siempre.

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

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

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Nunca me cansaré de agradecerle a mis padres y a mi familia, todo lo que me han brindado. Sin duda alguna a pesar de muchos golpes que la vida nos ha dado, siempre han visto la manera de salir adelante, mi madre mas que nadie. Madre se que muchas veces la vida no es justa, ni es como la hubiésemos querido, pero tú mas que nadie me ha enseñado la entereza que debemos tener ante cualquier adversidad. Sé que has sacrificado muchas cosas a lo largo de estos años y por eso estaré en deuda contigo toda la vida. Sin duda alguna este gran logro profesional que tengo el día de hoy te lo dedico a ti más que nadie, porque sin ti no sería quien soy hoy.

A mis amigos, Doña Rosa y Don Valdo, que han sido como unos segundos padres para mi, acogiéndome como un hijo adoptivo de su familia. Gracias porque siempre han estado para mi y no se han cansado de repetirme que siempre tendré alguien con quien contar y sobre todo porque han tenido solo palabras de aliento cuando las fuerzas han querido decaer.

A Elisa, mi roomie y sobre todo mi amiga, sin duda alguna hemos conocido lo mejor y lo peor de nosotros a lo largo de todos estos años. No habría elegido mejor persona para compartir tantos triunfos, fracasos, risas, llantos, todas esas platicas que ayudaban a olvidarnos un poco de la realidad de la vida. Muchas gracias por tu amistad.

A Angélica, sabes que, aunque la vida nos ha obligado un poco a distanciarnos, siempre estás presente. Gracias por ser mi mejor amiga por tantos años, nunca creí que llegaría a este punto de la vida, pero sin duda alguna no dejaría de agradecerte por haber influenciado tanto en mi persona, para bien y sin dudarlo para mal.

A Maritere, mi amiga y mi compañera de laboratorio favorita, compartimos tantos chismes, quejas, alegrías, festejos, tristezas y estrés. Gracias por todo y por brindarme tu amistad dentro y fuera del laboratorio. Por todo el apoyo que siempre me diste, incluso cuando creí que estaba en mi lecho de muerte en la que no dejabas de decirme torpe y que recordaré para siempre, espero la vida me permita seguir colaborando con una científica tan grandiosa y humilde como tú.

A Carmencita, eres mi orgullo pequeña padawan, se que te esperan grandes cosas. Nunca te rindas, eres mi mejor creación, no sabes la satisfacción que me brinda el saber que te conocí como una alumna pequeñita de licenciatura y ver que poco a poco se va abriendo camino como la gran científica en la que te estás convirtiendo.

A Adrián, fue un camino breve, pero te convertiste en una parte tan importante de mi vida. Agradezco todo el tiempo que pudimos compartir dentro y fuera del laboratorio y que me enseñó muchas cosas a nivel personal que tarde o temprano tengo que remediar. Siempre me recordaste que tengo las capacidades que me cuesta ver en mi. Gracias por ayudarme en cada momento en que quería tirar la toalla y sobre todo disculpas por todo en lo que pude fallar. Se te echa de menos.

A Vicente, te convertiste rápidamente en un gran amigo y a pesar de la diferencia de edad que nos separa has demostrado una madurez que inclusive muchas veces yo no tengo, sigue cosechando éxitos que aún te queda mucho camino por recorrer, solo quiero recordarte que la vida

no es fácil amiguito y esta se puede complicar tanto como tú quieras, pero recuerda que siempre vas a contar conmigo.

A Matilda, Grisete y Rafa, nunca creí conocer a gente tan buena y amable como ustedes en un lugar tan alejado del mundo. Ustedes me brindaron su amistad y me abrieron las puertas de su casa cuando llegué a Chile. Gracias por compartir y enseñarme tantas cosas en un ambiente nuevo para mi y sobre todo por hacerme sentir como un miembro más de su hermosa familia.

A Rodrigo, Claudio y Luli, formamos un gran grupo y la combinación mas extraña de nacionalidades, en poco tiempo nos convertimos en grandes amigos y me encanta que sigamos en comunicación, gracias por todos los buenos momentos que pasamos y los divertidos recuerdos que creamos juntos. Espero que pronto podamos crear nuevos en medio de discusiones, risas, enojos y decepciones. Soy su mejor armador y no me lo pueden negar.

A Daniel, el chileno mas hilarante que tuve el placer de conocer, sin duda alguna cada momento y plática con usted son únicos, le agradezco el cariño que siempre me ha demostrado, ya ve como si me titulé, usted hombre de poca fe.

Por último, le agradezco a todas las personas con las que he compartido poquito o mucho tiempo hasta el día de hoy y que sin afán de olvidarme de ustedes no los he mencionado aquí. Sé que de todas las personas se aprende algo, gracias a todas las personas que se han cruzado por mi vida aún así haya sido breve, todo es pasajero, pero tengan en mente que mi gratitud hacia ustedes jamás lo será. A lo largo de todos mis años de vida he compartido buenos y malos momentos con una infinidad de personas y de cada uno he logrado aprender cosas que me han trazado el camino que siempre he querido seguir, muchas veces titubeé y la duda me acosaba, pero al final creo que puedo decir que este gran reto que me planteé ha sido una de las cosas más satisfactorias de mi vida. Me honra compartir la enorme felicidad que me embarga por este gran logro profesional y sobre todo personal, el camino no acaba aquí y espero que muchos de ustedes continúen a mi lado.

GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE.

• Lista de figuras y tablas.....	9
• Abreviaturas.....	11
1. Resumen.....	12
2. Abstract.....	14
3. Introducción.....	16
3.1 La enfermedad de Parkinson.....	17
3.2 La nicotina como tratamiento para combatir la sintomatología y el progreso de la enfermedad de Parkinson.....	19
3.3 El papel de la serotonina en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.....	20
3.4 Causas genéticas de la enfermedad de Parkinson.....	22
3.5 Cuerpos de Lewy.....	24
3.6 Sinfilina y su papel en la enfermedad de Parkinson.....	25
4. Antecedentes.....	27
5. Justificación.....	32
6. Hipótesis.....	33
7. Objetivo general.....	33
8. Objetivos particulares.....	33
9. Metodología.....	34
10. Resultados.....	40
11. Discusión.....	58

12. Conclusiones.....	65
13. Perspectivas.....	68
14. Referencias.....	69
15. Anexos.....	77

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

Fig. 1.- Incidencia de la enfermedad de Parkinson en ciudades de distintos países.

Fig. 2.- Incidencia de la enfermedad de Parkinson en la población francesa.

Fig. 3.- Síntesis de dopamina.

Tabla 1. Genes asociados a la aparición del fenotipo parkinsoniano.

Fig. 4.- Sinapsis serotoninérgica.

Fig. 5.- Imágenes de tomografía por emisión de positrones fusionadas con resonancia magnética que muestran la inervación serotoninérgica.

Fig. 6.- Cuerpos de Lewy presentes en pacientes de la enfermedad de Parkinson.

Tabla 2. Modelos animales en los cuales se ha probado la nicotina.

Fig. 7.- Supervivencia de moscas con mutación en el gen park.

Fig. 8.- Movilidad de moscas con mutación en el gen park.

Fig. 9.- La expresión de Sph-1 en moscas reduce el número de neuronas dopaminérgicas.

Fig. 10.- Efecto de diferentes concentraciones de nicotina sobre la esperanza de vida y la motilidad.

Fig. 11.- El tratamiento con nicotina aumenta la vida en las moscas que expresan Sph-1, mientras que la reduce en los animales control.

Fig. 12.- La nicotina rescata la movilidad en los animales que expresan Sph-1 pero la reduce en las moscas control.

Fig. 13.- La nicotina no tiene efectos en la movilidad de las moscas en periodos de oscuridad.

Fig. 14.- Moscas jóvenes que expresan Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas muestran alteraciones en la capacidad olfativa.

Fig. 15.- Imágenes de microscopía confocal representativas de cerebros de machos adultos de *Drosophila*.

Fig. 16.- La nicotina reduce la pérdida del número de neuronas dopaminérgicas.

Fig. 17.- La exposición a nicotina incrementa los niveles de dopamina y tirosina hidroxilasa cerebral en moscas.

Fig. 18.- El tratamiento con nicotina en etapas avanzadas de la vida aumenta la sobrevivencia en moscas envejecidas que expresan Sph-1.

Fig. 19.- El sistema dopaminérgico tiene un papel importante tanto en la protección conferida por la nicotina, así cómo en la reducción de la sobrevivencia de las moscas.

Fig. 20.- Moscas jóvenes que expresan Sph-1 en el sistema dopaminérgico y/o serotoninérgico muestran alteraciones en la capacidad olfativa.

Fig. 21.- Los circuitos serotoninérgico y dopaminérgico parecen involucrados en actividades motoras en edades tempranas, mientras que la pérdida de la locomoción en edades avanzadas sólo se logra al manipular el circuito dopaminérgico.

Fig. 22.- Registros electrofisiológicos de la retina obtenidos al evaluar la capacidad visual de las moscas que expresan Sph-1.

Fig. 23.- Las moscas que expresan Sph-1 en el sistema serotoninérgico y dopaminérgico muestran alteraciones visuales.

Fig. 24.- La alteración del sistema serotoninérgico y/o dopaminérgico disminuye los niveles de la tirosina hidroxilasa.

Fig. 25.- La alteración del sistema serotoninérgico y/o dopaminérgico disminuye los niveles de la triptófano hidroxilasa.

Fig. 26.- Modelo propuesto para la acción de la nicotina ante la toxicidad mediada por la presencia de Sph-1.

ABREVIATURAS

AUC: Área Bajo la Curva.

Bz: Benzaldehído.

CL: Cuerpos de Lewy.

DDC: DOPA descarboxilasa.

DHB: Developmental Hybridoma Bank

EP: Enfermedad de Parkinson.

ERG: Electroretinogramas.

Fig: Figura.

GFP: Proteína verde fluorescente.

HPLC: High Liquid Chromatography

Sph: Sinfilina.

L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina.

MAO: Monoamina oxidasa 2

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina.

nAChRs: Receptores de acetilcolina de tipo nicotínico.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SERT: Transportador de reciclaje de serotonina.

TPH/TRH: Triptófano hidroxilasa.

TH: Tirosina hidroxilasa.

UAS: Upstream Activating Sequence.

VMAT: Transportador vesicular de monoamimas.

1. - RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida de neuronas en regiones específicas del cerebro, lo que afecta directamente a varias funciones controladas por el sistema nervioso. Debido a que la esperanza de vida ha aumentado a nivel mundial y a que el envejecimiento se relaciona directamente con la aparición de este tipo de enfermedades, el comprender mejor la aparición, el desarrollo y el desenlace de estas patologías se ha vuelto un objetivo clave.

Entre las enfermedades neurodegenerativas más comunes está la enfermedad de Parkinson, ocupando el segundo lugar sólo después de la enfermedad de Alzheimer. Por lo anterior, la enfermedad de Parkinson es considerado un problema de salud muy importante en términos de discapacidad y mortalidad a nivel mundial. La principal característica de la enfermedad de Parkinson es la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta*. Debido a la muerte de este tipo de neuronas, la enfermedad provoca no sólo defectos motores como temblor en reposo, rigidez, bradicinesia, sino también síntomas no motores como depresión, deterioro de la memoria, déficit olfativo, estreñimiento, trastornos cardíacos y del sueño.

A nivel molecular, la enfermedad de Parkinson es una patología multifactorial. Sin embargo, la causa más común de la enfermedad es el mal funcionamiento del sistema de ubiquitinación y su interacción con el proteosoma. Adicionalmente, la formación y acumulación de agregados proteicos, así como estrés oxidativo y desregulación de la expresión génica, han sido asociados a la enfermedad. Por otro lado, se sabe que, durante la enfermedad de Parkinson, las proteínas sinfilina-1 y α -sinucleína, juegan un papel fundamental en la formación de cuerpos de Lewy cuya acumulación es una de las características principales para el desarrollo posterior de la enfermedad.

A pesar de que actualmente la enfermedad de Parkinson no tiene cura, se ha observado que existe una clara correlación positiva entre el consumo de tabaco y una menor incidencia o un atraso en la aparición de la enfermedad. Además, la nicotina es un agonista colinérgico y es el principal compuesto psicoactivo del tabaco (*Nicotiana tabacum*), por lo que es la responsable de la adicción a los productos derivados del tabaco. Interesantemente, algunos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que existe un efecto benéfico de la nicotina tanto en modelos esporádicos como genéticos de la enfermedad de Parkinson.

En este trabajo, se evaluó el efecto protector de la nicotina en un modelo de *Drosophila melanogaster* para la enfermedad de Parkinson, donde se expresó la sinfilina-1 en neuronas dopaminérgicas usando el sistema *UAS-GAL4*. Se observó que la nicotina tiene un efecto moderado

sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas que se hace más evidente a medida que las moscas envejecen. La nicotina es benéfica para la supervivencia y la motilidad de las moscas, aumentando los niveles de la tirosina hidroxilasa y dopamina, sugiriendo que los agonistas colinérgicos pueden promover la supervivencia y la función metabólica de las neuronas dopaminérgicas que expresan sinfilina-1. Las moscas que expresan esta proteína son un buen modelo para el estudio de fenotipos de inicio temprano como la pérdida del olfato, uno de los principales síntomas no motores relacionados con la enfermedad de Parkinson. Por otro lado, los datos sugieren que la nicotina es una molécula con propiedades terapéuticas interesantes que deberían explorarse en futuras investigaciones sobre los moduladores fenotípicos de la enfermedad y para el desarrollo de nuevos tratamientos.

2. - ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are characterized by the loss of neurons in specific brain regions, that directly affects several nervous system-controlled functions. Due to the fact that life expectancy and aging are both increasing worldwide and the later one is positively correlated with the appearance of degenerating diseases; a better understanding about the onset, development and outcome of these pathologies is becoming critical.

Among the most common neurodegenerative diseases, Parkinson's disease occupies the second place only after Alzheimer's one. In addition, Parkinson's disease is increasing as one of the main health problems in terms of disability and mortality worldwide. The main characteristic of Parkinson's disease is the loss of dopaminergic neurons of the *substantia nigra pars compacta*. Due to the death of this kind of neurons, Parkinson's disease causes not only motor defects including tremor at rest, rigidity, bradykinesia, but also non-motor symptoms, such as, depression, memory impairment, olfactory deficits, constipation, heart, and sleep disorders.

Parkinson's disease is a multifactorial pathology. At the molecular level, the most conspicuous cause of this disease, is the malfunction of the ubiquitination system and its interaction with the proteasome. Additionally, inflammatory processes, mitochondrial dysfunctions, misfolding of proteins and accumulation of them (protein aggregates), oxidative stress and deregulation of gene expression, have been associated to Parkinson's disease.

Synphilin-1 is a protein that interacts with α -Synuclein, it is known that both proteins have a role in the development of the pathology of Parkinson's disease and the formation of Lewy bodies. Actually, Parkinson's disease has no cure. However, it has been observed that there is a positive correlation between tobacco consumption and a lower incidence of Parkinson's disease onset. Nicotine is a substance found in common tobacco (*Nicotiana tabacum*). Nicotine is a cholinergic agonist, and it is the principal psychoactive compound in tobacco linked to cigarette addiction. *In vivo* and *in vitro* studies have shown that there is a beneficial effect of nicotine in sporadic and genetic models of the Parkinson's disease.

In this work we evaluated nicotine's protective effect in a *Drosophila melanogaster* model for Parkinson's disease in which Synphilin-1 is expressed specifically in dopaminergic neurons. I found that nicotine has a moderate protective effect on dopaminergic neuron survival that becomes more evident as flies age. Nicotine is beneficial on fly survival and motility increasing tyrosine hydroxylase and dopamine levels, suggesting that cholinergic agonists may promote survival and metabolic function of the dopaminergic neurons that express Synphilin-1. The Synphilin-1 expressing fly is a

good model for the study of early-onset phenotypes such as olfaction loss one of the main non-motor symptoms related to Parkinson's disease. The data suggest that nicotine is an interesting therapeutic molecule which properties should be explored in future research regarding the phenotypic modulators of the disease and for the development of new treatments.

3. - INTRODUCCIÓN

El aumento en la esperanza de vida a nivel mundial ha ocasionado la aparición de diferentes enfermedades relacionadas con el envejecimiento de la población. Muchas de ellas han tomado importancia en los últimos años debido al impacto social y la pérdida en la calidad de vida que ocasionan en aquellas personas afectadas y sus familias. Algunas de estas patologías son las llamadas enfermedades neurodegenerativas, que se caracterizan por la pérdida o desregulación neuronal en distintas regiones del cerebro, provocando defectos en funciones como la movilidad, equilibrio, aprendizaje, habla y memoria (*Brookmeyer et al., 1998; Winner et al., 2011*).

Estas enfermedades están directamente relacionadas con el envejecimiento y la edad avanzada, siendo así éstos los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de estas patologías. Además se ha observado una relación entre la presencia de agregados proteicos anormales y la aparición de estas enfermedades (*Pollanen et al., 1993*). Adicionalmente, representan una de las principales amenazas para la salud humana por lo que en los últimos años, los estudios para el entendimiento de la aparición y progresión de estas patologías han aumentado (*Gitler et al., 2017*). Esto relacionado además a que año con año la población anciana va aumentando, siendo así un importante foco de interés para el sector salud de muchos países.

Los trastornos neurodegenerativos más comunes se producen por una mala regulación en la función y plegamiento proteico como las amiloidosis, tauopatías y sinucleinopatías. Las conformaciones proteicas anormales y su distribución celular constituyen la principal característica histopatológica esencial para realizar un diagnóstico específico de cada enfermedad (*Dugger & Dickson, 2017*). El identificar y comprender los mecanismos que desencadenan la dinámica de estas alteraciones proteicas y su relación con la aparición y progresión de estas neuropatologías, continúa siendo uno de los principales campos de estudio a nivel mundial.

La enfermedad de Alzheimer es el desorden neurodegenerativo más común, constituye aproximadamente dos tercios de los casos de demencia en general (del 42 al 81 por ciento de todas las demencias). Se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas colinérgicas particularmente en la corteza cerebral y en el hipocampo, promoviendo así una reducción en la síntesis de acetilcolina, ocasionando problemas principalmente en la memoria y en varios procesos cognitivos (*Nussbaum & Ellis, 2003*). Por su parte, la enfermedad de Parkinson representa la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, caracterizándose principalmente por problemas en la

coordinación motriz derivado de la disminución del número de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* (de Lau & Breteler, 2006). Ambas patologías representan dos de las principales enfermedades de las que se han realizado un gran número de investigaciones, identificando así múltiples factores de riesgo tanto genéticos como ambientales para su desarrollo. A pesar de esto, aún siguen sin entenderse muchos de los procesos moleculares y celulares que desencadenan la aparición de estas patologías y, sobre todo, sigue sin identificarse una cura, por lo que estas enfermedades continúan siendo progresivas y mortales.

3.1 La enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en el año de 1817 por James Parkinson, quien la definió como una “parálisis agitante”, es decir *un movimiento trémulo involuntario, con reducción en la potencia muscular en ciertas partes del cuerpo, en la acción e incluso en el soporte; con tendencia a doblar el tronco hacia adelante y lentitud para pasar de caminar a correr; en donde los sentidos y el intelecto parecían ilesos* (Parkinson, 1817).

Actualmente, se define como una enfermedad neurodegenerativa y progresiva del sistema nervioso central, que patológicamente se caracteriza por una degeneración de las neuronas dopaminérgicas en una región del mesencéfalo llamada *sustancia nigra pars compacta*. Durante su desarrollo, aparecen agregados proteicos intracelulares denominados cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas residuales y se ha visto una ligera mejoría en los síntomas motores al administrar L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina) (de Lau & Breteler, 2006; Gazewood et al., 2013).

Se estima que a nivel mundial, la EP afecta aproximadamente a 8-18 de cada 100 000 habitantes aunque se cree que estos números están subestimados, afectando aproximadamente al 1% de la población mayor de 60 años y al 4% de la población mayor de 80 (Twelves et al., 2003; de Lau & Breteler, 2006; Gazewood et al., 2013;). El pico de incidencia de la EP ocurre entre los 60 y 69 años de edad y solo entre el 4 y 7% de los casos comienza antes de los 40 años, en cuyo caso se define como Parkinson juvenil (de Lau & Breteler, 2006) (**Fig. 1**). Por otro lado, un estudio en población francesa mostró que es más prevalente en hombres que en mujeres, con relaciones de incidencia de 3.7:1.7 (Gillies et al., 2014; Elbaz et al., 2016) (**Fig. 2**). Esta enfermedad ocasiona problemas en la habilidad motora, desencadenando síntomas como temblor en reposo, rigidez, bradicinesia (de Lau & Breteler, 2006) y otros síntomas no motores tales como depresión, deterioro

de la memoria, déficits olfativos, estreñimiento y desordenes del sueño, solo por citar los más importantes (Poewe, 2008).

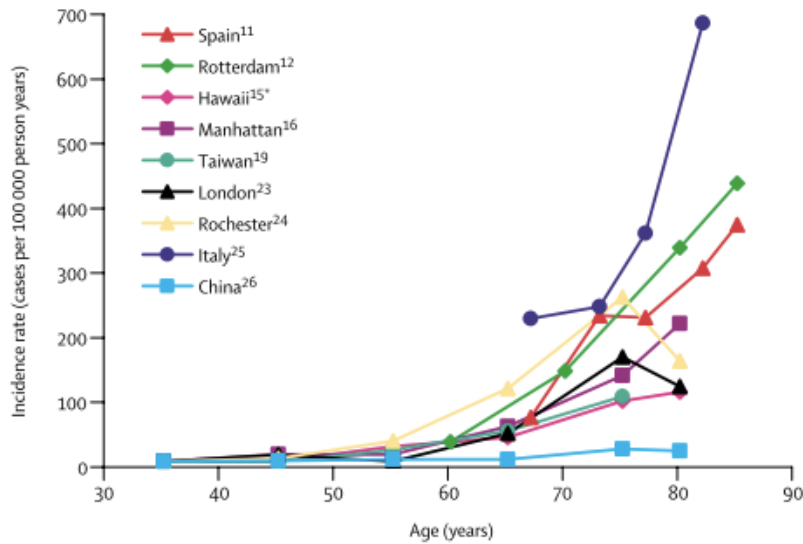


Fig. 1.- Incidencia de la enfermedad de Parkinson en ciudades de distintos países. Se puede observar cómo existe una tendencia de mayor incidencia de esta patología en personas mayores de 60 años. Italia (morado) probablemente es uno de los países con mayor incidencia debido su alta esperanza de vida y a que en este país se han identificado mutaciones de genes asociados al desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, países asiáticos como China tienen una incidencia baja que se ha relacionado a su dieta y su consumo abundante de antioxidantes presentes en los alimentos (de Lau & Breteler, 2006).

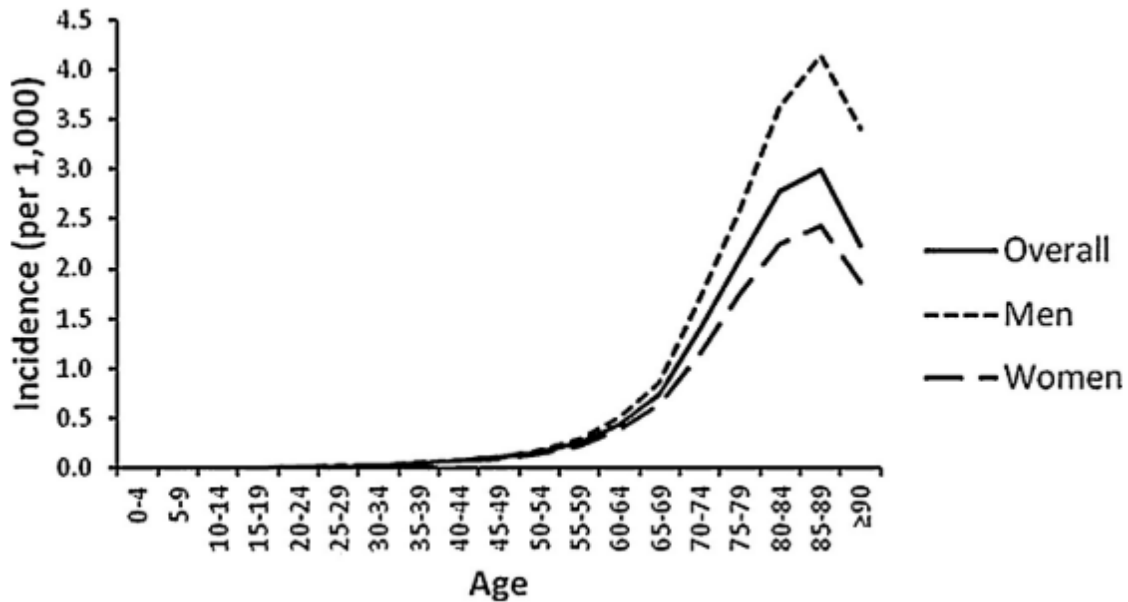
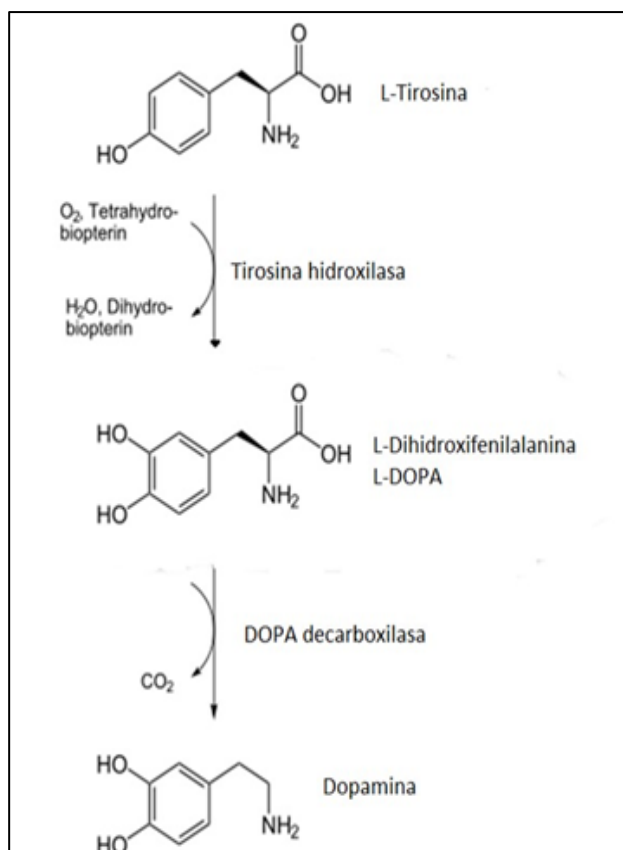


Fig. 2.- Incidencia de la enfermedad de Parkinson en la población francesa. En la gráfica se pueden observar los resultados de un estudio en donde se determinó que existe una mayor prevalencia de la EP en hombres que en mujeres, se cree que puede existir una neuroprotección mediada por los estrógenos y genes relacionados al cromosoma X lo que disminuiría la incidencia en mujeres, aunque no se sabe a ciencia cierta la razón. Otros estudios apuntan al estilo de vida de los hombres y a la exposición a factores ambientales como pesticidas, metales pesados, trauma cefálico, etc. (Elbaz et al., 2016).

La diagnosis de la EP se basa principalmente en síntomas clínicos. Cuando la cantidad de dopamina disponible se reduce, la comunicación con los ganglios basales disminuye, lo que resulta en una falta de control del movimiento voluntario (Dunn & Lewis, 2008). El criterio actual de diagnosis de parkinsonismo requiere la presencia de por lo menos dos de los síntomas característicos de la enfermedad: temblor en reposo, bradicinesia, rigidez o pérdida de la postura. Clínicamente la mejor diagnosis requiere de estudios postmortem en donde se ha observado que existe cerca de un 80% de reducción en el número de neuronas dopaminérgicas en pacientes afectados con la enfermedad (de Lau & Breteler, 2006).



Cabe recordar que la dopamina se sintetiza a partir de la tirosina hidroxilasa (th), esta enzima cataliza el primer paso entre la oxidación de L-tirosina a L-DOPA, siendo este un paso limitante en la vía de síntesis de Dopamina, posteriormente la L-DOPA se convierte a dopamina por medio de la Dopa descarboxilasa (ddc) (Fig. 3).

Fig. 3.- Síntesis de dopamina. A partir de L-Tirosina se produce L-DOPA por medio de la enzima Tirosina Hidroxilasa, por último, la L-DOPA se convierte a dopamina por medio de la Dopa descarboxilasa.

3.2 La nicotina como tratamiento para combatir la sintomatología y el progreso de la enfermedad de Parkinson

En la actualidad sólo existen tratamientos enfocados principalmente a tratar la sintomatología motora, aunque ninguno de ellos detiene el proceso de degeneración neuronal de la EP (Dexter & Jenner, 2013). Uno de los tratamientos más comunes, es la administración de L-DOPA, molécula

involucrada en la síntesis de catecolaminas que posteriormente es convertida a dopamina por acción de la enzima L- DOPA descarboxilasa; esta comúnmente se mezcla con carbidopa, que es un inhibidor de la L-DOPA descarboxilasa ya que en su ausencia la L-DOPA se descarboxila antes de atravesar la barrera hematoencefálica. Se utiliza L-DOPA y no dopamina ya que esta última no tiene la habilidad para penetrar la barrera hematoencefálica. Desafortunadamente el tratamiento con L-DOPA causa eventualmente genera tolerancia, por lo que su eficacia disminuye con el tiempo, permitiendo el progreso de la enfermedad y el agravamiento de los síntomas de la EP. Aún con estas limitaciones continua siendo el tratamiento más utilizado (*Florán-Garduño & Rangel-Barajas, 2005*).

Debido a que no existe un tratamiento definitivo, diferentes investigaciones han apuntado a nuevas moléculas como posibles agentes terapéuticos contra la EP y una de éstas es la nicotina, un alcaloide psicoactivo presente en el tabaco. En algunos estudios se ha observado que el consumo de tabaco parece reducir a la mitad el riesgo de padecer la enfermedad (*Hernán et al., 2002; Quik et al., 2008*). La nicotina también reduce algunos aspectos fenotípicos de la enfermedad, como los problemas motrices, aunque no se ha relacionado directamente con un efecto protector contra la muerte de neuronas dopaminérgicas, por lo que los mecanismos moleculares por los que la nicotina confiere esta protección aún se desconocen (*Srinivasan et al., 2014*). De esta manera, la nicotina actúa como agonista de la acetilcolina directamente sobre los receptores acetilnicotínicos de tipo nicotínico (nAChRs); promoviendo así la excitación neuronal y probablemente evitando el daño propio de la enfermedad, lo que hace a estos receptores un blanco interesante para el estudio de la neuropatología de la EP.

3.3 El papel de la serotonina en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

Uno de los principales neurotransmisores que se ha visto involucrado en el desarrollo de la EP y la aparición de algunos síntomas relacionados a esta enfermedad es la serotonina. La serotonina es una molécula que se produce en las neuronas serotoninérgicas a partir del triptófano, cuya enzima limitante es la triptófano hidroxilasa (trh) (**Fig. 4**). Se sabe que la serotonina está relacionada con desordenes que pueden alterar el neurodesarrollo (*Carvajal-Oliveros & Campusano, 2021*). También está involucrada en procesos como locomoción, alimentación, ciclo circadiano, agresión y regulación del sueño. Algunos de estos procesos también se encuentran alterados en la EP y ya han sido evaluados en modelos de mosca (*Kasture et al., 2018; Bacqué-cazenave et al., 2020*).

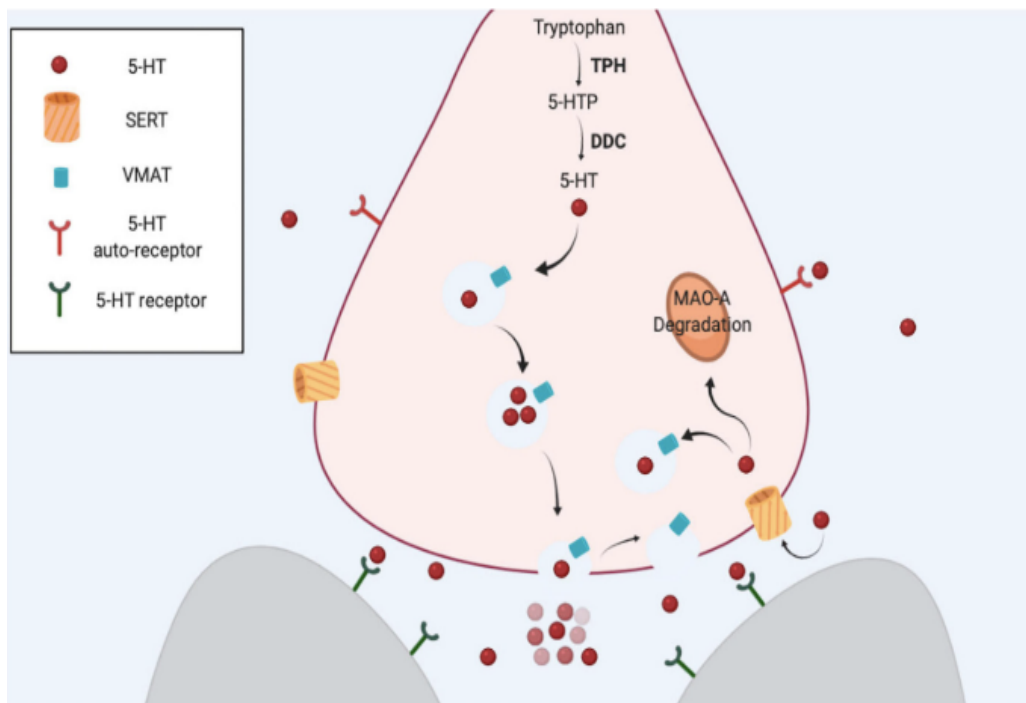


Fig. 4.- Sinapsis serotoninérgica. La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido triptófano. El primer paso es la hidroxilación del triptófano realizada por triptófano hidroxilasa (TPH), la enzima limitante de este proceso. La dopamina descarboxilasa (DDC) cataliza el paso final. Los transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT) transportan la serotonina desde el citosol a las vesículas. Una vez despolarizada la neurona, las vesículas liberan serotonina que puede unirse y activar receptores específicos en la misma neurona (presináptica) o en otras neuronas (postsináptica). El transportador de serotonina (SERT) vuelve a introducir la serotonina al citosol de la neurona presináptica, para que se pueda usar nuevamente como neurotransmisor o ser degradada por la monoamina oxidasa A (MAO-A) (Carvajal-Oliveros & Campusano, 2021)

En estudios post-mortem se ha observado que existe una reducción en la inervación serotoninérgica hacia el estriado, y que inclusive existe también una reducción significativa de la cantidad de serotonina presente en algunas áreas del cerebro como el hipotálamo y la corteza frontal, aunque esto no se ha relacionado directamente con la aparición de síntomas motores (Fox *et al.*, 2009).

Estudios *in vivo* han demostrado la pérdida de marcadores serotoninérgicos en el curso de la EP, lo que indica que el sistema serotoninérgico se ve afectado por la patología de esta enfermedad, esto relacionado también a que se ha observado la formación de CL en neuronas del núcleo de Rafé, que son principalmente serotoninérgicas. Esta reducción en la innervación serotoninérgica se ha logrado identificar por medio de tomografías de emisión de positrones, lo que ha proporcionado una fuerte evidencia de la participación del sistema serotoninérgico en la fisiopatología subyacente al desarrollo de síntomas y complicaciones motoras como los temblores y los no motores como la depresión, fatiga, pérdida de peso y alucinaciones visuales (**Fig. 5**) (*Politis & Niccolini, 2015*).

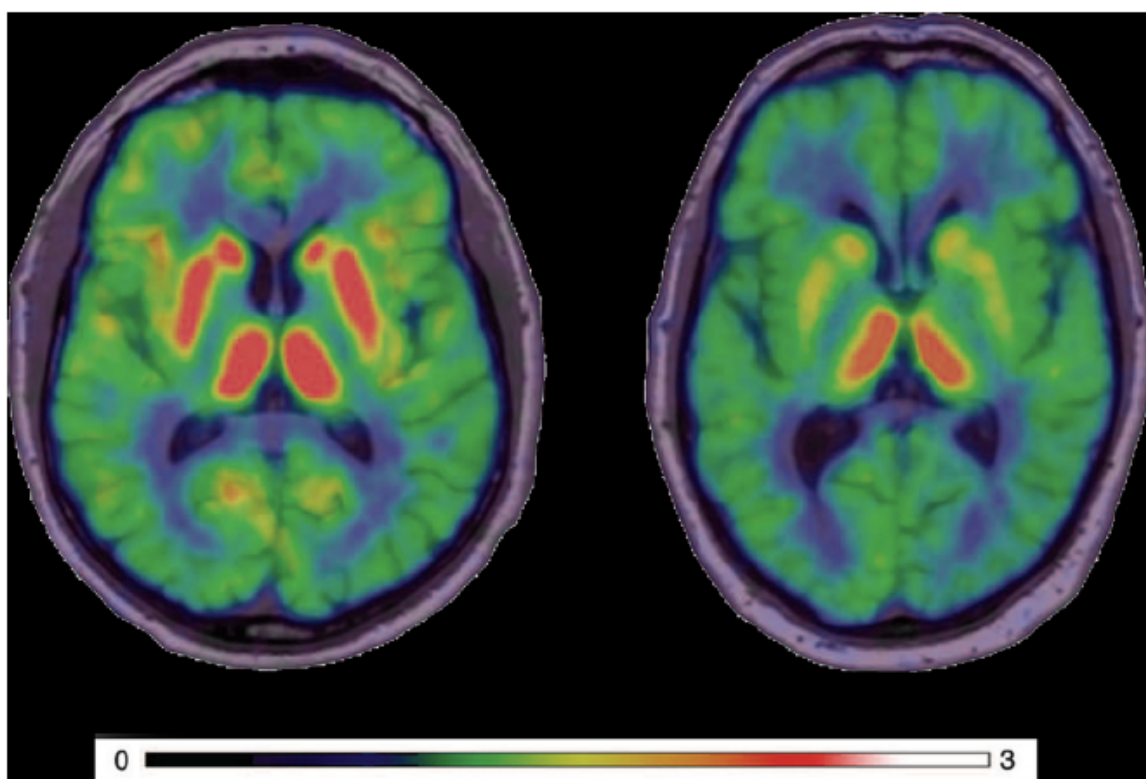


Fig. 5.- imágenes de tomografías por emisión de positrones fusionadas con resonancia magnética que muestran la innervación serotoninérgica. Marcando al transportador de serotonina, se muestra la innervación serotoninérgica (rojo) normal de un paciente sano (izquierda) comparada con la innervación serotoninérgica de un paciente con EP avanzado de 16 años después del diagnóstico. Se puede observar como existe una evidente reducción de la innervación serotoninérgica a nivel de los ganglios basales dorsales (*Politis & Niccolini, 2015*).

3.4 Causas genéticas de la enfermedad de Parkinson

A ciencia cierta no se conoce una causa específica para la aparición de la EP. Se sabe que se debe a una combinación de factores ambientales y genéticos, volviéndola así una enfermedad multifactorial (*Elbaz et al., 2016*). Cerca del 10-15 % de los casos de la enfermedad se deben a

factores genéticos hereditarios, aunque existen otros estudios que sugieren que el fenotipo de cerca del 60% de los casos de Parkinson idiopático se debe a factores genéticos (*Hamza & Payami, 2010*). En este aspecto se han identificado mutaciones en al menos 15 genes asociadas al desarrollo de la enfermedad (*Verstraeten et al., 2015*) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Genes asociados a la aparición del fenotipo Parkinsoniano (*Verstraeten et al., 2015*).

Gen	Proteína	Forma hereditaria	Fenotipo clínico
SNCA	Sinucleína	Autosómica dominante	Inicio temprano/Inicio tardío
PARK	Parkina	Autosómica recesiva	Inicio temprano
DJ1	Deglicasa-1	Autosómica recesiva	Inicio temprano
LRRK2	Cinasa 2 con repeticiones ricas en leucina	Autosómica dominante	Inicio tardío
PINK1	Cinasa 1 inducida por PTEN	Autosómica recesiva	Inicio temprano
ATP13A2	ATPasa transportadora de cationes 13A2	Autosómica recesiva	Parkinson Juvenil
FBXO7	Proteína F-Box 7	Autosómica recesiva	Parkinson Juvenil
PLA2G6	Fosfolipasa A2 del grupo 6	Autosómica recesiva	Parkinson Juvenil
VPS35	Proteína asociada a la clasificación de proteínas vacuolares	Autosomal dominante	Inicio tardío
EIF4G1	Factor de iniciación de traducción eucariota 4 Gamma 1	Autosómica dominante	Inicio tardío
DNAJC6	Proteína C6 de choque térmico	Autosómica recesiva	Parkinson Juvenil
ATP6AP2	Proteína 2 accesoria de transporte de la ATPasa H+	Ligado al cromosoma X	Parkinson Juvenil/Inicio temprano
COQ2	Polipreniltransferasa	Autosómica recesiva	Inicio tardío
SYNJ1	Sinaptojanina 1	Autosómica recesiva	Parkinson Juvenil
DNAJC13	Proteína C13 de choque térmico	Autosómica dominante	Inicio tardío

Muchos de estos genes están relacionados con la aparición de agregados o proteínas mal plegadas, de las cuales, se tiene evidencia de que promueven y aumentan la neurodegeneración. Se sabe que muchas de las proteínas codificadas por estos genes promueven formas oligoméricas que resultan tóxicas para la neurona, promoviendo así un mal funcionamiento metabólico de la célula, su posterior muerte y la consecuente reducción del neurotransmisor dopamina disponible en el cerebro (*Eyal et al., 2006; Stefanis, 2012*). Existe un debate acerca de si la acumulación de estas formas oligoméricas en agregados pudiese ser una forma en que la célula trata de inhibir su toxicidad, promoviendo la citoprotección (*Wakabayashi et al., 2007*), aunque también es cierto que

la presencia de estos agregados continua siendo una de las características patológicas mas comunes de la enfermedad.

3.5 Cuerpos de Lewy

Los cuerpos de Lewy (CL) son la principal marca histológica de la EP. Están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, incluyendo al hipotálamo, al núcleo basal de Meynert, a la *sustancia nigra*, al locus cerúleo, al núcleo del Rafé y a la médula espinal entre otros (*Wakabayashi et al., 2007*). Estos fueron descritos a principios del siglo XX por Fritz Jacob Heinrich Lewy, quien las describió como cuerpos extraños que se encontraban en el cerebro de pacientes afectados con la “parálisis agitante” (*Engelhardt & Gomes, 2017*).

Actualmente se sabe que los CL son agregados eosinofílicos presentes en el citoplasma de neuronas del sistema nervioso humano, con un tamaño que va desde los 5 a 25 μm de diámetro (**Fig. 6**). No estan relacionados exclusivamente a la EP, ya que también se han encontrado en otras enfermedades como Alzheimer, demencia por cuerpos de Lewy, enfermedad de Pick entre otras (*Pollanen et al., 1993; Kalia et al., 2013*).

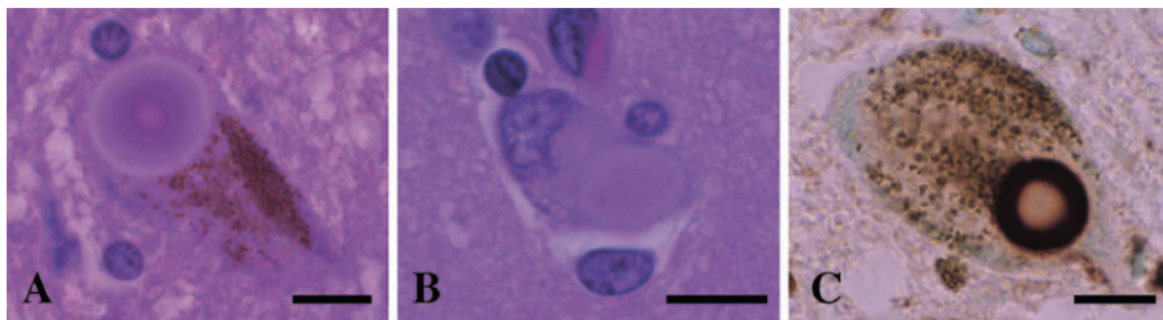


Fig. 6.- Cuerpos de Lewy presentes en pacientes de la enfermedad de Parkinson. A) Cuerpo de Lewy en neuronas de la sustancia nigra teñido con tinción de hematoxilina-eosina. **B)** Cuerpo de Lewy presente en la corteza cerebral. **C)** Cuerpo de Lewy en la sustancia nigra marcado con anticuerpo contra α -sinucleína (*Wakabayashi et al., 2007*).

Entre los principales componentes de los CL se encuentran proteínas como ubiquitina, tirosina hidroxilasa, $\alpha\beta$ - cristalina, citocromo C, dorfina, tubulina, tau y sinaptofisina (*Pollanen et al., 1993*). Se sabe que el principal componente de estos cuerpos es la α -sinucleína, proteína con múltiples conformaciones e interacciones y de la cual se han identificado modificaciones asociadas con la forma autosómica dominante de la EP, estas son las mutaciones A53T, A30P, E46K y

triplicaciones del gen (*Stefanis, 2012*). Estas mutaciones están relacionados con una estructura anormal de la proteína y una acumulación que exagera la toxicidad y promueve la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (*Paleologou & El-Agnaf, 2012; Wan & Chung, 2012*). Es importante mencionar que los componentes moleculares involucrados en la generación de cuerpos de Lewy no han sido totalmente dilucidados, aunque muchas investigaciones apuntan a un mal funcionamiento de la ruta ubiquitina-proteosoma (*Pollanen et al., 1993*).

3.6 Sinfilina y su papel en la enfermedad de Parkinson

Una de las interacciones más importantes de la α -sinucleína se da principalmente con la proteína sinfilina (Sph) o SNCAIP (Synuclein Interacting Protein), una proteína citoplasmática de 919 aa presente en las terminales presinápticas y de la cual no se conoce del todo su función. Sin embargo, se sabe que es uno de los principales componentes de los CL, por lo que se asocia con la aparición de enfermedades neurodegenerativas (*Engelender et al., 1999; Ribeiro et al., 2002*). Esta proteína posee al menos 8 isoformas que se generan a partir del gen SNCAIP, se sabe que algunas de estas isoformas generan proteínas truncas en el extremo C-terminal, las cuales pueden estar involucradas con la aparición de neuropatías promoviendo su acumulación y la formación de CL (*Humbert et al., 2007; Szargel et al., 2008*).

Otra de las características de Sph es que posee repeticiones de tipo anquirina y motivos de helice superenrollados, los cuales sugieren funciones de interacción proteína-proteína. Se ha observado que Sph es capaz de interactuar con α -sinucleína, parkina, cinasa 2 con repeticiones ricas en leucina, otras ubiquitin ligasas, subunidades y reguladores del proteosoma, los cuales están implicados en la patogénesis de la EP asociadas con la agregación de proteínas (*Ribeiro et al., 2002*).

Se ha identificado una mutación de la proteína Sph asociada con la aparición de la EP. Esta mutación consiste en un cambio de aminoácido (R621C), identificado en casos esporádicos de la enfermedad. Este cambio en la estructura proteica, parece incrementar su capacidad de agregación, lo que incrementa el número de cuerpos proteicos anormales dentro de la células, pudiendo ser así una de las causas por las que se promueva la muerte neuronal (*Marx et al., 2003*).

Es importante mencionar que se desconocen muchas cosas acerca de la Sph, incluyendo su función o los procesos molecular en los que participa, por lo que representa un blanco interesante estudio. Algunos estudios relacionados con la sobreexpresión de Sph en circuitos serotoninérgicos y dopaminérgicos de *D. melanogaster*, indican que esta proteína también puede estar relacionada con la homeostasis energética, ya que al expresarla en las neuronas de estos circuitos, se observó un incremento en el peso de las moscas, así como en el nivel de triacilglicerol, y el tamaño de los adipocitos, aumentando la acumulación de lípidos, por lo que muy probablemente también esté relacionada con obesidad y síndromes metabólicos (*Liu et al., 2012*).

4. - ANTECEDENTES.

Varios estudios muestran que la nicotina reduce los efectos de algunas neurotoxinas que dañan específicamente a las neuronas dopaminérgicas de la región mesencefálica, tales como la hidroxidopamina (6-OHDA) (Quik, O'Neill, et al., 2007; Perez et al., 2012). Por otro lado, se ha observado que existe una protección contra el daño nigroestriatal cuando se administra nicotina en modelos parkinsonianos ocasionados por la administración de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina), sustancia que produce daño exclusivamente en neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* en mono, ratón y humano (Quik et al., 2015). Se piensa que la protección es mediada por varias poblaciones de nAChRs que contienen las subunidades $\beta 2$ y $\alpha 7$ (Quik et al., 2012). Adicional a esto, el hallazgo de que las subunidades $\beta 2$ y $\alpha 7$ de los nAChRs están en las áreas del estriado y otras regiones del cerebro implicadas en el movimiento, es lo que sugiere que estas subunidades de los receptores pueden contribuir en los efectos neuroprotectores de la nicotina (Quik, Bordia, et al., 2007; Zhang et al., 2015) (**Tabla 2**).

Por otro lado, los compuestos del humo de cigarrillo como la nicotina y la hidroquinona inhiben la formación de fibrillas de α -sinucleína y su mutante A53T *in vitro*, de manera dependiente de la concentración, siendo la nicotina la más eficaz inhibiendo la formación de éstas (Hong, et al. 2009). Ésto sugiere que podría inhibir directamente la formación de agregados proteicos, como por ejemplo los CL o los formados por Sph.

La nicotina también previene la activación de vías relacionadas con el estrés oxidativo en modelos de rata, específicamente en el retículo endoplásmico, recuperando el funcionamiento correcto de la célula al detener la traducción de proteínas o aumentando la síntesis de chaperonas o en caso contrario promover la apoptosis disminuyendo la expresión y translocación de proteínas relacionadas con este sistema como CHOP, XBP1 y ATF6 entre otras, disminuyendo así la presencia de proteínas mal plegadas y promoviendo una protección a las neuronas dopaminérgicas (Srinivasan et al., 2016).

Tabla 2. Modelos animales en los cuales se ha probado nicotina.

Modelo animal	Inductor de daño en la zona nigroestriatal	Vía de administración	Efectos de la nicotina
Rata	6-OHDA	Inyección intranigral (1 mg/Kg)	Aumento en la cantidad de dopamina en el estriado y la <i>sustancia nigra</i> (Costa et al., 2001).
	Metanfetamina	En el agua de beber (10–75 µg/ml)	Aumento en subunidades $\alpha 4\beta 2$ de los nAChRs (Vieira-Brock et al., 2015)
Monos	MPTP	En el agua de beber (50 -650 µg/ml)	Aumento en la liberación de dopamina y expresión de nAChRs (Perez et al., 2012).
Ratón	MPTP	En el agua de beber. (200 µg/ ml)	Disminución de la neurodegeneración y de las moléculas involucradas en vías de inflamación (Nicholatos et al., 2018).
	Paraquat	En el agua de beber. (25-400 µg/ ml)	Disminución en muerte de neuronas dopaminérgicas en sustancia nigra, así como del transportador de dopamina en el estriado (Khwaja et al., 2007).

En modelos similares a los que se emplean en nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que la nicotina también confiere una protección teniendo efectos sobre la sobrevivencia, así como una mejoría en los síntomas motores. Esto se observó en un modelo de *Drosophila melanogaster*

deficiente de parkina, una E3 ubiquitin-ligasa, involucrada con el desarrollo de Parkinson juvenil. En este trabajo Chambers y colaboradores generaron una mosca mutante para parkina, cuya sobrevivencia *per se*, se ve disminuida con respecto a la mosca control *w¹¹¹⁸*. Estas moscas fueron alimentadas con diferentes concentraciones de nicotina (1.05, 2.11, 3.16 o 4.21 µg/ml de nicotina en la comida). Posteriormente se determinó el tiempo medio de vida y se observó que la nicotina promovía un aumento en la esperanza de vida de las moscas, siendo la concentración de 3.16 µg/ml de nicotina en la comida la que resultó más benéfica para las moscas; caso contrario y llamativo resultó el observar el efecto de la nicotina en aquellas moscas que no tienen predisposición genética para la degeneración de neuronas dopaminérgicas, en las que los tratamientos de nicotina resultaron perjudiciales para las moscas, reduciendo su esperanza de vida (**Fig. 7**) (*Chambers et al., 2013*).

Por otro lado, se determinó la capacidad de geotaxis negativa, que es una conducta que revela la coordinación motriz, al medir el escalamiento y movimiento en moscas. Se observó que la presencia de nicotina en la comida reducía la pérdida de la locomoción en las moscas parkinsonianas, adicionalmente se observó una reducción en la locomoción en las moscas control (**Fig. 8**) (*Chambers et al., 2013*).

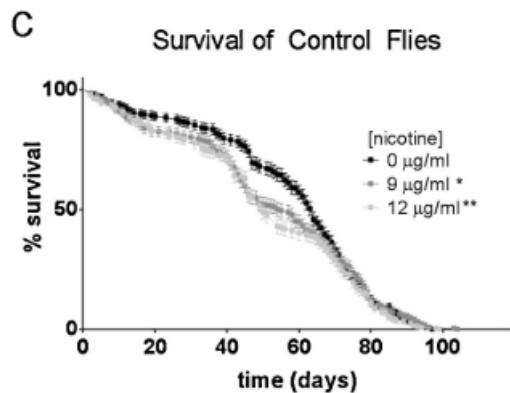
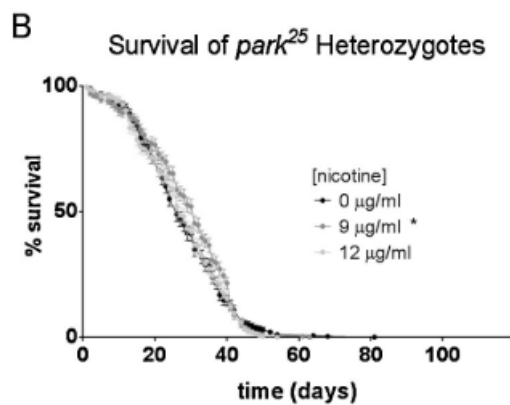
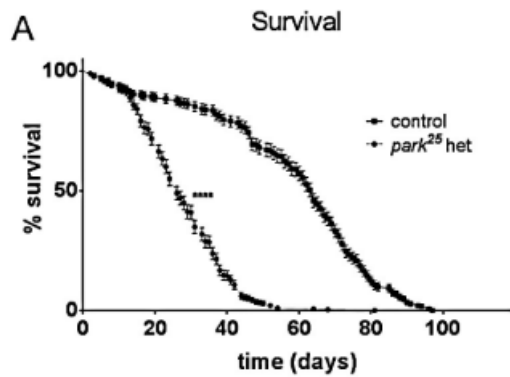


Fig. 7.-Sobrevivencia de moscas con mutación en el gen park. El tratamiento con nicotina aumenta la esperanza de vida en moscas con la mutación de parkina, mientras que en las moscas control este tratamiento resulta perjudicial. **A)** Sobrevivencia de las moscas mutantes park en comparación con las moscas silvestres. **B)** Sobrevivencia de las moscas park en distintas concentraciones de hemisulfato de nicotina. **C)** Sobrevivencia de las moscas control en distintas concentraciones de hemisulfato de nicotina (Chambers et al., 2013).

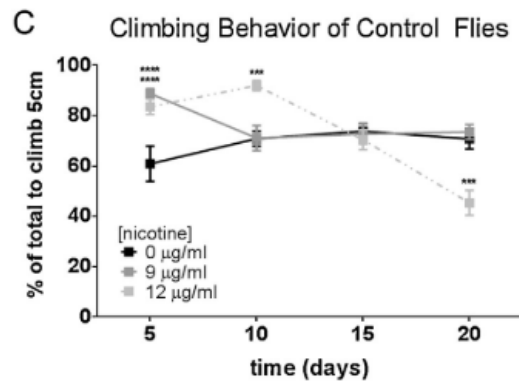
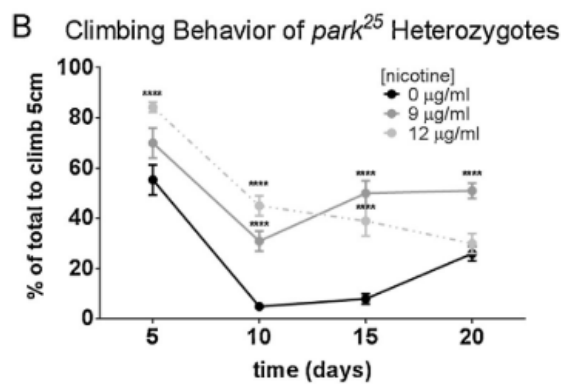
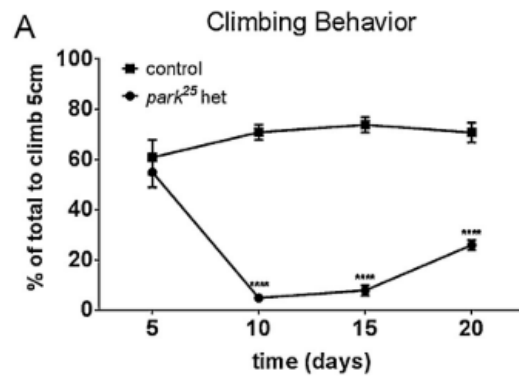


Fig. 8.- Movilidad de moscas con mutación en el gen park. El tratamiento con nicotina previene los déficits locomotores en las moscas con la mutación de parkina. En las moscas control este efecto se pierde para el día 20. **A)** Movilidad de las moscas mutantes park en comparación con las moscas silvestres. **B)** Movilidad de las moscas park en distintas concentraciones de hemisulfato de nicotina. **C)** Movilidad de las moscas control en distintas concentraciones de hemisulfato de nicotina (Chambers et al., 2013).

Después de analizar estos datos, resulta interesante determinar cuál sería el efecto de tratar con nicotina al modelo de expresión de Sph en las neuronas dopaminérgicas y si este tratamiento también podría reducir los fenotipos parkinsonianos ocasionados por la expresión de esta proteína, así como localizar que blancos moleculares que se ven afectados por la nicotina usando a *Drosophila melanogaster*.

Como antecedente del efecto de la expresión de Sph en modelos animales, sabemos por datos previos del laboratorio que la expresión de Sph en neuronas dopaminérgicas usando el promotor de la tirosina hidroxilasa (th), promueve un efecto neurotóxico, reduciendo la sobrevivencia, el movimiento y el número de neuronas dopaminérgicas (**Fig. 9**) (*Hernández-Vargas et al., 2011*), por lo que es un modelo ideal para evaluar el efecto de la nicotina en un fenotipo parkinsoniano.

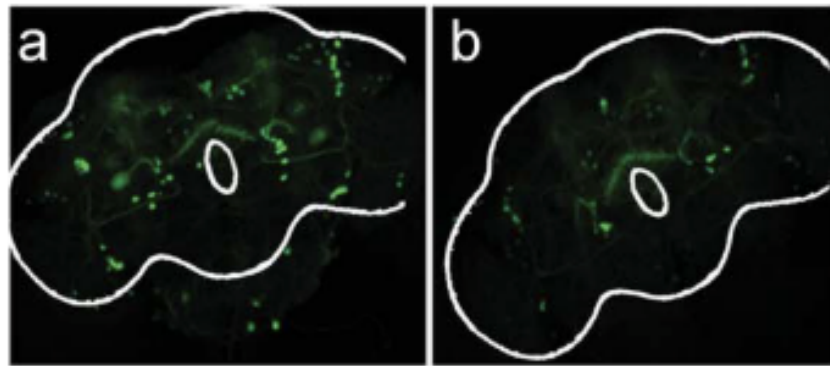


Fig. 9.- La expresión de sinfilina en moscas promueve la muerte de neuronas dopaminérgicas. La disminución de neuronas dopaminérgicas al expresar Sph bajo el promotor de la th hidroxilasa promueve la aparición de distintos fenotipos relacionados con la enfermedad de Parkinson, como la pérdida de la sobrevivencia y la movilidad relacionadas a la disminución del número de neuronas dopaminérgicas. **A)** Cerebro de una mosca control de 30 días de edad. **B)** Cerebro de una mosca de 30 días de edad que expresa Sph bajo el promotor de la th. En verde se observa la GFP cuya expresión se encuentra bajo el promotor de la th, marcador de las neuronas dopaminérgicas.

5. - JUSTIFICACIÓN.

En el laboratorio del Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se ha investigado ampliamente la relación entre la proteína sinfilina-1 y los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Esto se ha logrado gracias a la generación de líneas transgénicas de *Drosophila melanogaster* capaces de expresar esta proteína en distintos circuitos neuronales (Hernández-Vargas et al., 2011).

Dado que aún no se comprenden del todo las causas que promueven la aparición de la enfermedad, encontrar una cura es sumamente complicado, de tal manera que los pacientes afectados solo reciben un tratamiento paliativo con el cual solo se retrasan los síntomas relacionados con ella buscando minimizar el impacto que reciben en su vida cotidiana. Cabe señalar que muchos de estos tratamientos eventualmente generan tolerancia, lo que eventualmente disminuye su efectividad con el paso del tiempo, de manera que la EP es progresiva y mortal (de Lau & Breteler, 2006). Por estas razones es muy importante identificar los mecanismos moleculares involucrados en la aparición de la enfermedad usando modelos experimentales, ya que esta información nos permitirá identificar blancos moleculares para el desarrollo de posibles drogas o tratamientos que inhiban los mecanismos patológicos de la EP.

El tener un modelo de neurodegeneración dopaminérgica sencillo y rápido, nos permite evaluar diferentes drogas que permitan retrasar o inhibir el daño ocasionado por la presencia de una proteína, por lo que en este trabajo se propone usar a *Drosophila melanogaster* para evaluar el efecto que tiene la nicotina. Es importante mencionar que no existe una justificación médica para consumir nicotina, ya que es una droga que causa una fuerte adicción y puede tener efectos secundarios graves en el sistema cardiovascular. No obstante es importante estudiar y comprender el efecto neuroprotector que confiere para encontrar blancos terapéuticos, así como moléculas que lleven a cabo una función similar sin las desventajas que representa el uso de la nicotina (Srinivasan et al., 2016).

6. - HIPÓTESIS.

La nicotina mejora el funcionamiento neuronal en presencia del daño ocasionado por la expresión de sinfilina-1, mejorando el metabolismo dopaminérgico y reduciendo los fenotipos parkinsonianos.

7. - OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de la nicotina sobre diferentes fenotipos asociados a la enfermedad de Parkinson, usando como modelo de estudio la expresión de sinfilina-1 humana en el sistema dopaminérgico de *Drosophila melanogaster*.

8. - OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Determinar el efecto de la nicotina sobre la sobrevivencia de *Drosophila. melanogaster* con neurodegeneración dopaminérgica ocasionada por la expresión de sinfilina-1.
- 2) Analizar el efecto de la nicotina sobre fenotipos relacionados a la enfermedad de Parkinson en *Drosophila. melanogaster* que expresan sinfilina-1 en neuronas dopaminérgicas
- 3) Determinar algunas de las causas moleculares que intervienen en la protección que confiere la nicotina contra los fenotipos parkinsonianos.
- 4) Determinar cuál es el efecto de la nicotina cuando se administra temprana o tardíamente en las moscas afectadas por la expresión de sinfilina-1.
- 5) Determinar si existe algún otro circuito neuronal relacionado con la afectación que promueve la expresión de sinfilina-1 y si a su vez se encuentra involucrado en la protección que confiere la nicotina.

9. - METODOLOGÍA.

Material biológico

Todos los experimentos en esta tesis fueron realizados con machos de *Drosophila melanogaster* en etapa adulta. Las moscas fueron alimentadas con comida de maíz con levadura y mantenidas en una incubadora a 25°C con periodos de 12 horas de luz por 12 de oscuridad, con cambios a comida fresca cada 4 días. La expresión de la proteína Sph-1 humana se logró con ayuda del sistema *UAS-GAL4*. En este sistema, se utiliza el promotor de un gen endógeno para dirigir la expresión de GAL4. En este caso, se utilizó el promotor de la *th* para el circuito dopaminérgico debido a que es la enzima limitante en la síntesis de dopamina, el promotor de la triptófano hidroxilasa (*trh*) para el circuito serotoninérgico, enzima limitante en la síntesis de serotonina y el promotor de la dopa descarboxilasa (*ddc*) para ambos circuitos y cuya función enzimática es transformar L-DOPA y 5-Hidroxitriptofano en dopamina y serotonina respectivamente, posteriormente el factor transcripcional GAL4 reconoce la secuencia UAS promoviendo así la expresión del gen de interés específicamente en la región donde se expresa el gen endógeno.

Para la determinación del efecto de la nicotina en las moscas que expresan Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas, se usaron moscas de las líneas *UAS-GFP: th-GAL4* y *w¹¹¹⁸* que fueron obtenidas del banco de *Drosophila* de Bloomington de la Universidad de Indiana en Estados Unidos. (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). Para evaluar el efecto de la expresión de Sph-1 en el circuito serotoninérgico se usaron las líneas de moscas *+*; *trh-GAL4* y *+*; *ddc-GAL4* y para el dopaminérgico en esta sección de este trabajo se usó *+*; *th-GAL4*, obtenidas del mismo banco. La línea *UAS-Sph* fue generada previamente en el laboratorio del Dr. Reynaud. Esta línea expresa la isoforma larga de la proteína Sph-1 (919 aa) (*Hernández-Vargas et al., 2011*).

En ambos casos se realizaron cruzas genéticas a partir de las líneas GAL4 y UAS para obtener los distintos genotipos experimentales:

- *UAS-GFP/UAS-Sph; th-GAL4/+*
- *UAS-Sph/+; th-GAL4/+*
- *UAS-Sph/+; trh-GAL4/+*
- *UAS-Sph/+; ddc-GAL4/+*

Para la primera sección de esta tesis el control fue el genotipo *UAS-GFP/+; th-GAL4/+* a partir de la cruce de la línea *UAS-GFP; th-GAL4* con el fondo genético *w¹¹¹⁸*. En la segunda sección el control fue obtenido de la cruce de la línea *UAS-Sph* con el fondo genético *w¹¹¹⁸* dando como resultado el genotipo *UAS-Sph/+; +*.

Tratamiento con nicotina

Para determinar el efecto de la nicotina sobre la neurodegeneración dopaminérgica, se suplementó la comida de levadura-maíz con la concentración requerida de esta sustancia. Las moscas fueron transferidas a viales con comida suplementada con nicotina. Las moscas eran transferidas a viales con comida fresca cada 4 días durante la duración de los experimentos. Se realizaron experimentos preliminares de dosis respuesta usando tres concentraciones de nicotina base (12, 24, y 48 μM), estas concentraciones son equivalentes a las utilizadas en los experimentos de Chambers et. al. (*Chambers et al., 2013*). Todos los experimentos posteriores fueron realizados usando la concentración de 24 μM de nicotina después de determinar que era la óptima.

Expectativa de vida

Grupos de 20 moscas macho post-eclosionadas de 1 día de edad, fueron colocadas en comida con o sin nicotina (grupo control y experimental respectivamente). Los animales fueron transferidos a viales con comida fresca cada 4 días, momentos en los cuales se determinaba el total de moscas muertas, atrapadas en la comida o que se escaparan al momento de transferirlas a un nuevo vial para determinar solamente las muertes derivadas por el efecto de la nicotina (n=100 por cada grupo). La determinación de la sobrevivencia se realizó a 25 °C bajo periodos de 12/12 h luz/oscuridad. Los parámetros analizados fueron la expectativa total de vida (cuando ya no hay mas moscas vivas) y la vida media (cuando el 50% de moscas ha muerto).

En el caso del tratamiento interrumpido de nicotina (pre y post-nicotina), los experimentos se iniciaron con un grupo de 200 individuos por condición. Posteriormente, en el día 60 (vida media) se separaron en dos grupos independientes y se colocaron en su nuevo tratamiento, es decir, a comida con nicotina o a comida normal según correspondiera. En estos grupos se continuó evaluando el número de moscas muertas hasta que no quedaran moscas sobrevivientes.

Ensayos de movilidad

Los ensayos de geotaxis negativa se realizaron según lo reportado por Ali (*Ali et al., 2011*). En la primera parte de esta tesis, los experimentos de movilidad se realizaron cada 5 días durante 60 días en todos los grupos. En la segunda parte de la tesis se realizaron en los días 1 y 40. Se colocaron grupos de 10 moscas en cada vial marcado con una línea que marcaba 5 cm de altura, estas fueron forzadas a ir al fondo dándole 3 golpes suaves. En todo momento se video grabó el ensayo para posteriormente cuantificar el número de moscas que fue capaz de pasar la línea de 5 cm en un periodo de 10 segundos. Se realizaron 10 repeticiones con las mismas poblaciones con periodos de reposo de un minuto entre cada repetición.

La actividad espontánea fue cuantificada usando el Drosophila Activity Monitor (TriKinetics) (*Pfeiffenberger et al., 2010*). Catorce moscas de cada genotipo, edad y tratamiento fueron colocadas en el instrumento en donde se les dió un periodo de adaptación de 24 horas. Posteriormente se analizaron los datos de la actividad registrada los 3 días siguientes. Esto se realizó en periodos de 12/12 h luz/oscuridad. Las mediciones de la actividad fueron separadas en ambos periodos.

Ensayos olfativos

La capacidad olfativa fue evaluada usando el software libre Buritrack (*Colomb et al., 2012*). Los individuos de cada genotipo fueron colocados individualmente en una arena circular con fondo blanco (39 mm de ancho por 2 mm de alto) que contaba con dos agujeros de 0.1 mm de tamaño en lados opuestos. Estas moscas fueron expuestas a un estímulo olfativo repulsivo (100 µl de una solución de benzaldehído (Bz) al 10%) que se colocó en una pequeña bola de algodón para posteriormente ponerla en uno de los pequeños agujeros, mientras que en el agujero del lado opuesto se colocaron 100 µl de agua destilada sobre otro algodón como estímulo control. Estas soluciones fueron alternándose de lado para evitar que la mosca tuviera predilección hacia algún lado de la arena en particular. Para este experimento se utilizaron 15 moscas macho por cada condición, genotipo y tiempo. La forma en que se cuantificó la capacidad olfativa fue por medio del índice de rendimiento (PI) de acuerdo a lo reportado por Molina-Mateo (*Molina-Mateo et al., 2017*). Para la representación del PI, se realizaron mapas de calor que fueron divididos a la mitad en base a donde se posicionó el algodón con agua o Bz. La fórmula utilizada para el cálculo fue la siguiente:

$$PI = \frac{(AUCH2O - AUCBz)}{(AUCH2O + AUCBz)}$$

En donde:

AUCH2O= es el área bajo la curva del tiempo que la mosca paso en la mitad de la arena más cercana al agujero con el algodón que contenía agua.

AUCBz = es el área bajo la curva del tiempo que la mosca paso en la mitad de la arena más cercana al agujero con el algodón que contenía Bz.

Cuantificación neuronal

La expresión de GFP en la línea de moscas *UAS-GFP/+; th-GAL4/+* fue usada como reportero para cuantificar el número de las neuronas dopaminérgicas. Se disecaron 5 cerebros de moscas por edad y tratamiento en PBS 1X. Los cerebros fueron fijados en una solución de formaldehido/PBS al 4% durante 20 min. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS 1X. Finalmente los cerebros fueron montados individualmente usando citifluor (Ted Pella Inc. Redding, CA.). Las imágenes fueron tomadas en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada usando el microscopio confocal Olympus FV10 con el objetivo 20X. Los parámetros para capturar las imágenes fueron estandarizados usando las muestras de moscas del grupo control de 10 días de edad (*UAS-GFP/+;th-GAL4/+*) evitando la saturación de pixeles y brillo, así como el tamaño óptimo de apertura y grosor entre cada sección de 0.5X. Después de la adquisición de las imágenes, se realizaron proyecciones Z con máxima intensidad usando image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Todos los cerebros fueron analizados usando los mismos parámetros y el número de neuronas contabilizado usando el método de doble ciego.

Cuantificación de dopamina

La dopamina total del cerebro fue cuantificada según Molina-Mateo (*Molina-Mateo et al., 2017*) mediante HPLC (BAS, West Lafayette, IN) acoplado a un detector electroquímico. Los

cerebros de las moscas adultas correspondientes a cada edad y tratamiento fueron disecados y homogenizados en ácido perclórico 0.2 N usando sonicación. Posteriormente se filtró la muestra usando un filtro de 0.2 μm . Se inyectaron 5 μl de los extractos en el sistema de HPLC que contaba con la siguiente configuración: una bomba (modelo PM-80), una columna microbore SepStick (10A) y un detector amperométrico (modelo LC-4C). La fase móvil del HPLC consistió en una solución de NaH_2PO_4 0.1 M, ácido 1-octanesulfónico 1.8 mM y EDTA 1 mM (pH: 2.3) con un flujo de 60 $\mu\text{l}/\text{min}$. El potencial del detector amperométrico fue colocado a 0.650 V. Bajo estas condiciones experimentales, los tiempos de retención fueron de 5.50 y 6.80 min para la L-DOPA y la dopamina respectivamente. Las muestras fueron analizadas comparando los picos de las moléculas y su tiempo de elución usando como referencia soluciones de concentraciones de dopamina estándares. El límite de detección para la dopamina fue 0.5 fmol/ μl . Para este experimento se utilizaron 3 muestras independientes, las cuales consistían en una mezcla de 5 cerebros del mismo grupo experimental o control por muestra.

Western blot

Se utilizaron extractos proteicos totales de cabeza de mosca para realizar una semi-cuantificación semicuantitativa. Se cargaron 50 μg de proteína en geles de acrilamida al 12% (Biorad Mini protean gel electrophoresis system) y las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por 3 horas a 250 mA. Para la detección de TH, las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche a 4°C en una solución de PBS + Tween 0.1% (PBST) suplementado con leche al 10% (Nestlé Carnation). Posteriormente las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo antiTH (Inmunostar 1:1000) en solución PBST + leche al 5%, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBST. Para la detección de TRH las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche en una solución de PBST suplementada con BSA al 5%. Estas membranas fueron incubadas con el anticuerpo antiTRH (Micropore 1:1000) en PBST + BSA al 5%. Las membranas fueron lavadas 6 veces con PBST. Finalmente, todas las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario KPL HPRT goat-antimouse (SeraCare) o rabbit-antisheep (Zymed) (1:3000), según correspondiera, en solución PBST + leche al 5%. Se lavaron 6 veces durante 10 min cada vez y las señales se detectaron usando el kit SuperSignal West pico Chemiluminescence Substrate (ThermoFisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las señales de las membranas fueron cuantificadas usando el software ImageJ. El anticuerpo de ratón monoclonal anti-actina (DHB, 1:3000) fue utilizado como control de carga.

Electroretinogramas

Para los electroretinogramas (ERG), se llenaron electrodos de vidrio (con puntas de 1 μm de diámetro) con solución de Drosophila Ringer (CaCl_2 3mM, KCl 182 mM, NaCl 46 mM, tris base 10mM, pH 7,0). El electrodo de registro se puso en contacto con el ojo compuesto para establecer un contacto eléctrico estable. El electrodo de referencia se insertó en el tórax de la mosca. El estímulo de luz duró 1 s. Las señales generadas se amplificaron utilizando un amplificador diferencial DC (A-M Systems, Carlsborg, WA, EE. UU.) y fueron visualizadas y registradas en un osciloscopio (Tektronix, EE. UU.). Los datos presentados en esta tesis corresponden a registros electrofisiológicos obtenidos usando 20 moscas de cada genotipo, tratamiento y edad, fueron analizados con un programa diseñado en el laboratorio usando Python.

Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos y tratamientos fueron evaluadas usando ANOVAS de una o de dos vías y pruebas post-hoc de Tuckey. Las curvas de sobrevivencia se evaluaron por medio del método de Mantel-Cox. Para el análisis de la sobrevivencia al día 80, se utilizó la prueba exacta de Fisher. En las gráficas se muestra el promedio y el error estándar de los datos obtenidos en cada experimento, así como la prueba estadística utilizada. La significancia fue definida como $p < 0.05$. Todos los datos fueron analizados usando el software GraphPad Prism 9.

10. - RESULTADOS

Determinación de la concentración óptima de nicotina

Se determinó la concentración óptima de nicotina de tal manera que fuera la menos tóxica para las moscas del genotipo control y que tuviera el efecto terapéutico más benéfico en las moscas experimentales a través de una serie de experimentos preliminares de dosis-respuesta en los que se evaluó la sobrevivencia y la movilidad hasta los 60 días (**Fig. 10**). Estas dosis fueron equivalentes y tenían un efecto similar a las utilizadas por Chambers (*Chambers et al., 2013*). Se observa que al igual que en estudios previos de exposición a nicotina, esta tiene un efecto benéfico en moscas con predisposición genética al parkinsonismo. Por otro lado, existe un efecto tóxico en aquellas moscas sin esta predisposición. Todos los experimentos posteriores se realizaron con la concentración de 24 μM de nicotina después de determinar que esta era la concentración óptima.

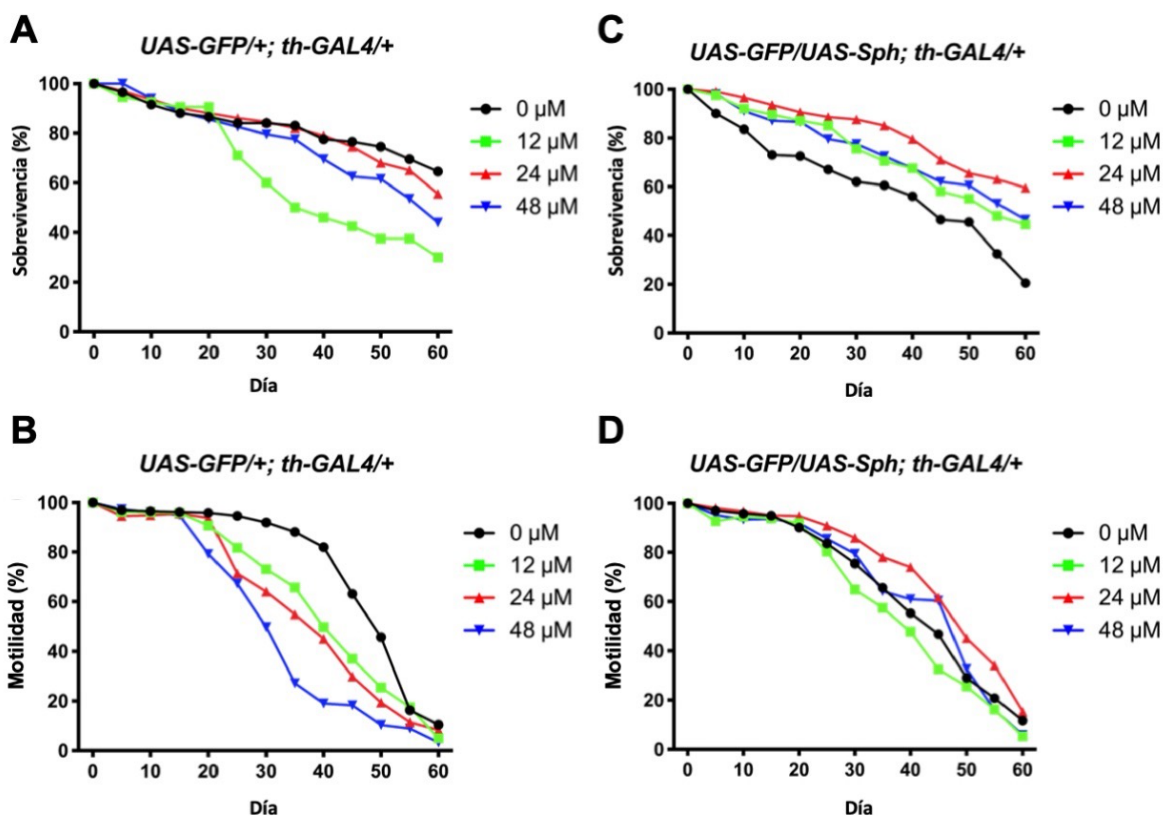


Fig. 10.- Efecto de diferentes concentraciones de nicotina sobre la esperanza de vida y la motilidad. Los machos adultos de la línea de control (**A** y **B**) y los machos que expresan Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas (**C** y **D**) se criaron en alimento suplementado con nicotina. Se utilizaron tres concentraciones diferentes. Los animales control (*UAS-GFP / +; th-GAL4 / +*) mostraron una reducción en la esperanza de vida cuando se trataron con nicotina. Las moscas que expresan Sph-1 en neuronas dopaminérgicas tenían una esperanza de vida mayor y una mejor motilidad cuando se las trataba de forma crónica con nicotina. La concentración que resultó más eficaz fue de 24 μM y se utilizó en todos los experimentos posteriores.

La nicotina promueve la sobrevivencia en las moscas que expresan Sph-1

Después de definir la dosis crónica más eficaz de nicotina, se procedió a evaluar el efecto de esta molécula sobre la sobrevivencia total de las moscas con fenotipo parkinsoniano. Las moscas que co-expresan Sph-1 y GFP en las neuronas dopaminérgicas exhibieron una vida media de 7 semanas. Las moscas del mismo genotipo tratadas con nicotina tuvieron un aumento significativo en su vida máxima de 16 a 17 semanas y también en su vida media de 7 a 13 semanas (**Fig. 11**). Como control se utilizó el genotipo *UAS-GFP/+; th-GAL4/+* que expresa GFP, una proteína no relacionada con la EP. De forma interesante, tanto la esperanza de vida máxima, así como la esperanza de vida de las moscas control tratadas con nicotina, se redujeron significativamente de 18 a 16 semanas y de 14 a 13 semanas respectivamente (**Fig. 11**). De acuerdo con estos resultados, en las moscas que expresan Sph-1, el tratamiento con nicotina mejoró significativamente los parámetros de sobrevivencia, mientras que en las moscas control los redujo. Estos datos apoyan la idea de que la nicotina promueve la sobrevivencia solo en moscas predispuestas a desarrollar un fenotipo similar a la EP.

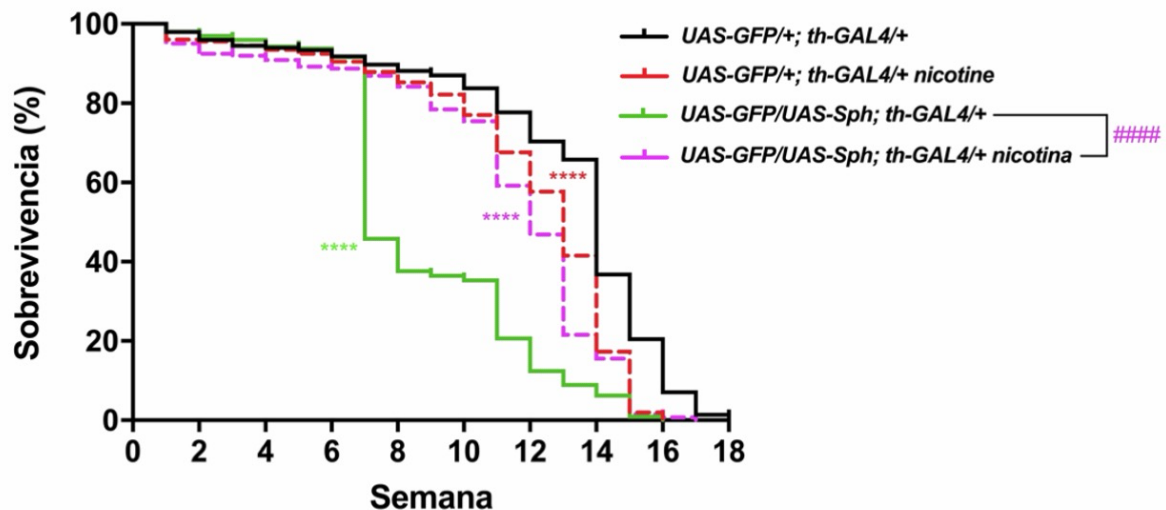


Fig. 11. El tratamiento con nicotina aumenta la vida en las moscas que expresan Sph-1, mientras que la reduce en los animales de control. La esperanza de vida en los animales control (que no expresan Sph-1) se reduce cuando se tratan con nicotina 24 μ M (línea punteada roja). Las moscas que expresan Sph-1 en neuronas dopaminérgicas tienen una esperanza de vida significativamente reducida (línea verde sólida). Sin embargo, esto se rescata con un tratamiento crónico con nicotina (línea punteada magenta). Los datos de los animales controles no tratados se presentan con la línea negra sólida. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba Log-rank (Mantel-Cox). Los asteriscos muestran la diferencia estadística entre la línea control no tratada (*UAS-GFP/+; th-GAL4/+*) y todos los demás genotipos y condiciones, el símbolo numérico (#) se utiliza para mostrar la diferencia estadística entre los grupos tratados y los no tratados en la línea que expresa Sph-1 (*UAS-GFP/UAS-Sph; th-GAL4/+*) **** o ##### $P < 0,0001$, $n = 200$ animales por condición experimental. Todos los animales tratados fueron expuestos crónicamente a nicotina 24 μ M.

La nicotina rescata la movilidad en las moscas que expresan Sph-1

Uno de los fenotipos más característicos de la EP es el deterioro de la motilidad espontánea e inducida (Fox *et al.*, 2018). El ensayo de geotaxis negativa es un paradigma que se ha utilizado para estudiar cómo se reduce la locomoción a medida que envejecen las moscas por medio de la medición de su capacidad de escalamiento. De acuerdo con esto, los resultados muestran que la capacidad de escalamiento de las moscas disminuye a medida que envejecen (**Fig. 12A, B**). Por otro lado, las moscas no tratadas con nicotina, que expresan Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas muestran una disminución significativa en la capacidad de trepar en comparación con los animales control (**Fig. 12A, B**). Para cuantificar este efecto, se calculó la motilidad acumulada a lo largo del tiempo y fue expresada usando el Área Bajo Curva (AUC). Estos datos muestran que las moscas que expresan Sph-1 (línea sólida verde) exhiben una movilidad reducida en comparación con los animales control (**Fig. 12A línea sólida negra**). Sorprendentemente, el tratamiento con nicotina suprime por completo este fenotipo en las moscas que expresan Sph-1 (**Fig. 12A, línea punteada magenta y 12B**). Por otro lado, las moscas control tratadas con nicotina mostraron una reducción significativa en su capacidad de trepar (**Fig. 12A, línea punteada roja y B**).

Los experimentos destinados a evaluar la actividad espontánea muestran resultados similares, siendo el efecto observable solamente durante los períodos de luz. Los animales que expresan Sph-1 muestran una motilidad espontánea reducida en comparación con el genotipo control, particularmente en edades más avanzadas (**Fig. 12C, D**). Esto se puede evidenciar mejor al observar los actogramas de estas dos cepas (**Fig. 12D**). Por otro lado, el fenotipo motor observado en animales que expresan Sph-1 se suprime parcialmente mediante el tratamiento crónico con nicotina (**Fig. 12C, línea punteada magenta**). Los animales control que no expresan Sph-1 exhiben una motilidad espontánea reducida cuando se tratan con nicotina (**Fig. 13C, línea punteada roja**). La actividad espontánea en los períodos de oscuridad no es significativamente diferente (**Fig. 13**).

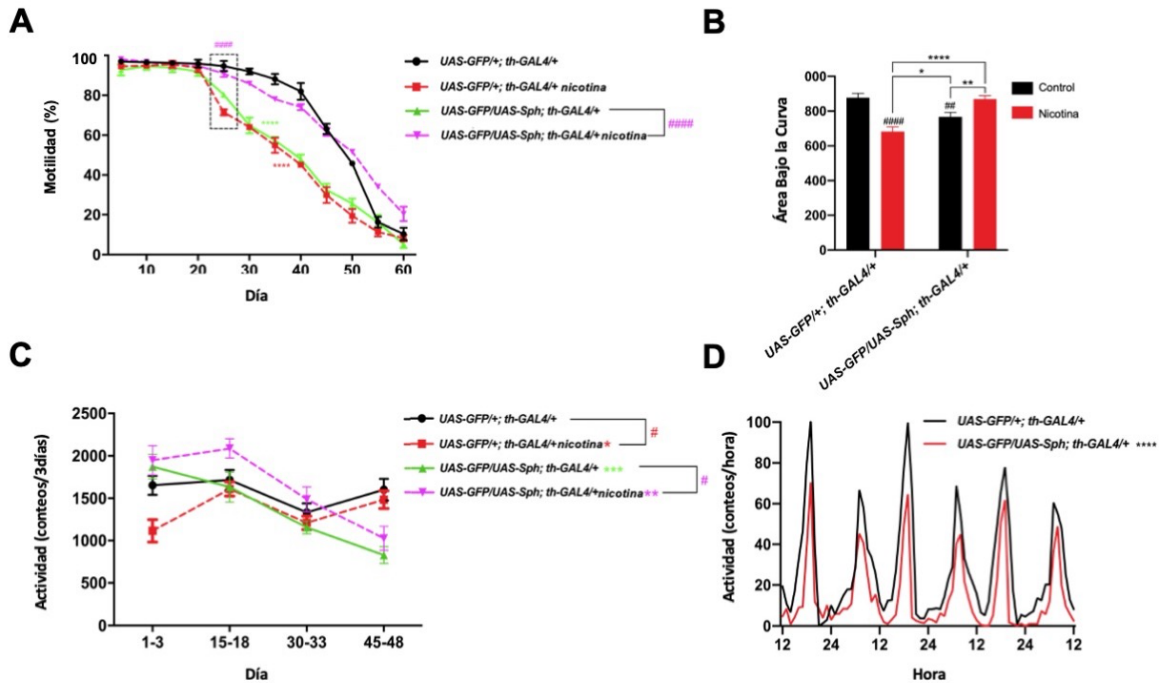


Fig. 12.- La nicotina rescata la movilidad en los animales que expresan Sph-1 pero la reduce en las moscas control. A) La geotaxis negativa de la línea Sph-1 (verde) es significativamente menor en comparación con la línea control (negro). El tratamiento con nicotina mejora la capacidad de escalamiento en las moscas Sph-1 (magenta) mientras que se reduce en las moscas control (rojo). **B)** Se muestra de manera acumulada los datos de escalamiento (área bajo la curva), el tratamiento con nicotina en las moscas Sph-1 revierte la pérdida de la capacidad de escalamiento (## indica $p < 0.01$; #### indica $p < 0.0001$ comparado con el grupo con tratamiento control). **C)** Animales control (negro) muestran una actividad espontánea significativamente menor cuando son tratadas con nicotina (rojo) mientras que este tratamiento rescata esta actividad en las moscas Sph-1. En A-C, se realizaron ANOVAS de dos vías seguidas por una prueba post-hoc de Tukey post-hoc. En todas las condiciones $n=100$, * indica $p < 0.05$; ** indica $p < 0.01$; **** indica $p < 0.0001$. **D)** Actogramas de las moscas control (negro) y Sph-1 (rojo). Se realizaron ANOVAS de dos vías seguidas por una prueba post-hoc de Tukey post-hoc. **** indica $p < 0.0001$ $n=14$ animales por grupo.

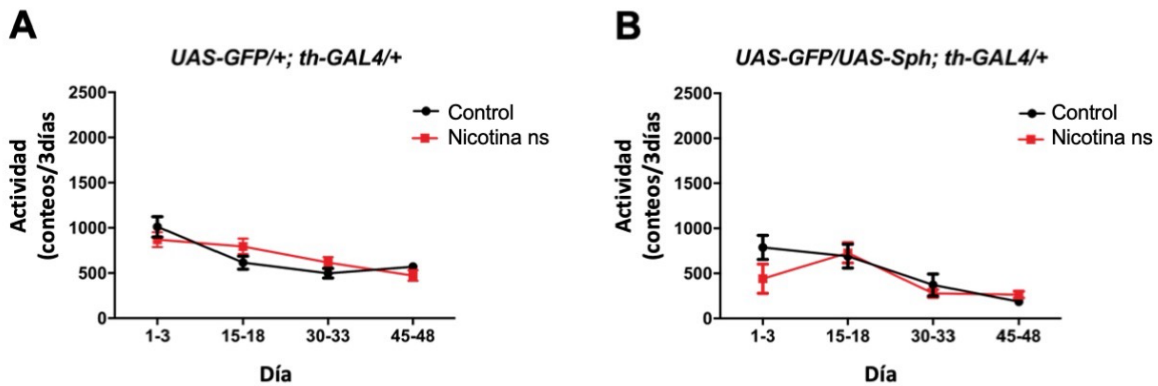


Fig. 13.- La nicotina no tiene efectos en la movilidad de las moscas en periodos de oscuridad. A) Los animales control no se ven afectados por el tratamiento con nicotina en la actividad espontánea durante los periodos de oscuridad. **B)** Los animales que expresan Sph-1 no tienen ningún cambio en la actividad espontánea durante los periodos de oscuridad. El tratamiento con nicotina tampoco afecta este comportamiento. Los datos de moscas en condiciones control se representan en negro, mientras que los datos de animales tratados con nicotina se muestran en rojo. La diferencia significativa de la motilidad espontánea se evaluó utilizando ANOVA de dos vías, seguido de prueba post hoc de Tuckey ns: no significativa $n = 14$ animales por grupo. En todos los casos, los animales de experimentación se trataron con nicotina 24 μ M.

La expresión de *Sph-1* induce alteraciones olfativas en moscas jóvenes.

Uno de los fenotipos tempranos de la EP más reconocidos es la pérdida del olfato (*Doty*, 2012), por lo que se decidió evaluar este fenotipo en las moscas que expresan *Sph-1*. Las moscas recién eclosionadas (un día de edad) exhiben una fuerte aversión hacia el estímulo olfativo del Bz 1%, evidenciado por un índice de rendimiento cercano a 0.5. Las **Figuras 14A, B** muestran que las moscas recién eclosionadas que expresan *Sph-1* en las neuronas dopaminérgicas tienen una reducción significativa en su respuesta hacia el Bz en comparación con los animales control. En los animales envejecidos durante 20 días que expresan *Sph-1*, no se observa ningún fenotipo en la pérdida de la capacidad olfativa en comparación con las moscas control. Por otro lado, el tratamiento crónico con nicotina redujo la respuesta aversiva al Bz en animales control envejecidos mientras que indujo un aumento leve pero no significativo en el rendimiento olfativo en moscas envejecidas que expresaban *Sph-1* (**Fig. 14C, D**). Estos datos apoyan la hipótesis de que el tratamiento con nicotina afecta negativamente el rendimiento olfativo de los animales control teniendo un efecto deletéreo similar a los anteriores fenotipos evaluados.

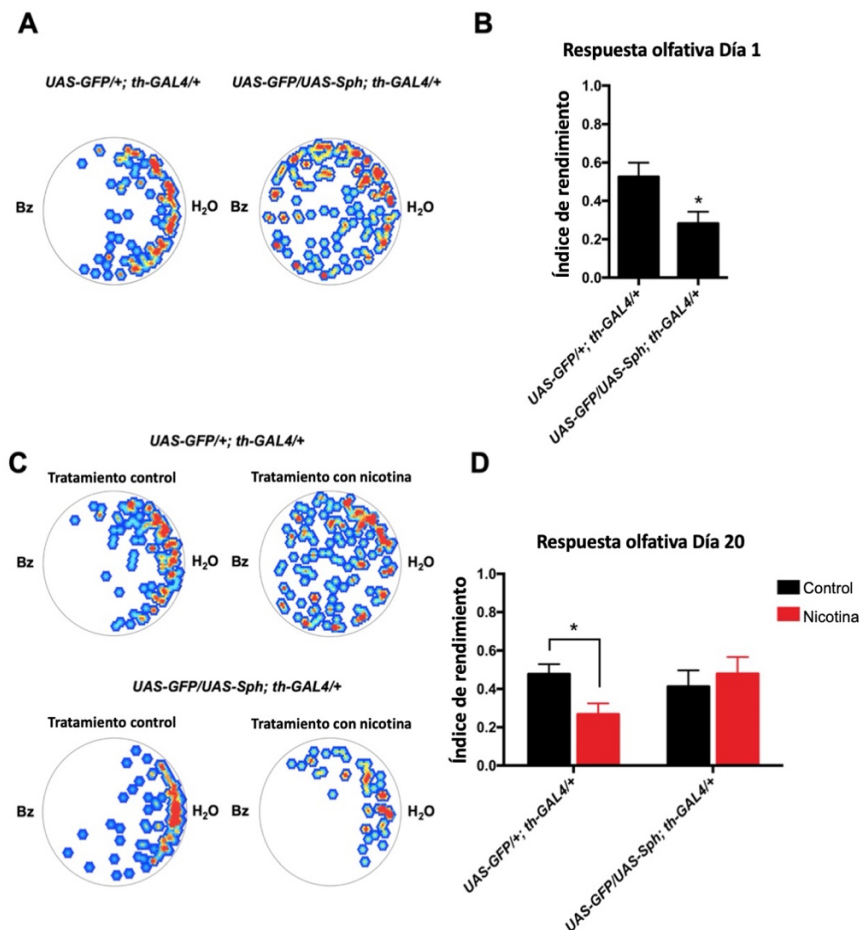


Fig. 14.- Moscas jóvenes que expresan *Sph-1* en las neuronas dopaminérgicas muestran alteraciones en la capacidad olfativa. **A)** Mapas de calor representativos donde se muestra la respuesta que tienen las moscas al Bz 1% al día 1. Los puntos rojos muestran donde paso el mayor tiempo la mosca, mientras que los azules la región donde menos tiempo pasa. **B)** Cuantificación de la conducta de las moscas estudiadas de cada genotipo al día 1. Los datos muestran que la respuesta aversiva al Bz se encuentra reducida en las moscas que expresan *Sph-1* en comparación con las moscas control. **C)** Mapas de calor representativos del día 20 de los tratamientos control o con nicotina. **D)** Cuantificación de la conducta de las moscas estudiadas de cada genotipo y tratamiento al día 20. Las moscas control tratadas con nicotina muestran una reducción de la capacidad olfativa en comparación con el tratamiento control. Se realizó ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Tukey. * $P < 0.05$, $n = 15$ animales por condición.

El tratamiento con nicotina previene la pérdida de neuronas dopaminérgicas en las moscas *Sph-1* envejecidas

El efecto de la nicotina sobre la sobrevivencia y la movilidad puede ser explicado por una modificación en algunos de los procesos metabólicos de las neuronas dopaminérgicas, principalmente por la sobrevivencia o mejoría en la función neuronal. Esto dió pie a explorar ambas posibilidades. En primera instancia se evaluó el número total de neuronas dopaminérgicas de los animales de ambos genotipos tanto con tratamiento con nicotina como sin él a lo largo del tiempo (Fig. 15A).

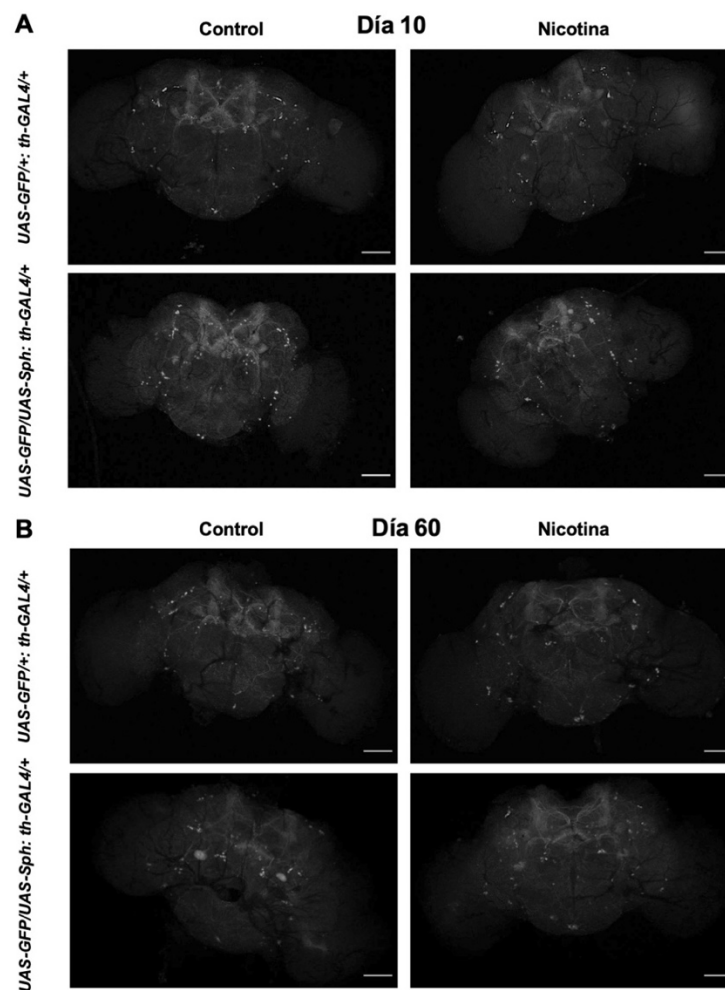


Fig. 15.- Imágenes de microscopía confocal representativas de cerebros de machos adultos de *Drosophila*. Para cuantificar el número total de neuronas dopaminérgicas se utilizó la expresión de GFP bajo el promotor de la *th*. **A)** Cerebros representativos de machos de 10 días de edad controles (panel superior) y que expresan *Sph-1* (panel inferior), las fotografías que corresponden a los tratamientos con nicotina se localizan a la derecha. No se observa ninguna diferencia entre el número de neuronas GFP+ entre las líneas o tratamientos. **B)** Cerebros representativos de machos de 60 días de edad con la misma distribución que en el inciso A. Se observa que existe una evidente reducción de las neuronas GFP+ entre los cerebros de las moscas control y los de la línea que expresa *Sph-1*, mientras que el tratamiento con nicotina reduce la muerte de estas neuronas en la línea de moscas experimental. Todas las imágenes se obtuvieron con los mismos parámetros. La barra de escala representa 100 μ m.

La cuantificación de las neuronas muestra que existe una reducción en el número de neuronas dopaminérgicas con el envejecimiento, en ambas líneas (**Fig. 1**). Aunque es importante recalcar que la reducción de las neuronas es más acelerada en las moscas que expresan Sph-1. Por el otro lado, el tratamiento con nicotina parece frenar esta pérdida neuronal acelerada de neuronas en comparación con las moscas no tratadas, siendo más evidente en edades más avanzadas (a partir del día 40). Los resultados de la evaluación de la sobrevivencia neuronal en moscas de 60 días de edad muestran una protección significativa, esto debido a que existe una menor señal de neuronas GFP positivas (**Fig. 15B**). Por su parte, la nicotina no parece tener ningún efecto relevante en las neuronas de las moscas control (**Fig. 15**)

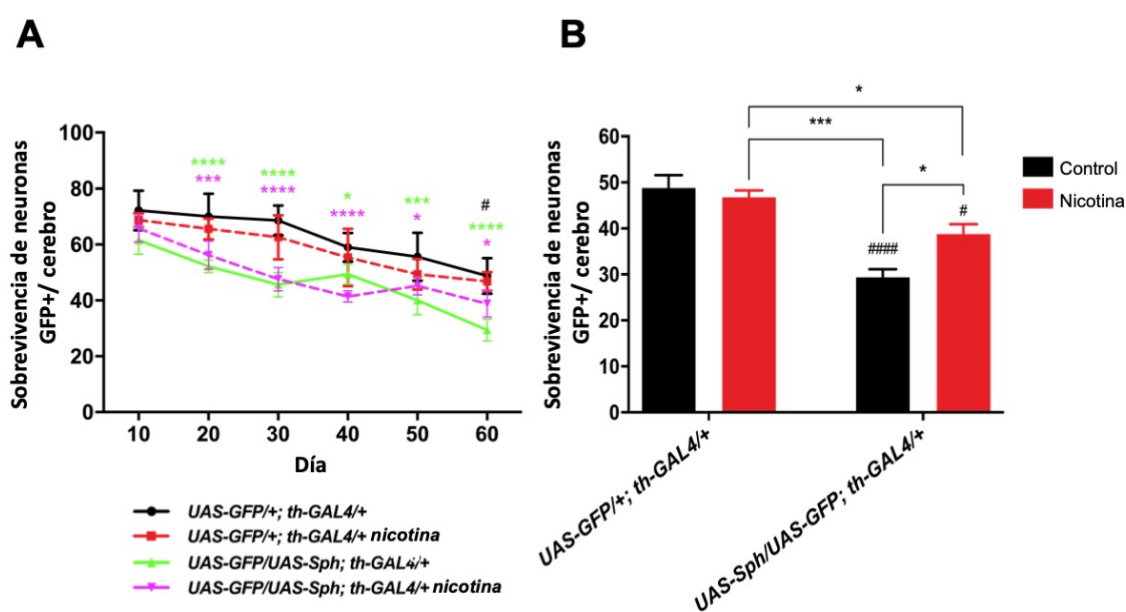


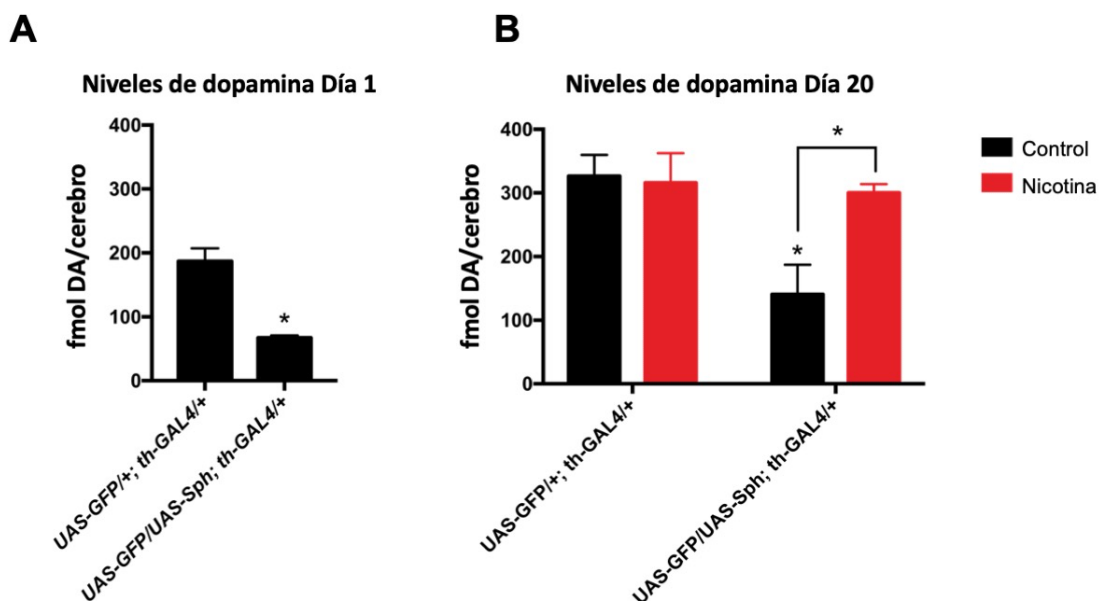
Fig. 15.- La nicotina reduce la pérdida del número de neuronas dopaminérgicas. A) La gráfica muestra la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la línea control (negra) y la línea experimental (verde) sin tratamiento, estos resultados muestran claramente como la expresión de Sph-1 afecta significativamente la sobrevivencia neuronal. Por otro lado, el tratamiento con nicotina en las moscas control parece no tener ningún efecto (roja), mientras que en la línea Sph-1 (magenta) se observa una menor diferencia en la pérdida de neuronas con respecto a la línea control, principalmente en edades avanzadas. **B)** Se muestra el número de neuronas sobrevivientes en el último punto estudiado (60 días). Por un lado, se puede observar cómo existe un menor número de neuronas en la línea Sph-1 sin tratamiento con respecto al control (#### p<0.0001) Por su parte, el tratamiento con nicotina confiere una evidente reducción en la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la línea Sph-1 en comparación con la línea control (# p<0.05) y en comparación con la línea Sph-1 sin tratamiento (*p<0.05). Se realizaron ANOVAS de dos vías seguido de una prueba post hoc de Tukey. n= 5 cerebros por genotipo en cada punto de la curva.

El tratamiento con nicotina incrementa los niveles de tirosina hidroxilasa y el contenido cerebral de dopamina

Una vez evaluado el efecto de la nicotina sobre el número de neuronas dopaminérgicas, se procedió a evaluar el efecto de esta molécula sobre el contenido total de dopamina en el cerebro. Por medio de HPLC se cuantificó la cantidad total de dopamina cerebral en muestras de moscas a

1 día de edad y a 20 días de edad, con y sin tratamiento crónico de nicotina. Estos resultados muestran que al día 1, la cantidad de dopamina presente en las muestras de moscas Sph-1 es significativamente menor con respecto a la línea control (**Fig. 16A**). Esta diferencia en el contenido de dopamina sigue siendo observable 20 días después. Interesantemente, las muestras de la línea Sph-1 tratadas con nicotina, muestran un aumento significativo en los niveles de dopamina con respecto a su tratamiento control mientras que en la línea control no se observa efecto alguno (**Fig. 16B**)

Consistentemente con la reducción de dopamina en el cerebro de las moscas del día 1 que expresan Sph-1, se observó una expresión menor de la th con respecto a la línea control (**Fig. 16C**). De igual forma, las moscas Sph-1 envejecidas muestran una reducción en la th. Sin embargo, el tratamiento con nicotina recupera parcialmente la deficiencia en los niveles de esta proteína en las moscas de esta línea con respecto a la línea control (**Fig. 16D**). Los resultados obtenidos tanto de la cuantificación de la dopamina, como de la cuantificación de los niveles de expresión de la enzima limitante en la síntesis de este neurotransmisor muestran que el tratamiento con nicotina promueve una recuperación de los niveles de dopamina en el cerebro de las moscas parkinsonianas y que este fenómeno se puede explicar parcialmente por un aumento en los niveles de la th.



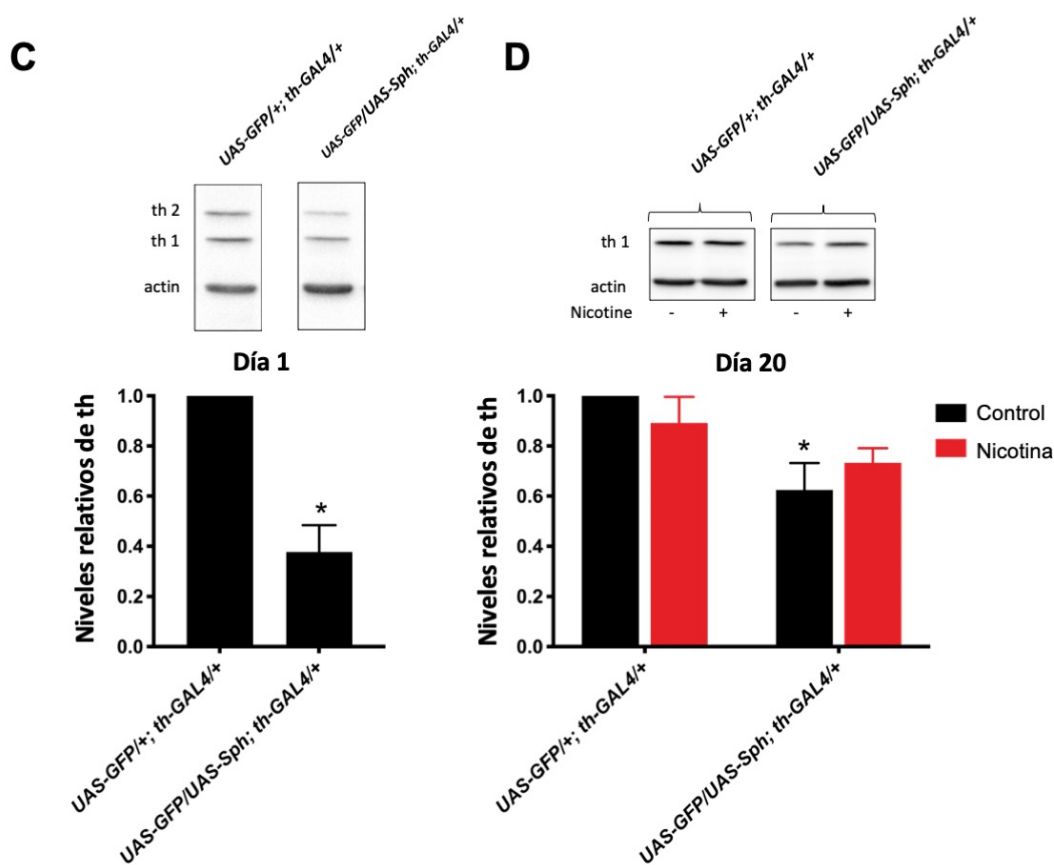


Fig. 16.- La exposición a nicotina incrementa los niveles de dopamina y tirosina hidroxilasa cerebral en moscas. A) Las moscas de 1 día de edad que expresan Sph-1 muestran una reducción en los niveles de dopamina con respecto a la línea control (* $p < 0.05$, prueba t). **B)** A los 20 días de envejecimiento, los niveles de dopamina continúan reducidos en la línea Sph-1 con respecto al control (# $p < 0.05$). Después de 20 días, el tratamiento crónico con nicotina induce un aumento en los niveles de dopamina cerebral en las moscas que expresan Sph-1 (* $p < 0.05$), estos niveles son similares a los niveles de la condición control. Los niveles de dopamina de los animales control tratados con nicotina no se ven afectados. Se realizaron ANOVAS de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Tukey. $n = 5$ muestras, cada muestra consistía en 5 cerebros de mosca. **C)** Al día 1 los niveles de la isoforma 1 de la th (isoforma neuronal) están reducidos en la línea Sph-1 con respecto al control. Se muestra la señal obtenida del western blot representativo. * $p < 0.05$; prueba t $n = 3$ diferentes muestras obtenidas de grupos independientes de animales. **D)** Al día 20 los niveles de th continúan reducidos en las moscas que expresan Sph-1 con respecto a las moscas control. Por su parte el tratamiento con nicotina promueve un incremento de la th a niveles similares al grupo control. Se realizaron ANOVAS de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Tukey. $n = 3$ diferentes muestras obtenidas de grupos independientes de animales.

La nicotina promueve un incremento en la sobrevivencia de las moscas Sph-1 inclusive cuando el tratamiento se interrumpe en la edad adulta o cuando la nicotina se administra a animales envejecidos.

Finalmente, para esta parte de la tesis, se decidió determinar si la nicotina tiene un efecto duradero incluso si el tratamiento se suspende cuando las moscas envejecen. También si el inicio del tratamiento con nicotina en animales envejecidos sigue siendo eficaz para promover la sobrevivencia de las moscas. Determinamos que la vida media de los animales que expresan Sph-1 es de 60 días (**Fig. 17A**). A esta edad, los fenotipos parkinsonianos son evidentes y hay una disminución importante en el número de neuronas dopaminérgicas como ya se mencionó

previamente. Para determinar si la nicotina tiene un efecto duradero incluso si se suspende el tratamiento, se trató crónicamente con nicotina a las moscas que expresan Sph-1 durante 60 días y luego se suspendió el tratamiento. En esta condición, se observó una prolongación significativa de la vida en comparación con los animales que no fueron alimentados con nicotina (**Fig. 17A, B**). Curiosamente, los animales que no fueron tratados con nicotina durante los primeros 60 días de su vida y luego recibieron nicotina también tuvieron una extensión significativa de su vida (**Fig. 17C, D**). Estos resultados indican que, en el genotipo de EP, la nicotina tiene un efecto benéfico sobre la supervivencia incluso cuando el fármaco se administra a una edad más avanzada; es decir, cuando los síntomas parkinsonianos ya son evidentes. Es importante destacar que este efecto parece ser muy específico, ya que la suspensión del tratamiento con nicotina reduce ligeramente la supervivencia de las moscas.

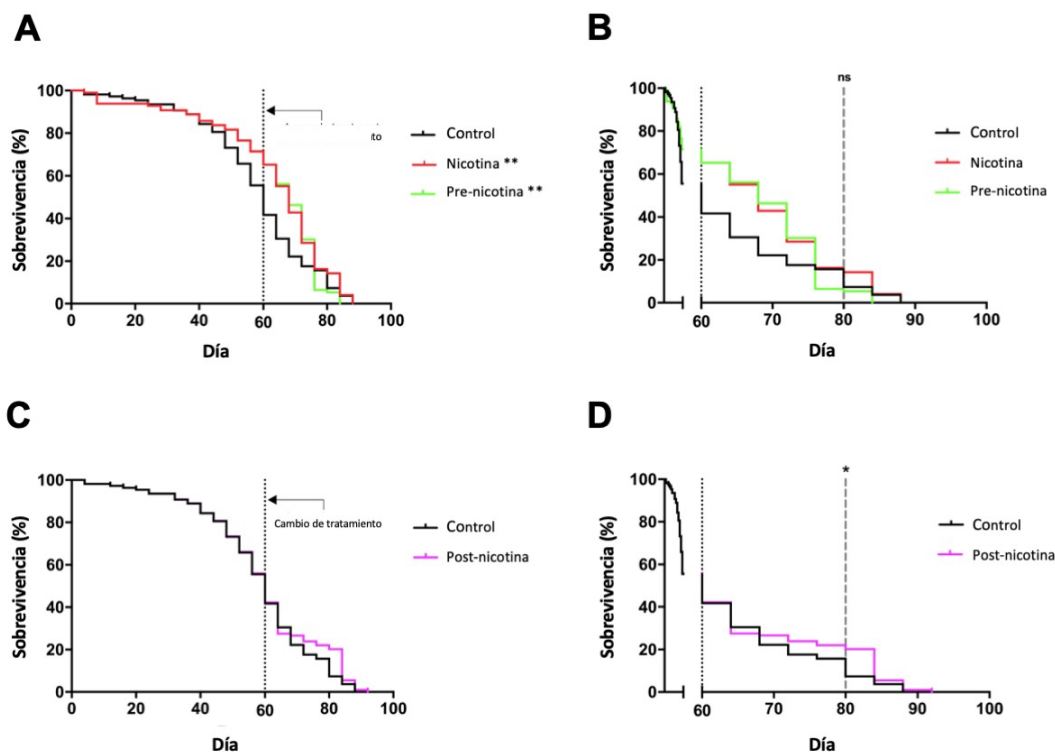


Fig. 17.- El tratamiento con nicotina en etapas avanzadas de la vida aumenta la supervivencia en moscas envejecidas que expresan Sph-1. El 50% de la población de moscas que expresan Sph-1 en neuronas dopaminérgicas muere cuando tienen 60 días de edad, por lo que se decidió como el punto en donde se cambiaría el tratamiento. **A)** Las moscas que fueron tratadas durante 60 días con nicotina (y luego transferidas a alimentos normal por el resto de su vida), tuvieron una supervivencia significativamente más larga en comparación con los animales no tratados. Se puede observar una ligera reducción en la supervivencia de estas moscas en comparación con los animales que fueron tratados crónicamente con nicotina durante toda su vida (80 días), sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa entre estos dos grupos. **B)** Se muestra una ampliación de los datos mostrados en el panel A después de los 60 días para observar mejor los efectos tardíos en la supervivencia. **C)** Los animales no tratados con nicotina y con inicio de tratamiento a los 60 días muestran un aumento significativo en la supervivencia en comparación con los no tratados 20 días después del inicio del tratamiento (80 días). **D)** Ampliación de los datos que se muestran en el panel C. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba Mantel-Cox. ** $P < 0.01$, $n = 100$ animales por condición. Para la comparación en el punto de 80 días se realizaron pruebas exactas de Fisher (* $p < 0.05$, ns = no significativo).

La afectación del sistema serotoninérgico no tiene efecto significativo sobre la supervivencia de las moscas mientras que el sistema dopaminérgico resulta determinante para su reducción al expresar Sph-1.

Los datos de supervivencia obtenidos previamente demuestran que la expresión de Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas promueve una disminución de la supervivencia de las moscas y que esta es rescatada con el tratamiento de nicotina. Se procedió a evaluar si al afectar el circuito serotoninérgico con la expresión de Sph-1, se observaba un fenotipo similar. Para estos experimentos se usó el promotor de la enzima trh para promover la expresión de Sph-1 en neuronas serotoninérgicas (*UAS-Sph/+; trh-GAL4/+*). Además, se utilizó otra mosca cuya expresión de Sph-1 se logró usando el promotor de la ddc, enzima que esta involucrada tanto en la síntesis de serotonina como de dopamina, para de esta manera afectar ambos circuitos neuronales (*UAS-Sph/+; ddc-GAL4/+*). Adicionalmente se usó de nueva cuenta una mosca con expresión de Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas (*UAS-Sph/+; th-GAL4/+*) pero esta vez sin la expresión de GFP. La línea *UAS* cruzada con el fondo genético *w¹¹¹⁸* fue usada como control (*UAS-Sph/+; +*).

Se administró nuevamente la concentración de 24 μ M de nicotina en la comida de las moscas y se evaluó el efecto del tratamiento crónico. En primer lugar, podemos observar nuevamente cómo la nicotina tiene un efecto negativo en las moscas sin predisposición genética al fenotipo parkinsoniano (**Fig. 18A**). Por otro lado, cuando se afecta el sistema dopaminérgico, la nicotina sigue teniendo un efecto protector en la supervivencia (**Fig. 18B**). Sin embargo, en aquellas moscas que expresan Sph-1 en las neuronas serotoninérgicas no se observa este efecto tan marcado, aunque al igual que en las moscas que expresan Sph-1 en ambos circuitos se observa una protección en la supervivencia sobre todo en las últimas etapas de la vida de la mosca (día 80 y día 60 respectivamente) (**Fig. 18C, D**). Estos resultados nos indican que la afectación del sistema dopaminérgico es lo que resulta tener un papel determinante en la reducción de la supervivencia ocasionada por la expresión de Sph-1.

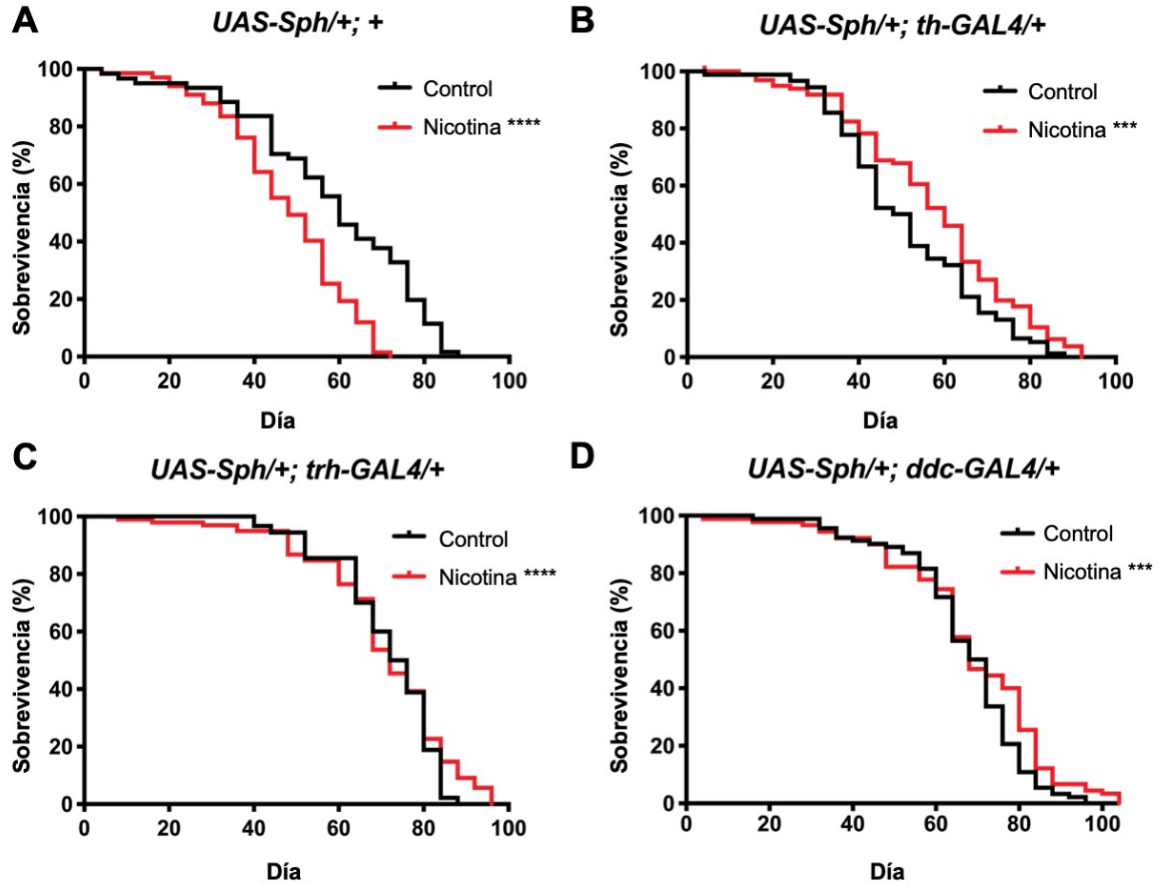


Fig. 18.- El sistema dopaminérgico tiene un papel importante en la protección conferida por la nicotina, así cómo en la reducción de la supervivencia de las moscas. A) La esperanza de vida en los animales control (las que no expresan Sph-1) se reduce cuando son tratadas con nicotina 24 μ M. B) Las moscas que expresan Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas tienen una esperanza de vida que se rescata con el tratamiento con nicotina. C) Cuando se afecta el sistema serotoninérgico, la nicotina no parece tener un efecto tan dramático, sin embargo, otorga un aumento en la supervivencia sobre todo en edades avanzadas (80 días). D) Cuando la expresión de Sph-1 se dirige a ambos circuitos, la nicotina promueve un efecto protector en la supervivencia, sobre todo en edades avanzadas (día 60), probablemente por la afectación al sistema dopaminérgico principalmente. Para el análisis estadístico se usó la prueba de Mantel-Cox. Los asteriscos muestran la significancia entre el tratamiento control (negra) y el tratamiento con nicotina (roja). *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$, $n=100$ animales por grupo.

El sistema serotoninérgico tiene mayor relevancia en la disfunción olfativa en moscas jóvenes ocasionada por la expresión de Sph-1.

Como bien se mencionó antes, el estudio de síntomas no motores asociados a la EP resulta ser de importante interés debido a que podrían ser usados como marcadores tempranos de la enfermedad. Uno de los síntomas que han tomado relevancia en este aspecto es la discapacidad olfativa. En los resultados previos ya se demostró que la expresión de Sph-1 en neuronas dopaminérgicas, promueve un efecto negativo sobre la capacidad olfativa de las moscas en edades jóvenes. Los resultados demuestran que al evaluar moscas de un día edad, las moscas que expresan

Sph-1 en las neuronas serotoninérgicas, así como las que la expresan en ambos sistemas resultan ser las más afectadas (**Fig. 19A y B**). Por su parte, las moscas que expresan Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas también muestran una afectación, aunque significativamente menor con respecto al control. Algunos otros datos que nos da el experimento con el Buritrack, como son la actividad, la distancia y la velocidad, nos permiten observar que esta pérdida de la capacidad olfativa no se debe a una disminución en el movimiento. Los resultados indican que existe un aumento significativo con respecto al control en estos tres parámetros en las líneas en que se les afecta el sistema serotoninérgico, es decir las que expresan Sph-1 bajo el promotor de *trh* y *ddc* (**Fig. 19C**). Con estos resultados podemos concluir que la disfunción olfativa ocasionada por la expresión de Sph-1 tiene un componente importante en el circuito serotoninérgico principalmente.

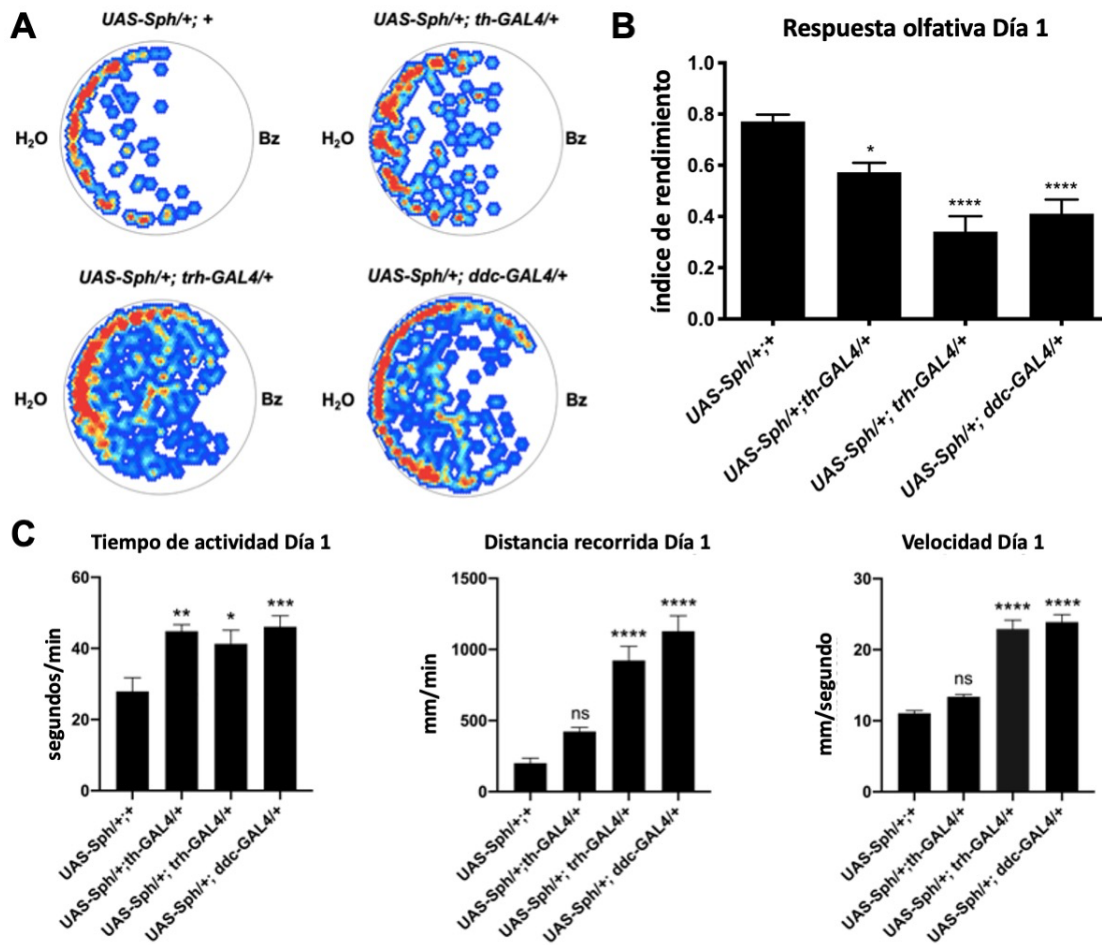


Fig. 19.- Moscas jóvenes que expresan Sph-1 en el sistema dopaminérgico y/o serotoninérgico muestran alteraciones en la capacidad olfativa. A) Mapas de calor representativos donde se muestran la respuesta que tienen las moscas al Bz 1% al día 1. Los puntos rojos muestran donde paso el mayor tiempo la mosca, mientras que los azules la región donde menos tiempo pasa. **B)** Cuantificación de la conducta de las moscas estudiadas de cada genotipo al día 1. Los datos muestran que la respuesta aversiva al Bz se encuentra reducida en las moscas que expresan Sph-1 en uno o ambos sistemas neuronales en comparación con las moscas control. **C)** Los parámetros de actividad, distancia y velocidad, indican que la disminución de la capacidad olfativa de las moscas con afectación serotoninérgica, no se debe a una disminución en su movilidad. Se realizó ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Tukey. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 n=20 animales por condición.

El desarrollo de síntomas motores ocasionados por la expresión de Sph-1 está directamente relacionado con el sistema dopaminérgico

Los síntomas motores son característicos de la EP por lo que es muy importante el evaluar esta conducta en nuestros modelos de expresión de Sph-1. En esta ocasión se decidió evaluar solamente la geotaxis negativa, esto por ser uno de los principales fenotipos evaluados en las disfunciones motoras y porque es más evidente al momento de evaluar la pérdida de la locomoción en las moscas. Los resultados muestran que en el día 1 (**Fig. 20A**), todas las líneas evaluadas parecen tener una hiperactividad, lo que también permite hablar de una pérdida de la correcta regulación de la comunicación neuronal tanto en el circuito dopaminérgico como en el serotoninérgico; como ya se mencionó esto también se observa en algunos parámetros obtenidos con los experimentos con el paradigma de Buridan (**Fig. 20C**). Por otro lado, al evaluar el efecto del tratamiento con nicotina en la movilidad, los resultados de la geotaxis negativa al día 40, indican claramente que la manipulación del circuito dopaminérgico produce la pérdida de la capacidad de escalamiento (**Fig. 20B**). Interesantemente se puede observar que las moscas en las que se afecta el sistema serotoninérgico no presentan una locomoción afectada y que inclusive la nicotina también confiere un efecto tóxico al igual que la línea control (**Fig. 20B**).

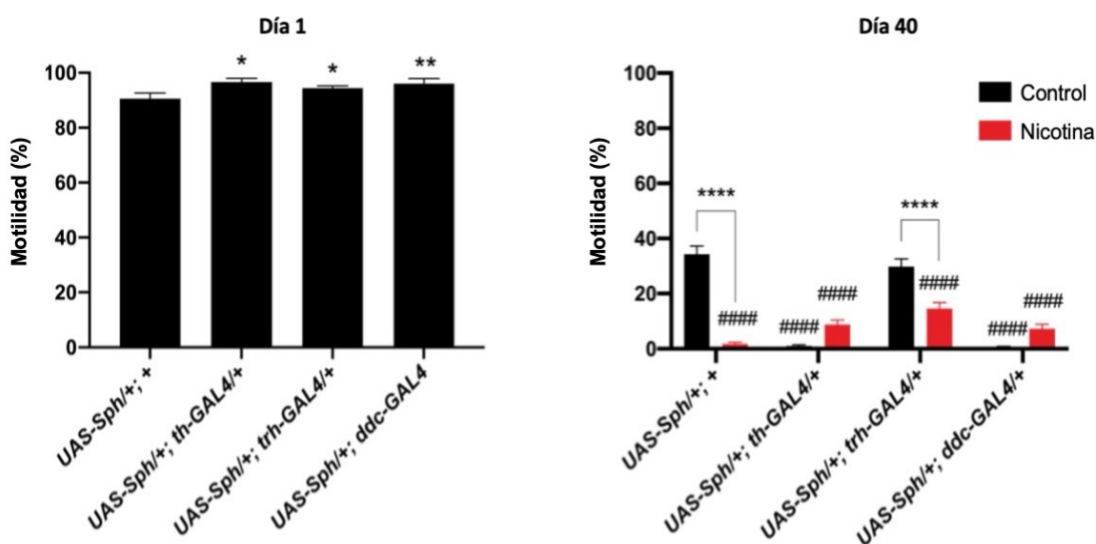


Fig. 20.- Los circuitos serotoninérgico y dopaminérgico parecen involucrados en actividades motoras en edades tempranas, mientras que la pérdida de la locomoción en edades avanzadas solo se logra al manipular el circuito dopaminérgico. A) La geotaxis negativa de las líneas que expresan Sph-1 muestran una hiperactividad en el día 1. **B)** El tratamiento crónico con nicotina después de 40 días, aumenta la pérdida de la capacidad de escalamiento en las moscas que expresan Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas como en la línea control. Se puede observar como las moscas que tienen alterado el sistema dopaminérgico (th y ddc), la movilidad se ve reducida, inclusive a 0, la nicotina parece tener un efecto benéfico en la movilidad, aunque no estadísticamente significativa. Se realizó ANOVA de dos vías seguidas por una prueba post-hoc de Tukey post-hoc. En los experimentos de geotaxis negativa n= 40, en los del paradigma de Buridán n=20 * indica p<0.05; ** indica p<0.01; *** indica p>0.001 ****indica p<0.0001 ns= no significativo #### indica p<0.001 en comparación con el control.

Las moscas que expresan Sph-1 en el sistema serotoninérgico y/o dopaminérgico muestran alteraciones en el sistema visual

El modelo del ojo se ha utilizado como un buen modelo de neurodegeneración, por lo que la evaluación de la funcionalidad del sistema visual nos permite conocer por un lado si existen alteraciones a nivel neuronal y por el otro de que manera la expresión de Sph-1 afecta la visión de las moscas al expresar una proteína relacionado con la EP, esto debido a que se sabe que la mayoría de pacientes de la EP, muestran alguna alteración en la capacidad visual (*Sang & Jackson, 2005*). Por medio de electroretinogramas se evaluó la funcionalidad del sistema visual de moscas. Se midieron 3 componentes cuya modificación es indicativa de una alteración a nivel visual, on, off y potencial de receptor, ya que son el indicativo de que existe una correcta captación, transmisión y recuperación ante un estímulo luminoso. Estos registros se realizaron al día 1 y al día 40 con y sin tratamiento con nicotina (**Fig. 21**).

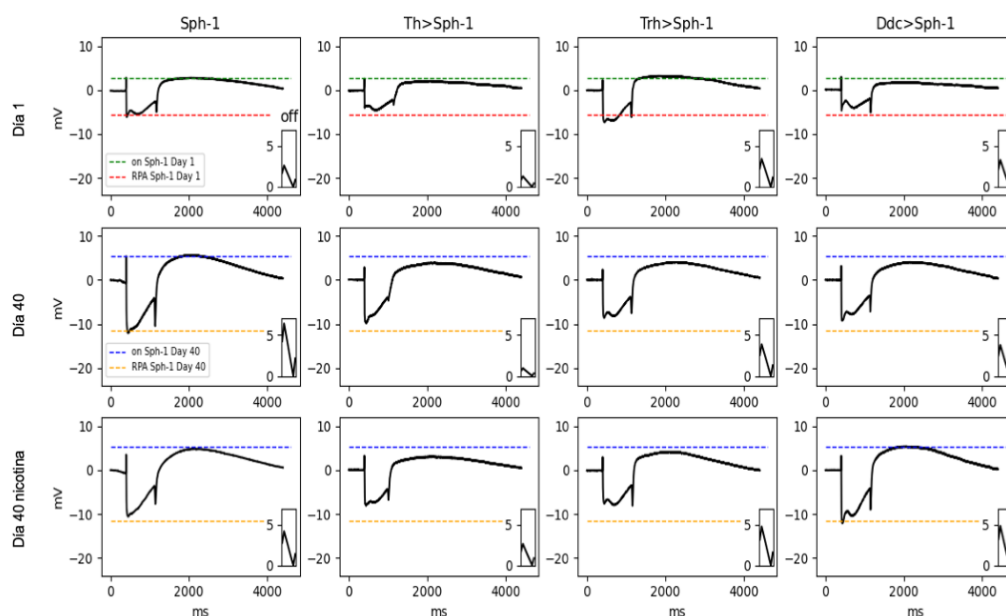


Fig. 21.- Registros electrofisiológicos de la retina obtenidos al evaluar la capacidad visual de las moscas que expresan Sph-1. Estos análisis se realizaron al día 1 y al día 40 con y sin tratamiento con nicotina, se observa como existen diferencias en la forma de estos registros que son traducidos a alteraciones en el sistema visual. Principalmente se evaluó el componente ON (línea verde día 1, línea azul día 40), OFF (recuadro inferior derecha) y el potencial de receptor (línea roja día 1, línea amarilla día 40). Se observa que existen alteraciones del componente OFF principalmente en edades tempranas cuando se alteran los circuitos neuronales con la expresión de Sph-1 (paneles superiores). 40 días después la respuesta en este componente sigue viéndose marcada (paneles medios) mientras que las moscas que recibieron el tratamiento con nicotina tienen una mejor respuesta al estímulo (paneles inferiores). Tanto el componente ON como el PR también se ven alterados cuando se expresa Sph-1 lo que nos habla de una mala respuesta visual ocasionada por la alteración del circuito dopaminérgico y serotoninérgico.

Los resultados obtenidos al evaluar los parámetros de los registros electrofisiológicos muestran que al día 1, las moscas que expresan Sph-1, muestran alteraciones en el sistema visual, tanto cuando se afecta el circuito dopaminérgico como cuando se afecta el serotoninérgico. Cuarenta

días después las moscas que expresan Sph-1 con tratamiento control continúan afectadas en sus parámetros electrofisiológicos, principalmente en el componente ON. Por otro lado, la nicotina parece no tener un efecto tan dramático como en los otros fenotipos parkinsonianos, aunque cabe señalar que rescata principalmente las afectaciones en el parámetro OFF. De manera notable y al igual que el resto de los fenotipos evaluados, la nicotina continúa siendo tóxica en la mosca control (Fig. 22).

Estos datos muestran que existe una alteración visual mas marcada cuando se modifica el sistema dopaminérgico, sobre todo en edades avanzadas, tanto en las moscas que expresan Sph-1 bajo el promotor de *th* como en el de *ddc*. Es interesante observar que estas alteraciones visuales se ven también mas afectadas en edades jóvenes cuando se afecta el sistema serotoninérgico. Esto nos permite hablar de una posible interacción de ambos circuitos, ya que la afectación temprana del sistema serotoninérgico conlleva a que, a largo plazo, el sistema dopaminérgico se vea afectado, apoyando la hipótesis de que la serotonina podría ser una de las principales desencadenantes de los fenotipos no motores en la EP.

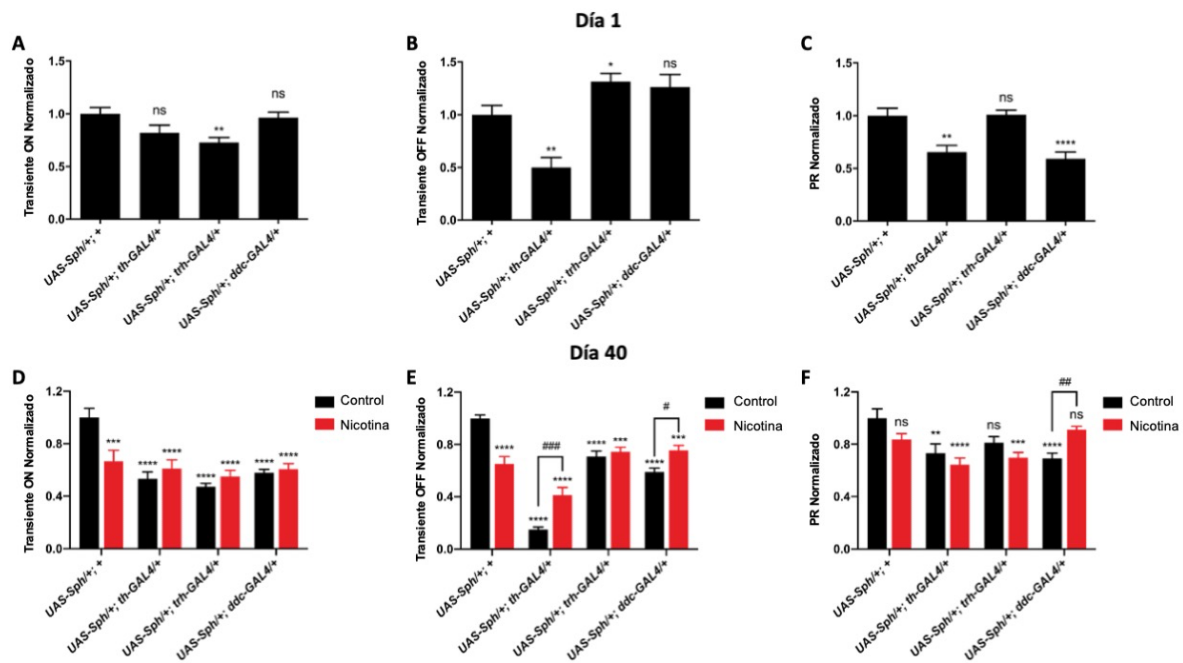


Fig. 22.- Las moscas que expresan Sph-1 en el sistema serotoninérgico y dopaminérgico muestran alteraciones visuales. Se puede observar cómo existen alteraciones visuales presentes desde el día 1 en todas las líneas que expresan Sph-1 (paneles superiores). Al evaluar las moscas al día 40 (paneles inferiores), se sigue observando la alteración del sistema visual en todas las líneas con respecto al control. Por su parte, el tratamiento con nicotina rescata principalmente el parámetro OFF, siendo más significativo en las moscas que tienen afectación en el sistema dopaminérgico (*th* y *ddc*). ANOVAS de dos vías seguidas de prueba post-hoc de Tukey. n= 20 moscas por condición experimental. * $p > 0.05$ ** $p > 0.01$ *** $p > 0.001$ **** $p > 0.0001$ # $p > 0.05$, ## $p > 0.01$, ### $p > 0.001$ ns= no significativo. “**” muestran significancia respectó al tratamiento sin nicotina de la línea control. “#” muestran significancia entre el tratamiento control y el tratamiento con nicotina en la misma línea. Estos resultados fueron obtenidos por el Dr. Iván Sánchez y el M. en C. René Hernández, posteriormente fueron procesados por el Lic. Diego Zambrano y analizados por el M. en C. Angel Carvajal.

Los niveles de las enzimas limitantes en la síntesis de dopamina y serotonina parecen estar alterados por la expresión de Sph-1

Anteriormente se describió la reducción que existe en los niveles de la th en las moscas que expresan Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas, por lo que medir los niveles de la th resulta importante para poder interpretar mejor los datos. Resultados preliminares con n=1 o 2, sugieren que, al día 1, los niveles de th se encuentran reducidos en las moscas que expresan Sph-1 con respecto al control, pero también en las moscas en donde la expresión ocurre en las neuronas serotoninérgicas. Por su parte, la th no tiene cambios en los en sus niveles. Al día 40, los experimentos tipo western blot muestran que la th continúa disminuida en las moscas que expresan Sph-1 específicamente en las neuronas dopaminérgicas aumentando cuando se administra nicotina (**Figura 23**). Interesantemente también se encuentran disminuidos los niveles de la th en las moscas que expresan Sph-1 tanto en neuronas dopaminérgicas como en serotoninérgicas con tratamiento control, mientras que el tratamiento con nicotina parece no tener ningún efecto (**Figura 24**). Esto resulta bastante interesante, ya que nos indica que existe una desregulación y posible comunicación de ambos sistemas. La serotonina estaría en niveles elevados promoviendo a su vez la reducción de dopamina, o viceversa. De cualquier forma, esto es un importante indicativo de que ambos sistemas son importantes para la aparición y el desarrollo de los síntomas típicos de la EP en el modelo de mosca.

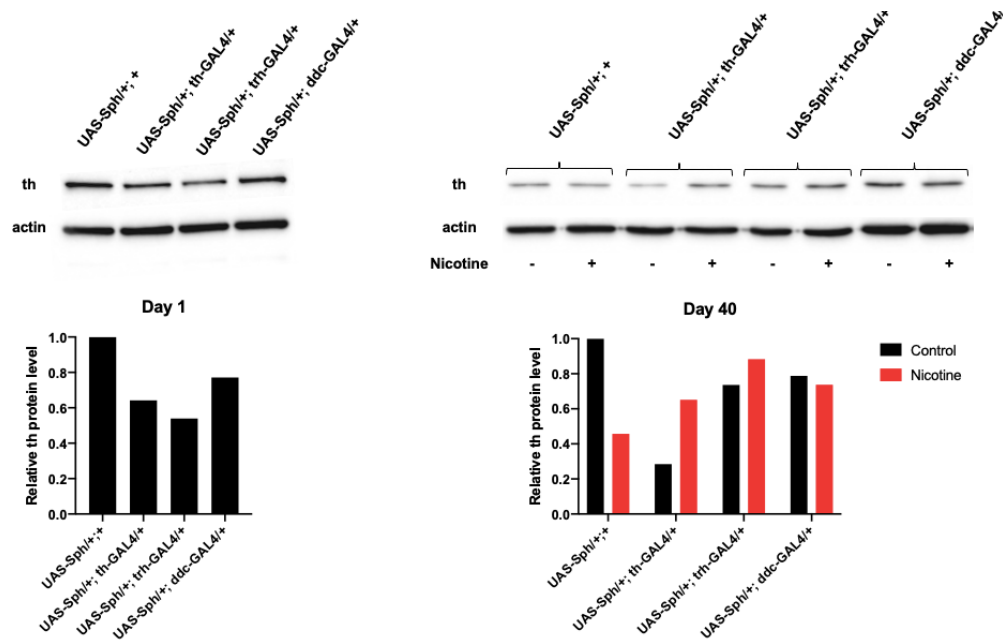


Fig. 23.- La alteración del sistema serotoninérgico y/o dopaminérgico disminuye los niveles de la tirosina hidroxilasa. Los resultados preliminares de una n de 1 muestran que probablemente existe una reducción de la th inclusive cuando no se afecta directamente al circuito dopaminérgico. Por su parte, al día 40, la nicotina parece rescatar esta reducción, principalmente en las moscas que expresan Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas, mientras que en el control reduce los niveles. n=1

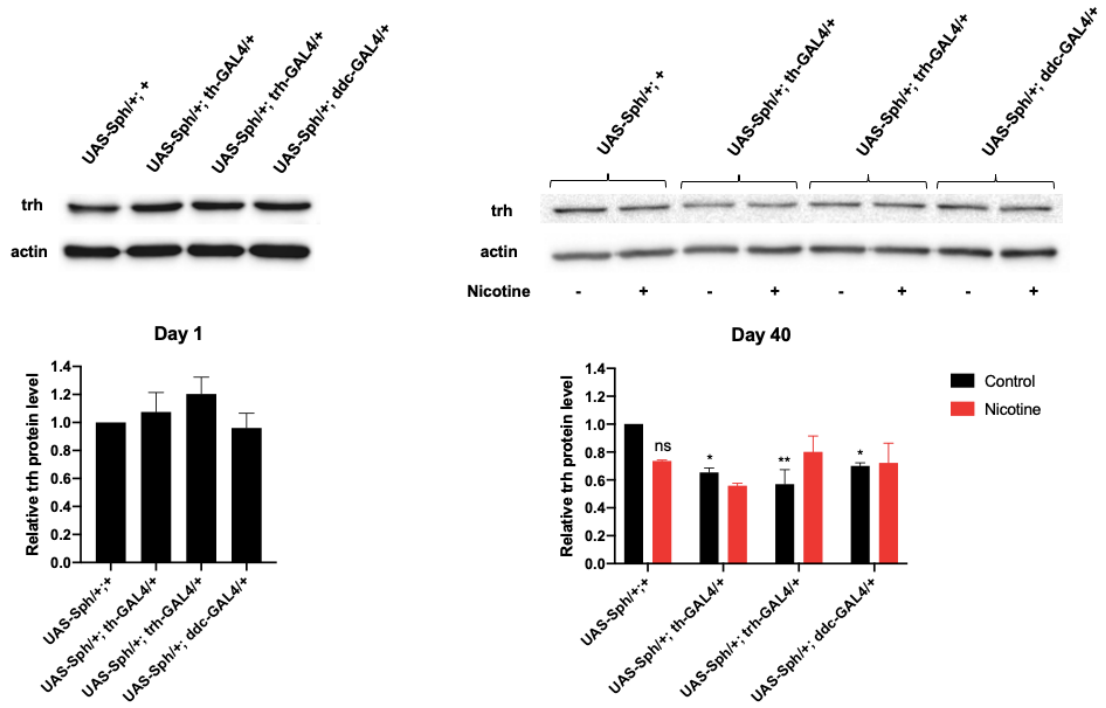


Fig. 24.- La alteración de sistema serotoninérgico y/o dopaminérgico disminuye los niveles de la triptófano hidroxilasa. Los resultados preliminares de una n de 2 muestran que probablemente existe una reducción de la trh inclusive cuando no se afecta directamente al circuito serotoninérgico. Por su parte, al día 40, la nicotina parece no tener efecto alguno en los niveles de esta proteína, en el control la nicotina parece tener una tendencia a reducir los niveles de esta enzima. n=2 ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Tuckey. *p>0.05 **p>0.1 ns= no significativo

11. - DISCUSIÓN

La EP es una enfermedad neurodegenerativa que tiene una etiología multifactorial. Investigaciones anteriores han encontrado evidencia de factores genéticos y ambientales que desencadenan o modulan su progresión. Es importante destacar que solo el 10% de los casos estudiados tienen causas genéticas bien definidas mientras que el resto se considera esporádico (*de Lau, L. Breteler, 2013*). Se sabe que α -sinucleína y sinfilina-1 tienen un papel central en la progresión de la EP (*Eyal & Engelender, 2006; Kalia et al., 2013; Spillantini et al., 1998*). Estas proteínas parecen estar asociadas a diferentes funciones celulares, en particular al ensamblaje o reciclaje de vesículas presinápticas. Es probable que la investigación sobre los procesos que transforman la Sph-1 en una proteína tóxica sea fundamental para nuestra comprensión de la EP y cómo el metabolismo neuronal contribuye a esta enfermedad (*Engelender et al., 1999; Eyal et al., 2006; Ribeiro et al., 2002; Wan & Chung, 2012*).

Existe un número limitado de reportes sobre el papel de Sph-1 en la progresión de la EP. Existe evidencia de que las isoformas cortas de Sph-1 se acumulan en muestras post mortem de pacientes con la enfermedad. Estudios *in vitro* muestran que las isoforma cortas de Sph-1 promueven la agregación de proteínas y la toxicidad (*Eyal et al., 2006; Eyal & Engelender, 2006*). Otros estudios apoyan que la sobreexpresión de Sph-1 o la presencia de la mutación R621C en el gen que codifica esta proteína, provocan deterioro motor y daño celular en pacientes con EP y en un modelo de ratones transgénicos (*Nuber et al., 2010*). Un trabajo previo de del laboratorio del Dr. Reynaud demostró que las moscas que expresan panneuralmente Sph-1, presentan alteraciones motoras (*Hernández-Vargas et al., 2011*), lo cual es consistente con todos los resultados obtenidos en este trabajo. Estos datos son consistentes con la hipótesis de que las moscas que exhiben niveles reducidos de dopamina en el cerebro también presentan deterioro en su capacidad de escalamiento. Los resultados muestran alteraciones en la actividad espontánea y la geotaxis negativa, resultados que son similares a los obtenidos por otros reportes que demuestran que las moscas que expresan genes asociados con la EP exhiben varios fenotipos motores y conductuales como el centrofobismo, la bradicinesia y la reducción en la distancia total recorrida (*Hernández-Vargas et al., 2011; Jimenez-Del-Rio et al., 2010; Riemensperger et al., 2011*). Aunque la mayoría de las investigaciones sobre la EP se centran en la neurodegeneración y los síntomas motores, existen muchos otros síntomas no motores que aparecen al principio de la enfermedad que están asociados a procesos sensoriales como el olfato y la vista o bien que implican otras manifestaciones como problemas gastrointestinales y depresión. Estos síntomas no motores tienen un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes (*Pfeiffer, 2016; Poewe, 2008; Tibar et al., 2018*), y son relevantes porque se consideran

marcadores tempranos de la EP. Sorprendentemente, los resultados de este trabajo muestran que en moscas jóvenes que expresan Sph-1 es posible observar un síntoma no motor muy característico, la disfunción olfativa, antes del inicio de las discapacidades motoras. Por lo tanto, el modelo de Sph-1 comparte este fenotipo característico con otros modelos animales de la enfermedad (por ejemplo, las moscas mutantes Pink1) (*Molina-Mateo et al., 2017*), y brinda una excelente oportunidad para evaluar el efecto de posibles moléculas terapéuticas en etapas tempranas de la progresión de la EP.

La nicotina es una molécula de interés notable, ya que es de accesibilidad fácil y dadas sus propiedades excitatorias es capaz de inducir la activación neuronal; a pesar de que tiene varios efectos secundarios negativos. La nicotina es una sustancia química que ya consume una gran parte de la población mundial y que parece tener propiedades preventivas para la EP. De hecho, se ha propuesto que las personas con riesgo parkinsoniano probablemente descubran empíricamente que la nicotina suprime los temblores de inicio temprano y comiencen a automedicarse con tabaco, previniendo o retrasando la aparición de esta enfermedad (*Hernán et al., 2002; Ma et al., 2017*). Por otro lado, se han observado efectos protectores similares en modelos de mamíferos en los que la nicotina suprime las discinesias. Por lo anterior, la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos protectores o preventivos de la nicotina, es una importante vía de investigación donde el uso de modelos animales y modelos in vitro podría ser muy útil (*Bordia et al., 2010; Chambers et al., 2013; Lu et al., 2017; Mouhape et al., 2019; Quik, O'Neill, et al., 2007; Ross & Petrovitch, 2001*). Dentó de esto, el modelo de la expresión de Sph-1 podría resultar interesante para la investigación de la EP y el papel de la nicotina como agente protector.

El tratamiento crónico con nicotina fue eficaz para reducir los fenotipos parkinsonianos motores causados por la expresión de Sph-1 y redujo la pérdida de neuronas dopaminérgicas. El aumento de los niveles de dopamina en los cerebros de las moscas Sph-1 20 días después de la exposición a la nicotina sugiere que el efecto protector de este fármaco se produce mediante la estimulación de la síntesis y/o disminución de la degradación de la dopamina. Las propiedades de activación neuronal de la nicotina pueden promover un metabolismo neuronal más saludable ya que está, aumenta directamente la homeostasis de la dopamina. Informes anteriores han demostrado que la nicotina estimula directamente la liberación de dopamina a través de la activación de los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico presentes en las neuronas dopaminérgicas, reduciendo las concentraciones de dopamina citoplásmica. Se sabe que el efecto protector de la nicotina mayormente está mediado por la activación de estos receptores, ya que este es inhibido por la mecamelamina, bloqueador específico de estos receptores (*Mouhape et al., 2019*). Reducir los

niveles intracelulares de dopamina por la estimulación con nicotina pudiera reducir el estrés oxidativo y, por lo tanto, disminuir la producción de metabolitos de degradación de la dopamina, como las quinonas, que se sabe son tóxicas. De esta manera, el entorno intracelular se volvería menos agresivo y las proteínas que están enriquecidas en los cuerpos de Lewy, como Sph-1 y α -Syn, se volverían menos propensas a agregarse. Así, las proteínas no agregadas son incapaces de secuestrar otras proteínas como la th, por lo que podrían seguir desempeñando sus función normal, como la interacción con el complejo SNARE, manteniendo así la capacidad de las neuronas dopaminérgicas para producir y liberar dopamina incluso en un entorno genético que predispone a la EP (Hong et al., 2009; Kardani et al., 2017; Nakashima & Ikuta, 1984). El aumento de los niveles de dopamina en el cerebro puede explicarse por la síntesis de *nov* de la amina, ya que la enzima th exhibe una inhibición por parte de la catecolamina. La reducción de los niveles intracelulares de dopamina podría dar como resultado una menor inhibición de la enzima y, por lo tanto, una mayor actividad de esta. La dopamina recién sintetizada se transporta rápidamente a las vesículas presinápticas por VMAT2, para después ser secretada después de la estimulación con nicotina, posteriormente se recicla rápidamente mediante DAT, lo que lleva a un aumento neto en el contenido de dopamina (Daubner et al., 2011) (Fig. 26).

Aunque la concentración de nicotina utilizada en este estudio puede parecer superficialmente alta, está en el rango más bajo de las concentraciones utilizadas en otros modelos animales como ratones y peces cebras que tienden a ser mucho más altos. En ratones, las concentraciones experimentales de nicotina oscilan entre 25 y 400 μ M (Khwaja et al., 2007). En el pez cebrado, donde la absorción real es mucho mayor porque la nicotina se suplementa en el agua donde los peces nadan y se absorbe a través de la piel, el rango de concentraciones de nicotina utilizadas es de 5 a 100 μ M (Klee et al., 2011). En cualquier caso, la cantidad de nicotina que se les da a las moscas no es la concentración real que llega a los tejidos y órganos. Cuando los animales son alimentados con una sustancia química, la concentración real que llega a los órganos internos es aproximadamente 1/100 de la dosis original (Silva et al., 2015). Por lo tanto, dado que la concentración de nicotina elegida en este estudio para los experimentos es de 24 μ M, es razonable estimar que la concentración real en la hemolinfa o en el cerebro de la mosca es de aproximadamente 200 nM. Curiosamente, se ha establecido que, en los seres humanos, la concentración máxima de nicotina en la sangre después de fumar un cigarrillo es de aproximadamente 300 nM (Matta et al., 2007), que es una concentración muy similar a la que se estima llega al cerebro en los experimentos de esta tesis.

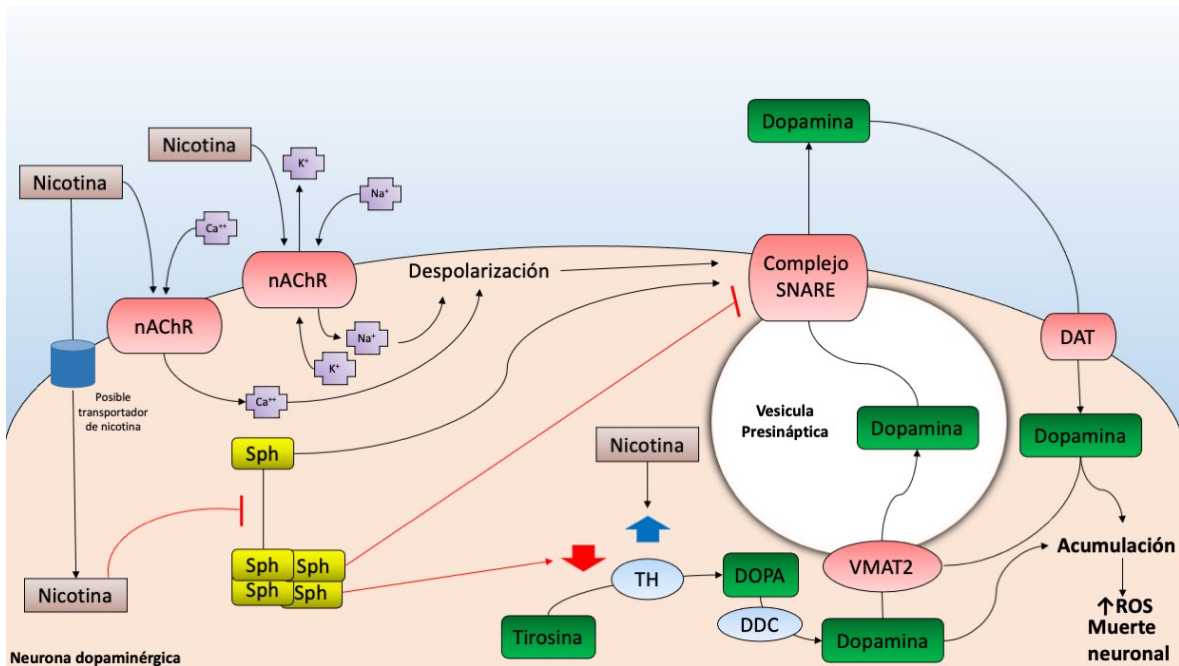


Fig. 26.- Modelo propuesto para la acción de la nicotina ante la toxicidad mediada por la presencia de Sph-1. En este modelo se propone que la nicotina causa la despolarización neuronal al unirse a los nAChRs permitiendo la entrada de sodio y calcio, aumentando así la liberación de dopamina. Se sabe que la acumulación de algunas proteínas como sinucleína puede promover el mal ensamblaje del complejo SNARE, por lo que Sph, al ser una proteína que interactúa fuertemente con sinucleína, podría estar promoviendo el mismo efecto, inhibiendo así la liberación de dopamina. Adicionalmente, un posible transportador de la nicotina podría introducir a la nicotina al interior de la célula para tener un efecto sobre los agregados, impidiendo su acumulación, aunque esto solo es algo hipotético y aun no comprobado. En esta hipótesis la acumulación de dopamina en el interior de la neurona sería una de las principales responsables de la muerte neuronal por aumento de especies activas de oxígeno (ROS) que derivan de la oxidación de la amina. En esta tesis pudimos comprobar que la nicotina tiene efectos sobre los niveles de la TH aumentándolos (flecha azul), mientras que la sola expresión de Sph-1 los reduce (flecha roja).

Un hallazgo interesante de este trabajo es que la nicotina no tiene efectos benéficos en las moscas control; de hecho, reducen su esperanza de vida e inducen el deterioro motor en estos animales. Estos resultados son consistentes con lo que se ha reportado previamente en moscas mutantes de Parkina donde se ha demostrado que la nicotina también promueve la sobrevivencia solo en el genotipo predispuesto al fenotipo parkinsoniano. Es importante destacar que en ambos casos los efectos de la nicotina dependen de la dosis (*Chambers et al., 2013*). Este trabajo no permite definir una razón específica por la que la nicotina afecta negativamente a las moscas control y positivamente a las moscas modelo de la EP. Sin embargo, una posible explicación para estos efectos es que la nicotina mejora directamente el metabolismo celular y la funcionalidad general en las células. Por lo tanto, en células con problemas metabólicos, como las neuronas dopaminérgicas que expresan Sph-1 y que contienen niveles reducidos de amina, la activación de los receptores nicotínicos, la consiguiente despolarización y el aumento del calcio intracelular mejora la síntesis y liberación de este neurotransmisor, mejorando así la función dopaminérgica (*Herman et al., 2014; Wing et al., 2015*). Por otro lado, en las moscas no parkinsonianas y que exhiben niveles normales

de dopamina, la nicotina podría actuar de forma tóxica, debido a que la promoción del metabolismo de la dopamina podría resultar en la generación de quinonas y un desequilibrio oxido-reducción intracelular. Es claro que se necesitan más investigaciones para avanzar en la comprensión sobre cómo la nicotina afecta diferencialmente a estos genotipos.

Por otra parte, la serotonina se ha estudiado amplia y principalmente en conductas complejas como la agresión y el estado de ánimo, teniendo un papel muy relevante en algunos desórdenes mentales como el autismo, la esquizofrenia y el déficit de atención (*Carvajal-Oliveros & Campusano, 2021*). La evidencia de interacciones entre el sistema dopaminérgico y serotoninérgico ha sido ampliamente documentado en mamíferos e invertebrados, en donde se ha observado que la serotonina actúa como un inhibidor, mientras que la dopamina participa principalmente en la excitación neuronal (*Kasture et al., 2018*). Alterar el sistema serotoninérgico por si solo usando el promotor de la enzima triptófano hidroxilasa o en conjunto con el dopaminérgico usando el promotor de la dopa descarboxilasa, se han logrado formular algunas conjeturas acerca del papel que tiene este neurotransmisor en la progresión del fenotipo parkinsoniano. Por ejemplo, se conocen los efectos al disminuir los niveles de serotonina en el cerebro y es interesante ver que estos están relacionados con algunos fenotipos no motores de la EP, como son la fatiga, la depresión, los desórdenes del sueño y las alteraciones visuales (*Politis & Niccolini, 2015*). Al evaluar distintos fenotipos asociados a la EP, tanto motores como no motores, también se ha logrado entender mejor el papel que tienen tanto la serotonina como la dopamina en la gravedad de estos síntomas, además de saber el efecto al tratarlos con nicotina, esto sabiendo que la nicotina es capaz de estimular al sistema serotoninérgico a través de aumentar la cantidad de serotonina disponible en el cerebro (*Bhalsinge et al., 2017*).

Los resultados muestran que la sobrevivencia parece no ser afectada cuando se altera el sistema serotoninérgico con la expresión de Sph-1, aunque la nicotina si aumenta ligeramente la sobrevivencia de estas moscas sobre todo en edades avanzada. Por el contrario, se pudo determinar que, para el sistema dopaminérgico, la nicotina resulta crucial en la reducción de la sobrevivencia. Cabe recalcar que, para esta parte del proyecto, en la que se determinó del papel del sistema serotoninérgico en el desarrollo de la EP relacionada a la expresión de Sph-1, se uso otra línea de moscas para la expresión de esta proteína en el sistema dopaminérgico. Adicionalmente, se usó la ddc para alterar ambos sistemas, aun así, se reprodujeron los datos de la primera parte de la tesis, en donde la expresión de Sph-1 reduce drásticamente la vida de las moscas y la nicotina rescata este fenotipo. Esto permite concluir que la dopamina es un neurotransmisor muy importante en el

mantenimiento de la sobrevivencia de las moscas. Por otro lado, en el caso de la evaluación del movimiento por medio de la geotaxis negativa, se observó que la dopamina es el neurotransmisor más importante en la regulación de este fenotipo, y que la nicotina inclusive tiene efectos negativos sobre él, reduciéndola en edades avanzadas. Esto concuerda con algunos reportes que indican que la afectación serotoninérgica parece no tener efecto sobre los fenotipos motores como las discinesias, aunque existen algunos estudios que indican que si con la pérdida de la postura y los temblores en reposo (Fox et al., 2009; Politis & Niccolini, 2015).

Los fenotipos no motores evaluados como la estimulación visual y el olfato, parecen tener un componente principal serotoninérgico. En estos se pudo observar cómo existe una alteración significativa en los parámetros de pérdida del olfato y los obtenidos en los electroretinogramas principalmente en edades tempranas. Esto nos permite pensar que puede existir una alteración serotoninérgica inclusive antes de la alteración dopaminérgica en la EP. Se sabe que existe también una muerte de las neuronas serotoninérgicas, principalmente en el núcleo de Rafé, que proyectan hacia el estriado y algunas zonas de la *sustancia nigra pars reticulata*, sumado además de que se han identificado CL en la zona del núcleo de Rafé, que se sabe es rica en neuronas serotoninérgicas (Fox et al., 2009). Todo esto permite pensar que una disminución de los niveles de serotonina disponibles en el cerebro podría desencadenar la consecuente disminución de los niveles de dopamina.

En cuanto a los niveles de las enzimas limitantes para la síntesis de ambos neurotransmisores, fue interesante ver como existe reducción de estas, incluso cuando no se está afectando el circuito neuronal al que pertenecen tanto en edades avanzadas como en edades tempranas. A nivel de desarrollo, la serotonina cumple un papel muy importante en el correcto desarrollo de la innervación dopaminérgica, y esta relacionada con el desarrollo de esquizofrenia, depresión y la EP. Sumado a esto, también se sabe que la depleción de dopamina resulta en una mala innervación serotoninérgica, lo que de nueva cuenta habla de un “cross-talk” entre ambos circuitos (Kasture et al., 2018)

El diagnóstico temprano de la EP podría dar un mejor pronóstico y manejo terapéutico, lo cual sería relevante para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Desgraciadamente esto sigue siendo difícil y, una vez que se llega al diagnóstico, existen muy pocas opciones de tratamiento para los pacientes con EP. La L-DOPA sigue siendo el tratamiento más utilizado para la EP y su

administración suele comenzar una vez que los síntomas motores son evidentes. Se sabe que este químico induce tolerancia y después de un periodo de administración su eficacia se reduce, haciendo reaparecer las discinesias (Fahn, 2008; Schapira et al., 2009). Por ello, se continúa la búsqueda de nuevos tratamientos con menos efectos secundarios y es uno de los puntos mas importantes en las investigaciones de la EP. Los resultados de este proyecto muestran que el tratamiento crónico con nicotina resulta ser benéfico en el modelo de mosca Sph-1 y que inclusive es benéfico cuando ya los síntomas motores son muy evidentes. Estos resultados destacan la necesidad de seguir estudiando los efectos de la nicotina en modelos de la EP como las moscas que expresan Sph-1 y refuerzan la idea de que la nicotina podría ser una molécula interesante para la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos contra la EP.

Los datos muestran que el modelo de la EP en el que se promueve la expresión de Sph-1 en neuronas dopaminérgicas brinda una buena oportunidad para estudiar los síntomas tempranos de la EP como la alteración del olfato, así como también para el estudio de los síntomas tardíos como lo son la neurodegeneración y el deterioro motor. Por otro lado, trabajar en este modelo animal permite avanzar en el estudio de los efectos terapéuticos del tratamiento con nicotina sobre varios fenotipos relacionadas con la EP. El efecto protector de la nicotina parece ser específico para el genotipo predispuesto a desarrollar un fenotipo parkinsoniano y proporciona una pista sobre la idea de que el tratamiento con nicotina, incluso en las etapas posteriores de la enfermedad, podría ser benéfico para los pacientes. Estos hallazgos proporcionan nuevas ideas que contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes a los efectos positivos de la nicotina en la EP.

En conclusión, *Drosophila melanogaster* representa un modelo biológico muy importante para entender algunos aspectos moleculares de las enfermedades neurodegenerativas. El tamaño del organismo confiere ventajas que permiten manipularlo de una manera sencilla y rápida; por otro lado el sistema nervioso de este animal es relativamente poco “complejo”, lo que nos permite entender mas profundamente su fisiología y funcionamiento (Carvajal-Oliveros, tesis de licenciatura 2017). Por lo anterior, *Drosophila melanogaster*, representa un modelo excelente para la evaluación de farmacos que pudiesen retrasar o contrarrestar el fenotipo causado por la EP. Finalmente, en este trabajo, se pudo determinar que este organismo modelo brinda excelentes ventajas en el estudio de la alteración de diferentes circuitos neuronales, permitiendo así la elucidación de los procesos moleculares y celulares que desencadenan esta patología.

12. - CONCLUSIONES.

- La expresión de Sph-1 en las neuronas dopaminérgicas promueve una pérdida significativa de la sobrevivencia de las moscas, mientras que la nicotina promueve la protección ante esta reducción, siendo mas efectiva a la concentración de 24 μ M. Por otro lado, la nicotina promueve la pérdida de la supervivencia en aquellas moscas sin predisposición genética al fenotipo parkinsoniano.
- La expresión de Sph-1 promueve la pérdida de la movilidad, mientras que la nicotina también tiene un efecto benéfico en este fenotipo, retrasando la pérdida de la movilidad.
- La expresión de Sph-1 promueve pérdida del olfato en moscas jóvenes, lo que nos indica que el modelo de expresión de esta proteína también promueve la aparición de fenotipos no motores. La nicotina no tiene efectos en el olfato en edades avanzadas.
- La nicotina promueve la pérdida de la capacidad olfativa en moscas control, lo que de nueva cuenta muestra que la nicotina tiene efectos negativos cuando no existe predisposición genética al desarrollo del fenotipo parkinsoniano.
- La expresión de Sph-1 promueve pérdida neuronal, así como disminución de los niveles de th y dopamina. Esto permite pensar que parte de éste aumento en la cantidad total de dopamina se debe en parte a la *síntesis de novo*.
- La nicotina promueve la sobrevivencia neuronal específicamente en edades avanzadas, lo que permitiría contar con una mayor disponibilidad de la dopamina cuando ya existe una evidente reducción de las neuronas funcionales.
- El tratamiento tardío con nicotina rescata la sobrevivencia, mientras que la interrupción del tratamiento la disminuye. Esto favorece la hipótesis de que la nicotina promueve efectos

benéficos a corto plazo, y que no a largo plazo, ya que la interrupción del tratamiento reduce la supervivencia.

- La afectación del sistema serotoninérgico no tiene efectos sobre la supervivencia, mientras que la del dopaminérgico sí. Este resultado indica que la dopamina es un neurotransmisor muy importante para la supervivencia. Por otro lado la nicotina solo tiene efectos benéficos cuando se altera el sistema dopaminérgico.
- La pérdida de la movilidad es un fenotipo más relacionado con el circuito dopaminérgico, la nicotina promueve un ligero aumento de movilidad, aunque debido a que se evaluó a una edad muy avanzada, la protección dada por esta molécula ya no es tan significativa.
- La nicotina promueve la pérdida de la movilidad cuando se afecta el sistema serotoninérgico, al igual que el grupo control.
- El circuito serotoninérgico es el principal responsable de la pérdida de la capacidad olfativa, esto permite formular la hipótesis de que la serotonina puede ser responsable de la aparición de síntomas no motores.
- En términos de la capacidad visual, cuando se expresa Sph-1 en el circuito serotoninérgico, los síntomas parecen aparecer más temprano, mientras que cuando se expresa en Sph-1 en el circuito dopaminérgico los síntomas tienden a aparecer más tarde. Esto de nuevo refuerza la teoría de que la alteración de la comunicación serotoninérgica podría desencadenar la aparición de síntomas motores.
- Los niveles de las enzimas limitantes en la síntesis de dopamina y serotonina, se afectan con la expresión de Sph-1, incluso cuando no se afecta el circuito al que pertenecen con la expresión de Sph-1, lo que indica que existe una fuerte relación y comunicación entre ambos circuitos en la EP.

- Dado que se pudo observar que la serotonina parece ser la responsable de la aparición de los síntomas no motores, el estudio de este neurotransmisor podría ser relevante en el estudio de la etapa presintomática de la EP.
- Sph-1 es una proteína que se ha estudiado muy poco en la patofisiología de la EP. El modelo de *Drosophila melanogaster*, resulto ser un excelente modelo para el estudio de la dinámica y progresión de la EP ocasionada por la posible agregación de esta proteína.

13. - *PERSPECTIVAS.*

- Evaluar el efecto de la nicotina en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Parkinson, para caracterizar a fondo el efecto de esta molécula a nivel molecular y la vía específica en la que brinda la protección.
- Estudiar el efecto de alterar otros circuitos neuronales que pudiesen estar afectados en la enfermedad de Parkinson y que permitan encontrar mejores blancos en el estudio de esta patología.

14. - REFERENCIAS.

- Ali, Y. O., Escala, W., Ruan, K., & Zhai, R. G. (2011). Assaying locomotor, learning, and memory deficits in *Drosophila* models of neurodegeneration. *Journal of Visualized Experiments*, 49, 1–5. <https://doi.org/10.3791/2504>
- Bacqué-cazenave, J., Bharatiya, R., Barrière, G., Delbecque, J. P., Bouguiyoud, N., Di Giovanni, G., Cattaert, D., & De Deurwaerdère, P. (2020). Serotonin in animal cognition and behavior. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 5, pp. 1–23). <https://doi.org/10.3390/ijms21051649>
- Bhalsinge, R. R., Barde, A. A., Worlikar, P. S., Limaye, M. V., Dhole, M. P., & Tilak, A. V. (2017). Effect of nicotine on serotonin (5-HT) levels in brain of depressed rats. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 6(4), 938. <https://doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20171108>
- Bordia, T., Campos, C., McIntosh, J. M., & Quik, M. (2010). Nicotinic receptor-mediated reduction in L-DOPA-induced dyskinesias may occur via desensitization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(3), 929–938. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.162396>
- Brookmeyer, R., Gray, S., & Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *American Journal of Public Health*, 88(9), 1337–1342. <https://doi.org/10.2105/AJPH.88.9.1337>
- Carvajal-Oliveros, A., & Campusano, J. M. (2021). Studying the Contribution of Serotonin to Neurodevelopmental Disorders. Can This Fly? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14(January), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.601449>
- Chambers, R. P., Call, G. B., Meyer, D., Smith, J., Techau, J. A., Pearman, K., & Buhlman, L. M. (2013). Nicotine increases lifespan and rescues olfactory and motor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 253, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.020>
- Colomb, J., Reiter, L., Blaszkiewicz, J., Wessnitzer, J., & Brembs, B. (2012). Open source tracking and analysis of adult *Drosophila* locomotion in Buridan's paradigm with and without visual targets. *PLoS ONE*, 7(8), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042247>
- Costa, G., Abin-Carriquiry, J. A., & Dajas, F. (2001). Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra. *Brain Research*, 888(2), 336–342. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03087-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03087-0)
- Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>

- de Lau, L. Breteler, M. (2013). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 5(June), 54–58.
- de Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5, 525–535. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9)
- Dexter, D. T., & Jenner, P. (2013). Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>
- Doty, R. L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 8(6), 329–339. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80>
- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>
- Dunn, L., & Lewis, P. A. (2008). The Shaking Palsy - Advances in Our Understanding of Parkinson's Disease. *Opticon1826*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.5334/opt.040806>
- Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S., & Moisan, F. (2016). Epidemiology of Parkinson's disease. *Revue Neurologique*, 172(1), 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.09.012>
- Engelender, S., Kaminsky, Z., Xin, G., Sharp, A. H., Amaravi, R. K., Kleiderlein, J. J., Margolis, R. L., Troncoso, J. C., Lanahan, A. A., Worley, P. F., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ross, C. A. (1999). Synphilin-1 associates with α -synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nature Genetics*, 22(1), 110–114. <https://doi.org/10.1038/8820>
- Engelhardt, E., & Gomes, M. da M. (2017). Lewy and his inclusion bodies: Discovery and rejection. *Dementia e Neuropsychologia*, 11(2), 198–201. <https://doi.org/10.1590/1980-57642016dn11-020012>
- Eyal, A., & Engelender, S. (2006). Synphilin isoforms and the search for a cellular model of lewy body formation in Parkinson's disease. *Cell Cycle*, 5(18), 2082–2086. <https://doi.org/10.4161/cc.5.18.3209>
- Eyal, A., Szargel, R., Avraham, E., Liani, E., Haskin, J., Rott, R., & Engelender, S. (2006). Synphilin-1A: An aggregation-prone isoform of synphilin-1 that causes neuronal death and is present in aggregates from α -synucleinopathy patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15), 5917–5922. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509707103>
- Fahn, S. (2008). How do you treat motor complications in Parkinson's disease: Medicine, surgery, or both? *Annals of Neurology*, 64(SUPPL. 2), 56–64. <https://doi.org/10.1002/ana.21453>
- Florán-Garduño, B., & Rangel-Barajas, C. (2005). Activación de receptores dopaminérgicos por L-DOPA. De la acción terapéutica a las discinesias. *Revista Biomédica*, 16(4), 273–280. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v16i4.428>

- Fox, S. H., Chuang, R., & Brotchie, J. M. (2009). Serotonin and Parkinson's disease: On movement, mood, and madness. *Movement Disorders*, 24(9), 1255–1266. <https://doi.org/10.1002/mds.22473>
- Fox, S. H., Katzenschlager, R., Lim, S. Y., Barton, B., de Bie, R. M. A., Seppi, K., Coelho, M., & Sampaio, C. (2018). International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 33(8), 1248–1266. <https://doi.org/10.1002/mds.27372>
- Gazewood, J. D., Richards, D. R., & Clebak, K. (2013). Parkinson disease: An update. *American Family Physician*, 87(4), 267–273. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597921>
- Gillies, G. E., Pienaar, I. S., Vohra, S., & Qamhawi, Z. (2014). Sex differences in Parkinson's disease. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 35, Issue 3, pp. 370–384). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.02.002>
- Gitler, A. D., Dhillon, P., & Shorter, J. (2017). Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 10(5), 499–502. <https://doi.org/10.1242/dmm.030205>
- Hamza, T. H., & Payami, H. (2010). The heritability of risk and age at onset of Parkinson's disease after accounting for known genetic risk factors. *Journal of Human Genetics*, 55(4), 241–243. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.13>
- Herman, A. I., Devito, E. E., Jensen, K. P., & Sofuoglu, M. (2014). Pharmacogenetics of nicotine addiction: Role of dopamine. *Pharmacogenomics*, 15(2), 221–234. <https://doi.org/10.2217/pgs.13.246>
- Hernán, M. A., Takkouche, B., Caamaño-Isorna, F., & Gestal-Otero, J. J. (2002). A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 52(3), 276–284. <https://doi.org/10.1002/ana.10277>
- Hernández-Vargas, R., Fonseca-Ornelas, L., López-González, I., Riesgo-Escovar, J., Zurita, M., & Reynaud, E. (2011). Synphilin suppresses α -synuclein neurotoxicity in a Parkinson's disease *Drosophila* model. *Genesis*, 49(5), 392–402. <https://doi.org/10.1002/dvg.20740>
- Hong, D. P., Fink, A. L., & Uversky, V. N. (2009). Smoking and Parkinson's disease: Does nicotine affect α -synuclein fibrillation? *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794(2), 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.09.026>
- Humbert, J., Beyer, K., Carrato, C., Mate, J. L., Ferrer, I., & Ariza, A. (2007). Parkin and synphilin-1 isoform expression changes in Lewy body diseases. *Neurobiology of Disease*, 26(3), 681–687. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.03.007>
- Jimenez-Del-Rio, M., Guzman-Martinez, C., & Velez-Pardo, C. (2010). The effects of polyphenols on

- survival and locomotor activity in drosophila melanogaster exposed to iron and paraquat. *Neurochemical Research*, 35(2), 227–238. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0046-1>
- Kalia, L. V., Kalia, S. K., McLean, P. J., Lozano, A. M., & Lang, A. E. (2013). A-Synuclein Oligomers and Clinical Implications for Parkinson Disease. *Annals of Neurology*, 73(2), 155–169. <https://doi.org/10.1002/ana.23746>
- Kardani, J., Sethi, R., & Roy, I. (2017). Nicotine slows down oligomerisation of α -synuclein and ameliorates cytotoxicity in a yeast model of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(6), 1454–1463. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.002>
- Kasture, A. S., Hummel, T., Sucic, S., & Freissmuth, M. (2018). Big lessons from tiny flies: Drosophila melanogaster as a model to explore dysfunction of dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061788>
- Khwaja, M., McCormack, A., McIntosh, J. M., Di Monte, D. A., & Quik, M. (2007). Nicotine partially protects against paraquat-induced nigrostriatal damage in mice; link to $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs. *Journal of Neurochemistry*, 100(1), 180–190. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04177.x>
- Klee, E. W., Ebbert, J. O., Schneider, H., Hurt, R. D., & Ekker, S. C. (2011). Zebrafish for the study of the biological effects of nicotine. *Nicotine and Tobacco Research*, 13(5), 301–312. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntr010>
- Liu, J., Li, T., Yang, D., Ma, R., Moran, T. H., & Smith, W. W. (2012). Synphilin-1 alters metabolic homeostasis in a novel Drosophila obesity model. *International Journal of Obesity*, 36(12), 1529–1536. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.111>
- Lu, J. Y. D., Su, P., Barber, J. E. M., Nash, J. E., Le, A. D., Liu, F., & Wong, A. H. C. (2017). The neuroprotective effect of nicotine in Parkinson's disease models is associated with inhibiting PARP-1 and caspase-3 cleavage. *PeerJ*, 2017(10), 1–24. <https://doi.org/10.7717/peerj.3933>
- Ma, C., Liu, Y., Neumann, S., & Gao, X. (2017). Nicotine from cigarette smoking and diet and Parkinson disease: A review. *Translational Neurodegeneration*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0090-8>
- Marx, F. P., Holzmann, C., Strauss, K. M., Li, L., Eberhardt, O., Gerhardt, E., Cookson, M. R., Hernandez, D., Farrer, M. J., Kachergus, J., Engelender, S., Ross, C. A., Berger, K., Schöls, L., Schulz, J. B., Riess, O., & Krüger, R. (2003). Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 12(11), 1223–1231. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg134>
- Matta, S. G., Balfour, D. J., Benowitz, N. L., Boyd, R. T., Buccafusco, J. J., Caggiula, A. R., Craig, C.

- R., Collins, A. C., Damaj, M. I., Donny, E. C., Gardiner, P. S., Grady, S. R., Heberlein, U., Leonard, S. S., Levin, E. D., Lukas, R. J., Markou, A., Marks, M. J., McCallum, S. E., ... Zirger, J. M. (2007). Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology*, *190*(3), 269–319. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0441-0>
- Molina-Mateo, D., Fuenzalida-Uribe, N., Hidalgo, S., Molina-Fernández, C., Abarca, J., Zárate, R. V., Escandón, M., Figueroa, R., Tevy, M. F., & Campusano, J. M. (2017). Characterization of a presymptomatic stage in a *Drosophila* Parkinson's disease model: Unveiling dopaminergic compensatory mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1863*(11), 2882–2890. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.013>
- Mouhape, C., Costa, G., Ferreira, M., Abin-Carriquiry, J. A., Dajas, F., & Prunell, G. (2019). Nicotine-Induced Neuroprotection in Rotenone In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease: Evidences for the Involvement of the Labile Iron Pool Level as the Underlying Mechanism. *Neurotoxicity Research*, *35*(1), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9931-1>
- Nakashima, S., & Ikuta, F. (1984). Tyrosine hydroxylase protein in Lewy bodies of parkinsonian and senile brains. *Journal of the Neurological Sciences*, *66*(1), 91–96. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(84\)90144-8](https://doi.org/10.1016/0022-510X(84)90144-8)
- Nicholatos, J. W., Francisco, A. B., Bender, C. A., Yeh, T., Lugay, F. J., Salazar, J. E., Glorioso, C., & Libert, S. (2018). Nicotine promotes neuron survival and partially protects from Parkinson's disease by suppressing SIRT6. *Acta Neuropathologica Communications*, *6*(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0625-y>
- Nuber, S., Franck, T., Wolburg, H., Schumann, U., Casadei, N., Fischer, K., Calaminus, C., Pichler, B. J., Chanarat, S., Teismann, P., Schulz, J. B., Luft, A. R., Tomiuk, J., Wilbertz, J., Bornemann, A., Krüger, R., & Riess, O. (2010). Transgenic overexpression of the alpha-synuclein interacting protein synphilin-1 leads to behavioral and neuropathological alterations in mice. *Neurogenetics*, *11*(1), 107–120. <https://doi.org/10.1007/s10048-009-0212-2>
- Nussbaum, R. L., & Ellis, C. E. (2003). Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, *348*(14), 1356–1364. <https://doi.org/10.1056/NEJM2003ra020003>
- Paleologou, K. E., & El-Agnaf, O. M. A. (2012). *α-Synuclein Aggregation and Modulating Factors* (Vol. 65, pp. 109–164). https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_6
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *14*(2), 223–236. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>
- Perez, X. A., Ly, J., McIntosh, J. M., & Quik, M. (2012). Long-term nicotine exposure depresses dopamine release in nonhuman primate nucleus accumbens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *342*(2), 335–344. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.194084>

- Pfeiffenberger, C., Lear, B. C., Keegan, K. P., & Allada, R. (2010). Locomotor activity level monitoring using the *Drosophila* activity monitoring (DAM) system. *Cold Spring Harbor Protocols*, 5(11), 1238–1242. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5518>
- Pfeiffer, R. F. (2016). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 22, S119–S122. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.09.004>
- Poewe, W. (2008). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, 15(SUPPL. 1), 14–20. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02056.x>
- Politis, M., & Niccolini, F. (2015). Serotonin in Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 277, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.037>
- Pollanen, M. S., Dickson, D. W., & Bergeron, C. (1993). Pathology and Biology of the Lewy Body. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 52(3), 183–191. <https://doi.org/10.1097/00005072-199305000-00001>
- Quik, M., Bordia, T., & O'Leary, K. (2007). Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, 74(8), 1224–1234. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.015>
- Quik, M., Bordia, T., Zhang, D., & Perez, X. A. (2015). Nicotine and Nicotinic Receptor Drugs: Potential for Parkinson's Disease and Drug-Induced Movement Disorders. In *International Review of Neurobiology* (1st ed., Vol. 124, pp. 247–271). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.07.005>
- Quik, M., O'Leary, K., & Tanner, C. M. (2008). Nicotine and Parkinson's disease: Implications for therapy. *Movement Disorders*, 23(12), 1641–1652. <https://doi.org/10.1002/mds.21900>
- Quik, M., O'Neill, M., & Perez, X. A. (2007). Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: importance of the animal model. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(5), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.03.001>
- Quik, M., Perez, X. A., & Bordia, T. (2012). Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 27(8), 947–957. <https://doi.org/10.1002/mds.25028>
- Ribeiro, C. S., Carneiro, K., Ross, C. A., Menezes, J. R. L., & Engelender, S. (2002). Synphilin-1 is developmentally localized to synaptic terminals, and its association with synaptic vesicles is modulated by α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23927–23933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201115200>
- Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iché-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., Hirsh, J., & Birman, S. (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 834–839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010930108>

- Ross, G. W., & Petrovitch, H. (2001). Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. *Drugs and Aging*, 18(11), 797–806. <https://doi.org/10.2165/00002512-200118110-00001>
- Sang, T., & Jackson, G. R. (2005). Drosophila models of neurodegenerative disease. *NeuroRX*, 2(3), 438–446. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.3.438>
- Schapira, A. H. V., Emre, M., Jenner, P., & Poewe, W. (2009). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, 16(9), 982–989. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02697.x>
- Silva, B., Molina-Fernández, C., Ugalde, M. B., Tognarelli, E. I., Angel, C., & Campusano, J. M. (2015). Muscarinic ACh receptors contribute to aversive olfactory learning in Drosophila. *Neural Plasticity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/658918>
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6469–6473. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6469>
- Srinivasan, R., Henderson, B. J., Lester, H. A., & Richards, C. I. (2014). Pharmacological chaperoning of nAChRs: A therapeutic target for Parkinson's disease. In *Pharmacological Research* (Vol. 83, pp. 20–29). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.02.005>
- Srinivasan, R., Henley, B. M., Henderson, B. J., Indersmitten, T., Cohen, B. N., Kim, C. H., McKinney, S., Deshpande, P., Xiao, C., & Lester, H. A. (2016). Smoking-relevant nicotine concentration attenuates the unfolded protein response in dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 36(1), 65–79. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2126-15.2016>
- Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
- Szargel, R., Rott, R., & Engelender, S. (2008). Synphilin-1 isoforms in Parkinson's disease: Regulation by phosphorylation and ubiquitylation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(1), 80–88. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7343-0>
- Tibar, H., El Bayad, K., Bouhouche, A., Haddou, E. H. A. Ben, Benomar, A., Yahyaoui, M., Benazzouz, A., & Regragui, W. (2018). Non-motor symptoms of Parkinson's Disease and their impact on quality of life in a cohort of Moroccan patients. *Frontiers in Neurology*, 9(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00170>
- Twelves, D., Perkins, K. S. M., & Counsell, C. (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. In *Movement Disorders* (Vol. 18, Issue 1, pp. 19–31). <https://doi.org/10.1002/mds.10305>

- Verstraeten, A., Theuns, J., & Van Broeckhoven, C. (2015). Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends in Genetics*, 31(3), 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.01.004>
- Vieira-Brock, P. L., McFadden, L. M., Nielsen, S. M., Ellis, J. D., Walters, E. T., Stout, K. A., McIntosh, J. M., Wilkins, D. G., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2015). Chronic nicotine exposure attenuates methamphetamine-induced dopaminergic deficits. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 355(3), 463–472. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.221945>
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., & Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology*, 27(5), 494–506. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00803.x>
- Wan, O. W., & Chung, K. K. K. (2012). The role of alpha-synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 7(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038545>
- Wing, V. C., Payer, D. E., Houle, S., George, T. P., & Boileau, I. (2015). Measuring Cigarette Smoking-Induced Cortical Dopamine Release: A [11C]FLB-457 PET Study. *Neuropsychopharmacology*, 40(6), 1417–1427. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.327>
- Winner, B., Kohl, Z., & Gage, F. H. (2011). Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *The European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1139–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07613.x>
- Zhang, D., Mcgregor, M., Bordia, T., Perez, X. A., McIntosh, J. M., Decker, M. W., & Quik, M. (2015). A7 Nicotinic Receptor Agonists Reduce Levodopa-Induced Dyskinesias With Severe Nigrostriatal Damage. *Movement Disorders*, 30(14), 1901–1911. <https://doi.org/10.1002/mds.26453>

14. - ANEXOS

Publicaciones realizadas durante el desarrollo de este proyecto.

Carvajal-Oliveros, A., Domínguez-Baleón, C., Zárate, R. V, Campusano, J. M., Narváez-Padilla, V., & Reynaud, E. (2021). Nicotine suppresses Parkinson's disease like phenotypes induced by Synphilin-1 overexpression in *Drosophila melanogaster* by increasing tyrosine hydroxylase and dopamine levels. *Scientific Reports*, 11(1), 9579. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88910-4>

-Carvajal-Oliveros, A., & Campusano, J. M. (2021). Studying the Contribution of Serotonin to Neurodevelopmental Disorders. Can This Fly? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14(January), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.601449>



OPEN

Nicotine suppresses Parkinson's disease like phenotypes induced by Synphilin-1 overexpression in *Drosophila melanogaster* by increasing tyrosine hydroxylase and dopamine levels

Angel Carvajal-Oliveros¹, Carmen Domínguez-Baleón¹, Rafaella V. Zárate², Jorge M. Campusano², Verónica Narváez-Padilla³ & Enrique Reynaud^{1✉}

It has been observed that there is a lower Parkinson's disease (PD) incidence in tobacco users. Nicotine is a cholinergic agonist and is the principal psychoactive compound in tobacco linked to cigarette addiction. Different studies have shown that nicotine has beneficial effects on sporadic and genetic models of PD. In this work we evaluate nicotine's protective effect in a *Drosophila melanogaster* model for PD where Synphilin-1 (Sph-1) is expressed in dopaminergic neurons. Nicotine has a moderate effect on dopaminergic neuron survival that becomes more evident as flies age. Nicotine is beneficial on fly survival and motility increasing tyrosine hydroxylase and dopamine levels, suggesting that cholinergic agonists may promote survival and metabolic function of the dopaminergic neurons that express Sph-1. The Sph-1 expressing fly is a good model for the study of early-onset phenotypes such as olfaction loss one of the main non-motor symptom related to PD. Our data suggest that nicotine is an interesting therapeutic molecule whose properties should be explored in future research on the phenotypic modulators of the disease and for the development of new treatments.

PD is the second most common neurodegenerative disorder and it is characterized by the loss of dopaminergic neurons of the *substantia nigra pars compacta*. Neuron cell death diminishes the amount of dopamine released in the *striatum* and other parts of the brain leading to the characteristic motor symptoms associated with this disease. Non-motor symptoms are also observed, including loss of olfaction and sleep disorders¹⁻³. In classic PD, is possible to find intracellular protein inclusions in the soma of the surviving dopaminergic neurons, known as Lewy bodies⁴. The primary component of these aggregates is α -Synuclein (α -Syn), a protein vastly found in pre-synaptic terminals, which has been proposed to be involved in assembly of the SNARE complex and neurotransmitter release⁵⁻⁷. α -Syn monomers interact with each other to form oligomers and promote the accumulation of other proteins. Proteomic assays have shown a physical interaction of α -Syn with at least another 571 proteins, among which the most important are the PD associated proteins PINK1, LRRK2 and Sph-1⁸.

Sph-1 has been involved in the progression of PD and it is also one of the most abundant components of Lewy bodies. Human Sph-1 is a 919 amino acid cytoplasmic protein codified by the gene SNCAIP. Sph-1 inhibits the E3 ubiquitin ligase activity of SIAH1 and the proteasomal degradation of several proteins including its own⁹. Sph-1 appears to be important for synaptic connections but its specific functions, just as those of α -Syn, are unknown¹⁰. It has been proposed, that Sph-1 might be involved in supporting proteasome degradation, and given its strong interaction with α -Syn, it could play a central role in Lewy body formation and synaptic

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, A.P. 510-3, 62210 Cuernavaca, Mor., Mexico. ²Laboratorio Neurogenética de la Conducta, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. ³Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico. ✉email: enrique@ibt.unam.mx

function^{11,12}. Sph-1 has at least eight isoforms and some of them lack the N-terminal domain, a feature known to promote its aggregation^{13–15}.

Currently, there are only symptomatic treatments for PD. Therefore, it is of crucial importance to search for molecules that might help maintain dopaminergic neuron function or prevent degeneration caused by protein accumulation¹⁶. Remarkably, one of these potentially protective molecules is nicotine, the primary psychoactive substance of tobacco. Epidemiologic research has shown that tobacco use may reduce up to 50% the risk of suffering PD^{17–19}. Although nicotine is known as an acetylcholine receptor agonist that promotes cellular excitability, the mechanisms underlying its cytoprotective mechanisms are unknown²⁰.

Here, we evaluated the effect of a chronic nicotine treatment on a *Drosophila melanogaster* model for PD generated by the expression of human Sph-1 in dopaminergic neurons. Our results show that expression of Sph-1 in *Drosophila* central nervous system (CNS) neurons promotes characteristic Parkinsonian phenotypes such as motor impairment, neuronal death and dysregulation of the dopaminergic neural system. Remarkably, the fly PD model also exhibits olfactory dysfunction in young flies, probably the most important early-onset, non-motor symptom of the disease. Nicotine treatment has a beneficial effect on survival, motility and dopamine levels in flies that express Sph-1 and are therefore predisposed to dopaminergic neurodegeneration. On the other hand, nicotine has deleterious effects in control flies. These data suggest that Sph-1 expression in *Drosophila* CNS neurons is a good model to study the progression of PD through aging. The demonstration that nicotine counteracts several PD phenotypes, makes this molecule a very interesting seed compound for the search of new chemicals against PD.

Methods

Genotypes and crosses. All behavioral experiments were performed with male flies. Flies were fed with standard cornmeal-yeast food and kept at 25 °C in an incubator under 12/12 light/dark cycle. *UAS-GFP*, *th-GAL4* and *w¹¹¹⁸* were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center. *UAS-Sph* was generated in our laboratory and expresses the canonical 919 amino acid long isoform 1 as reported in the UniProt database (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y6H5>)²¹. Experimental genotype was *UAS-GFP/UAS-Sph*; *th-GAL4/+*. Control flies (*UAS-GFP/+*; *th-GAL4/+*) were in all cases the progeny of the *UAS-GFP/UAS-GFP*; *th-GAL4/th-GAL4* crossed with *w¹¹¹⁸*.

Nicotine treatment. Standard cornmeal-yeast food was supplemented with 24 μM nicotine base. Flies were transferred to fresh food vials supplemented with nicotine every third day for the duration of the experiment.

Life expectancy and motility assays. Groups of 20 one-day old male flies were placed in standard corn meal agar food with or without nicotine (experimental and control groups, respectively) at the corresponding concentrations. Animals were transferred to fresh vials every 4 days; dead, trapped and escaped individuals were recorded (n = 100 per group). Assays were performed at 25 °C under 12/12 h light/dark cycle. Parameters analyzed include the maximum life span (the time point at which no alive flies are found), and the half lifespan (the time point where 50% of flies have died). In the discontinuation of chronic nicotine treatment or late in life treatment initiation experiments, an initial cohort of 200 individuals of the corresponding genotypes was separated in two groups of 100 individuals each: one group was treated with nicotine only for the first half of its life-expectancy (first 60 days after eclosion), while the other was treated only for the second half of its life expectancy (treatment initiated only after 60 days of aging); both groups were reared and analyzed simultaneously for their whole life-span until there were no survivors.

Negative geotaxis was assayed essentially as reported by Ali²²; flies were aged and their climbing was measured every 5 days until they were 60 days old. Five vials with 10 flies of the corresponding genotype were analyzed. Flies were forced to the bottom of the vial with three gentle taps. Then, their ability to climb over 10 s to a 5 cm mark was quantified. Animals were allowed to rest for a minute and then the assay was repeated with the same population. This procedure was repeated ten times in total.

Spontaneous activity was quantified using the *Drosophila* Activity Monitor (*TriKinetics*)²³; 14 individuals of each genotype, age and treatment were allowed to adapt for 24 h to the setup, and afterwards data was recorded for 3 days in a 12 h light/dark cycle. Activity was analyzed separately for the light and dark periods.

Olfactory assays. Olfactory test was analyzed using the BuriTrack software²⁴. Briefly, individual flies of each genotype and treatment were placed on a circular white arena (39 mm wide 2 mm tall). Aversive olfactory stimulus (100 μl 1% benzaldehyde -Bz- in water on a small cotton ball) and control (100 μl distilled water on a small cotton ball) were presented through 0.1 mm holes on opposite sides of the arena. The preference of flies for either side of the arena was quantified according to Molina-Mateo et al.²⁵. The performance index is reported (n = 15 for each genotype and treatment).

Neuronal survival quantification. GFP expression in *UAS-GFP/+*; *th-GAL4/+* organisms were used as a reporter for surviving dopaminergic neurons. Neuronal survival was quantified by dissecting out brains of the corresponding age and treatment. Brains were fixed with 4% formaldehyde in PBS, mounted individually in Citifluor (Ted Pella Inc. Redding, CA.) and images were taken at the National Laboratory of Advanced Microscopy using a confocal Olympus FV10 microscope with a 20X objective. Five brains of each genotype, age and condition were counted in a blinded manner. Confocal acquisition parameters were set and fixed using 10 days old control flies (*UAS-GFP/+*; *th-GAL4/+*). The whole brain was sampled avoiding pixel saturation in the brightest section with optimal pinhole aperture and optimal section thickness, steps were 0.5X section thickness so the

whole tissue was sampled twice, after data collection, maximum intensity projections (assembled with image J, <https://imagej.nih.gov/ij/> taking in account section thickness and 2X oversampling) were used to make a single flat image and neurons were counted, if there was ambiguity about the number of neurons in a particular cluster in a particular maximally projected brain image, individual sections were analyzed. All other conditions and genotypes were acquired using these pre-set acquisition parameters.

Dopamine quantification. Total brain dopamine was quantified as in Molina-Mateo et al.²⁵ using HPLC (BAS, West Lafayette, IN) coupled to electrochemical detection. Briefly, adult brains of the corresponding age and treatment were dissected, homogenized using sonication in 0.2 N Perchloric acid and the solution filtrated through a 0.2 μm filter. 5 μl of the extracts were injected in the HPLC system with the following configuration: a pump (model PM-80), a SepStick microbore column, and an amperometric detector (model LC-4C). The HPLC mobile phase, consisting of 0.1 M NaH_2PO_4 , 1.8 mM 1-octanesulfonic acid and 1 mM EDTA (pH adjusted to 2.3) was pumped at a flow rate of 60 $\mu\text{l}/\text{min}$. The potential of the amperometric detector was set at 0.650 V. Under these experimental conditions, retention times were 5.50 and 6.80 min for L-DOPA and dopamine, respectively. Samples were analyzed by comparing the peak area of the neuroactive molecules and their elution times with respect to reference standards. The detection limit for L-DOPA and dopamine was 0.5 fmol/ μl , allowing measurement of baseline levels.

Western blot densitometry. Total head extracts were used for semiquantitative densitometric Western blot. Briefly, 50 μg of protein were loaded in 12% Laemmli-SDS-PAGE gels (Biorad Mini protean gel electrophoresis system) and transferred to nitrocellulose membranes for 3 h at 250 mA. Membranes were blocked overnight at 4°C temperature with PBS 0.1% tween (PBST) supplemented with 10% milk. Membranes were then incubated at 4 °C overnight with antiTH (Immunostar 1:1000) in 5% milk PBST, washed 3 times with PBST and incubated at room temperature for 1 h with KPL HPRT goat-antimouse (Sera Care) in 5% milk PBST. Blots were then washed 3 times in PBST, and bands were detected using the SuperSignal West pico Chemiluminescence Substrate (ThermoFisher) according to manufacturer's instructions. Blot signals were digitalized and quantified using ImageJ. Mouse monoclonal anti-actin (DHB, 1:3000) was used as loading control.

Statistical analysis. Differences between groups were assessed using ANOVA and Tuckey's pot-hoc test. Survival (life expectancy) was analyzed using the Mantel-Cox log-rank test. Survival of aged flies (older than 80 days of age) was analyzed using Fisher's exact test. Average data is plotted with its corresponding Standard Error, for each experiment the number of individual experiments is shown. Significance was defined as $p < 0.05$. All data was analyzed using GraphPad Prism 8 software.

Ethical approval. No human or vertebrates were used in this works. The project was approved by the Bioethical Committee of the Instituto de Biotecnología and performed accordingly to the ethical guidelines of our institution.

Results

Determination of optimal nicotine dosage. We determined an optimal nicotine concentration that was the least harmful to wt flies and the one that had the most beneficial therapeutic effect in the experimental flies through a set of preliminary dose–response experiments (Supplementary Fig. 1) that consisted in long term survival experiments in food supplemented with fixed doses of nicotine base (12, 24, and 48 μM). These doses were equivalent and had a similar effect to the ones used by Chambers et al.²⁶. All subsequent experiments were performed at 24 μM after determining that this was the optimal concentration. Even though, this nicotine concentration may superficially appear to be high, it is in the lower range of the concentrations used in other animal models such as mice and zebra fish that tend to be a lot higher. In mice, nicotine experimental concentrations range from 25 to 400 μM ²⁷. In zebra fish where the actual absorption is much higher because nicotine is supplemented in the water where the fish swim and it is absorbed through the skin, the range of nicotine concentrations used is from 5 to 100 μM ²⁸. In any case, the amount of nicotine fed to the flies is not the actual concentration reaching tissues and organs. In our experience, when animals are fed a chemical, the actual concentration that reaches the internal organs is about 1/100 of the original dose²⁹. Thus, given that the concentration of nicotine chosen in our study for feeding experiments is 24 μM , it is reasonable to estimate that the actual concentration in the hemolymph or the fly brain is about 200 nM. Interestingly, it has been established that in humans, the peak concentration of nicotine in the blood after smoking one cigarette is about 300 nM³⁰ which is a very similar concentration to the one estimated to reach the brain in our experiments.

Nicotine promotes survival in flies that express Sph-1. We defined the most effective chronic dose of nicotine on the lifespan of flies that have been previously used as a model for PD (*UAS-GFP/UAS-Sph; th-GAL4/+*)²¹ (Fig. 1 and Supplementary Fig. 1). Flies that co-express Sph-1 and GFP in their dopaminergic neurons exhibited a half-life of 7 weeks. Nicotine treated flies of the same genotype had a significant increase in their maximum life span from 16 to 17 weeks and also in their half-life from 7 to 13 weeks (Fig. 1). As a control genotype we used *UAS-GFP/+; th-GAL4/+* that expresses GFP, a protein unrelated to PD. Interestingly, the maximum lifespan and half life expectancy of nicotine treated control flies were significantly reduced from 18 to 16 weeks, and from 14 to 13 weeks respectively (Fig. 1). We also tested the effect of nicotine treatment in flies that express α -synuclein and GFP in their dopaminergic neurons (*UAS-GFP/+; th-GAL4/UAS-SNCA*), these flies have milder and more subtle phenotypes. Consistent with our results with Sph-1 expressing flies, nicotine treatment sig-

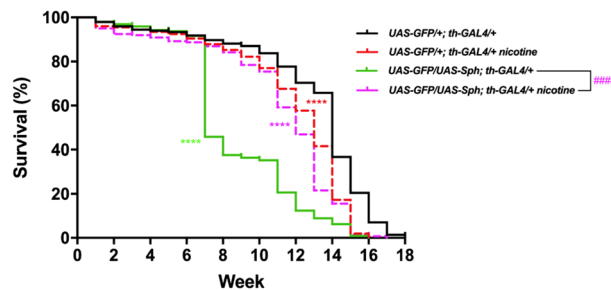


Figure 1. Nicotine treatment increases lifespan in Sph-1 expressing flies, while reduces it in control animals. Lifespan in control animals (that do not express Sph-1) is reduced when treated with 24 μ M nicotine. Flies expressing Sph-1 in dopaminergic neurons have a significantly reduced life span (green solid line). However, this is rescued by chronic nicotine treatment (magenta dotted lines). Data of untreated control animals are presented with black solid lines; data of nicotine-treated control animals are graphed with red dotted lines. Statistical analyses were performed using Log-rank (Mantel-Cox) test. Asterisks are used to show statistical significance between the untreated control line (*UAS-GFP/+; th-GAL4/+*) and all the other genotypes and conditions, the number symbol (#) is used to show statistical significance between the treated and untreated Sph-1 lines (*UAS-GFP/UAS-Sph; th-GAL4/+*) **** or #### $P < 0.0001$, $n = 200$ animals per experimental condition. All treated animals were chronically exposed to 24 μ M nicotine.

nificantly improved motility and survival parameters of the α -synuclein expressing flies while having a deleterious effect on the control genotype. It has previously been reported that the co-expression of Sph-1 and α -Syn partially suppresses the toxicity caused by the expression of either of the proteins alone. Interestingly, when we treated these flies (*UAS-GFP/UAS-Sph-1; th-GAL4/UAS-SNCA*) that have a milder PD-like phenotypes with nicotine, its effect still significantly improves their motility while slightly reducing maximal lifespan Fig. 2²¹. These data support the idea that nicotine promotes survival only in flies predisposed to develop a PD-like phenotype.

Nicotine rescues motility in flies that express Sph-1. One of the most characteristic phenotypes of PD is the impairment in spontaneous and induced motility³¹. The startle-induced climbing assay (negative geotaxis) is a paradigm that has been used to study how locomotion is reduced as flies age. Consistent with this, our data show that the climbing ability of flies diminishes as they age (Fig. 3A,B). Interestingly, untreated flies expressing Sph-1 in their dopaminergic neurons showed significantly faster decay in the startle-induced climbing ability in comparison with control animals (Fig. 3A,B). In order to quantify this effect, we recorded the accumulated motility over time (expressed as Area Under Curve). Our data show that Sph-1 expressing flies (green solid lines) exhibit reduced motility compared with control animals (Fig. 3A black solid lines). Remarkably, nicotine treatment completely suppresses this phenotype in Sph-1 expressing flies (Fig. 3A magenta dotted lines, and 3B). On the other hand, control flies treated with nicotine showed a significant reduction in their climbing ability (Fig. 3A, red dotted lines and B).

Experiments aimed at evaluating spontaneous activity show similar results, being the effect only observable during the light periods. Animals expressing Sph-1 show reduced spontaneous motility in comparison with the control genotype, particularly at older ages (Fig. 3C,D). This can be better evidenced when looking at actograms of these two strains (Fig. 3D). On the other hand, the motor phenotype observed in Sph-1 expressing animals is partially suppressed by chronic nicotine treatment (Fig. 3C, magenta dotted lines). Control animals that do not express Sph-1 exhibit reduced spontaneous motility when treated with nicotine (Fig. 3C, red dotted lines). Spontaneous activity at dark periods is not different (Supplementary Fig. 2).

Sph-1 expression induces impairment in olfaction in young flies. A recognized PD feature is early onset olfactory loss³². We decided to assess olfactory responses in the Sph-1 expressing flies. Newly eclosed (one day old) flies exhibit strong aversion towards the odorant benzaldehyde (1%), evidenced by a Performance Index close to 0.5. Figure 4A,B show that newly eclosed flies that express Sph-1 in their dopaminergic neurons have a significant reduction in their response towards Bz compared with control animals. If the animals are aged for 20 days no olfactory phenotype is observed in Sph-1 expressing animals compared with control flies. Chronic nicotine treatment reduced the aversive response to benzaldehyde in aged control animals while induced a slight but not significant increase in olfactory performance in aged Sph-1 expressing flies (Fig. 4C,D). These data supports the hypothesis that nicotine treatment negatively affects olfactory performance of control animals.

Nicotine treatment increases tyrosine hydroxylase levels and brain dopamine content. The nicotine effect on fly survival (Fig. 1) and motility (Fig. 3), might be explained by a modification in some of the functional properties of dopaminergic neurons, leading to cell survival and/or preserving neuronal function. We decided to explore both possibilities. We assessed the total number of dopaminergic neurons in the genotypes of interest and their change as flies age. We then evaluated whether nicotine treatment affects the number of surviving dopaminergic neurons in these animals. Our data show that the number of tyrosine hydroxylase positive neurons decrease in both genotypes, over aging (Fig. 5A,B and Supplementary Fig. 3). The number of positive

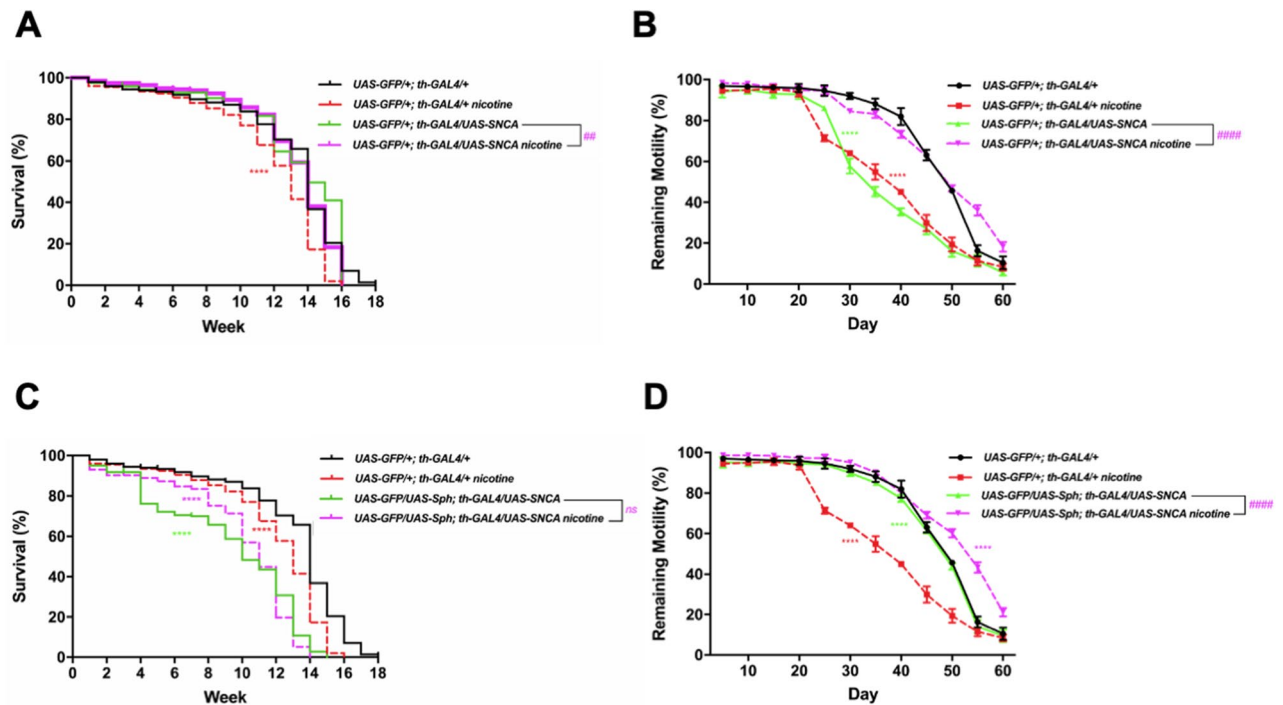


Figure 2. Nicotine treatment increases motility in α -synuclein (SNCA) expressing flies, while reduces it in control animals. **(A)** Lifespan and motility in control animals (that do not express SNCA) are reduced when treated with 24 μ M nicotine. Flies expressing SNCA in dopaminergic neurons have a significantly reduced life expectancy which is similar in chronic nicotine treated animals (24 μ M). **(B)** However, motility is rescued in genotypes that are predisposed to PD like symptoms and treated with nicotine. **(C,D)** show the lifespan and motility in animals that co-express Sph-1 and α -Syn. As previously reported²¹, animals that co-express both proteins have a milder phenotype than the ones that only express Sph-1. It has previously been reported that the co-expression of Sph-1 with α -Syn partially suppresses the toxicity caused by the expression of the individual proteins. The flies that co-express Sph-1 and α -Syn have milder phenotypes, and the effect of nicotine is also more subtle. Regardless of the penetrance of the PD like genotype, nicotine always appears to have beneficial therapeutic effects in the organisms that are predisposed to PD like symptoms. Data of untreated control animals are presented with black traces solid lines; data of nicotine-treated control animals are graphed with red traces dotted lines. Statistical analyses were performed using Log-rank (Mantel-Cox) test. Asterisks are used to show statistical significance between the untreated control line (*UAS-GFP/+; th-GAL4/+*) and all the other genotypes and conditions, the number symbol (#) is used to show statistical significance between the treated and untreated SNCA lines (*UAS-GFP/+; th-GAL4/UAS-SNCA*) **** or ##### $P < 0.0001$, ### $P < 0.001$, ns: no significant. $n = 200$ animals per experimental condition. All treated animals were chronically exposed to 24 μ M nicotine.

cells decreases faster in animals expressing Sph-1 in their dopaminergic neurons than in control flies, which is evidenced by the slope of the curves. Importantly, the rate of dopaminergic neuron decay is slowed down by nicotine treatment in the PD fly model, an effect that is more evident at later time points (40 days old and older). The evaluation of the number of dopaminergic neurons in 60 days old flies, show that nicotine treatment significantly increases the number of surviving dopaminergic neurons in Sph-1 expressing animals (Fig. 5B). On the other hand, nicotine treatment did not have any effect on the rate of dopaminergic cell loss in control animals (Fig. 5A), which is also evidenced in their number of surviving dopaminergic cells (Fig. 5B). Thus, our data suggest that at least some of the effects induced by nicotine on survival and motor behavior, involve differential changes of this cholinergic agonist on the two genotypes.

We then decided to determine if nicotine can affect dopaminergic function later in life. In order to explore this possibility, we evaluated total brain dopamine content in young and aged adult *Drosophila* brains. Our results show that there is a decrease in total dopamine levels in newly eclosed flies that express Sph-1 in their dopaminergic neurons compared with control animals (Fig. 6A). The difference in brain dopamine content observed between the experimental and control strains can still be observed in twenty days old flies (Fig. 6B). Chronic nicotine treatment significantly increases the dopamine levels in Sph-1 expressing flies to control levels. However, brain dopamine levels in control animals are not affected by nicotine treatment (Fig. 6B). Consistently with the reduced brain dopamine levels in Sph-1 expressing animals, newly eclosed flies that express Sph-1 exhibit decreased levels of tyrosine hydroxylase isoform 1 which is expressed in the dopaminergic neurons throughout the fly's life. In young flies the higher MW cuticle specific isoform 2, can also be detected; this isoform stops being expressed as soon as the cuticle is melanized and can no longer be detected in aged flies³³ (Fig. 6C and Supplementary Fig. 4). The aged PD fly model also exhibited reduced tyrosine hydroxylase protein expression

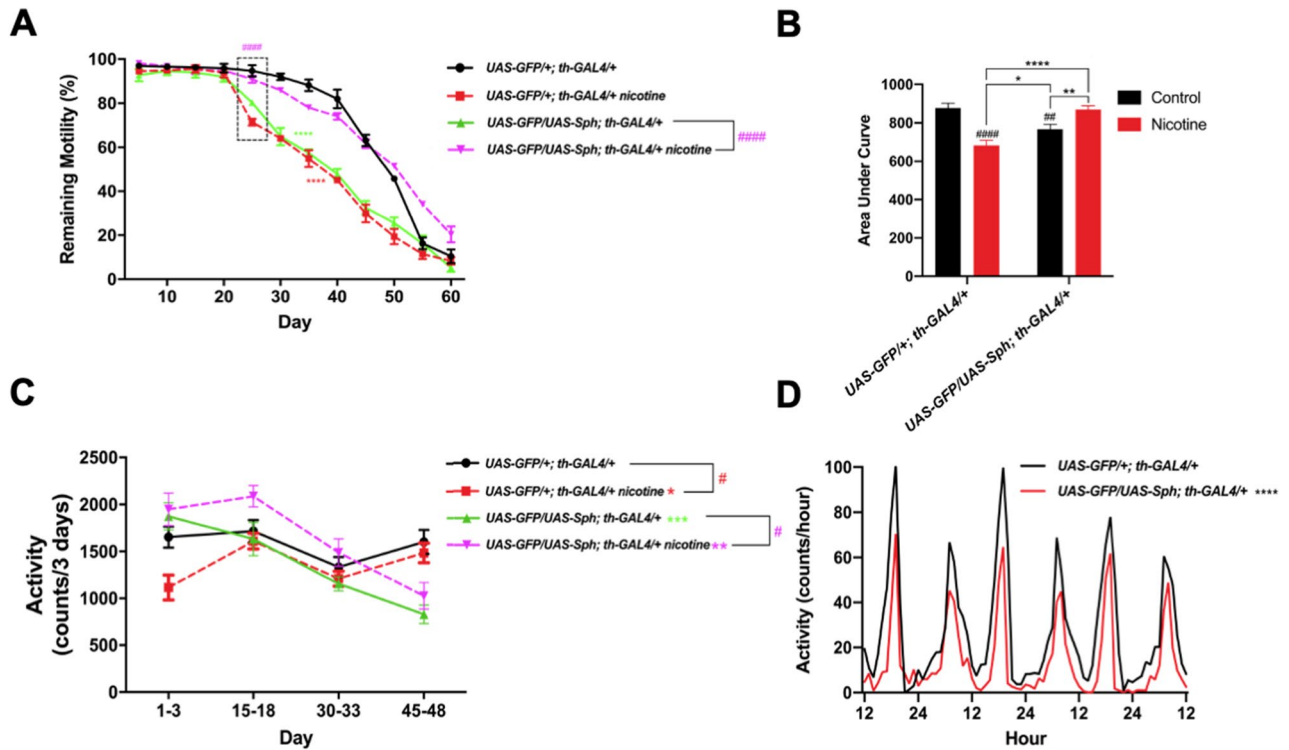


Figure 3. Nicotine rescues spontaneous and startle-induced motility in animals that express Sph-1 but deteriorates locomotion in control flies. (A) Startle-induced response of flies of the control genotype (*UAS-GFP/+; th-GAL4/+*) (black solid lines) exhibit a startle-induced response that is reduced when animals are treated with nicotine (red dotted lines). Startle-induced motility is significantly better when experimental genotype Sph-1 animals (*UAS-GFP/UAS-Sph; th-GAL4/+*) (green solid lines) are treated with nicotine (magenta dotted lines). (B) Cumulative locomotion in startle-induced experiments was assessed as area under the curve from data presented in (A). Results show that motor response is reduced in the Sph-1 expressing flies compared with the control genotype and that motility is rescued when experimental animals are treated with nicotine (## indicates $p < 0.01$ compared with control group). In addition, a significant decrease in motor response is observed in control flies treated with nicotine compared with flies that did not receive nicotine (### indicates $p < 0.0001$ compared with control situation). (C) Control animals (black solid lines) exhibit spontaneous activity that significantly decreases when flies are treated with nicotine (red dotted lines) while spontaneous activity is rescued in the Sph-1 expressing ones (magenta dotted lines). In (A–C), two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc was used to evaluate statistical differences between experimental groups. In all conditions $n = 100$, * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.0001$. Data from untreated flies are represented in dotted lines, while data from nicotine-treated animals are shown in solid lines. (D) Actograms of control and Sph-1 expressing flies. Data from control genotype are presented in black, data from Sph-1 expressing flies is shown in red. Two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc, **** indicates $p < 0.0001$ between groups, $n = 14$ animals per group. All treated animals were chronically exposed to 24 μM nicotine.

compared with control flies (Fig. 6D and Supplementary Fig. 4). Nicotine treatment did not affect tyrosine hydroxylase levels in aged control flies (Fig. 6D and Supplementary Fig. 4). However, nicotine treatment partially recovered the deficiency in dopamine and tyrosine hydroxylase protein levels in Sph-1 expressing flies. In fact, the significant difference observed between the two strains in control conditions (no nicotine treatment) is no longer observed between control and experimental flies due to an increased tyrosine hydroxylase expression in experimental flies after chronic nicotine treatment. This finding would be consistent with the idea that the recovery of brain dopamine levels observed after chronic nicotine treatment (Fig. 6B), could be at least partially explained by the increase in tyrosine hydroxylase protein levels (Fig. 6D).

Nicotine promotes an increase in survival even when treatment begins in aged animals. We then decided to determine whether nicotine has a long-lasting effect even if treatment is suspended when flies age. We also studied whether starting the nicotine treatment in older animals is still effective at promoting fly survival. We determined that the half-life of animals that express Sph-1 is 60 days (Fig. 7A); at this age, parkinsonian phenotypes are evident and there is an important decrease in the number of dopaminergic neurons (Fig. 5B). To determine if nicotine has a long-lasting effect even if treatment is suspended, we chronically treated Sph-1 expressing flies for 60 days and then suspended the treatment; in this condition, a significant lifespan extension was observed compared with animals that were never nicotine fed (Fig. 7A,B). Interestingly, flies that were not treated with nicotine for the first 60 days of their life and then received nicotine also had a significant

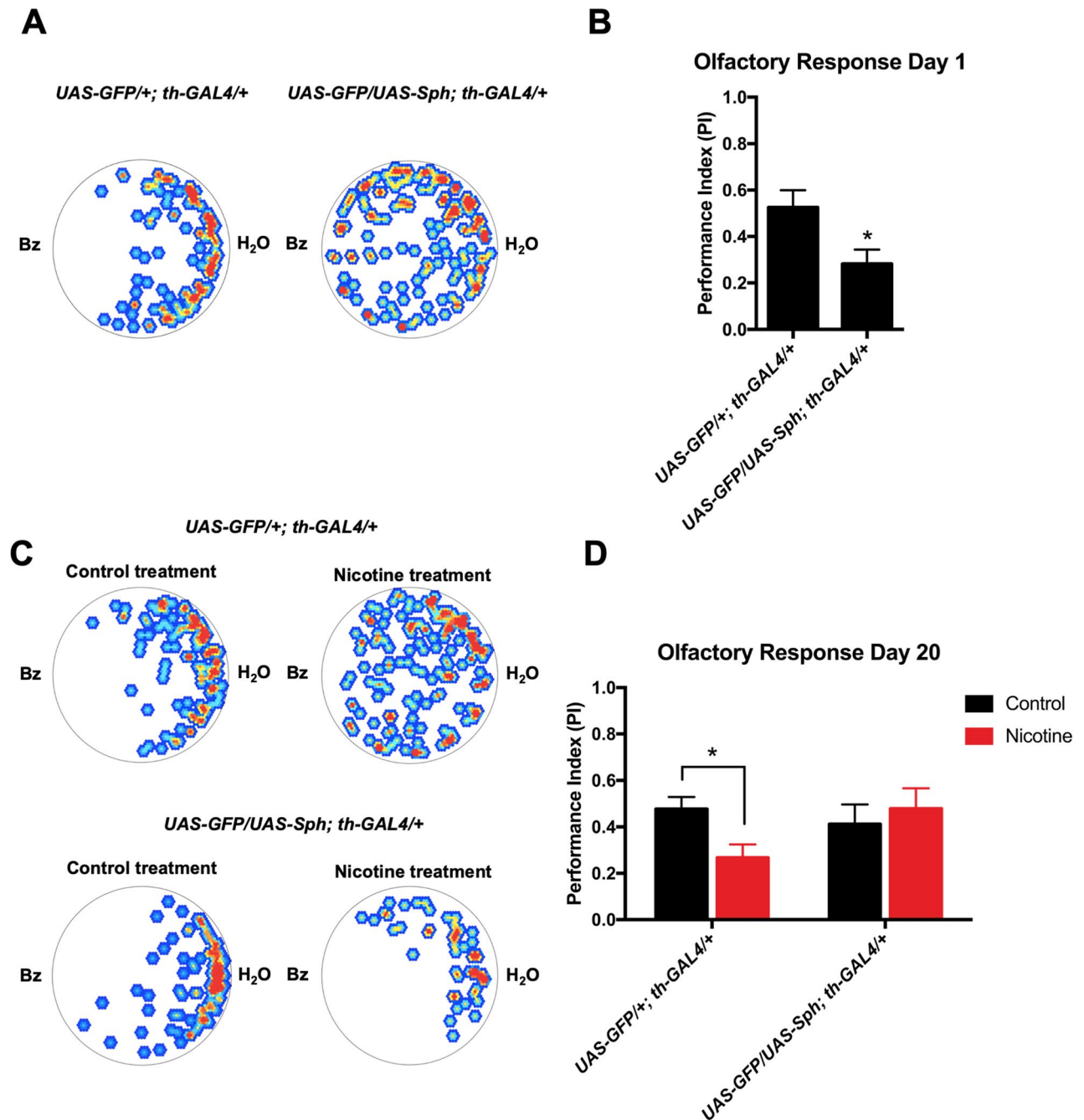


Figure 4. Young flies that express Sph-1 in dopaminergic neurons exhibit impaired olfactory responses. (A) Heat maps of a typical experiment showing the aversive response towards benzaldehyde (Bz) of recently eclosed flies of the control genotype (*UAS-GFP/+; th-GAL4/+*) and of flies expressing Sph-1 in dopaminergic neurons (*UAS-GFP/UAS-Sph; th-GAL4/+*). The position of flies over 3 min is presented in color ranges, where red or yellow hue represent points in the arena where flies spent longer time, while blue or white hue show regions in the arena where flies spent little or no time at all. In both cases, Bz was placed to the left side of the arena. (B) Quantification of the cumulative behavior of the flies tested for each genotype expressed as Performance Index. These data shows that aversive response is reduced in Sph-1 expressing flies compared with control flies. (C) Representative heat maps of behavior of flies (20 days old) from both genotypes, after chronic treatment with nicotine, or in control condition (no treatment). (D) Quantification of behavior of several flies (20 days old) show no difference in olfactory response between the two genotypes in control condition. Aged control flies treated with nicotine show reduced olfactory response compared with control flies not receiving the cholinergic agonist. Data from untreated animals were represented in black bars; data from nicotine-treated animals were represented in red bars. * $P < 0.05$, $n = 15$ animals per condition. Two-way ANOVA. Tuckey's post-hoc test. All treated animals were chronically exposed to 24 μM nicotine.

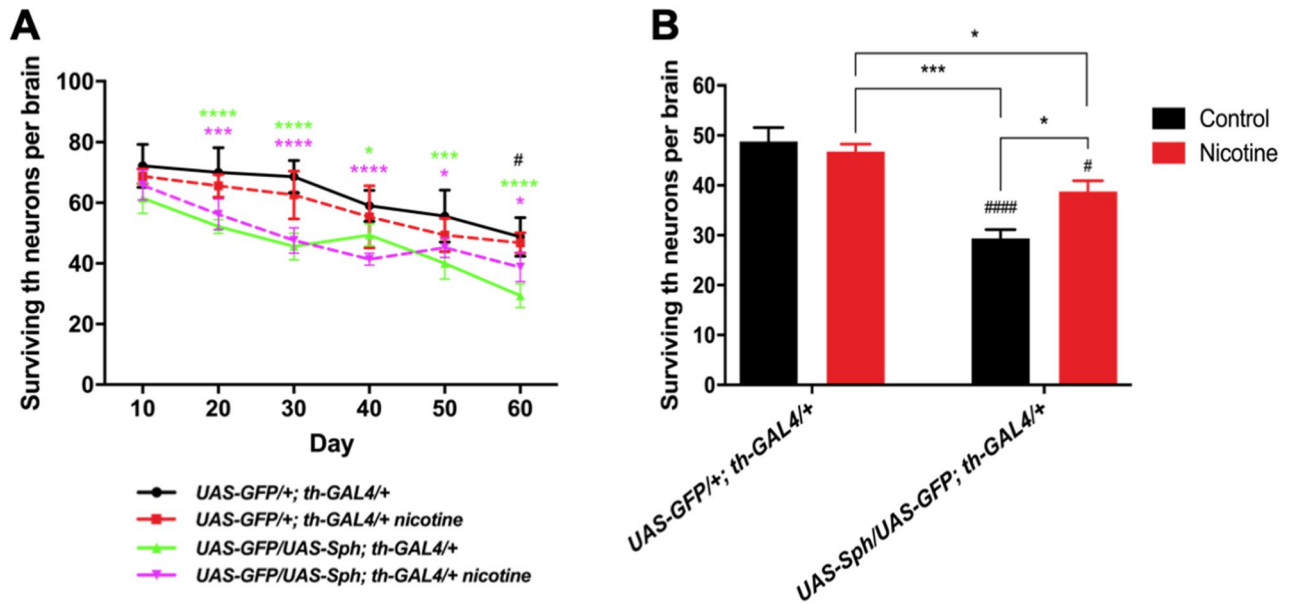


Figure 5. Nicotine promotes dopaminergic neuron survival. **A**) Dopaminergic neuron loss over time in control (*UAS-GFP/+; th-GAL4/+*) and experimental (*UAS-GFP/UAS-Sph; th-GAL4/+*) genotypes; untreated populations are represented by solid lines and treated populations by dotted lines. No significant differences were evidenced between the treated and untreated control genotype. Flies expressing Sph-1 in dopaminergic neurons have significantly fewer neurons than the control genotype throughout their life. However this difference becomes smaller between control and the Sph-1 expressing treated population as flies age. **B**) The number of surviving TH neurons in each experimental condition at the last time point studied (Day 60) evidences a reduction in th-positive neurons in the Sph-1 expressing flies compared with control genotype (#### $p < 0.0001$). Interestingly, this analysis also shows that nicotine treatment does not affect the number of th-positive neurons in the control genotype ($p > 0.05$), but it does so in the Sph-1 expressing flies (# $p < 0.05$ compared with the control genotype not treated with nicotine). The Sph-1 expressing flies treated with nicotine show a partial recovery in the number of th-positive neurons, since it is significantly increased compared with not-treated Sph-1 expressing flies ($*p < 0.05$), but does not reach the number of positive neurons recorded in the control genotype ($*p < 0.05$). In each case, data from controls were represented in black bars; data from animals treated with nicotine were represented in red bars. All statistical analysis were from two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test, $n = 5$ fly brains. In all cases experimental animals were treated with $24 \mu\text{M}$ nicotine.

extension of their lifespan (Fig. 7C,D). These results indicate that in the PD genotype nicotine has a beneficial effect on survival even when the drug is provided at older age, when the parkinsonian symptoms are already evident. Importantly, this effect appears to be very specific as suspension of the nicotine treatment slightly decreases flies' survival.

Discussion

PD is a neurodegenerative disease that has a multifactorial etiology. Previous research has found evidence of genetic and environmental factors that trigger or modulate disease progression. Importantly, only 10% of the cases studied have well-defined genetic causes while the rest are considered sporadic¹. It has been recognized that α -Syn and Sph-1 have a central role in PD progression^{7,34,35}. These proteins appear to be associated to different cellular functions, in particular to the assembly or recycling of presynaptic vesicles. Research on the processes that transform Sph-1 into a toxic protein is likely to be central for our understanding of PD and how neural metabolism contributes to this disease^{36–38}.

A limited number of reports exist on the role of Sph-1 in PD progression. There is evidence that the short isoforms of Sph-1 accumulate in post-mortem samples of patients with the disease. In vitro studies show that Sph-1 short isoforms promote protein aggregation and toxicity¹². Other studies support that the overexpression of Sph-1 or the presence of the mutation R621C in the gene coding for this protein, cause motor impairment and cell damage in PD patients and in a transgenic mice model³⁹. A previous work from our laboratory showed that panneurally-expressing Sph-1 flies exhibit motor alterations²¹, which is consistent with the present work where we express this protein only in dopaminergic neurons. Our data is consistent with the hypothesis that flies that exhibit reduced dopamine brain levels are also impaired in their climbing ability. Our results showing alterations in basal and startle-induced locomotion are also in agreement with previous reports demonstrating that flies that express genes associated with PD exhibit several motor and behavioral phenotypes such as centrophobism, bradykinesia and reduction in total distance traveled^{21,40,41}. Although most research about PD is focused on neurodegeneration and motor symptoms, there are many other non-motor symptoms that appear early in the disease and are associated to sensory processes such as olfaction, vision, or involve other manifestations like gastrointestinal problems and depression. These non-motor symptoms have a negative impact in the quality of life

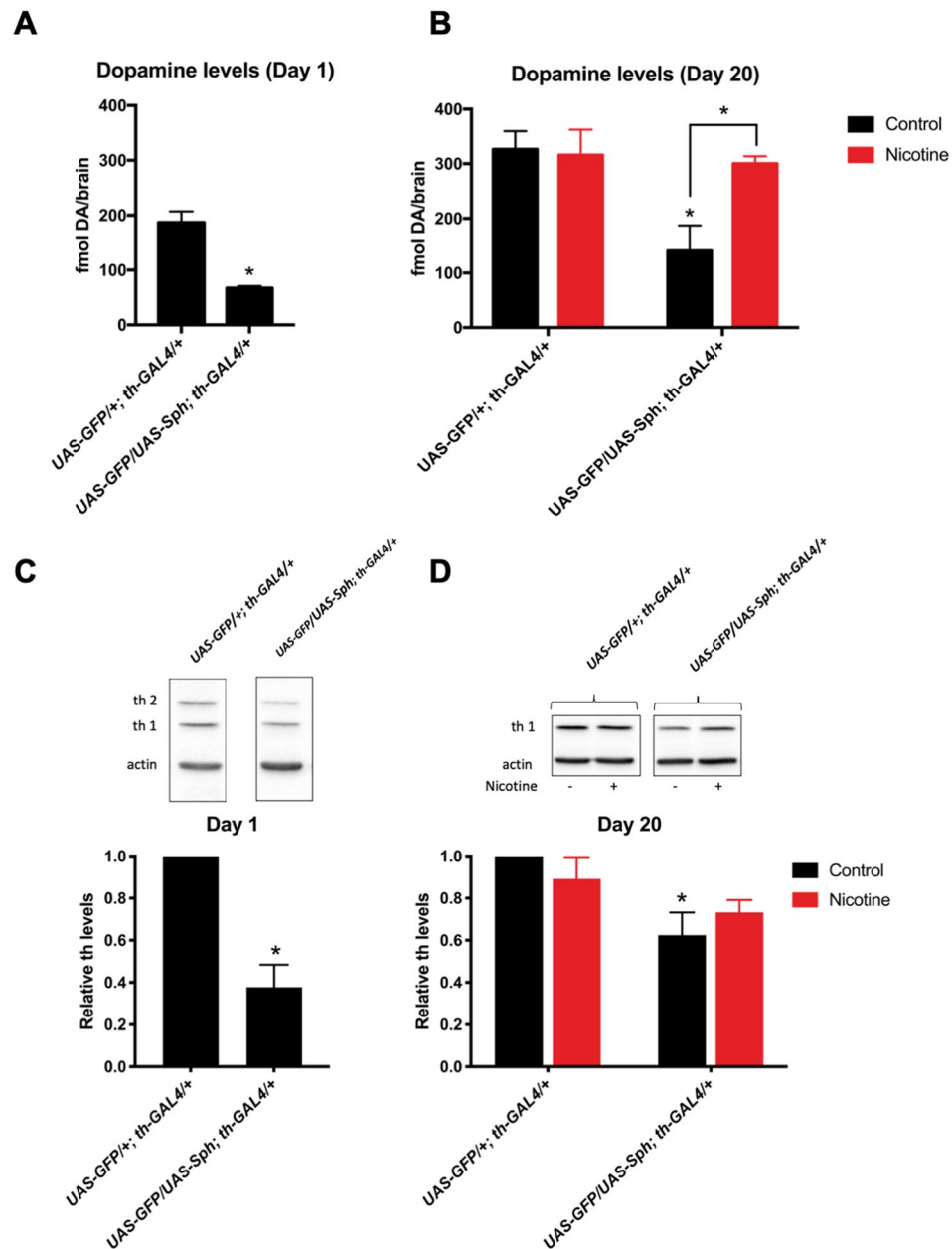


Figure 6. Nicotine exposure increases brain dopamine and tyrosine hydroxylase levels. (A) Newly eclosed flies (one day old) that express Sph-1 (*UAS-GFP/UAS-Sph; th-GAL4/+*) show reduced dopamine brain levels compared with control (*UAS-GFP/+; th-GAL4/+*) flies. * $p < 0.05$, t-test (B) After 20 days of aging, dopamine levels are reduced in animals that express Sph-1 compared with control flies ($\#p < 0.05$). 20 days of chronic nicotine treatment induces an increase in dopamine brain levels in Sph-1 expressing flies (* $p < 0.05$) so amine brain content becomes similar to levels recorded in control flies. Dopamine levels in control animals are not affected by the nicotine treatment. In each case, data from controls were represented in black bars; data from animals treated with nicotine were represented in red bars. Statistical analysis after two-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ($n = 5$ samples, each consisting of 5 fly brains). (C) At day one, tyrosine hydroxylase isoform 1 (th1) protein levels are reduced in flies that express Sph-1 (*UAS-GFP/UAS-Sph; th-GAL4/+*) when compared with control flies (*UAS-GFP/+; th-GAL4/+*), as can be observed in a representative experiment (top panel) in young flies. The higher MW cuticle-specific tyrosine hydroxylase isoform 2 (th2) can also be detected; this isoform stops being expressed as soon as the fly's cuticle is melanized and cannot be detected in aged flies. Quantification of several blots from independent experiments (bottom panel) show significant reduction in tyrosine hydroxylase protein levels (th1). * $P < 0.05$; t-test compared with control strain; $n = 3$ different samples obtained from independent groups of animals. (D) At day twenty, untreated Sph-1 expressing flies show lower tyrosine hydroxylase levels compared with control animals, as evidenced in a typical experiment (top panel). Quantification of several blots from three independent biological samples (bottom panel) show a significant lower protein expression in Sph-1 expressing flies (* $P < 0.05$). Nicotine treatment promotes an increase of tyrosine hydroxylase to normal levels compared with the control genotype ($p > 0.05$). Statistical analyses with two-way ANOVA and Tukey's post-hoc test, in $n = 3$ independent samples. In all cases experimental animals were treated with 24 μM nicotine, full blots used for quantifications are shown in Supplementary Fig. 4.

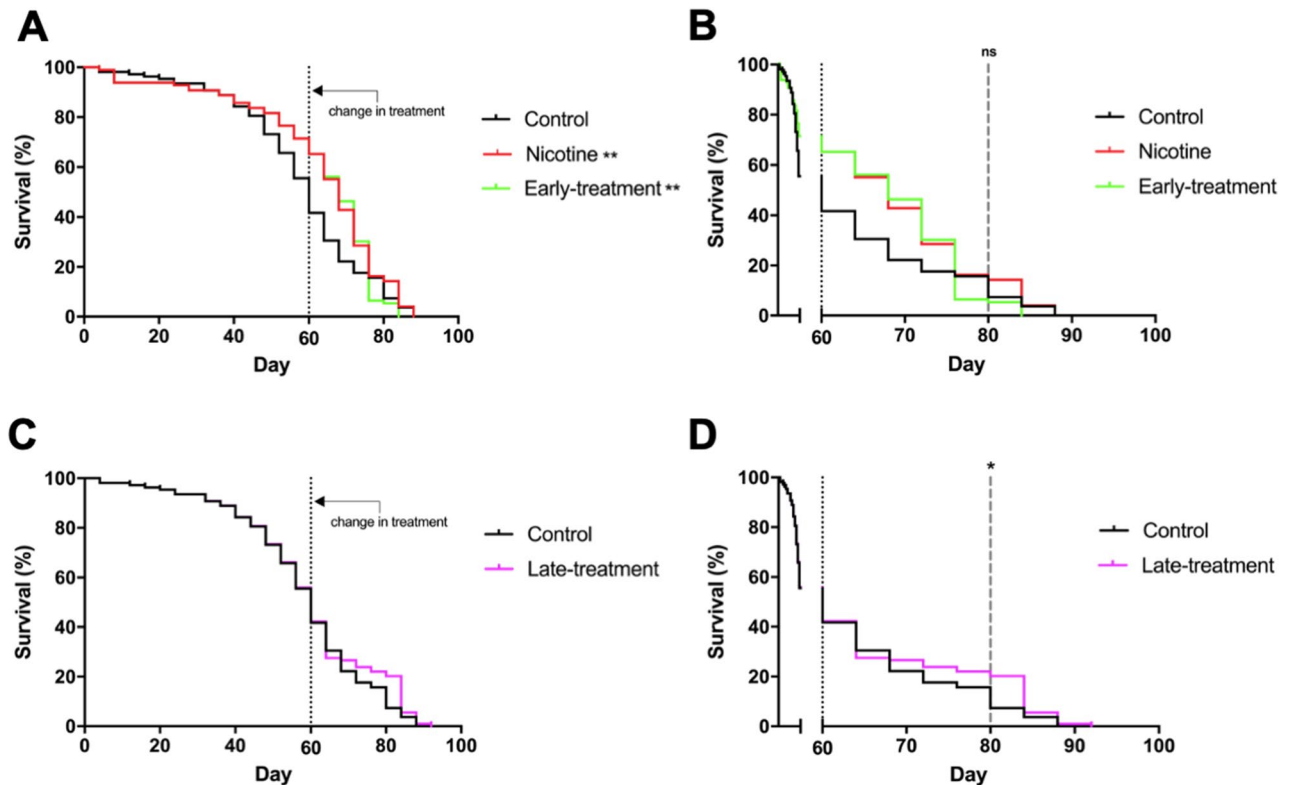


Figure 7. Late in life nicotine treatment increases survival in old flies that express Sph-1. Fifty percent of the population of flies expressing Sph-1 in dopaminergic neurons die by the time they are 60 days old. This time point was defined as the moment to shift treatment. (A) Flies that were treated for 60 days with nicotine (and were then transferred to normal food for the rest of their lives), had a significantly longer lifespan compared with untreated animals; a slight reduction in the lifespan of these flies can be observed when compared with animals that were chronically treated with nicotine for their whole life (80 days), however, this reduction was not statistically significant between these two groups. (B) Zoom in of the data shown in panel (A) after the 60 day time point to better observe the late lifetime effects. (C) Animals not treated with nicotine until they are 60 days old and onwards exhibit a significant increase in their lifespan compared with untreated ones. (D) Zoom in of the data shown in panel (C) the 60 day time point. Statistical analyses were performed using Log-rank (Mantel-Cox) test. $**P < 0.01$, $n = 100$ animals per experimental condition. Fisher's exact tests were used to evaluate the differences at day 80 ($*p < 0.05$, ns = no significant).

of patients^{42–44}, and are relevant because they are considered early markers of PD. Remarkably, our results show that in young Sph-1 expressing flies it is possible to observe a very characteristic non-motor symptom, olfactory dysfunction, before the onset of motor disabilities. Thus, the Sph-1 PD model share this characteristic phenotype with other animal models of the disease (e.g. the Pink1 mutant flies)²⁵, and provides an excellent opportunity to evaluate the effect of potential therapeutic molecules on early stages of PD progression.

In this regard, nicotine is a remarkably interesting molecule, since it is easily available and given its excitatory properties is able to induce neuronal activation; despite the fact it has several negative secondary effects. Nicotine is a chemical already being consumed by a big proportion of the world population and seems to exhibit PD preventive properties. Actually, it has been proposed that people with parkinsonian risk probably discover empirically that nicotine suppresses early-onset tremors and begin to self-medicate with tobacco, thus preventing or delaying the onset of this disease^{17,19}. Research from other groups has associated nicotine with protective and/or preventive effects against parkinsonian symptoms; similar protective effects have been observed in mammalian models where dyskinesias are suppressed by nicotine. The understanding of the molecular mechanisms that underlie the protective or preventive effects of nicotine, is an important research avenue where the use of animal or in vitro models could be very useful^{18,26,45–49}. Here we decided to advance on this issue, by studying the potential anti-parkinsonian effect of nicotine in flies that express Sph-1²¹. Chronic nicotine treatment was effective at reducing motor parkinsonian phenotypes caused by Sph-1 expression and it did slow down dopaminergic neuron loss. The increase in dopamine levels in the brains of the Sph-1 flies 20 days after nicotine exposure suggests that the protective effect of this drug is via the stimulation of dopamine synthesis and/or release. The neuronal activating properties of nicotine may promote a healthier neuronal metabolism that directly augments dopamine homeostasis. Previous reports have shown that nicotine directly stimulates dopamine release through the activation of nAChRs present in dopaminergic neurons, lowering cytoplasmic dopamine concentrations and probably reducing levels of chelatable iron. Nicotine protective effect is mediated through nAChRs activation as it is blocked by mecamylamine, at least in other models⁴⁹. Lower intracellular dopamine and iron levels induced

by nicotine stimulation reduce oxidative stress and therefore decrease the production of dopamine degradation products such as quinones that are known to be toxic. Thus, the intracellular environment becomes less aggressive and proteins that are enriched in Lewy bodies, such as Sph-1 and α -Syn become less prone to aggregate. The unaggregated proteins are therefore unable to sequester tyrosine hydroxylase, and keep playing their normal functions, which include their interaction with the SNARE complex, thus maintaining the ability of the dopaminergic neurons to release dopamine even in a genetic environment that predisposes to PD^{50–52}. Increased brain dopamine levels may be explained by de novo synthesis of the bioamine as the enzyme tyrosine hydroxylase exhibits feedback inhibition by the catecholamine. Reducing dopamine intracellular levels might result in less enzyme inhibition and therefore, increased activity of the biosynthetic enzyme. The newly synthesized dopamine is then rapidly transported into presynaptic vesicles by VMAT2, secreted after nicotine stimulation and rapidly recycled by DAT and VMAT into presynaptic vesicles, leading to a net increase in dopamine content⁵³.

An interesting finding of our work is that nicotine does not have beneficial effects in control flies; actually, reducing their lifespan and inducing motor impairment in these animals. Our results are consistent with what has previously been reported in Parkin mutant flies where it has been shown that nicotine also promotes survival only in the predisposed genotype. Importantly, in both cases the nicotine effects are dose-dependent²⁶. How nicotine differentially affects the control and PD genotypes is outside the scope of this work. However, a possible explanation for the differential effect of nicotine in control and the PD fly model, is that the chemical directly improves cell metabolism and overall functionality in cells. Thus, in metabolically challenged cells such as the dopaminergic neurons that express Sph-1 which contain reduced amine levels, the activation of nicotinic receptors, the consequent depolarization and increase in intracellular calcium enhances dopamine synthesis and release, thus improving dopaminergic function, as discussed above^{54,55}. On the other hand, in control non-parkinsonian flies that exhibit normal dopamine levels, nicotine might act as an excitotoxic insult, due to the fact that promoting dopamine metabolism could result in the generation of quinones and an imbalance in the intracellular redox. Further work is needed to advance our understanding on how nicotine differentially affects these genotypes.

Early PD diagnosis is associated to a better prognosis and therapeutic management, which is relevant for a better quality of life of patients. Early PD diagnosis continues to be difficult and once diagnosis is reached, there are very few treatments options for PD patients. L-DOPA continues to be the most widely used treatment for PD and its administration usually begins once the motor symptoms are evident. It is known that this chemical induces tolerance and overtime show reduced effectiveness, making dyskinesias reappear^{56,57}. The search of new treatments with fewer side effects continues. Our results show that a protocol for nicotine chronic treatment is beneficial for the PD fly model. Feeding PD flies nicotine and then stopping its consumption still has beneficial effects in fly survival. Notably, a nicotine treatment that begins later in life increases fly survival in the Sph-1 expressing flies. Our results highlight the necessity to keep studying the effects of nicotine in PD models such as the Sph-1 expressing flies and advance on the idea that nicotine could be an important seed molecule for the development of new treatments even when the disease is well advanced.

In conclusion our data show that the PD model by expression of Sph-1 in dopaminergic neurons provides a good opportunity to study the early prodromal stages of PD, while also the late onset symptoms such as neurodegeneration and motor impairment in aged animals. On the other hand, working on this animal model has allowed us to advance on the therapeutic effects of nicotine treatment over several PD-linked features. The protective effect of nicotine appears to be specific for the genotype predisposed to develop a parkinsonian phenotype and provide a hint on the idea that nicotine treatment even in later stages of the disease could be beneficial to patients. Our findings provide new ideas that contribute to a better understanding on the mechanisms underlying the positive effects of nicotine in PD.

Received: 23 August 2020; Accepted: 30 March 2021

Published online: 05 May 2021

References

- de Lau, L. M. & Breteler, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **5**, 525–535 (2006).
- Dexter, D. T. & Jenner, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **62**, 132–144 (2013).
- Frucht, S. J. Parkinson disease: an update. *Neurologist* **10**, 185–194 (2004).
- Pollanen, M. S., Dickson, D. W. & Bergeron, C. Pathology and biology of the lewy body. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **52**, 183–191 (1993).
- Cheng, F., Vivacqua, G. & Yu, S. The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J. Chem. Neuroanat.* **42**, 242–248 (2011).
- Wang, W. *et al.* A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17797–17802 (2011).
- Kalia, L. V., Kalia, S. K., McLean, P. J., Lozano, A. M. & Lang, A. E. A-synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* **73**, 155–169 (2013).
- McFarland, M. A., Ellis, C. E., Markey, S. P. & Nussbaum, R. L. Proteomics analysis identifies phosphorylation-dependent α -synuclein protein interactions. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 2123–2137 (2008).
- Szargel, R. *et al.* Synphilin-1A inhibits seven in absentia homolog (SIAH) and modulates α -synuclein monoubiquitylation and inclusion formation. *J. Biol. Chem.* **284**, 11706–11716 (2009).
- Krüger, R. The role of synphilin-1 in synaptic function and protein degradation. *Cell Tissue Res.* **318**, 195–199 (2004).
- Ribeiro, C. S., Carneiro, K., Ross, C. A., Menezes, J. R. L. & Engelender, S. Synphilin-1 is developmentally localized to synaptic terminals, and its association with synaptic vesicles is modulated by α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **277**, 23927–23933 (2002).
- Eyal, A. *et al.* Synphilin-1A: an aggregation-prone isoform of synphilin-1 that causes neuronal death and is present in aggregates from α -synucleinopathy patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5917–5922 (2006).
- Eyal, A. & Engelender, S. Synphilin isoforms and the search for a cellular model of lewy body formation in Parkinson's disease. *Cell Cycle* **5**, 2082–2086 (2006).
- Humbert, J. *et al.* Parkin and synphilin-1 isoform expression changes in Lewy body diseases. *Neurobiol. Dis.* **26**, 681–687 (2007).

15. Brudek, T. *et al.* Altered α -synuclein, parkin, and synphilin isoform levels in multiple system atrophy brains. *J. Neurochem.* **136**, 172–185 (2016).
16. Connolly, B. S. & Lang, A. E. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **311**, 1670–1683 (2014).
17. Hernán, M. A., Takkouche, B., Caamaño-Isorna, F. & Gestal-Otero, J. J. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **52**, 276–284 (2002).
18. Quik, M., Perez, X. A. & Bordia, T. Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **27**, 947–957 (2012).
19. Ma, C., Liu, Y., Neumann, S. & Gao, X. Nicotine from cigarette smoking and diet and Parkinson disease: a review. *Transl. Neurodegener.* **6**, 1–7 (2017).
20. Quik, M., O'Leary, K. & Tanner, C. M. Nicotine and Parkinson's disease: implications for therapy. *Mov. Disord.* **23**, 1641–1652 (2008).
21. Hernández-Vargas, R. *et al.* Synphilin suppresses α -synuclein neurotoxicity in a Parkinson's disease Drosophila model. *Genesis* **49**, 392–402 (2011).
22. Ali, Y. O., Escala, W., Ruan, K. & Zhai, R. Grace. Assaying locomotor, learning, and memory deficits in Drosophila models of neurodegeneration. *J. Vis. Exp.* **49**, 1–5 (2011).
23. Pfeiffenberger, C., Lear, B. C., Keegan, K. P. & Allada, R. Locomotor activity level monitoring using the Drosophila activity monitoring (DAM) system. *Cold Spring Harb. Protoc.* **5**, 1238–1242 (2010).
24. Colomb, J., Reiter, L., Blaszkiewicz, J., Wessnitzer, J. & Brembs, B. Open source tracking and analysis of adult Drosophila locomotion in Buridan's paradigm with and without visual targets. *PLoS ONE* **7**, 1–12 (2012).
25. Molina-Mateo, D. *et al.* Characterization of a presymptomatic stage in a Drosophila Parkinson's disease model: unveiling dopaminergic compensatory mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1863**, 2882–2890 (2017).
26. Chambers, R. P. *et al.* Nicotine increases lifespan and rescues olfactory and motor deficits in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* **253**, 95–102 (2013).
27. Khwaja, M., McCormack, A., McIntosh, J. M., Di Monte, D. A. & Quik, M. Nicotine partially protects against paraquat-induced nigrostriatal damage in mice; link to $\alpha\beta\gamma$ nAChRs. *J. Neurochem.* **100**, 180–190 (2007).
28. Klee, E. W., Ebbert, J. O., Schneider, H., Hurt, R. D. & Ekker, S. C. Zebrafish for the study of the biological effects of nicotine. *Nicotine Tob. Res.* **13**, 301–312 (2011).
29. Silva, B., Molina-Fernández, C., Ugalde, M. B., Tognarelli, E. I., Angel, C. & Campusano, J. M. Muscarinic ACh receptors contribute to aversive olfactory learning in Drosophila. *Neural Plast.* **2015**, (2015).
30. Matta, S. G. *et al.* Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology* **190**, 269–319 (2007).
31. Fox, S. H. *et al.* International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **33**, 1248–1266 (2018).
32. Doty, R. L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 329–339 (2012).
33. Friggi-Grelin, F., Iché, M. & Birman, S. Tissue-specific developmental requirements of Drosophila tyrosine hydroxylase isoforms. *Genesis* **35**, 175–184 (2003).
34. Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6469–6473 (1998).
35. Spillantini, M. G. & Goedert, M. Neurodegeneration and the ordered assembly of α -synuclein. *Cell Tissue Res.* **373**, 137–148 (2018).
36. Engelender, S. *et al.* Synphilin-1 associates with α -synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat. Genet.* **22**, 110–114 (1999).
37. Chung, K. K. K. *et al.* Parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat. Med.* **7**, 1144–1150 (2001).
38. Kawamata, H., Mclean, P. J., Sharma, N. & Hyman, B. T. Interaction of α -synuclein and synphilin-1: effect of Parkinson's disease-associated mutations. *J. Neurochem.* **77**, 929–934 (2001).
39. Nuber, S. *et al.* Transgenic overexpression of the alpha-synuclein interacting protein synphilin-1 leads to behavioral and neuropathological alterations in mice. **11**, 107–120 (2010).
40. Jimenez-Del-Rio, M., Guzman-Martinez, C. & Velez-Pardo, C. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in drosophila melanogaster exposed to iron and paraquat. *Neurochem. Res.* **35**, 227–238 (2010).
41. Riemensperger, T. *et al.* Behavioral consequences of dopamine deficiency in the Drosophila central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 834–839 (2011).
42. Poewe, W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* **15**, 14–20 (2008).
43. Pfeiffer, R. F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* **22**, S119–S122 (2016).
44. Tibar, H. *et al.* Non-motor symptoms of Parkinson's Disease and their impact on quality of life in a cohort of Moroccan patients. *Front. Neurol.* **9**, 1–12 (2018).
45. Ross, G. W. & Petrovitch, H. Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. *Drugs Aging* **18**, 797–806 (2001).
46. Quik, M., O'Neill, M. & Perez, X. A. Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: importance of the animal model. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 229–235 (2007).
47. Bordia, T., Campos, C., McIntosh, J. M. & Quik, M. Nicotinic receptor-mediated reduction in L-DOPA-induced dyskinesias may occur via desensitization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **333**, 929–938 (2010).
48. Lu, J. Y. D. *et al.* The neuroprotective effect of nicotine in Parkinson's disease models is associated with inhibiting PARP-1 and caspase-3 cleavage. *PeerJ* **2017**, (2017).
49. Mouhape, C. *et al.* Nicotine-induced neuroprotection in rotenone in vivo and in vitro models of Parkinson's disease: evidences for the involvement of the labile iron pool level as the underlying mechanism. *Neurotox. Res.* **35**, 71–82 (2019).
50. Hong, D. P., Fink, A. L. & Uversky, V. N. Smoking and Parkinson's disease: does nicotine affect α -synuclein fibrillation? *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1794**, 282–290 (2009).
51. Kardani, J., Sethi, R. & Roy, I. Nicotine slows down oligomerisation of α -synuclein and ameliorates cytotoxicity in a yeast model of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1863**, 1454–1463 (2017).
52. Nakashima, S. & Ikuta, F. Tyrosine hydroxylase protein in Lewy bodies of parkinsonian and senile brains. *J. Neurol. Sci.* **66**, 91–96 (1984).
53. Daubner, S. C., Le, T. & Wang, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **508**, 1–12 (2011).
54. Herman, A. I., Devito, E. E., Jensen, K. P. & Sofuoglu, M. Pharmacogenetics of nicotine addiction: role of dopamine. *Pharmacogenomics* **15**, 221–234 (2014).
55. Wing, V. C., Payer, D. E., Houle, S., George, T. P. & Boileau, I. Measuring Cigarette Smoking-Induced Cortical Dopamine Release: A [11 C] FLB-457 PET Study. 1417–1427 (2015).
56. Fahn, S. How do you treat motor complications in Parkinson's disease: medicine, surgery, or both?. *Ann. Neurol.* **64**, 56–64 (2008).
57. Schapira, A. H. V., Emre, M., Jenner, P. & Poewe, W. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* **16**, 982–989 (2009).

Acknowledgements

This work was performed in fulfillment of the requirements for a PhD degree of Angel Carvajal-Oliveros who is enrolled in the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas at the Universidad Nacional Autónoma de México (ID 306001509). Angel received fellowships (446128) from CONACYT, PAEP-UNAM, Santander Universidades and IBRO LARC Programs. Rafaella Zárate was supported by a doctoral fellowship from ANID, Chile. We thank Dr. Maria Estela Andrés, Dra. Katia Gysling, and Marcela González from Pontificia Universidad Católica de Chile for help with HPLC determinations. The authors are also grateful to Dr. Ivan Sánchez-Díaz and M. Sci. René Hernández-Vargas for technical support and *Drosophila* care.

Author contributions

A.C.O. and E.R. were responsible for research design, JMC and VNP assisted with data curation and interpretation. A.C.O., J.M.C. and E.R. were responsible for writing the manuscript. C.D.B. and R.V.Z. assisted to A.C.O. with interpretation of olfaction and HPLC experiments. A.C.O., J.M.C., V.N.P. and E.R. reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the CONACyT (Grant Number 255478) and by DGAPA-PAPIIT (Grant Number IN206517).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88910-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



Studying the Contribution of Serotonin to Neurodevelopmental Disorders. Can This Fly?

Angel Carvajal-Oliveros¹ and Jorge M. Campusano^{2,3*}

¹ Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ² Laboratorio Neurogenética de la Conducta, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, ³ Centro Interdisciplinario de Neurociencia UC, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Serotonin is a biogenic amine that acts as neurotransmitter in different brain regions and is involved in complex behaviors, such as aggression or mood regulation. Thus, this amine is found in defined circuits and activates specific receptors in different target regions. Serotonin actions depend on extracellular levels of this amine, which are regulated by its synthetic enzymes and the plasma membrane transporter, SERT. Serotonin acts also as a neurotrophic signal in ontogeny and in the mature brain, controlling cell proliferation, differentiation, neurogenesis, and neural plasticity. Interestingly, early alterations in serotonergic signaling have been linked to a diversity of neurodevelopmental disorders, including autism spectrum disorder (ASD), attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD), or mental illnesses like schizophrenia or depression. It has been proposed that given the complex and numerous actions of serotonin, animal models could better serve to study the complexity of serotonin actions, while providing insights on how hindering serotonergic signaling could contribute to brain disorders. In this mini-review, it will be examined what the general properties of serotonin acting as a neurotransmitter in animals are, and furthermore, whether it is possible that *Drosophila* could be used to study the contribution of this amine to neurodevelopmental and mental disorders.

Keywords: neurodevelopmental disorders, serotonin, SERT, *Drosophila*, ASD

OPEN ACCESS

Edited by:

Clare C. Rittschof,
University of Kentucky, United States

Reviewed by:

Therese A. Kosten,
University of Houston, United States
Jorge A. Bergado,
Universidad del Sinú, Colombia

*Correspondence:

Jorge M. Campusano
jcampusano@bio.puc.cl

Specialty section:

This article was submitted to
Learning and Memory,
a section of the journal
Frontiers in Behavioral Neuroscience

Received: 01 September 2020

Accepted: 14 December 2020

Published: 12 January 2021

Citation:

Carvajal-Oliveros A and
Campusano JM (2021) Studying
the Contribution of Serotonin
to Neurodevelopmental Disorders.
Can This Fly?
Front. Behav. Neurosci. 14:601449.
doi: 10.3389/fnbeh.2020.601449

SEROTONIN IS A BIOGENIC AMINE ACTING NOT ONLY AS A CLASSICAL NEUROTRANSMITTER, BUT ALSO AS A NEUROTROPHIC FACTOR

Biogenic amines (BAs) are a group of neuroactive molecules that contain one or more amino group, are synthesized from amino acids, and act as classical neurotransmitters, neuromodulators or neurohormones. Among them, serotonin is a BA associated with a number of physiological processes and the control of several behaviors, including sleep regulation, social rank, mood and learning. The alteration of serotonergic neural systems is associated with some neurodevelopmental and mental disorders, including anxiety, depression and ASD. However, we are far from fully understanding the complex cellular and molecular actions of amines and how the alteration of neural systems that store and release them contributes to these disorders.

As with other classical neurotransmitters, serotonin is synthesized in the cytosol in a two-step biosynthetic pathway (**Figure 1**). The enzyme tryptophan hydroxylase (TPH, aka TRH or TrpH) catalyzes the conversion of Tryptophan to 5-hydroxytryptophan. Then, the Dopa decarboxylase enzyme (DDC, aka AADC) catalyzes the final conversion to serotonin (5-hydroxytryptamine). Serotonin is stored in vesicle compartments located mainly in axon terminals (the presynaptic neuron). Upon the arrival of an action potential, these vesicles fuse with the plasma membrane to release their content in the extracellular space (the synaptic cleft), so that the neurotransmitters can reach specific receptors in the postsynaptic neuron to induce cellular responses. These receptors mostly belong to the superfamily of G protein-coupled metabotropic receptors. Finally, the end of the action of the neurotransmitter depends on the reuptake of the chemical from the synapse back into the presynaptic neuron, via SERT. Once inside the cytosol, the neurotransmitter can be reutilized as a neurotransmitter (is transported back into a synaptic vesicle by the vesicle monoamine transporter, VMAT), or it can be metabolized by the MAO enzyme (Daubert and Condrón, 2010). The two biosynthetic enzymes and SERT help define the neurochemical identity of a neuron as serotonergic (**Figure 1**).

Interestingly, serotonin also plays a critical role as a signaling/trophic molecule early in development (Gaspar et al., 2003; Daubert and Condrón, 2010; Bonnín and Levitt, 2011). Actually, when no cells from the developing organism are able to synthesize or release serotonin, some placental cells transiently acquire the ability to synthesize and release serotonin, which can then reach the embryo (Bonnín and Levitt, 2011). Earlier, the first source for serotonergic information for the rodent embryo is the maternal blood (Koren et al., 1966). In addition, neurons that in the rodent mature brain are not serotonergic (e.g., thalamic neurons), transiently express VMAT and SERT early in development (by E13) in order to accumulate and release serotonin at later times (Lebrand et al., 1996; Cases et al., 1998). All these findings support the idea that this amine is required early in development and that non-embryonic sources of this BA are crucial to fulfill this need. Later in development, the embryonic neurons of the Raphe Nucleus, the main serotonergic nucleus in vertebrates, acquire the ability to synthesize and release serotonin, and the fetus becomes independent of the exogenous supply of the amine. It is possible to find the first serotonergic neurons in 5-week old human embryos, earlier than other aminergic populations (Sundstrom et al., 1993). A similar situation—serotonin neurons established a little earlier than dopaminergic cells—is observed in rodents. Thus, it is possible to propose a dynamic change in serotonin levels in the central nervous system (CNS) over development (**Figure 2**; Suri et al., 2015). Importantly, it has been postulated that interruption or alteration of the serotonergic information reaching the embryo or fetus, is implicated in a higher incidence for several brain disorders including ASD, major depressive disorder (MDD), ADHD, anxiety, and schizophrenia, among others (Schain and Freedman, 1961; Bleich et al., 1988; Caspi et al., 2003; Hranilovic et al., 2007; Olivier et al., 2011). This mini review intends to discuss the contribution of serotonin to the onset and progression

of behavioral traits common to several neuropsychiatric diseases. However, particular attention is placed on ASD, given that several evidences support that this amine plays a role in this particular disorder.

ALTERATION IN SEROTONIN LEVELS ASSOCIATED WITH ASD AND OTHER BRAIN DISORDERS

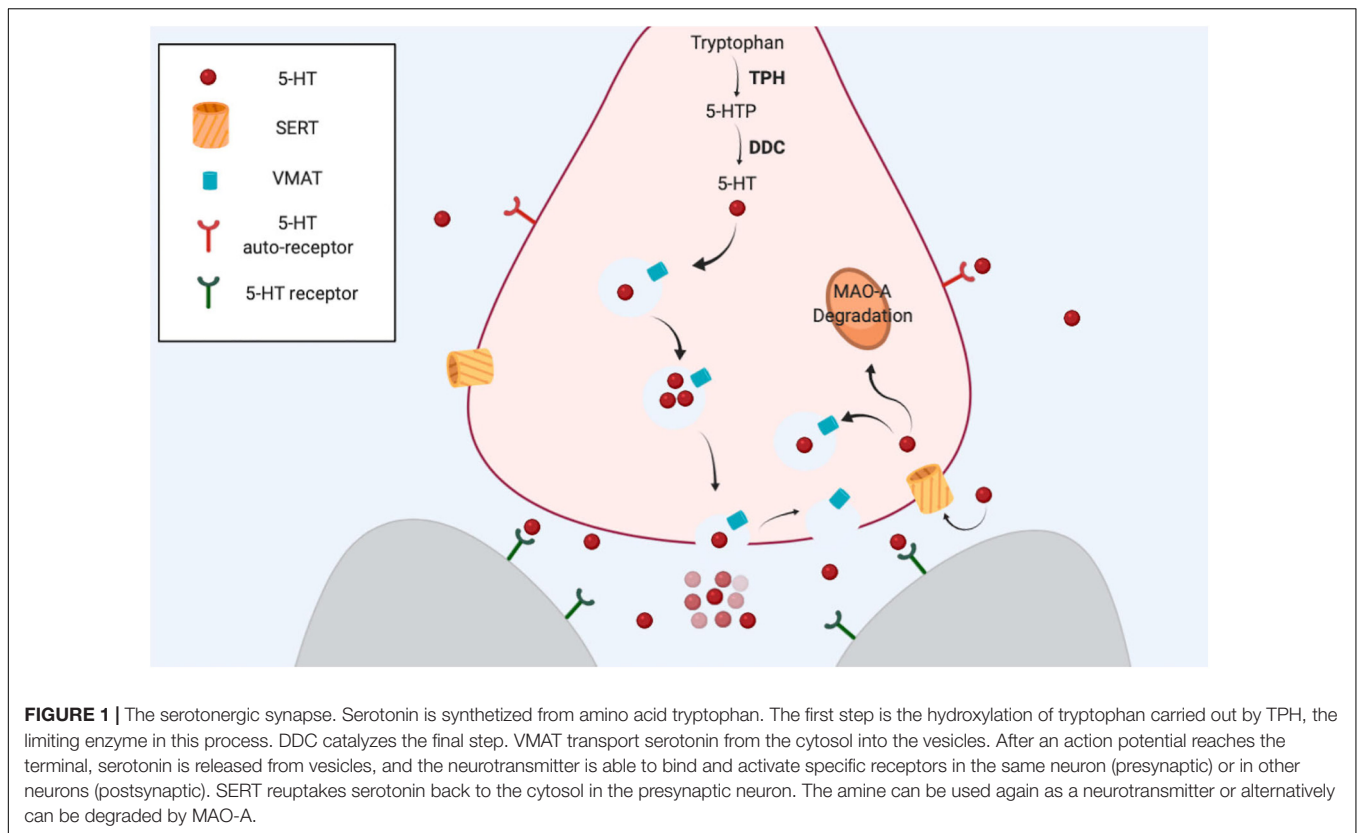
It has been reported that about 30% of children diagnosed with ASD show higher levels of serotonin in the blood as compared to control children (Gabriele et al., 2014). The increased serotoninemia seems to be unrelated to any specific genetic alteration linked to this disorder. Actually, only about 15–20% of ASD cases are genetic; among the alterations associated with ASD, it has been reported mutations in specific genes (e.g., Shank or Neuroliquin 3), gene copy number variation, and chromosomal disorders (Miles, 2011). Increase in blood serotonin concentration is also detected in schizophrenic patients, while hyposerotoninemia has been described in people diagnosed with depression (Muck-Seler et al., 2004). Most of these disorders are classified as neurodevelopmental disorders, in that genetic or genomic alterations underlying these conditions are present as early as the embryo develops and/or over critical time windows in the development of brain neural circuits (Suri et al., 2015).

Similarly, it has been proposed that environmental factors affecting serotonergic signaling (e.g., exposure to drugs affecting the serotonergic system) could play a role in neurodevelopmental disorders. It has been shown in rodent models that these chemicals could be particularly effective at hindering serotonergic signaling early over development, since the blood–brain barrier (BBB) becomes fully functional only by E15 (Ben-Zvi et al., 2014). Therefore, at earlier time points there is no obstacle that stops these chemicals from acting at targets such as serotonin receptors or SERT, affecting serotonergic signaling both in the periphery and centrally. SERT plays a crucial role as the major regulator of serotonin homeostasis and over recent years this transporter has been the focus of several studies (reviewed in Muller et al., 2016). Importantly, several environmental stimuli modifying SERT operation and some mutations affecting the SERT gene have been associated to brain disorders, including ASD.

GENE AND ENVIRONMENTAL ALTERATIONS AFFECTING SERT, LINKED TO BRAIN DISORDERS

Mutations in SERT Linked to Neurodevelopmental and Mental Disorders

Several modifications in the gene coding for SERT have been associated to different brain disorders, including obsessive-compulsive disorder and Asperger syndrome/ASD (Kilic et al., 2003; Prasad et al., 2009). Some are located in the untranslated



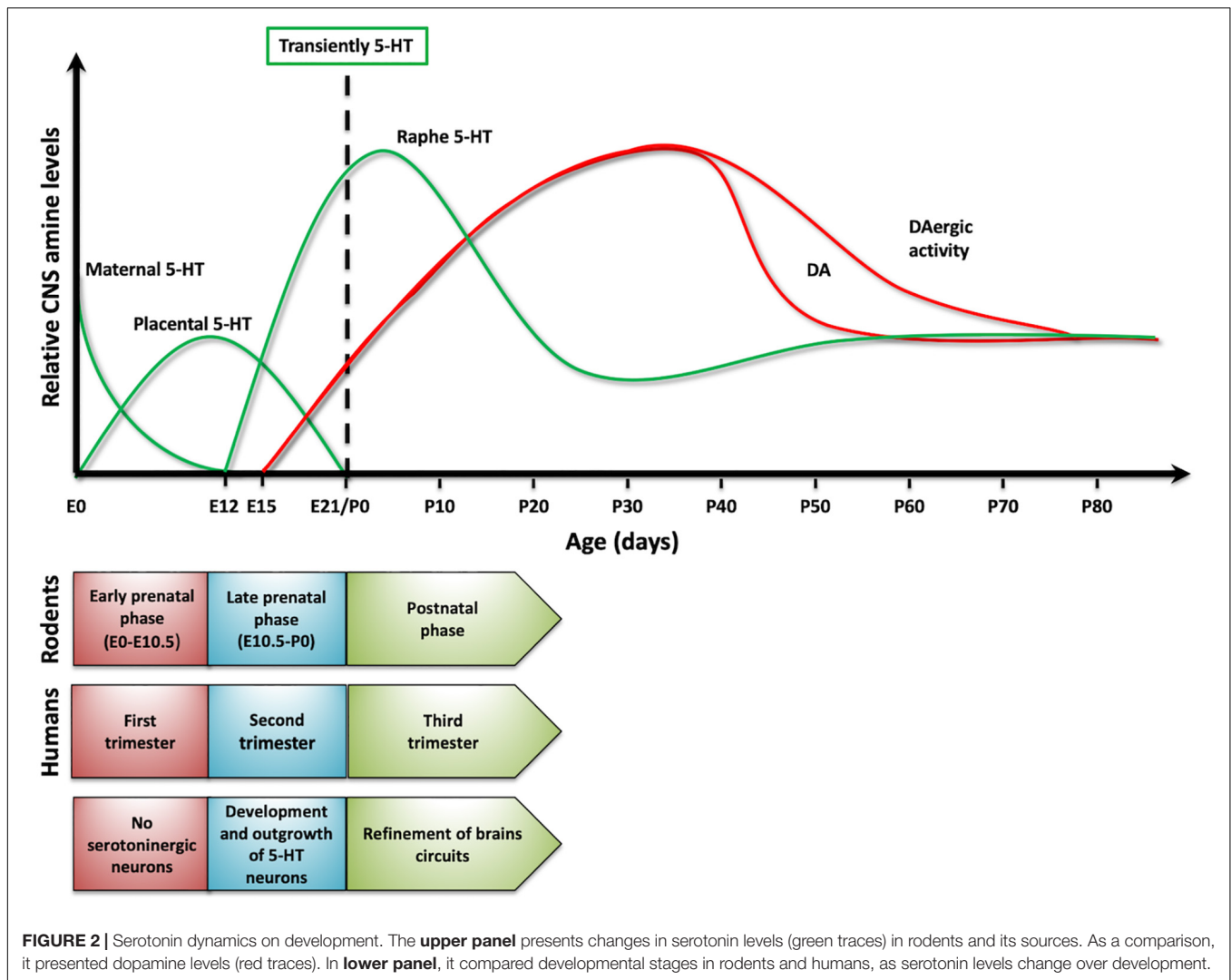
regions (UTR) of SERT gene, particularly the promoter, resulting in decreased transported expression. Reduced SERT expression could underlie the increased extracellular serotonin levels found in ASD and other disorders. Interestingly, some of the SERT mutations described (e.g., Ile425Leu, Phe465Leu, and Leu550Val) are gain-of-function mutations that increase the activity of the transporter, but hinder SERT insertion in the plasma membrane. Thus, reduced localization of SERT in the membrane would result in reduced serotonin uptake and consequently hyperserotonemia (Prasad et al., 2009), as it is reported in ASD (Gabriele et al., 2014).

Environmental Manipulations Affecting SERT and Linked to Brain Disorders: Clinical Studies

It is estimated that about 10% of pregnant women are prescribed antidepressant drugs for treatment of clinical depression and anxiety (Cooper et al., 2007; Huybrechts et al., 2013). A big proportion of antidepressant drugs are Serotonin Selective Reuptake Inhibitors (SSRIs), whose molecular target is SERT, and include fluoxetine and citalopram (Patil et al., 2011). These chemicals are able to cross cell membranes and tissues like the placenta and the BBB (Heikkinen et al., 2002), which also explains why that they can be found in the breast milk (Hendrick et al., 2001). The focus of this mini-review is on discussing how manipulations affecting SERT result in brain-associated deficits, but several reports have described that prenatal exposure to SSRIs

is associated to increased risk for preterm delivery (Davis et al., 2007; Maschi et al., 2008; Reis and Kallen, 2010; Huang et al., 2014), low birth weight (Oberlander et al., 2006; Reis and Kallen, 2010; Huang et al., 2014), and cardiac defects (Kallen, 2007; Pedersen et al., 2009; Kornum et al., 2010). This is consistent with the idea that serotonin plays key roles in the development of the entire organism.

A number of reports have argued that prenatal exposure of SSRIs is associated to higher incidence of ASD (e.g., Boukhris et al., 2016). Similar studies have shown a positive correlation between prenatal SSRI exposure and ADHD (Figuroa, 2010; Clements et al., 2015). Only one study (Malm et al., 2016) has assessed depression and prenatal exposure to SSRIs, and reported a positive correlation, as well. On the other hand, a different set of studies has argued that no association between prenatal exposure to SSRIs and ASD or ADHD exists (e.g., Castro et al., 2016). Interestingly, this and other studies (Mezzacappa et al., 2017) proposed that a relevant factor explaining the higher incidence for ASD is the medical condition of the mother—i.e., maternal depression. However, Croen et al. (2011) determined no increase in the risk of ASD in the offspring of mothers with a history of depression, an effect that did not depend on prenatal consumption of SSRI. All these (and other) studies (Kaplan et al., 2017; Maloney et al., 2018; Halvorsen et al., 2019) show that it is not clear whether the use of SSRIs results in increased incidence for ASD, ADHD or any other disorder. One additional problem with these studies is the difficulty to access and study larger populations (as discussed in Millard et al., 2017). In spite of these



considerations, it is possible to argue that SSRIs could reach the embryo and neonates and possibly affect the developing central nervous system in a way not fully understood but that could lead to brain disorders. In reviewing the available information on this issue, authors have come to the conclusion that relevant information to further support or discard the contribution of SSRIs to these disorders could be obtained from animal models (Pedersen, 2015).

Environmental Manipulations Affecting SERT and Linked to Brain Disorders: Animal Models

When modeling human disorders in animals, researchers have focused on replicating one or few specific behavioral features, although it has to be considered that some features are difficult to recreate in animal models (e.g., hallucinations or psychosis) (Anderson and Adolphs, 2014). Thus, for instance, ASD animal models usually recreate repetitive behaviors or the impaired social interaction observed in this disorder (Yenkovyan et al.,

2017). An additional issue to be considered when modeling these disorders is that it is estimated that postnatal day 7 in rodents is equivalent to time of birth in humans (Figure 2). This means that a postnatal manipulation in rodents could be equivalent to a prenatal one in humans (Clancy et al., 2007). In spite of these caveats, the key impact of animal models is on advancing our understanding of these disorders at the cellular, molecular, neurochemical and/or circuit levels.

In particular, very few studies have directly assessed the possibility that antenatal or perinatal exposure to SSRIs affects incidence of ASD-like features in animals. For instance, Sprowles et al. (2016) studied the effects of perinatal exposure to citalopram in rats. Results obtained demonstrate several autistic-like behavioral traits in the offspring (repetitive behaviors, impaired social behavior), which are consistent with the concurrent description of anatomical alterations in Raphe and in cortical structure and physiology (Darling et al., 2011; Simpson et al., 2011). These findings argue in favor of the idea that prenatal SSRI exposure increases the incidence of ASD. A different study reported that perinatal inhibition of MAO, which could

be considered a manipulation that like SSRIs increases the availability of serotonin, results in alteration of serotonin metabolism and hyperserotonemia (Hranilovic et al., 2011), and an increased incidence of ASD features (Davis et al., 2008). There is not much information on how perinatal exposure to SSRIs affects incidence for other disorders, and the little data available is contradictory. For instance, while one report supports the idea that perinatal exposure to SSRIs exacerbates depressive-like behaviors in a strain of rats prone to anxiety and depression (Glover et al., 2015), other works propose that perinatal SSRIs partially reverses some of these behavioral traits (Rayen et al., 2011; Boulle et al., 2016), while another study shows no effect of the treatment (Zohar et al., 2016). Unfortunately, these studies have not been consistent with the SSRI used, doses of these chemicals, the developmental age at which interventions begin, or the gender of the animals studied, among other factors. Thus, it remains an open question whether exposure to SSRIs over ontogeny contributes to brain disorders.

On the other hand, increased serotonin levels observed in SERT knockout mice have been associated with abnormal development of thalamocortical axons and somatosensory cortical barrels (Persico et al., 2001; Gaspar et al., 2003), and also anxiety and depressive-like behaviors (Ansorge et al., 2004).

DROSOPHILA AS ANIMAL MODEL FOR THE STUDY OF NEURODEVELOPMENTAL AND MENTAL DISORDERS

The vinegar fly *Drosophila melanogaster* has served as a workhorse in various fields in biology, in part based on the diverse genetic toolbox available, as discussed elsewhere in this special issue. Remarkably, *Drosophila* exhibits a complex behavioral repertoire. For instance, one of the best-studied social behaviors in flies is courtship behavior: male flies court a female animal in order to mate, a behavior that is decreased after males have experienced rejection by a fertilized female (Siegel and Hall, 1979; Kamyshv et al., 1999). New social paradigms have been described including the study of clustering behavior observed in groups of flies (Simon et al., 2012). Recent studies have also shown that flies may exhibit attention-like processes (van Swinderen and Flores, 2007), goal-driven behavioral adaptations (Pick and Strauss, 2005) and decision making (Zhang et al., 2007). *Drosophila* has been also used as a model organism to study aggression (Baier et al., 2002) and addiction (Wolf, 1999).

In recent years, it has become evident that it is possible to model neurodevelopmental disorders in *Drosophila*, aiming at reproducing some of the key behavioral traits associated with these illnesses. One of the best-studied models for neurodevelopmental disorders in *Drosophila* is the ASD model based on mutations in the *FMR1* gene (van Alphen and van Swinderen, 2013). This is a gene associated with fragile X syndrome, a disorder linked to intellectual disability and where a high incidence for ASD is reported. *Drosophila FMR1* mutants exhibit reduced memory in a courtship social paradigm

(McBride et al., 2005) and repetitive grooming, which is reminiscent of recurring behaviors observed in ASD (Tauber et al., 2011). In addition, brain and circuit organization is affected in fly *FMR1* mutants (Siller and Broadie, 2011), consistent with structural changes in axonal and dendritic branches, a feature shared by mice *FMR1* mutants (Zhang et al., 2001; Zhang and Broadie, 2005; Callan and Zarnescu, 2011; van Alphen and van Swinderen, 2013).

***Drosophila* as an Animal Model for Studying the Contribution of Serotonin to Neurodevelopmental and Mental Disorders?**

The molecular mechanisms involved in serotonin biosynthesis are evolutionary conserved, and in *Drosophila*, they begin with the hydroxylation of the tryptophan amino acid by TPH (Coleman and Neckameyer, 2005). Likewise, it has been described a *Drosophila* SERT (Giang et al., 2011; Hidalgo et al., 2017) and one VMAT (Greer et al., 2005) that share structural and functional similarities to that of vertebrates. Five serotonin receptors have been described in the *Drosophila* genome, all of them classified as metabotropic. Thus, the *Drosophila* serotonergic system is highly conserved as compared to its mammalian counterpart (Kasture et al., 2018). Importantly, it is already known that serotonin contributes to several behaviors in *Drosophila* including locomotion, feeding behavior, circadian activity, sleep regulation, and aggression (Silva et al., 2014; Kasture et al., 2018; Bacque-Cazenave et al., 2020).

Out of the approximately 100,000 neurons in the fly brain, about 80 cells are identified as serotonergic neurons, organized in 11 clusters (reviewed in Kasture et al., 2018)). Valles and White (1988), by using immunochemistry, described the serotonergic neural system in the larval and adult CNS and also described how serotonin levels change over development. The first detection of serotonin-positive cells is in 16–20 h *Drosophila* embryos. The detection of immunopositive serotonin cells before fly CNS is fully developed and supports the idea that serotonin could play a role as developmental signaling molecule, as in vertebrates (Lundell and Hirsh, 1994). In this regard, it has been suggested that serotonin modulates the development of serotonergic varicosities in the fly CNS (Sykes and Condrón, 2005). Consistent with this, mutants in DOPA decarboxylase which are associated with reduced amine levels exhibit alterations in branch spacing (Budnik et al., 1989). Conversely, overexpression of TPH in *Drosophila* promotes higher levels of cytoplasmic serotonin, which is related with abnormalities in neurite morphology in larval and adult fly neuropils (Daubert et al., 2010). Moreover, altering serotonin synthesis in early embryos results in impaired anatomy and functioning of the feeding circuit in larvae, a phenotype that can be reversed as serotonin levels are rescued (Neckameyer, 2010). All these findings suggest that, as in mammals, hindering serotonergic signaling at early developmental stages does have implications for the establishment of mature circuits that underlie behaviors. However, the information on this issue is limited. New research should ask whether pharmacological or

genetic manipulations tampering with serotonergic components (SERT, biosynthetic enzymes or any of the receptors), affect the organization of brain circuits and consequently, result in behavioral features associated with neurodevelopmental or mental disorders.

Although the literature has not thoroughly explored this, there are some reports supporting this idea. For instance, centrophobism, a behavior in which flies avoid the center of an arena, is considered to be an anxiety-like behavior in flies. Different genetic or pharmacological manipulations that affect SERT functioning affect centrophobism in *Drosophila* (Mohammad et al., 2016; Hidalgo et al., 2017). In particular, we showed that feeding flies an amphetamine derivative that stimulates serotonin release decreases centrophobism, a similar result observed in animals mutant for SERT (Hidalgo et al., 2017). In addition, a recent work from our group showed deficits in social behavior and locomotion in a *Drosophila* mutant for the dysbindin gene, an animal model for schizophrenia. Interestingly, the phenotypes observed in the dysbindin mutants seem to depend at least in part on altered serotonergic signaling (Hidalgo et al., 2020).

Demonstrating that serotonin signaling is affected in fly models for brain disorders, is not only relevant for advancing our understanding of the underpinnings of these illnesses, it also opens up the possibility to carry out a high-throughput search

for new chemicals that affect specific phenotypes in flies, which could eventually lead to new therapeutic tools for these disorders (Nichols, 2006; Roy et al., 2020).

A better understanding of serotonin dynamics over development and how serotonergic deficiency could be involved in mental disorders could provide insights in the search for new treatments for these disorders, a path in which *Drosophila* could play an important role.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC-O and JC wrote this manuscript. Both authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

AC-O received a doctoral fellowship (446128) from CONACyT (Mexico) and Alianza del Pacífico-AGCID.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Campusano Lab for comments on the idea of this mini review.

REFERENCES

- Anderson, D. J., and Adolphs, R. (2014). A framework for studying emotions across species. *Cell* 157, 187–200. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.003
- Ansorge, M. S., Zhou, M., Lira, A., Hen, R., and Gingrich, J. A. (2004). Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* 306, 879–881. doi: 10.1126/science.1101678
- Bacque-Cazenave, J., Bharatiya, R., Barriere, G., Delbecq, J. P., Bouguieyou, N., Di Giovanni, G., et al. (2020). Serotonin in animal cognition and behavior. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1649.
- Baier, A., Wittek, B., and Brembs, B. (2002). *Drosophila* as a new model organism for the neurobiology of aggression? *J. Exp. Biol.* 205(Pt 9), 1233–1240.
- Ben-Zvi, A., Lacoste, B., Kur, E., Andreone, B. J., Mayshar, Y., Yan, H., et al. (2014). Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature* 509, 507–511. doi: 10.1038/nature13324
- Bleich, A., Brown, S. L., Kahn, R., and van Praag, H. M. (1988). The role of serotonin in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 14, 297–315. doi: 10.1093/schbul/14.2.297
- Bonnin, A., and Levitt, P. (2011). Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. *Neuroscience* 197, 1–7. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.005
- Boukhris, T., Sheehy, O., Mottron, L., and Berard, A. (2016). Antidepressant use during pregnancy and the risk of autism spectrum disorder in children. *JAMA Pediatr.* 170, 117–124. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.3356
- Boulle, F., Pawluski, J. L., Homberg, J. R., Machiels, B., Kroeze, Y., Kumar, N., et al. (2016). Prenatal stress and early-life exposure to fluoxetine have enduring effects on anxiety and hippocampal BDNF gene expression in adult male offspring. *Dev. Psychobiol.* 58, 427–438. doi: 10.1002/dev.21385
- Budnik, V., Wu, C. F., and White, K. (1989). Altered branching of serotonin-containing neurons in *Drosophila* mutants unable to synthesize serotonin and dopamine. *J. Neurosci.* 9, 2866–2877. doi: 10.1523/jneurosci.09-08-02866.1989
- Callan, M. A., and Zarnescu, D. C. (2011). Heads-up: new roles for the fragile X mental retardation protein in neural stem and progenitor cells. *Genesis* 49, 424–440. doi: 10.1002/dvg.20745
- Cases, O., Lebrand, C., Giros, B., Vitalis, T., De Maeyer, E., Caron, M. G., et al. (1998). Plasma membrane transporters of serotonin, dopamine, and norepinephrine mediate serotonin accumulation in atypical locations in the developing brain of monoamine oxidase A knock-outs. *J. Neurosci.* 18, 6914–6927. doi: 10.1523/jneurosci.18-17-06914.1998
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., et al. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301, 386–389. doi: 10.1126/science.1083968
- Castro, V. M., Kong, S. W., Clements, C. C., Brady, R., Kaimal, A. J., Doyle, A. E., et al. (2016). Absence of evidence for increase in risk for autism or attention-deficit hyperactivity disorder following antidepressant exposure during pregnancy: a replication study. *Transl. Psychiatry* 6:e708. doi: 10.1038/tp.2015.190
- Clancy, B., Finlay, B. L., Darlington, R. B., and Anand, K. J. (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* 28, 931–937. doi: 10.1016/j.neuro.2007.01.014
- Clements, C. C., Castro, V. M., Blumenthal, S. R., Rosenfield, H. R., Murphy, S. N., Fava, M., et al. (2015). Prenatal antidepressant exposure is associated with risk for attention-deficit hyperactivity disorder but not autism spectrum disorder in a large health system. *Mol. Psychiatry* 20, 727–734. doi: 10.1038/mp.2014.90
- Coleman, C. M., and Neckameyer, W. S. (2005). Serotonin synthesis by two distinct enzymes in *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 59, 12–31. doi: 10.1002/arch.20050
- Cooper, W. O., Willy, M. E., Pont, S. J., and Ray, W. A. (2007). Increasing use of antidepressants in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196:544 e1–5.
- Croen, L. A., Grether, J. K., Yoshida, C. K., Odouli, R., and Hendrick, V. (2011). Antidepressant use during pregnancy and childhood autism spectrum disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 1104–1112. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.73
- Darling, R. D., Alzghoul, L., Zhang, J., Khatri, N., Paul, I. A., Simpson, K. L., et al. (2011). Perinatal citalopram exposure selectively increases locus ceruleus circuit function in male rats. *J. Neurosci.* 31, 16709–16715. doi: 10.1523/jneurosci.3736-11.2011

- Daubert, E. A., and Condrón, B. G. (2010). Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends Neurosci.* 33, 424–434. doi: 10.1016/j.tins.2010.05.005
- Daubert, E. A., Heffron, D. S., Mandell, J. W., and Condrón, B. G. (2010). Serotonergic dystrophy induced by excess serotonin. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 297–306. doi: 10.1016/j.mcn.2010.04.001
- Davis, L. K., Hazlett, H. C., Librant, A. L., Nopoulos, P., Sheffield, V. C., Piven, J., et al. (2008). Cortical enlargement in autism is associated with a functional VNTR in the monoamine oxidase A gene. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B, 1145–1151. doi: 10.1002/ajmg.b.30738
- Davis, R. L., Rubanowice, D., McPhillips, H., Raebel, M. A., Andrade, S. E., Smith, D., et al. (2007). Risks of congenital malformations and perinatal events among infants exposed to antidepressant medications during pregnancy. *Pharmacoevidemiol. Drug Saf.* 16, 1086–1094. doi: 10.1002/pds.1462
- Figuerola, R. (2010). Use of antidepressants during pregnancy and risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in the offspring. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 31, 641–648. doi: 10.1097/dbp.0b013e3181e5ac93
- Gabriele, S., Sacco, R., and Persico, A. M. (2014). Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24, 919–929. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.02.004
- Gaspar, P., Cases, O., and Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 1002–1012. doi: 10.1038/nrn1256
- Giang, T., Ritze, Y., Rauchfuss, S., Ogueta, M., and Scholz, H. (2011). The serotonin transporter expression in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* 25, 17–26. doi: 10.3109/01677063.2011.553002
- Glover, M. E., Pugh, P. C., Jackson, N. L., Cohen, J. L., Fant, A. D., Akil, H., et al. (2015). Early-life exposure to the SSRI paroxetine exacerbates depression-like behavior in anxiety/depression-prone rats. *Neuroscience* 284, 775–797. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.10.044
- Greer, C. L., Grygoruk, A., Patton, D. E., Ley, B., Romero-Calderson, R., Chang, H.-Y., et al. (2005). A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. *J. Neurobiol.* 64, 239–258. doi: 10.1002/neu.20146
- Halvorsen, A., Hesel, B., Østergaard, S. D., and Danielsen, A. A. (2019). In utero exposure to selective serotonin reuptake inhibitors and development of mental disorders: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr. Scand.* 139, 493–507. doi: 10.1111/acps.13030
- Heikkinen, T., Ekblad, U., Kero, P., Ekblad, S., and Laine, K. (2002). Citalopram in pregnancy and lactation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 72, 184–191. doi: 10.1067/mcp.2002.126181
- Hendrick, V., Stowe, Z. N., Altschuler, L. L., Mintz, J., Hwang, S., Hostetter, A., et al. (2001). Fluoxetine and norfluoxetine concentrations in nursing infants and breast milk. *Biol. Psychiatry* 50, 775–782. doi: 10.1016/s0006-3223(01)01197-0
- Hidalgo, S., Castro, C., Zarate, R. V., Valderrama, B. P., Hodge, J. J. L., and Campusano, J. M. (2020). The behavioral and neurochemical characterization of a *Drosophila* dysbindin mutant supports the contribution of serotonin to schizophrenia negative symptoms. *Neurochem. Int.* 138:104753. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104753
- Hidalgo, S., Molina-Mateo, D., Escobedo, P., Zarate, R. V., Fritz, E., Fierro, A., et al. (2017). Characterization of a novel *Drosophila* SERT mutant: insights on the contribution of the serotonin neural system to behaviors. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 2168–2179. doi: 10.1021/acscemneuro.7b00089
- Hranilovic, D., Blazevic, S., Ivica, N., Cicin-Sain, L., and Oreskovic, D. (2011). The effects of the perinatal treatment with 5-hydroxytryptophan or tranlycypromine on the peripheral and central serotonin homeostasis in adult rats. *Neurochem. Int.* 59, 202–207. doi: 10.1016/j.neuint.2011.05.003
- Hranilovic, D., Bujas-Petkovic, Z., Vragovic, R., Vuk, T., Hock, K., and Jernej, B. (2007). Hyperserotonemia in adults with autistic disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 37, 1934–1940. doi: 10.1007/s10803-006-0324-6
- Huang, H., Coleman, S., Bridge, J. A., Yonkers, K., and Katon, W. (2014). A meta-analysis of the relationship between antidepressant use in pregnancy and the risk of preterm birth and low birth weight. *Gen. Hosp. Psychiatry* 36, 13–18. doi: 10.1016/j.genhosppsych.2013.08.002
- Huybrechts, K. F., Palmsten, K., Mogun, H., Kowal, M., Avorn, J., Setoguchi-Iwata, S., et al. (2013). National trends in antidepressant medication treatment among publicly insured pregnant women. *Gen. Hosp. Psychiatry* 35, 265–271. doi: 10.1016/j.genhosppsych.2012.12.010
- Kallen, B. (2007). The safety of antidepressant drugs during pregnancy. *Expert Opin. Drug Saf.* 6, 357–370. doi: 10.1517/14740338.6.4.357
- Kamyshv, N. G., Iliadi, K. G., and Bragina, J. V. (1999). *Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory. *Learn. Mem.* 6, 1–20.
- Kaplan, Y. C., Keskin-Arslan, E., Acar, S., and Sozmen, K. (2017). Maternal SSRI discontinuation, use, psychiatric disorder and the risk of autism in children: a meta-analysis of cohort studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83, 2798–2806. doi: 10.1111/bcp.13382
- Kasture, A. S., Hummel, T., Sucic, S., and Freissmuth, M. (2018). Big lessons from tiny flies: *Drosophila melanogaster* as a model to explore dysfunction of dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems. *Int. J. Mol. Sci.* 19:1788. doi: 10.3390/ijms19061788
- Kilic, F., Murphy, D. L., and Rudnick, G. (2003). A human serotonin transporter mutation causes constitutive activation of transport activity. *Mol. Pharmacol.* 64, 440–446. doi: 10.1124/mol.64.2.440
- Koren, Z., Pfeifer, Y., and Sulman, F. G. (1966). Distribution and placental transfer of C-14-serotonin in pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 95, 290–295. doi: 10.1016/0002-9378(66)90182-7
- Kornum, J. B., Nielsen, R. B., Pedersen, L., Mortensen, P. B., and Norgaard, M. (2010). Use of selective serotonin-reuptake inhibitors during early pregnancy and risk of congenital malformations: updated analysis. *Clin. Epidemiol.* 2, 29–36. doi: 10.2147/clep.s9256
- Lebrand, C., Cases, O., Adelbrecht, C., Doye, A., Alvarez, C., El Mestikawy, S., et al. (1996). Transient uptake and storage of serotonin in developing thalamic neurons. *Neuron* 17, 823–835. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80215-9
- Lundell, M. J., and Hirsh, J. (1994). Temporal and spatial development of serotonin and dopamine neurons in the *Drosophila* CNS. *Dev. Biol.* 165, 385–396. doi: 10.1006/dbio.1994.1261
- Malm, H., Brown, A. S., Gissler, M., Gyllenberg, D., Hinkka-Yli-Salomaki, S., McKeague, I. W., et al. (2016). Gestational exposure to selective serotonin reuptake inhibitors and offspring psychiatric disorders: a national register-based study. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 55, 359–366. doi: 10.1016/j.jaac.2016.02.013
- Maloney, S. E., Akula, S., Rieger, M. A., McCullough, K. B., Chandler, K., Corbett, A. M., et al. (2018). Examining the reversibility of long-term behavioral disruptions in progeny of maternal SSRI exposure. *eNeuro* 5:ENEURO.0120-18.2018.
- Maschi, S., Clavenna, A., Campi, R., Schiavetti, B., Bernat, M., and Bonati, M. (2008). Neonatal outcome following pregnancy exposure to antidepressants: a prospective controlled cohort study. *BJOG* 115, 283–289. doi: 10.1111/j.1471-0528.2007.01518.x
- McBride, S. M., Choi, C. H., Wang, Y., Liebelt, D., Braunstein, E., Ferreiro, D., et al. (2005). Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a *Drosophila* model of fragile X syndrome. *Neuron* 45, 753–764. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.038
- Mezzacappa, A., Lasicca, P. A., Gianfagna, F., Cazas, O., Hardy, P., Falissard, B., et al. (2017). Risk for autism spectrum disorders according to period of prenatal antidepressant exposure: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 171, 555–563. doi: 10.1001/jamapediatrics.2017.0124
- Miles, J. H. (2011). Autism spectrum disorders—a genetics review. *Genet. Med.* 13, 278–294. doi: 10.1097/gim.0b013e3181ff67ba
- Millard, S. J., Weston-Green, K., and Newell, K. A. (2017). The effects of maternal antidepressant use on offspring behaviour and brain development: implications for risk of neurodevelopmental disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 80, 743–765. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.06.008
- Mohammad, F., Aryal, S., Ho, J., Stewart, J. C., Norman, N. A., Tan, T. L., et al. (2016). Ancient anxiety pathways influence *Drosophila* defense behaviors. *Curr. Biol.* 26, 981–986. doi: 10.1016/j.cub.2016.02.031
- Muck-Seler, D., Pivac, N., Mustapic, M., Crncic, Z., Jakovljevic, M., and Sagud, M. (2004). Platelet serotonin and plasma prolactin and cortisol in healthy, depressed and schizophrenic women. *Psychiatry Res.* 127, 217–226. doi: 10.1016/j.psychres.2004.04.001
- Muller, C. L., Anacker, A. M., and Veenstra-VanderWeele, J. (2016). The serotonin system in autism spectrum disorder: from biomarker to animal models. *Neuroscience* 321, 24–41. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.010

- Neckameyer, W. S. (2010). A trophic role for serotonin in the development of a simple feeding circuit. *Dev. Neurosci.* 32, 217–237. doi: 10.1159/000304888
- Nichols, C. D. (2006). *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol. Ther.* 112, 677–700. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.05.012
- Oberlander, T. F., Warburton, W., Misri, S., Aghajanian, J., and Hertzman, C. (2006). Neonatal outcomes after prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants and maternal depression using population-based linked health data. *Arch. Gen. Psychiatry* 63, 898–906. doi: 10.1001/archpsyc.63.8.898
- Olivier, B., Chan, J. S., Snoeren, E. M., Olivier, J. D., Veening, J. G., Vinkers, C. H., et al. (2011). Differences in sexual behaviour in male and female rodents: role of serotonin. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 8, 15–36. doi: 10.1007/7854_2010_116
- Patil, A. S., Kuller, J. A., and Rhee, E. H. (2011). Antidepressants in pregnancy: a review of commonly prescribed medications. *Obstet. Gynecol. Surv.* 66, 777–787. doi: 10.1097/ogx.0b013e31823e0cbf
- Pedersen, L. H. (2015). Prenatal antidepressant exposure and childhood autism spectrum disorders: cause for concern? *Paediatr. Drugs* 17, 443–448. doi: 10.1007/s40272-015-0141-5
- Pedersen, L. H., Henriksen, T. B., Vestergaard, M., Olsen, J., and Bech, B. H. (2009). Selective serotonin reuptake inhibitors in pregnancy and congenital malformations: population based cohort study. *BMJ* 339:b3569. doi: 10.1136/bmj.b3569
- Persico, A. M., Mengual, E., Moessner, R., Hall, F. S., Revay, R. S., Sora, I., et al. (2001). Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J. Neurosci.* 21, 6862–6873. doi: 10.1523/jneurosci.21-17-06862.2001
- Pick, S., and Strauss, R. (2005). Goal-driven behavioral adaptations in gap-climbing *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, 1473–1478. doi: 10.1016/j.cub.2005.07.022
- Prasad, H. C., Steiner, J. A., Sutcliffe, J. S., and Blakely, R. D. (2009). Enhanced activity of human serotonin transporter variants associated with autism. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 163–173. doi: 10.1098/rstb.2008.0143
- Rayen, I., van den Hove, D. L., Prickaerts, J., Steinbusch, H. W., and Pawluski, J. L. (2011). Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence. *PLoS One* 6:e24003. doi: 10.1371/journal.pone.0024003
- Reis, M., and Kallen, B. (2010). Delivery outcome after maternal use of antidepressant drugs in pregnancy: an update using Swedish data. *Psychol. Med.* 40, 1723–1733. doi: 10.1017/s0033291709992194
- Roy, B., Han, J., Hope, K. A., Peters, T. L., Palmer, G., and Reiter, L. T. (2020). An unbiased drug screen for seizure suppressors in duplication 15q syndrome reveals 5-HT1A and dopamine pathway activation as potential therapies. *Biol. Psychiatry* 88, 698–709. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.03.021
- Schain, R. J., and Freedman, D. X. (1961). Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J. Pediatr.* 58, 315–320. doi: 10.1016/s0022-3476(61)80261-8
- Siegel, R. W., and Hall, J. C. (1979). Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3430–3434. doi: 10.1073/pnas.76.7.3430
- Siller, S. S., and Broadie, K. (2011). Neural circuit architecture defects in a *Drosophila* model of Fragile X syndrome are alleviated by minocycline treatment and genetic removal of matrix metalloproteinase. *Dis. Model. Mech.* 4, 673–685. doi: 10.1242/dmm.008045
- Silva, B., Goles, N. I., Varas, R., and Campusano, J. M. (2014). Serotonin receptors expressed in *Drosophila* mushroom bodies differentially modulate larval locomotion. *PLoS One* 9:e89641. doi: 10.1371/journal.pone.0089641
- Simon, A. F., Chou, M. T., Salazar, E. D., Nicholson, T., Saini, N., Metchev, S., et al. (2012). A simple assay to study social behavior in *Drosophila*: measurement of social space within a group. *Genes Brain Behav.* 11, 243–252. doi: 10.1111/j.1601-183x.2011.00740.x
- Simpson, K. L., Weaver, K. J., de Villiers-Sidani, E., Lu, J. Y., Cai, Z., Pang, Y., et al. (2011). Perinatal antidepressant exposure alters cortical network function in rodents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18465–18470. doi: 10.1073/pnas.1109353108
- Sprowles, J. L., Hufgard, J. R., Gutierrez, A., Bailey, R. A., Jablonski, S. A., Williams, M. T., et al. (2016). Perinatal exposure to the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram alters spatial learning and memory, anxiety, depression, and startle in Sprague-Dawley rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 54, 39–52. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2016.08.007
- Sundstrom, E., Kolare, S., Souverbie, F., Samuelsson, E. B., Pschera, H., Lunell, N. O., et al. (1993). Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 75, 1–12. doi: 10.1016/0165-3806(93)90059-j
- Suri, D., Teixeira, C. M., Cagliostro, M. K., Mahadevia, D., and Ansorge, M. S. (2015). Monoamine-sensitive developmental periods impacting adult emotional and cognitive behaviors. *Neuropsychopharmacology* 40, 88–112. doi: 10.1038/npp.2014.231
- Sykes, P. A., and Condron, B. G. (2005). Development and sensitivity to serotonin of *Drosophila* serotonergic varicosities in the central nervous system. *Dev. Biol.* 286, 207–216. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.025
- Tauber, J. M., Vanlandingham, P. A., and Zhang, B. (2011). Elevated levels of the vesicular monoamine transporter and a novel repetitive behavior in the *Drosophila* model of fragile X syndrome. *PLoS One* 6:e27100. doi: 10.1371/journal.pone.0027100
- Valles, A. M., and White, K. (1988). Serotonin-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: development and distribution. *J. Comp. Neurol.* 268, 414–428. doi: 10.1002/cne.902680310
- van Alphen, B., and van Swinderen, B. (2013). *Drosophila* strategies to study psychiatric disorders. *Brain Res. Bull.* 92, 1–11. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.09.007
- van Swinderen, B., and Flores, K. A. (2007). Attention-like processes underlying optomotor performance in a *Drosophila* choice maze. *Dev. Neurobiol.* 67, 129–145. doi: 10.1002/dneu.20334
- Wolf, M. E. (1999). Cocaine addiction: clues from *Drosophila* on drugs. *Curr. Biol.* 9, R770–R772.
- Yenkoyan, K., Grigoryan, A., Fereshetyan, K., and Yepremyan, D. (2017). Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Behav. Brain Res.* 331, 92–101. doi: 10.1016/j.bbr.2017.04.038
- Zhang, K., Guo, J. Z., Peng, Y., Xi, W., and Guo, A. (2007). Dopamine-mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in *Drosophila*. *Science* 316, 1901–1904. doi: 10.1126/science.1137357
- Zhang, Y. Q., Bailey, A. M., Matthies, H. J., Renden, R. B., Smith, M. A., Speese, S. D., et al. (2001). *Drosophila* fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell* 107, 591–603. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00589-x
- Zhang, Y. Q., and Broadie, K. (2005). Fathoming fragile X in fruit flies. *Trends Genet.* 21, 37–45. doi: 10.1016/j.tig.2004.11.003
- Zohar, I., Shoham, S., and Weinstock, M. (2016). Perinatal citalopram does not prevent the effect of prenatal stress on anxiety, depressive-like behaviour and serotonergic transmission in adult rat offspring. *Eur. J. Neurosci.* 43, 590–600. doi: 10.1111/ejn.13150

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Carvajal-Oliveros and Campusano. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.