



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Efecto de la nicotina en un modelo de la enfermedad de Parkinson inducida por la expresión de  $\alpha$ -Sinucleína y Sinfilina humanas en *Drosophila melanogaster*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Luis Angel Carvajal Oliveros

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosa Estela Navarro González  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Leonor Pérez Martínez  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Febrero, 2017.



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.

# ÍNDICE

Índice de figuras.....	4
Abreviaturas.....	6
Agradecimientos.....	7
I. Resumen.....	8
II. Introducción.....	10
II.1 La Enfermedad de Parkinson.....	10
II. 2 $\alpha$ -sinucleína.....	12
III. 3 Interacción $\alpha$ -sinucleína/sinfilina y su papel en la enfermedad de Parkinson.....	13
III. 4 Nicotina.....	15
III. Antecedentes.....	17
IV. Justificación.....	22
V. Hipótesis.....	23
VI. Objetivos.....	24
VII. Materiales y Método.....	25
VII. 1 Material biológico.....	25
VII. 2 Diseño de cruzas.....	25
VII. 3 Genotipificación.....	26
VII. 4 Determinación de la supervivencia.....	26
VII. 5 Determinación de la movilidad voluntaria.....	27
VII. 6 Disección y fotografía de cerebros.....	28
VII. 7 Cuantificación de neuronas.....	29

VIII.	Resultados.....	30
VIII. 1	Comprobación de los genotipos.....	30
VIII. 2	La nicotina promueve una disminución de la supervivencia de las moscas control.....	30
VIII. 3	La nicotina promueve un aumento de la supervivencia de las moscas sinf.....	32
VIII. 4	La nicotina promueve una disminución de la supervivencia de las moscas de la línea $\alpha$ -sin.....	33
VIII. 5	La nicotina promueve un aumento de la supervivencia de las moscas de la línea sinf/ $\alpha$ -sin.....	34
VIII. 6	La interacción $\alpha$ -sin silvestre y sinf promueve un aumento en la vida media de las moscas.....	35
VIII. 7	La nicotina reduce el movimiento voluntario en las moscas de la línea control.....	36
VIII. 8	La nicotina aumenta el movimiento voluntario en las moscas de la línea sinf.....	37
VIII. 9	La nicotina promueve una reducción en el movimiento voluntaria de las moscas de la línea $\alpha$ -sin.....	38
VIII. 10	La nicotina promueve la pérdida de la movilidad voluntaria de las moscas sinf/ $\alpha$ -sin.....	39
VIII. 11	La nicotina no promueve una protección contra la muerte de neuronas dopaminérgicas.....	40
IX.	Discusión.....	44
IX.	Modelo de acción de la nicotina.....	46
X.	Conclusiones.....	48
XI.	Perspectivas.....	49
XII.	Bibliografía consultada.....	50
XIII.	Referencias electrónicas.....	54
XIV.	Anexos.....	56
	Anexo 1 “Genotipificación”.....	56

## INDICE DE FIGURAS

TABLA 1. Genes asociados a la enfermedad de Parkinson.....	11
Fig. 1. Cuerpos de Lewy.....	12
Fig. 2. Estructura de $\alpha$ -sin.....	13
Fig. 3. Nodos de las principales interacciones de $\alpha$ -sin.....	14
Fig. 4. Comparación de cerebros de moscas de 30 días de edad afectadas con proteínas asociadas a la EP.....	15
Fig. 5. Receptor nACh.....	16
Fig. 6 Principales combinaciones de los nAChRs en el SNC de mamíferos.....	17
TABLA 2. Modelos animales y estudios en nicotina.....	18
Fig. 7. Supervivencia de moscas con mutación en el gen park.....	19
Fig. 8. Movilidad de moscas con mutación en el gen park .....	19
Fig. 9. Supervivencia en 60 días de las moscas transgénicas de $\alpha$ -sin y sinf.....	20
Fig. 10. Escalamiento en 60 días de las moscas transgénicas de $\alpha$ -sin y sinf.....	21
Fig. 11. Moscas experimentales.....	26
Fig. 12. Determinación de la supervivencia.....	27
Fig. 13. Determinación de la movilidad voluntaria.....	28
Fig. 14. Genotipificación.....	30
Fig. 15. Supervivencia moscas <i>UAS-GFP/+;th-gal4/+</i> .....	31
Fig. 16. Curva de supervivencia de las moscas transgénicas de sinf.....	32
Fig. 17. Curva de supervivencia de las moscas transgénicas de $\alpha$ -sin.....	33
Fig. 18. Curva de supervivencia de las moscas transgénicas de sinf/ $\alpha$ -sinf.....	34
Fig. 19. Vida media.....	35
Fig. 20. Movilidad de las moscas control .....	37
Fig. 21. Movilidad de las moscas sinf.....	38

Fig. 22. Movilidad de las moscas $\alpha$ -sin.....	39
Fig. 23. Movilidad de las moscas sinf/ $\alpha$ -sin.....	40
Fig. 24. Supervivencia de neuronas en la línea control.....	41
Fig. 25. Supervivencia de neuronas en la línea sinf.....	41
Fig. 26. Supervivencia de neuronas en la línea $\alpha$ -sin.....	42
Fig. 27. Supervivencia de neuronas en la línea sinf/ $\alpha$ -sin.....	43
Fig. 28. Modelo de acción de la nicotina.....	47

## ABREVIATURAS

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EP: Enfermedad de Parkinson.

UPS: Sistema de Ubiquitinación del proteosoma.

L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina.

$\alpha$ -sin:  $\alpha$ -sinucleína.

Sinf: sinfilina

aa: aminoácidos.

PINK: Serine/threonine-protein kinase.

LRRK<sup>2</sup>: Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2

SNCAIP: Synuclein alpha interacting protein.

Synf: Sinfilina.

GFP: Proteína verde fluorescente.

nAChRs: Receptores acetilnicotínicos.

6-OHDA: Hidroxidopamina.

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

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas.

th: Tirosina hidroxilasa.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

DAM: Drosophila Activity Monitor.

Fig: Figura.

ns: No significativo.

## AGRADECIMIENTOS

*A toda mi familia, en especial a mis padres, y amigos.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México.*

*Al Instituto de Biotecnología, UNAM.*

*Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca para realizar mis estudios de posgrado con número 385397 y número de becario 330155.*

*A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Leonor Pérez y Dra. Rosa Navarro, por cada una de sus observaciones realizadas a este trabajo durante los 2 años que duro el desarrollo de este.*

*A los miembros del jurado por tomarse el tiempo necesario para la revisión de esta tesis de maestría.*

*A mi director de tesis, Dr. Enrique Reynaud, y a cada uno de los miembros del laboratorio Zurita-Reynaud.*

# I. RESUMEN.

La esperanza de vida aumenta año con año a nivel mundial, lo que desencadena un incremento en el número de personas adultas mayores y por consecuencia problemas de salud característicos de esta población. Con el envejecimiento, aparecen un gran número de enfermedades, siendo las enfermedades neurodegenerativas una de las principales. Estas se caracterizan en su mayoría por una muerte neuronal que ocasiona alteraciones en el funcionamiento normal del sistema nervioso, tales como la memoria y el movimiento.

Una de estas patologías es la enfermedad de Parkinson, caracterizada por la muerte de neuronas dopaminérgicas en una región del mesencéfalo llamada *sustancia nigra pars compacta*. La muerte de este tipo neuronal disminuye el neurotransmisor dopamina, quien cumple un papel importante en la modulación de la función motora del organismo, ocasionando problemas como la dificultad para controlar el movimiento, pérdida de la postura, dificultad para caminar, temblores en reposo y algunos otros no relacionados con el movimiento tales como pérdida del sueño, pérdida del olfato y problemas en el habla. Esta enfermedad también se caracteriza por la presencia de agregados proteicos anormales, compuestos principalmente por  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina, proteínas con múltiples funciones, que están relacionadas con la liberación de vesículas presinápticas y cuyas mutaciones claramente están relacionadas con la aparición de Parkinson familiar.

Si bien no existe cura para la enfermedad de Parkinson, algunos reportes señalan a diferentes sustancias como posibles agentes farmacológicos que podrían servir para el tratamiento o la prevención de la enfermedad. Uno de estos es la nicotina, el componente psicoactivo más importante del tabaco. La nicotina es un agonista del neurotransmisor acetilcolina, por lo que es reconocida por los receptores acetilcolinérgicos de tipo nicotínico que se encuentran en las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*, promoviendo así una liberación de dopamina hacia el estriado. Por otro lado, en personas fumadoras hay hasta un 50% de reducción en la predisposición a padecer la enfermedad de Parkinson. Adicionalmente, los tratamientos con nicotina disminuyen la pérdida de la movilidad, la pérdida del olfato y aumentan la liberación de dopamina en modelos murinos y primates, por lo que esta sustancia puede ser importante en el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Parkinson.

En este trabajo se evaluó el efecto de la nicotina en parámetros asociados a la enfermedad de Parkinson, como la vida media, la capacidad motriz y el número de neuronas dopaminérgicas sobrevivientes usando a *Drosophila melanogaster* como modelo. Usando el sistema *gal4/UAS*, se promovió la expresión de  $\alpha$ -

sinucleína y sinfilina bajo el promotor de la tirosina hidroxilasa para causar la muerte específica de las neuronas dopaminérgicas. Los resultados muestran que la nicotina promueve un aumento en la vida de las moscas, teniendo un mayor efecto en las moscas que expresan sinfilina. En cuanto a movimiento, la nicotina se comporta de manera diferente en cada línea de moscas, promoviendo una disminución en aquellas moscas que expresan  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina, pero con un ligero aumento en las que expresan sinfilina. A nivel de supervivencia neuronal, la nicotina no tiene efecto, lo que relaciona con lo ya reportado en la literatura para otros modelos animales.

En conclusión, bajo nuestras condiciones experimentales, la nicotina promueve efectos protectores en la enfermedad de Parkinson, pero cuyo mecanismo de acción y blancos aún necesitan esclarecerse.

## II. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida de neuronas en regiones específicas del sistema nervioso, desencadenando problemas en la movilidad, el equilibrio, el aprendizaje, el habla y la memoria (*Brookmeyer, et. al. 1998*). Estas enfermedades cada día cobran más importancia debido al aumento en la esperanza de vida y al envejecimiento global de la población, lo que lleva a un incremento en el número de personas afectadas con alguna de estas patologías (*Winner, et. al. 2011*). El envejecimiento y la edad avanzada correlacionan positivamente con el desarrollo de estas patologías y por lo tanto se consideran los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de estas. Además, se ha observado como característica integradora de muchas enfermedades neurodegenerativas la aparición de agregados proteicos anormales (*Pollanen, et. al. 1993*).

La enfermedad neurodegenerativa más común es la enfermedad de Alzheimer (EA), que afecta principalmente a las neuronas colinérgicas, promoviendo una reducción en la síntesis de acetilcolina, ocasionando problemas en la memoria y en los procesos cognitivos. En segundo lugar, encontramos a la enfermedad de Parkinson, la cual se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra pars compacta* y por el desarrollo de cuerpos de Lewy, que son agregados proteicos presentes en los somas de las neuronas y cuyo principal componente es  $\alpha$ -sinucleína (*Gazewood, et. al. 2013*).

### III.1 LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

La enfermedad de Parkison (EP), es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra pars compacta*, región que se encuentra en el mesencéfalo (*Gazewood, et. al. 2013*). Se estima que a nivel mundial afecta a cerca de 10 millones de personas con una incidencia de 160 por cada 100 000 habitantes (*Samii, et. al 2004*), afectando aproximadamente al 1% de la población mayor de 60 años y al 4% de la población mayor de 80. El pico de incidencia ocurre entre los 60 y 69 años de edad y sólo entre el 4 y 7% de los casos comienza antes de los 40 años, en cuyo caso se define como Parkinson juvenil (*de Lau, et. al. 2006, SSA, 2006*). Además, es más prevalente en hombres que en mujeres, con una relación de 3 hombres afectados por una mujer. (*Schrag, et. al. 2000*). Esta enfermedad ocasiona principalmente problemas en la habilidad motora, desencadenando síntomas como temblor en

reposo, rigidez, bradicinesia (*de Lau, et. al. 2006*) y otros síntomas no motores como depresión, deterioro de la memoria, déficits olfativos, estreñimiento y desordenes del sueño (*Langston, et. al. 2006*).

No se conocen todas las causas de la EP, varios estudios sugieren que se trata de una enfermedad multifactorial, siendo la causa más conspicua el mal funcionamiento del sistema de ubiquitinación del proteosoma (UPS) (*Mcnaught, et. al. 2001*) y los procesos de inflamación, el mal plegamiento y posterior acumulación de proteínas, tales como  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina. También se ha relacionado la EP con disfunciones mitocondriales, estrés oxidativo, y sobreexpresión de algunos genes (*Dexter, et. al. 2013*) (*Tabla 1*). Adicionalmente se sabe que existen otros factores de riesgo asociados a la EP como la exposición a pesticidas y metales pesados (*SSA, 2006*).

**TABLA 1. GENES ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**  
(*Keyser, et. al, 2011*)

<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>Forma de herencia</b>	<b>Función proteínica</b>
PARK 1/4	$\alpha$ -sinucleína	autosómica dominante	posible proteína sináptica
PARK 2	parkina	autosómica recesiva	E3 ubiquitin ligasa
PARK 6	PINK 1	autosómica recesiva	cinasa mitocondrial
PARK 7	DJ-1	autosómica recesiva	chaperona
PARK 8	LRRK2	autosómica dominante	cinasa y GTPasa
PARK 9	ATP13A2	autosómica recesiva	ATPasa lisosomal

En la actualidad solo existen tratamientos sintomáticos, pero ninguno de ellos puede detener el proceso de degeneración neuronal (*Dexter, et. al. 2013*). Entre los tratamientos más comunes, se encuentra la administración de levodopa o L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina), precursor de la dopamina y que posteriormente es convertida a dopamina por acción de la enzima L-DOPA descarboxilasa por lo comúnmente se mezcla con carbidopa, 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 habilidad para penetrar la barrera hematoencefálica. Desafortunadamente el tratamiento con L-DOPA causa eventualmente tolerancia por lo que su eficacia disminuye conforme pasa el tiempo, permitiendo el desarrollo de la enfermedad y la agravación de los síntomas de la EP. Aún con éstas limitaciones continua siendo el tratamiento más utilizado (*Rangel-Barajas, et. al. 2005*).

Diferentes investigaciones apuntan a los antioxidantes como posibles agentes terapéuticos. Un ejemplo de este tipo de moléculas es la curcumina, sustancia obtenida a partir de la planta de cúrcuma (*Curcuma longa*), en la cual se ha observado una interacción física con los cuerpos de Lewy propios de la enfermedad de la EP, promoviendo una mejoría en la locomoción y un aumento en la fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína en modelos murinos. El efecto de la curcumina, apunta directamente a una mejoría en la actividad del proteosoma y a una disminución en la formación de agregados proteicos (Spinelli, et. al. 2015). Por otro lado, la curcumina incrementa la esperanza de vida en modelos de neurodegeneración dopaminérgica en *Drosophila melanogaster*, cuando es inducida por paraquat, un herbicida cuya acción tóxica consiste en la producción de radicales libres, elevando el estrés oxidativo de las células, reduciendo los síntomas motores y aumentando la liberación de dopamina (Limamanen, et. al. 2014; Siddique, et. al. 2014).

### III.2 $\alpha$ -SINUCLEÍNA.

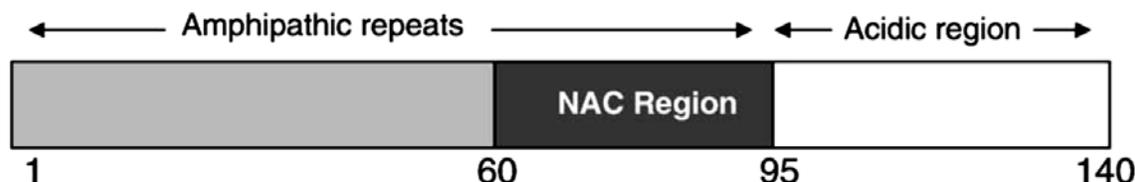
Una de las características de la EP es la presencia de agregados multiprotéicos llamados cuerpos de Lewy, siendo  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) uno de los principales componentes de estos cuerpos proteicos (Fig. 1) (Kalia, et. al. 2013).  $\alpha$ -sin es una proteína de 14kDa (140 aa), codificada por el gen SNCA en mamíferos, que se encuentra principalmente en las terminales presinápticas, razón por la cual se le ha asociado a un papel relacionado con la liberación de vesículas, aunque su función no se conoce (Wan Wan, et. al. 2012). Esta proteína puede presentar distintas conformaciones formando oligómeros y agregados amiloides involucrados con algunas otras enfermedades conocidas como sinucleopatías. Adicionalmente, se han identificado modificaciones de la proteína asociadas con la forma autosómica dominante de la EP, estas son las mutaciones A53T, A30P, E46K y triplicaciones del gen (Fig. 2). Estas mutaciones están relacionados con una estructura anormal de la proteína y una acumulación de



Fig. 1. Cuerpos de Lewy. Cuerpos de Lewy inmunopositivos a  $\alpha$ -sin, estos se marcan con una flecha, la barra inferior indica 13  $\mu$ m (Tomada de Spillantini, et. al. 1998).

$\alpha$ -sin que exacerba la toxicidad y promueve la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. (Polymeropoulos, et. al. 1997, Conway, et. al. 1998).

1 MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH  
 51 GVATVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL  
 101 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYPEA



**Fig. 2. Estructura de  $\alpha$ -sin.** Se muestran remarcadas en negritas las tres mutaciones en la secuencia de la proteína asociadas a la EP, Estas promueven que la proteína presente un mal plegamiento provocando así la acumulación y agregación de la proteína. En la parte inferior se muestran los tres dominios por los que está compuesta la proteína, un dominio anfipático en el cual se han identificado las tres mutaciones de la proteína, una región non-beta-amyloid component (NAC) rica en hojas  $\beta$  y que está asociada a la agregación de la proteína y una región enriquecida en prolinas y residuos ácidos (Tomada de Uversky, et. al. 2009).

### III.3 INTERACCIÓN $\alpha$ -SINUCLÉINA/SINFILINA Y SU PAPEL EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Uno de los principales estudios de las interacciones de  $\alpha$ -sin fue realizado por McFarland y colaboradores en el 2008. Utilizando sinaptosomas de cerebro de ratón y a partir de la fosforilación de la serina 129 de  $\alpha$ -sin, la cual sabe es una de las principales modificaciones de la proteína asociada a los cuerpos de Lewy, se determinó la composición de estos para conocer las proteínas que interactúan con  $\alpha$ -sin fosforilada y desfosforilada. Los resultados demostraron que el extremo carboxilo terminal de  $\alpha$ -sin desfosforilada está más enriquecida en proteínas involucradas en el transporte de electrones de la mitocondria, mientras que el extremo carboxilo terminal de  $\alpha$ -sin fosforilada está enriquecida en proteínas del citoesqueleto y tráfico de vesículas, lo que sugiere que existen diferencias funcionales cuando  $\alpha$ -sin se encuentra fosforilada. Este trabajo es importante para el estudio de la interacción de  $\alpha$ -sin con otras proteínas debido a que en primer lugar se sabe que en los cuerpos de Lewy se encuentra principalmente  $\alpha$ -sin fosforilada, la cual interactúa con proteínas como MAP1B, espectrina, actina, neurofilamento L y tau, lo que sugiere que la producción de cuerpos de Lewy involucra elementos del citoesqueleto (McFarland, et. al. 2008).



Hernández y colaboradores en 2011, observaron que la muerte de las neuronas dopaminérgicas se agudiza al expresar  $\alpha$ -sin y sinf en el cerebro de *Drosophila melanogaster*; sin embargo, cuando estos se coexpresan, disminuye o desaparece la neurotoxicidad, lo que sugiere que la interacción genética promueve protección, ya que observaron una reducción en la pérdida de la movilidad, aumento en la supervivencia de las moscas y un mayor número de neuronas dopaminérgicas (Fig. 4).

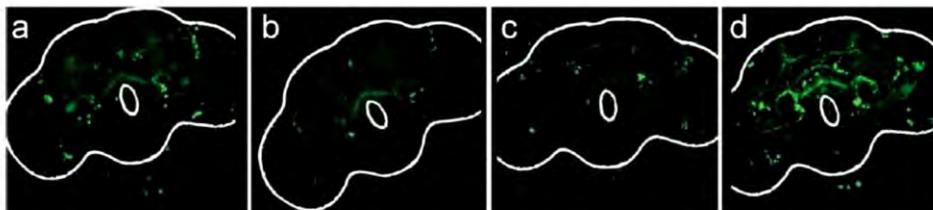


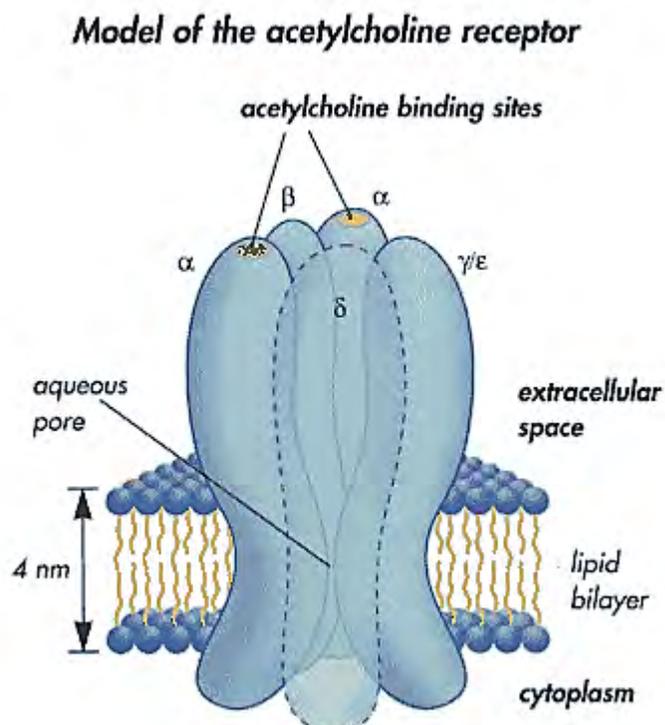
Fig. 4. Comparación de cerebros de moscas de 30 días de edad afectadas con proteínas asociadas a la EP. a) Moscas que expresan solo GFP en neuronas dopaminérgicas b) Moscas que expresan GFP y sinf en neuronas dopaminérgicas. c) Moscas que expresan  $\alpha$ -sin y GFP en neuronas dopaminérgicas d) Moscas que expresan  $\alpha$ -sin, sinf y GFP en neuronas dopaminérgicas. (Tomada y modificada de Hernández-Vargas, et. al. 2011).

### III.4 NICOTINA.

Se han estudiado varias sustancias que pudiesen promover una protección contra el deterioro neuronal causado por la EP, entre ellas es la nicotina, alcaloide psicoactivo presente en el cigarrillo y que algunos estudios indican que el consumo de tabaco parece reducir a la mitad el riesgo de padecer la enfermedad (Hernán, et. al. 2002; Tanner, et. al. 2002). La nicotina actúa como agonista de la acetilcolina directamente sobre los receptores acetilnicotínicos de tipo nicotínico (nAChRs); promoviendo la excitación neuronal y probablemente evitando el daño propio de la enfermedad, lo que hace a estos receptores un blanco interesante en el estudio de la neuropatología de la EP, pero los mecanismos por los que la nicotina confiere esta protección se desconocen (Srinivasan, et. al. 2016).

Existen numerosas poblaciones de nAChRs en el cerebro humano. Estos son receptores pentaméricos que pueden estar compuestos de subunidades  $\alpha$  (homoméricos) o de una combinación de subunidades  $\alpha$ -  $\beta$  (heteroméricos). En los nAChRs del cerebro de los mamíferos, se ha identificado una composición de nueve receptores  $\alpha$  ( $\alpha$ 2-  $\alpha$ 10) y tres subunidades  $\beta$  ( $\beta$ 2- $\beta$ 4) (Fig. 5) (Albuquerque, et. al. 2009). Se ha identificado la expresión de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha$ 2-  $\alpha$ 6) y subunidades  $\beta$

( $\beta 2$ – $\beta 4$ ) en el sistema nigroestriatal, con una muy restringida localización de  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  en la *sustancia nigra*. Otras subunidades, como la  $\alpha 7$  están distribuidas en regiones corticales y subcorticales vinculadas a circuitos que controlan el movimiento (Albuquerque, et. al. 2009). La combinación de subunidades  $\alpha 4\beta 2$  de los nAChR está enriquecida en los ganglios basales, así como en otras regiones del cerebro involucrados en el movimiento, mientras que las subunidades  $\alpha 6\beta 2$  de los nAChR se encuentran principalmente en el estriado (Fig. 6) (Quik, et. al. 2011).



**Fig. 5. Receptor nACh.** Se sabe que los nAChR están compuestos por cinco cadenas polipeptídicas. Se ha identificado a las subunidades  $\alpha$ , como los subunidades catalíticas. En estos receptores se han identificado dos sitios de unión para la acetilcolina, los cuales al unirse acetilcolina o nicotina promueve la activación del canal y la consecuente despolarización neuronal (Alberts, et. al. 2011)

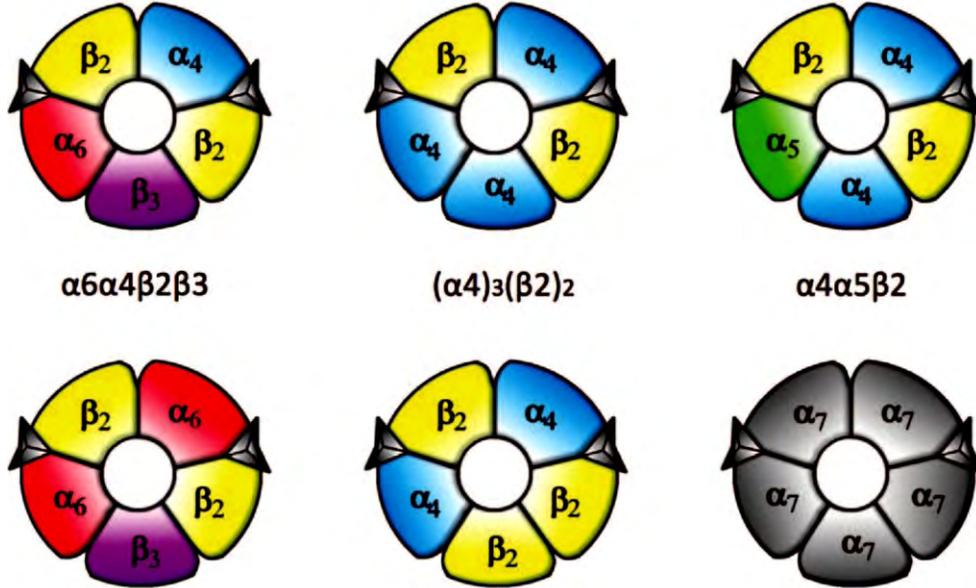


Fig. 6. Principales combinaciones de los nAChRs en el SNC de mamíferos.  $\alpha6\alpha4\beta2\beta3$  y  $\alpha6\beta2\beta3$  tiene una distribución restringida en el SNC incluyendo el sistema nigrostriatal.  $\alpha4\beta2$  y  $\alpha4\alpha5\beta2$  están ampliamente presentes en todo el cerebro, incluyendo la sustancia nigra. El homómero  $\alpha7$ , se ha identificado en regiones vinculadas con los circuitos que controlan el movimiento (Tomada de Quik, et. al. 2012).

### III. ANTECEDENTES.

En modelos mamíferos, la nicotina reduce los efectos de algunas neurotóxicas que dañan específicamente a las neuronas dopaminérgicas de la región mesencefálica, tales como la hidroxidopamina (6-OHDA) (Quik, 2007; Quik, 2012). Existe también una protección contra el daño nigrostriatal cuando se administra nicotina en modelos parkinsonianos ocasionados por la presencia de MPTP, sustancia que produce daño exclusivamente en neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* en mono y ratón (Bordia, et. al. 2006). Se piensa que la protección está mediada por varias poblaciones de nAChRs, ya que éstas son abundantes en áreas del estriado y otras regiones del cerebro implicadas en el movimiento (Bordia, et. al. 2007, Quik, et. al. 2011) (Tabla 2).

**TABLA 2. MODELOS ANIMALES Y ESTUDIOS EN NICOTINA.**

Modelo animal	Daño a la zona nigroestriatal	Tratamiento con nicotina	Protección	Referencia
Ratas	6-OHDA	inyección, mini bomba, bebida.	mejoría en los déficits conductuales y medidas moleculares y funcionales en el estriado.	<i>Costa, et.al, 2001.</i> <i>Ryan, et. al. 2001.</i>
Monos	MPTP	bebida	mejoría en los déficits conductuales y medidas moleculares y funcionales en el estriado	<i>Quik, et. al. 2006.</i> <i>Bordia, et. al. 2006.</i>
Ratón	MPTP	inyección, mini bomba, bebida.	efectos variables, protección en varios estudios pero no en todos.	Janson, et. al. 1992. Parain, et. al. 2003.
	paraquat	bebida	mejoría en marcadores moleculares en el estriado.	<i>Khwaja, et. al. 2007.</i>
	metanfetamina	inyección	mejoría en marcadores moleculares en el estriado.	<i>Ryan, et. al. 2001.</i>

La nicotina también previene la activación de vías relacionadas con el estrés oxidativo específicamente en el retículo endoplásmico, como la repuesta a proteínas mal plegadas (UPR), cuya función es recuperar el funcionamiento correcto de la célula al detener la traducción de proteínas o aumentando la síntesis de chaperonas y en caso contrario promover la apoptosis. Srinivasan y colaboradores en 2016, observaron en modelos de rata, que la nicotina promueve una disminución de la expresión y translocación de proteínas relacionados con este sistema como CHOP, XBP1 y ATF6 entre otros promoviendo así una protección a las neuronas dopaminérgicas (*Srinivasan, et. al. 2016*).

Sumado a esto, los compuestos de humo de cigarrillo como la nicotina y la hidroquinona inhiben la formación de fibrillas *in vitro* de  $\alpha$ -sin y su mutante A53T, de manera dependiente de la concentración, siendo la nicotina la más eficaz inhibiendo la formación de éstas. (*Hong, et. al. 2009*).

En *Drosophila melanogaster*, la nicotina confiere una mayor esperanza de vida y una mejoría en la capacidad motriz en animales mutantes de parkina, una E3 ubiquitinligasa involucrada con la aparición de Parkinson juvenil (Chambers, et. al. 2013). Chambers y colaboradores generaron una mosca mutante para parkina, cuya supervivencia *per se*, se disminuye. En estas moscas, la nicotina promueve un aumento en la esperanza de vida. Por el contrario, la nicotina reduce la supervivencia en aquellas moscas que no tienen un riesgo aumentado para la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Fig. 7). Por otro lado la presencia de nicotina en la comida promueve la disminución en la pérdida de la locomoción mientras que en las moscas control se notó una reducción (Fig. 8).

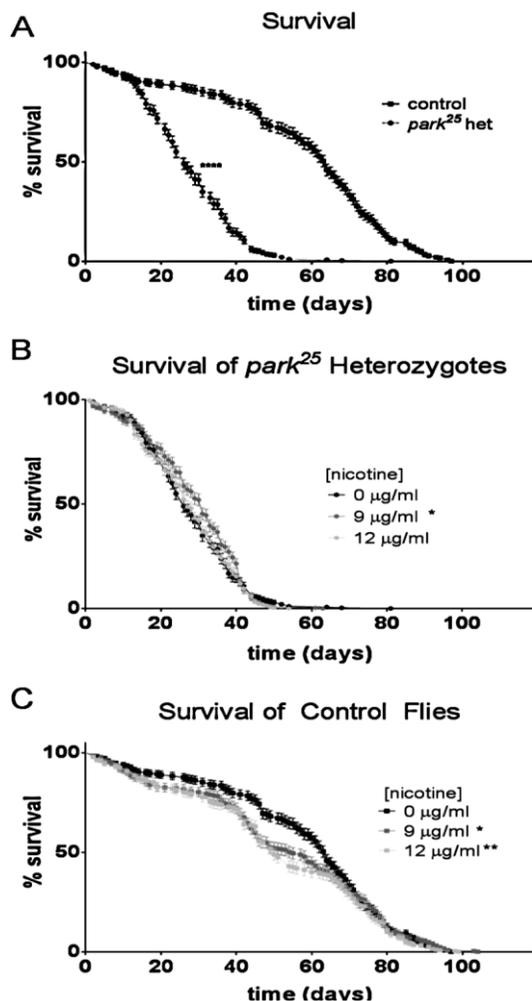


Fig. 7. Supervivencia de moscas con mutación en el gen park. El tratamiento con nicotina aumenta la esperanza de vida en moscas con la mutación de parkina, mientras que en las moscas control este tratamiento resulta perjudicial (Chambers, et. al. 2013)

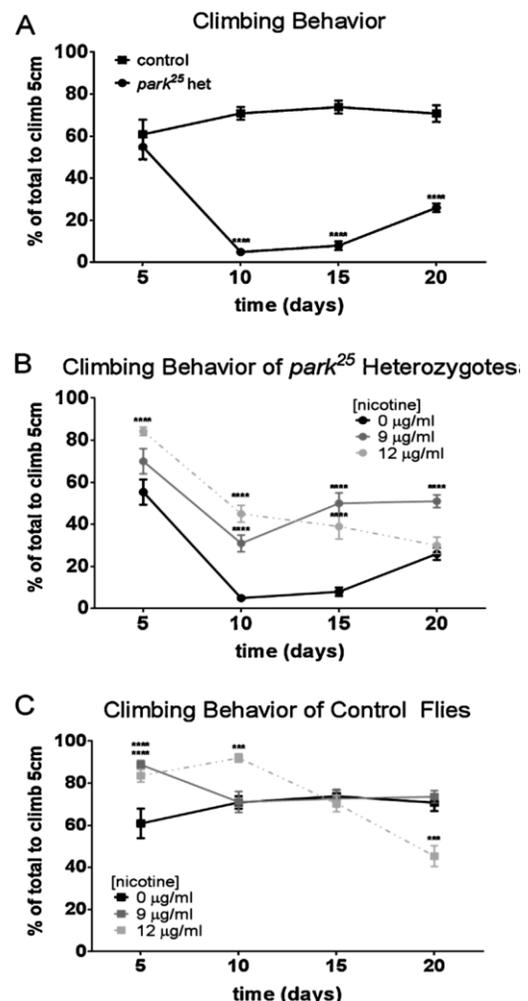


Fig. 8. Movilidad de moscas con mutación en el gen park. El tratamiento con nicotina previene los déficits locomotores en las moscas con la mutación de parkina. En las moscas control este efecto se pierde para el día 20 (Chambers, et. al. 2013).

Datos preliminares en el laboratorio determinaron el efecto de alimentar con nicotina a moscas que expresan  $\alpha$ -sin y sinf bajo el promotor de la tirosina hidroxilasa. Se probaron diferentes concentraciones de nicotina (0, 2, 4 y 6  $\mu\text{g/ml}$  de nicotina en la comida) durante 60 días. Al igual que Chambers y colaboradores, se determinó que la nicotina promueve una reducción en la muerte de las moscas que expresan las proteínas relacionadas con la EP, mientras que en las moscas control la nicotina la acelera (Fig. 9) (Pérez-Arizmendi, 2015. Tesis de licenciatura).

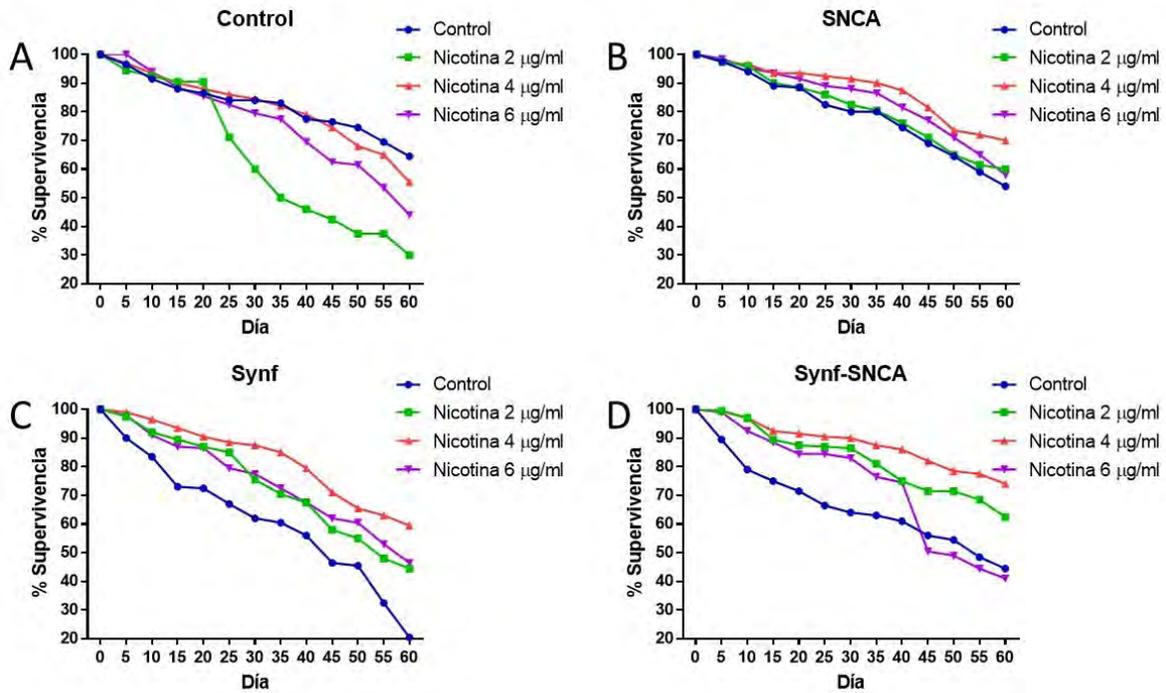


Fig. 9. Supervivencia en 60 días de las moscas transgénicas de  $\alpha$ -sin y sinf. Porcentaje de supervivencia de moscas en 60 días. La nicotina disminuye la esperanza de vida en las moscas control. El tratamiento con nicotina incrementa la esperanza de vida en las moscas experimentales, resultando más benéfica la concentración de 4  $\mu\text{g/ml}$  (Modificado de Pérez-Arizmendi, 2015. Tesis de licenciatura).

En cuanto a ensayos de movilidad, se evaluó el efecto de la nicotina sobre la geotaxis negativa, que es la conducta innata de las moscas a trepar. La nicotina promovió una disminución en la pérdida de este movimiento, mientras que en el control se perdió esta capacidad. La concentración ideal fue de 4  $\mu\text{g/ml}$  de nicotina en la comida ya que resultaba ser la más benéfica para las moscas tanto en supervivencia como en movilidad (Fig. 10) (Pérez-Arizmendi, 2015. Tesis de licenciatura).

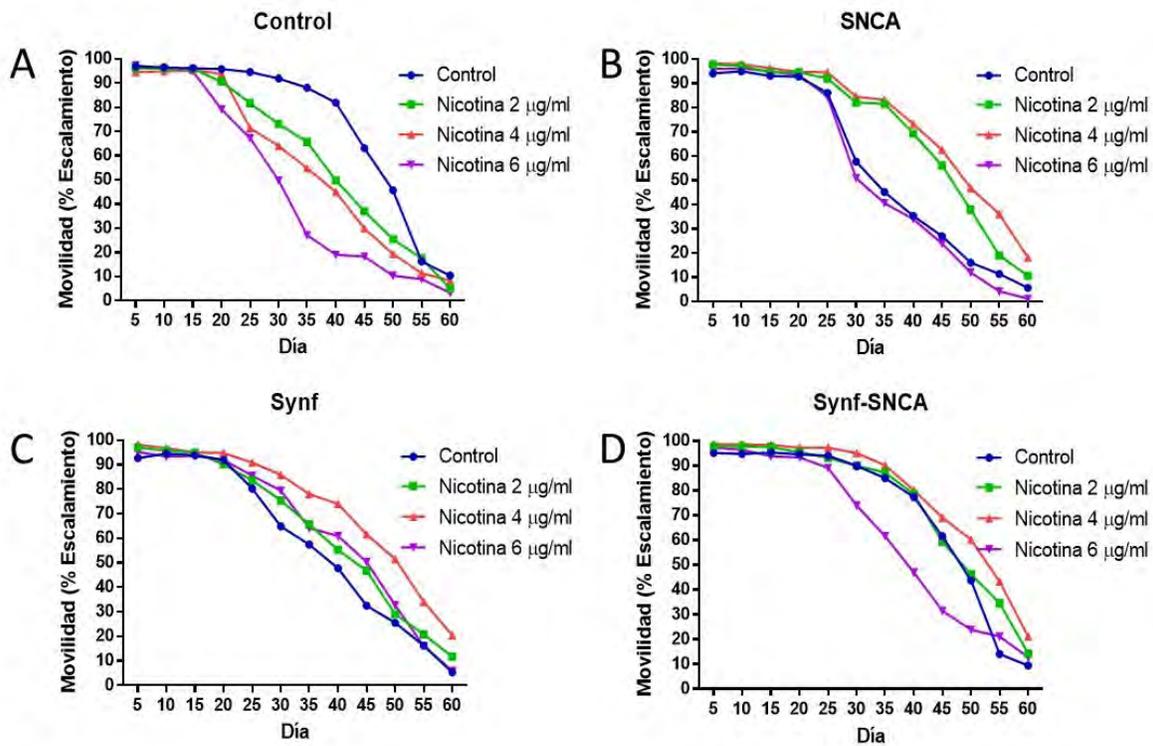


Fig. 10. Escalamiento en 60 días de las moscas transgénicas de  $\alpha$ -sin y sinf. A) Porcentaje de escalamiento de moscas control en 60 días La nicotina promueve la pérdida de la movilidad en las moscas control. B), C), D) Porcentaje de escalamiento en las moscas transgénicas. La nicotina reduce la pérdida de la movilidad, resultando más benéfica la concentración de 4 µg/ml (Modificado de Pérez-Arizmendi, 2015. Tesis de licenciatura).

En resumen, en *Drosophila melanogaster*, el tratamiento con nicotina promueve un aumento en la vida de las moscas y una reducción en la capacidad de escalamiento, por lo que entender cuáles son los mecanismos de protección de la nicotina en la neurodegeneración dopaminérgica y su efecto en modelos que reflejan la predisposición genética a padecer la enfermedad se han convertido en un foco de atención para continuar estudiando el papel neuroprotector que confiere la nicotina en la EP.

## IV. JUSTIFICACIÓN.

El tener un modelo de neurodegeneración dopaminérgica sencillo, nos permite evaluar diferentes drogas que permitan retrasar o inhibir el daño ocasionado por la presencia de sinf y  $\alpha$ -sin en la EP. *Drosophila melanogaster* permite evaluar el efecto que tiene la nicotina sobre la neurodegeneración dopaminérgica, permitiendo realizar experimentos con un gran número de organismos en un corto periodo de tiempo. También permite reproducir fenotipos asociados a la enfermedad como pérdida del movimiento, muerte neuronal y reducción en la supervivencia, por lo que hace un organismo atractivo para el estudio de la patología.

Por otro lado, aún no se comprenden del todo las causas que promueven el desarrollo de la enfermedad y por consecuencia los pacientes afectados reciben un tratamiento con el que se tratan de frenar o retrasar los síntomas relacionados, buscando minimizar el impacto en su vida cotidiana. Es necesario señalar que muchos de estos tratamientos eventualmente generan tolerancia, lo que disminuye su efectividad con el paso del tiempo, de manera que la EP es progresiva y mortal (Quik, et. al. 2013). Por estas razones es importante identificar los mecanismos moleculares que causan la EP con ayuda de modelos experimentales. Esta información nos permitirá identificar blancos moleculares para posibles sustancias químicas o tratamientos que inhiban los mecanismos patológicos de la EP.

Probablemente no se encontrará una justificación médica para consumir nicotina, ya que es una droga que causa una fuerte adicción; no obstante es importante conocer y entender el efecto neuroprotector que confiere para encontrar moléculas que lleven a cabo una función similar sin las desventajas de adicción y toxicidad de ésta (Srinivasan, et. al. 2016).

## V. HIPÓTESIS.

La nicotina tiene un efecto protector en el modelo genético de la enfermedad de Parkinson ocasionada por la expresión de  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina, promoviendo una protección a las neuronas dopaminérgicas dañadas y retrasando los aspectos fenotípicos de la enfermedad.

## VI. OBJETIVOS.

### GENERAL.

- Determinar el efecto de la nicotina en moscas transgénicas de  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina.

### PARTICULARES.

- Determinar el efecto de la nicotina en diferentes periodos de vida de las moscas transgénicas de  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina.
- Determinar la pérdida de la movilidad voluntaria de moscas transgénicas de  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina por medio del instrumento DAM en presencia de nicotina.
- Determinar el número de neuronas dopaminérgicas en el cerebro de moscas alimentadas con nicotina en diferentes edades.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

### VII. 1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Las moscas transgénicas que expresan  $\alpha$ -sin y los drivers que expresan *GFP* y *gal4* asociados al promotor de *th*, fueron obtenidas directamente del banco de moscas *Drosophila*, en la Universidad de Indiana (<http://flystocks.bio.indiana.edu>) en Bloomington. Las moscas transgénicas que expresan *sinf* fueron construidas previamente en el laboratorio (*Hernández-Vargas, et. al. 2011*). Las moscas dobles transgénicas, es decir las que expresan tanto  $\alpha$ -sin como *sinf*, fueron obtenidas por medio de cruza genéticas. Todas las líneas fueron estabilizadas por medio de cromosomas balanceadores que impiden la recombinación entre cromosomas homólogos, permitiéndonos de esta manera mantener estables las líneas transgénicas (*Greenspan, 2004*).

### VII. 2 DISEÑO DE CRUZAS.

Se diseñó un sistema de cruza para obtener moscas que expresarán  $\alpha$ -sin, *sinf* o ambas proteínas en las neuronas dopaminérgicas así como *GFP*. Como control se usó la línea driver *UAS-GFP; th-gal4* y se cruzó con la línea *white* para obtener organismos heterocigos para la expresión de *GFP* como las moscas experimentales. De esta manera, el esquema de cruza quedó como se indica en la Figura 11.

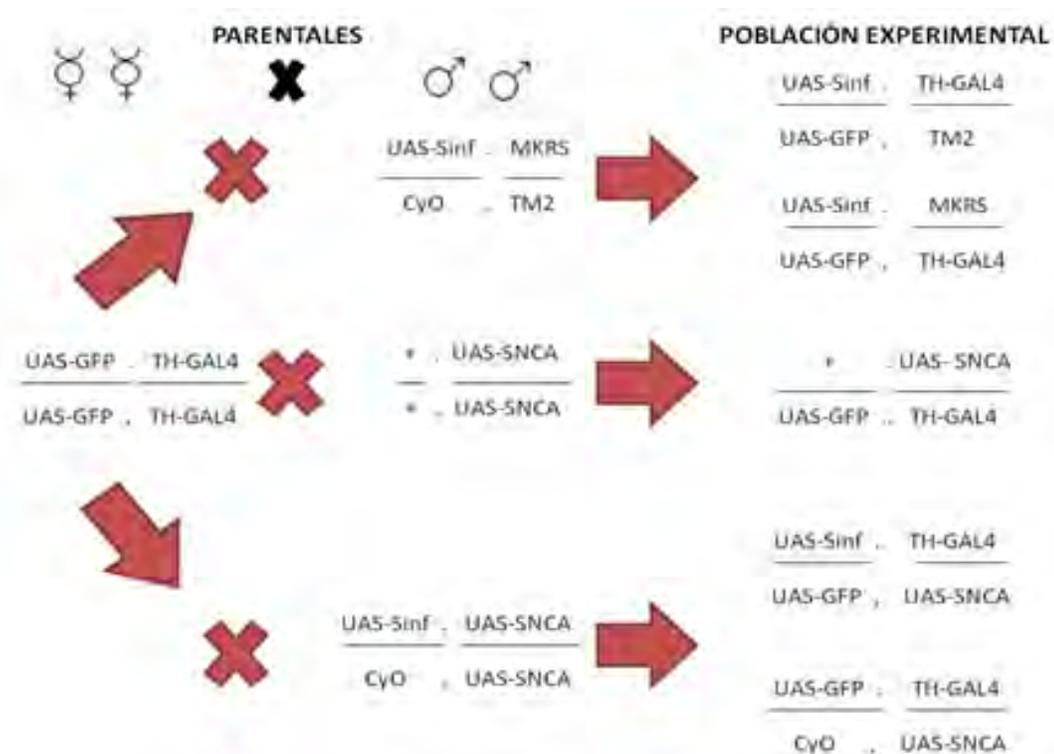


Fig. 11. Moscas experimentales. Esquema de cruzas por las cuales se obtuvieron las moscas experimentales. (El resto de la descendencia se omitió por no ser de interés para el desarrollo de esta tesis).

## VII. 3 GENOTIPIFICACIÓN.

Para corroborar el genotipo de cada línea experimental se realizó una purificación de DNA a partir de moscas completas. Por PCR se comprobó la presencia de *gal4*,  $\alpha$ -sin, *sinf* y *rp49*, una proteína ribosomal, como control. Los oligonucleótidos usados se muestran en el Anexo 1 (Véase Anexo 1).

## VII. 4 DETERMINACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA.

Para determinar la supervivencia de las moscas, se seleccionaron 400 machos adultos por cada línea. Se seleccionaron 200 por condición y se separaron en 20 por vial. Se preparó la comida estándar como tratamiento control (5.25 g de levadura seca, 1.75 g de agar, 12.25 g de dextrosa, 5.25 g de sacarosa, 15 g de maíz molido, 1 ml de ácido propiónico y 250 ml de H<sub>2</sub>O destilada). Para la comida con nicotina se usó la misma receta de la comida estándar, suplementada con 1  $\mu$ l de nicotina base en 250 ml de comida para una concentración final de 2.4 nM. Esta

comida se preparó dos veces por semana. Las moscas se colocaron en la comida control y experimental a partir del primer día de eclosión de la pupa y se cambiaron a comida fresca dos veces por semana. En cada cambio de comida se cuantificó el número de moscas muertas, escapadas y atrapadas en la comida; el registro se hizo semanalmente y se realizó hasta la muerte de la última mosca de cada línea. Se graficaron las curvas de supervivencia, usando el programa online OASIS 2 (Han, et. al. 2016), y GraphPad Prism® En la Fig. 12 se representa gráficamente el protocolo que se siguió.

Para comparar de manera global la diferencia entre las curvas de supervivencia se realizaron pruebas de Mantel-Cox. En las comparaciones de los puntos 25%, 50% y 75% de supervivencia se usaron las pruebas estadísticas exactas de Fisher ya que esta prueba nos permite comparar únicamente dos condiciones diferentes en un punto determinado de tiempo de la curva de supervivencia y comprobar si son estadísticamente diferentes.

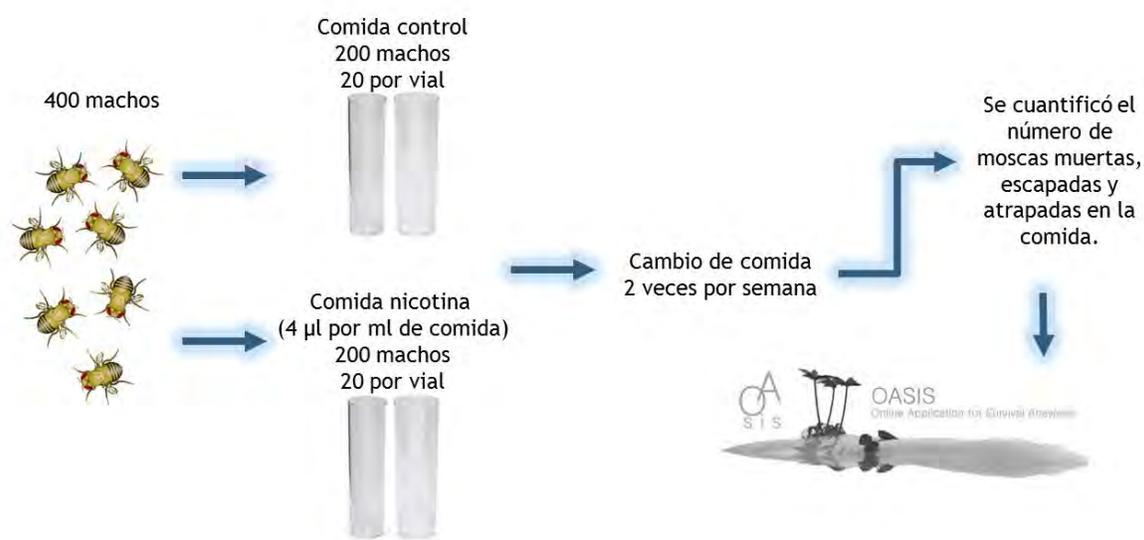


Fig. 12. Determinación de la supervivencia. A partir de 400 machos por cada línea de moscas se procedió a realizar una curva de supervivencia para determinar los efectos de la nicotina en las moscas.

## VII. 5 DETERMINACIÓN DE LA MOVILIDAD VOLUNTARIA.

Para cuantificar la movilidad de las moscas se usó el instrumento Drosophila Activity Monitor (DAM) (Pfeiffenberger, et, al. 2010), el cual consiste en sensor infrarrojo con capacidad para 32 moscas. Las moscas se introducen en un tubo de plástico en el que se coloca de un lado comida y del lado contrario un algodón para

permitir la entrada de oxígeno. El DAM está conectado a un computador el cual registra el número de pases en determinado periodo de tiempo. Es importante señalar que a diferencia de la prueba de geotaxis, negativa, en la cual el experimentador obliga a la mosca a moverse, este instrumento mide el movimiento voluntario, ya que la mosca es libre de moverse cuando ella así lo desee.

Se usaron dos DAM en paralelo, uno para la condición control y otro para el tratamiento con nicotina. Se colocaron 20 moscas por cada condición cada 15 días. Los instrumentos se mantuvieron en una incubadora a 25 °C con periodos de 12 horas de luz por 12 de oscuridad. Los registros del movimiento se realizaron cada hora durante siete días. A las primeras 24 horas de registro se les denominó periodo de adecuación y fueron eliminados del análisis. Posteriormente se tomaron las 96 horas subsecuentes para determinar el movimiento en cada línea y tratamiento. Estos resultados se graficaron usando el programa GraphPad Prism® y se realizaron ANOVAS de una vía para el análisis global y pruebas de t para la comparación de cada semana (Fig. 13).



Fig. 13. Determinación de la movilidad. Usando el DAM se procedió a determinar la movilidad de las moscas, esto se realizó a partir de 20 machos por cada línea y tratamiento de moscas. Los resultados se obtuvieron de las 96 horas posteriores al tiempo de adecuación.

## VII. 6 DISECCIÓN Y FOTOGRAFIA DE CEREBROS.

Para diseccionar los cerebros se seleccionaron cinco moscas machos cada 10 días de las diferentes líneas. Estos se diseccionaron en PBS 1X y se mantuvieron en la misma solución, una vez obtenidos los cerebros se fijaron usando formaldehído en

PBS a una concentración de 3.7% durante 15 minutos, posteriormente se lavaron tres veces con PBS. Se montaron en 15 µl de citifluor (Ted Pella Inc.) sobre un portaobjetos de 75 x 20 X 1 mm, colocándoles encima un cubreobjetos circular de 12 mm. Se observaron en el microscopio confocal Olympus Multifotónico Upright y se tomaron cortes usando el objetivo 10X con 0.4 de apertura numérica con zoom de 1.5. Todas las fotos se tomaron con las mismas condiciones de intensidad y voltaje del láser.

## **VII. 7 CUANTIFICACIÓN DE NEURONAS.**

A partir de la proyección Z, se cuantificó el número de neuronas presentes para cada cerebro. Se graficaron los resultados usando el programa GraphPad Prism® y se realizaron pruebas de t.

## VIII. RESULTADOS.

### VIII. 1 Comprobación de los genotipos.

Se realizó la extracción de DNA genómico a partir de moscas totales. Por medio de PCR se corroboró la correcta expresión de los genes que codifican para  $\alpha$ -sin, synf, gal4 y rp49. Los amplicones se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Fig. 14).

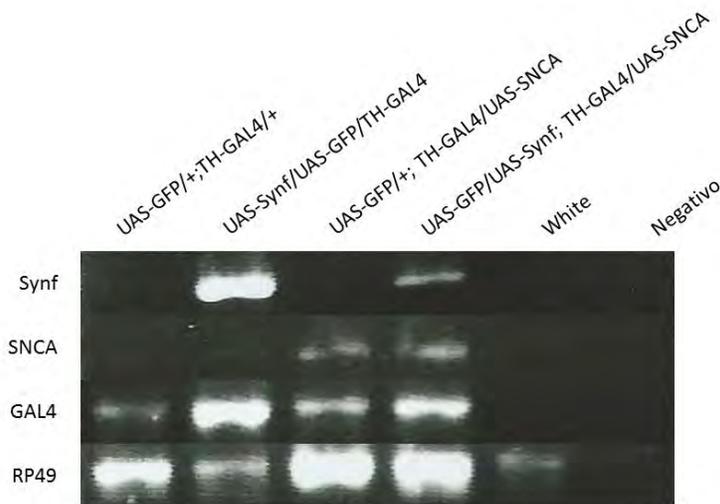
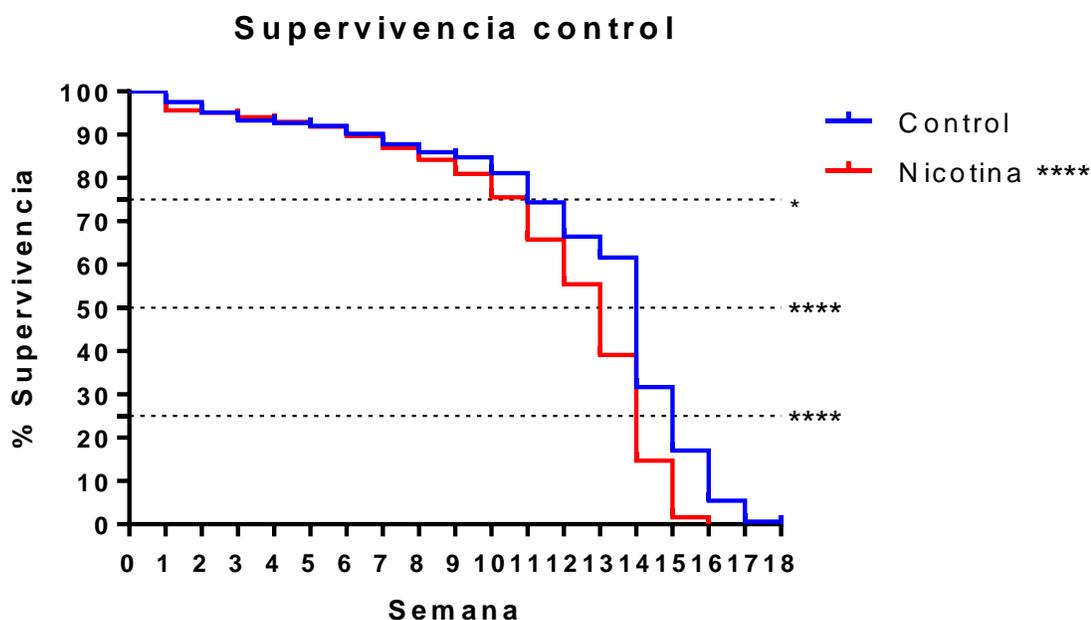


Fig. 14 Genotipificación. Productos de PCR obtenidos para cada línea experimental. Se muestra la correcta expresión de los genes transgénicos en las moscas experimentales. Como control se usó a la línea white. En el control negativo se observó que no existía una amplificación inespecífica de los oligonucleótidos.

### VIII. 2 La nicotina promueve una disminución de la supervivencia de las moscas Control.

El consumo de cigarrillos conlleva una serie de efectos secundarios negativos para la salud de las personas, como varios tipos de cánceres, pérdida del olfato y del gusto, problemas cardíacos, etc., siendo uno de los principales efectos adversos de la nicotina la adicción que crea a las personas fumadoras.

En la línea *UAS-GFP/+; th-gal4/+*, la vida de las moscas disminuye en el tratamiento con nicotina. Para comparar en qué punto la nicotina ejerce mayor efecto en la curva de supervivencia, comparamos tres puntos, en donde el 75%, 50% y 25% de las moscas aún sobrevivían. Las pruebas estadísticas sugieren que en el caso de las moscas control, el tratamiento con nicotina ejerce un efecto negativo a lo largo de toda la vida de las moscas, lo que nos indica que la nicotina tiene un efecto negativo en aquellas moscas que no están predispuestas a desarrollar alguna afectación neuronal, esto es consistente con lo ya reportado en la literatura (*Chambers, et. al. 2013*) y a los datos preliminares del laboratorio donde solo se habían cuantificado los 60 primeros días de vida adulta (*Arizmendi-Pérez, tesis de licenciatura, 2016*) (*Fig. 15*).



*Fig. 15. Supervivencia moscas UAS-GFP/+; th-gal4/+. El tratamiento con nicotina (rojo) promueve la reducción en la supervivencia de las moscas en comparación con las del tratamiento control (azul). (Para el análisis global de supervivencia se usó la prueba de Mantel-Cox. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Para el análisis específico a 75%, 50% y 25% de supervivencia se usó la prueba exacta de Fisher. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).*

### VIII. 3 La nicotina promueve un aumento de la supervivencia de las moscas de la línea *sinf*.

La literatura reporta que la nicotina promueve un aumento en la supervivencia en moscas con mutaciones en *parkina*, y este efecto es dependiente de la concentración (Chambers, et. al. 2013).

En el caso particular de las moscas que expresan la proteína *sinf* en las neuronas dopaminérgicas, se determinó que la vida media fue de 8 semanas, mientras que la de las moscas del tratamiento con nicotina fue de 12 semanas; por lo que la nicotina promueve un aumento de la supervivencia de las moscas. La evaluación de los puntos 25%, 50% y 75% de la curva nos indican que la nicotina posee un efecto en el aumento de supervivencia a lo largo de toda la vida de la mosca (Fig. 16).

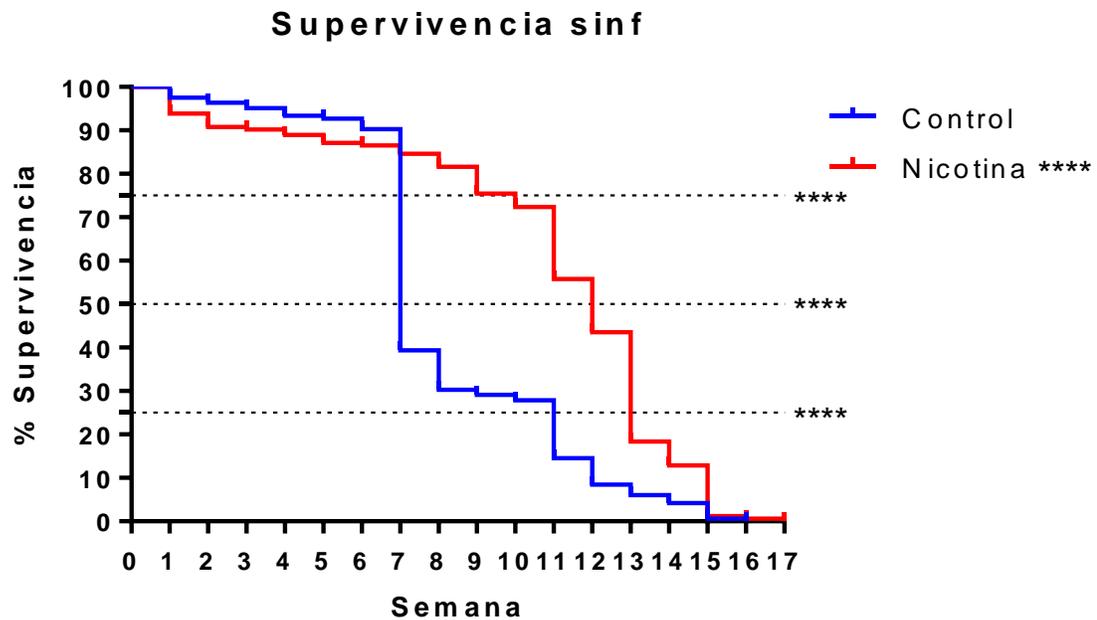


Fig. 16. Curva de supervivencia de las moscas transgénicas de *sinf*. El tratamiento con nicotina (rojo) promueve el aumento en la supervivencia de las moscas en comparación con las del tratamiento control (azul). (Para el análisis global de supervivencia se usó la prueba de Mantel-Cox. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Para el análisis específico a 75%, 50% y 25% de supervivencia se usó la prueba exacta de Fisher. \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## VIII. 4 La nicotina promueve una disminución de la supervivencia de las moscas de la línea $\alpha$ -sin.

La proteína  $\alpha$ -sin, es una de las principales responsables de la aparición de Parkinson, familiar. En este trabajo se usó una línea de moscas que expresa la proteína  $\alpha$ -sin silvestre humana. Fue interesante observar que la nicotina tuvo un efecto negativo en la supervivencia de estas moscas. De acuerdo a los datos de Chambers y colaboradores en 2013 y a lo observado en la línea de moscas *sin*, la supervivencia de las moscas se aumenta cuando existe una predisposición genética al desarrollo de la EP y cuando se les da un tratamiento con nicotina. El análisis de la curva sugiere que el efecto más adverso de la nicotina sobre la disminución de la supervivencia se da en la etapa final de las moscas (25% de supervivencia). Esto abre más aun el panorama en los estudios enfocados al estudio de la dinámica y efecto de esta proteína en el cerebro de pacientes con la enfermedad (Fig. 17).

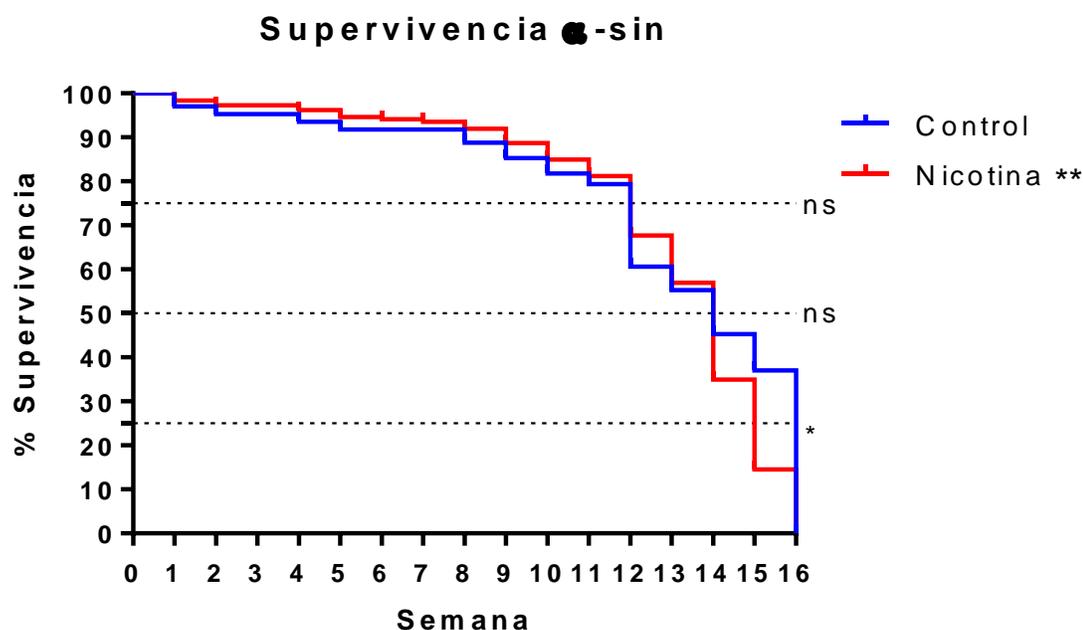


Fig. 17. Curva de supervivencia de las moscas transgénicas de  $\alpha$ -sin. El tratamiento con nicotina (rojo) promueve la reducción en la supervivencia de las moscas en comparación con las del tratamiento control (azul). Cabe señalar que esta reducción en la supervivencia ocurre principalmente la última etapa de vida de las moscas (semana 14-16). (Para el análisis global de supervivencia se usó la prueba de Mantel-Cox. \*\* $p < 0.005$ . Para el análisis específico a 75%, 50% y 25% de supervivencia se usó la prueba exacta de Fisher. \* $p < 0.05$ , ns=no significativo).

## VIII. 5 La nicotina promueve un aumento de la supervivencia de las moscas de la línea *synf/α-sin*.

Hernández-Vargas y colaboradores en 2011, reportaron que la interacción entre *synf* y variantes mutantes de  $\alpha$ -*sin*, promueve una protección a las neuronas dopaminérgicas, así como un aumento en la supervivencia de las moscas. Por otro lado, en las moscas que solo expresan una de las proteínas, *synf* o  $\alpha$ -*sin*, la supervivencia y el número de neuronas se reduce, concluyendo que la toxicidad de las proteínas se inhibe cuando interactúan entre sí. (Hernández-Vargas, *et. al.* 2011). Por esta razón se probó también como es que la nicotina afecta a esta línea de moscas, partiendo de la idea de que al contar con la expresión de ambas proteínas tienen una protección *per se*.

Las pruebas estadísticas muestran que la nicotina promueve un aumento de la supervivencia de estas moscas. Es importante mencionar que la nicotina tiene un efecto más benéfico sobre la vida media (50%), en donde las pruebas estadísticas demuestran una mayor diferencia entre los *tratamientos* (Fig. 18).

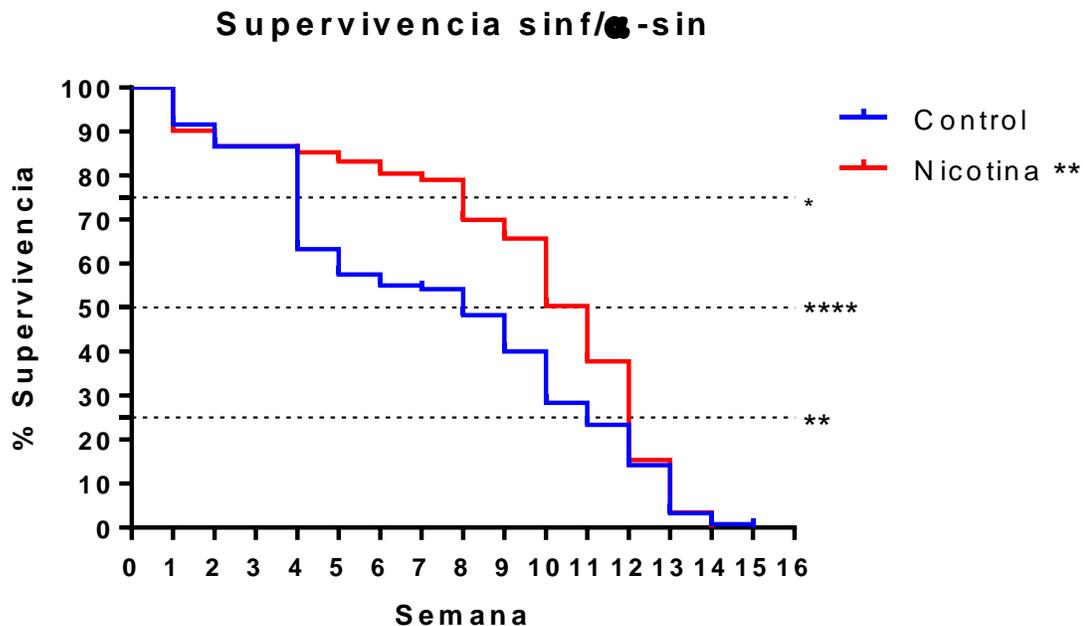


Fig. 18. Curva de supervivencia de las moscas transgénicas de *synf/α-sin*. El tratamiento con nicotina (rojo) promueve la reducción en la supervivencia de las moscas en comparación con las del tratamiento control (azul). Cabe señalar que esta reducción en la supervivencia ocurre principalmente la última etapa de vida de las moscas (semana 14-16). (Para el análisis global de supervivencia se usó la prueba de Mantel-Cox. \*\* $p < 0.005$ . Para el análisis específico a 75%, 50% y 25% de supervivencia se usó la prueba exacta de Fisher. \* $p < 0.05$ , ns=no significativo).

## VIII. 6 La interacción $\alpha$ -sin silvestre y sinf promueve un aumento en la vida media de las moscas.

Anteriormente en la literatura se había reportado únicamente el efecto de la interacción de sinf con alguna de las mutantes de  $\alpha$ -sin; concluyendo que esta interacción promueve un aumento en la vida media de las moscas (Hernández-Vargas, et. al. 2011).

En este trabajo, se probó el efecto de la interacción de sinf con  $\alpha$ -sin silvestre, la cual promueve un aumento en la vida media en comparación con la línea que solo expresa sinf. Si bien, la interacción  $\alpha$ -sin silvestre/sinf no provoca un efecto tan exacerbado como lo ya reportado con las mutantes, si reduce la toxicidad de sinf sobre la vida media de las moscas (Fig. 19).

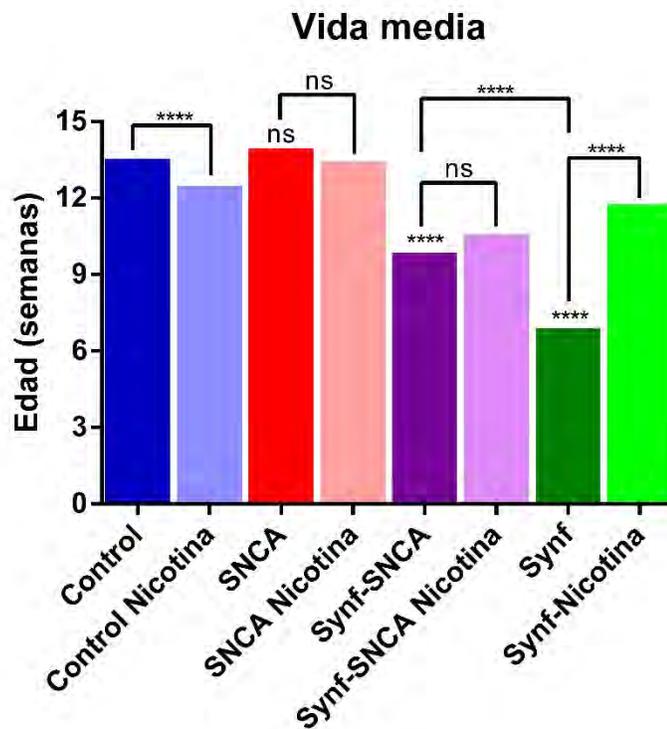


Fig. 19. Vida media. El tratamiento con nicotina es beneficioso para las moscas de la línea sinf. Por el contrario, es perjudicial para las moscas control. La interacción genética de  $\alpha$ -sin-sinf (morado) resulta benéfica por sí sola cuando es comparada contra la sola expresión de sinf (verde). Los asteriscos sobre las barras indican la diferencia con respecto al control (azul fuerte) Los asteriscos sobre las líneas indican la diferencia entre barras (Prueba de exacta de Fisher \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## **VIII. 7 La nicotina reduce el movimiento voluntario en las moscas de la línea control.**

Para evaluar uno de los aspectos fenotípicos más importantes del parkinsonismo en este modelo, se cuantificó la pérdida de la movilidad en cada uno de los tratamientos. Se midió el movimiento voluntario de las moscas con el instrumento DAM, comparando el movimiento total de las moscas durante cuatro días posteriores al periodo de adecuación.

Chambers y colaboradores demostraron que la nicotina no posee efecto en la geotaxis negativa de la línea de moscas *white*, razón por la cual se esperó que la línea control utilizada en este trabajo se comportará de la misma manera (Chambers, *et. al*, 2013). Por otro lado, los datos preliminares en el laboratorio demostraron que la nicotina promueve la pérdida de la conducta de escalamiento en las moscas *UAS-GFP/+; th-gal4/+* (Arizmendi-Pérez, *tesis de licenciatura*, 2015).

Es importante mencionar que se tratan de dos movimientos diferentes, ya que en el caso de la geotaxis negativa es un movimiento en el cual el experimentador obliga a las moscas a moverse, mientras que en la metodología usada en este trabajo el movimiento es voluntario. Se observó que la nicotina en 60 días reduce levemente la movilidad de las moscas control, con una diferencia remarcada en la semana uno. En la semana nueve se observa un aumento en la movilidad en las moscas control, por lo que en el futuro sería importante evaluar a largo plazo la movilidad de estas moscas para determinar el efecto de la nicotina en edades avanzadas de las moscas (Fig. 20).

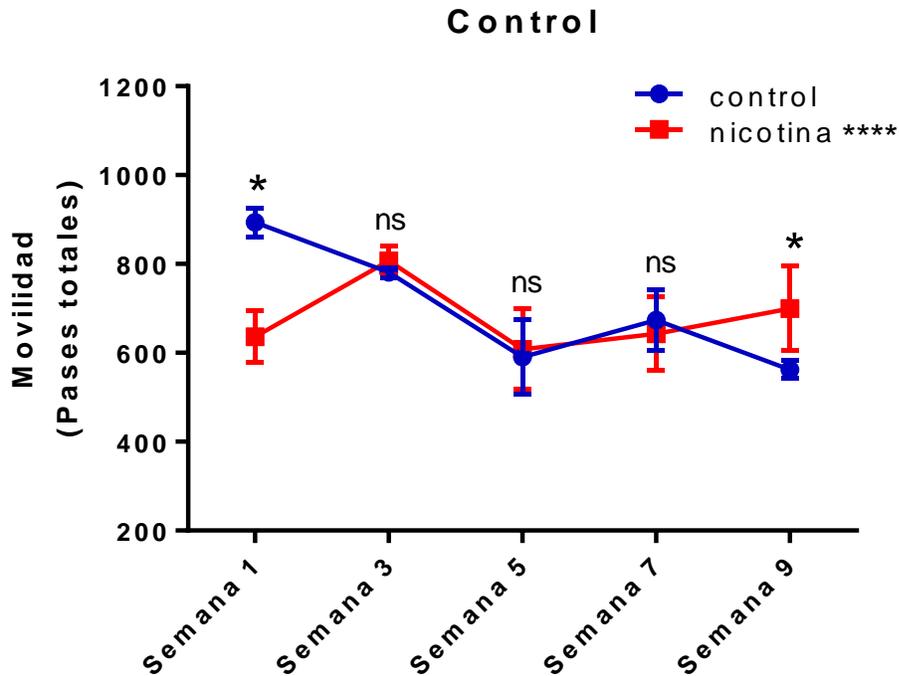


Fig. 20. Movilidad de las moscas control. En azul las moscas alimentadas con la comida control, en rojo las moscas alimentadas con nicotina. Se observa una ligera tendencia de mayor movilidad en las moscas del tratamiento control en días tempranos, al contrario se observa mayor movimiento con el tratamiento con nicotina en días tardíos (ANOVA de una vía para el análisis general \*\*\*\* $p < 0.0001$  Para el análisis en cada punto se utilizaron pruebas de  $t^* p < 0.05$ ).

### **VIII. 8 La nicotina aumenta el movimiento voluntario en las moscas de la línea *sinf*.**

En las moscas de la línea *sinf* existe una tendencia de mayor movilidad en las moscas con el tratamiento con nicotina, con puntos estadísticamente significativos en la semana tres y semana siete (Fig. 21). Al ser las moscas con la menor esperanza de vida de todas las líneas utilizadas, el evaluar la semana nueve fue imposible. A pesar de tratarse de movimientos diferentes, estos resultados sustentan a los ya obtenidos previamente en el laboratorio, en los que se observó que la nicotina promueve una disminución en la pérdida del escalamiento (Arizmendi-Pérez, tesis de licenciatura, 2015).

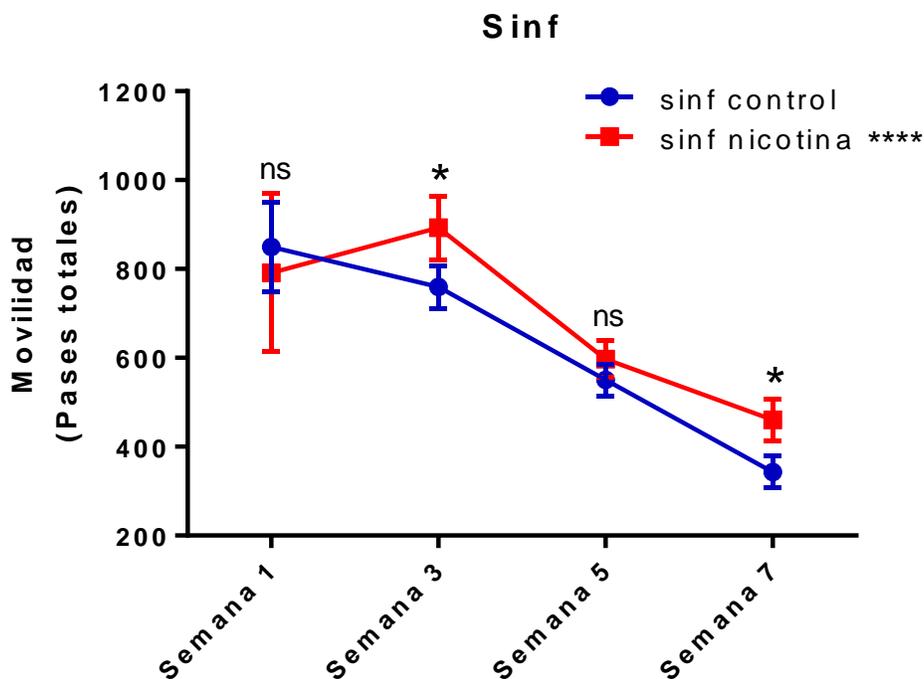


Fig. 21. Movilidad de las moscas de *sinf*. En azul las moscas alimentadas con la comida control, en rojo las moscas alimentadas con nicotina. Se observa una tendencia de mayor movilidad en las moscas con el tratamiento con nicotina significativamente mayor en la semana 3 y 7. (ANOVA de una vía para el análisis general \*\*\*\* $p < 0.0001$  Para el análisis en cada punto se utilizaron pruebas de  $t^* p < 0.05$ ).

### **VIII. 9 La nicotina promueve una reducción en el movimiento voluntario de las moscas de la línea $\alpha$ -*sinf*.**

En el análisis de supervivencia, se determinó que la nicotina promueve una reducción en la supervivencia de las moscas de  $\alpha$ -*sinf*. Aunado a esto, resultado llamativo que el movimiento voluntario se ve afectado por la nicotina, reduciéndolo en la línea  $\alpha$ -*sinf* (Fig. 22). Por otro lado, no existe diferencia entre la supervivencia de esta línea con respecto a las moscas control. Si bien estos resultados indican que la sola expresión de  $\alpha$ -*sinf* silvestre no es necesaria para desarrollar un efecto fenotípico de la enfermedad, también remarca la importancia de utilizar mutantes de la proteína para desarrollar un mejor modelo de la enfermedad.

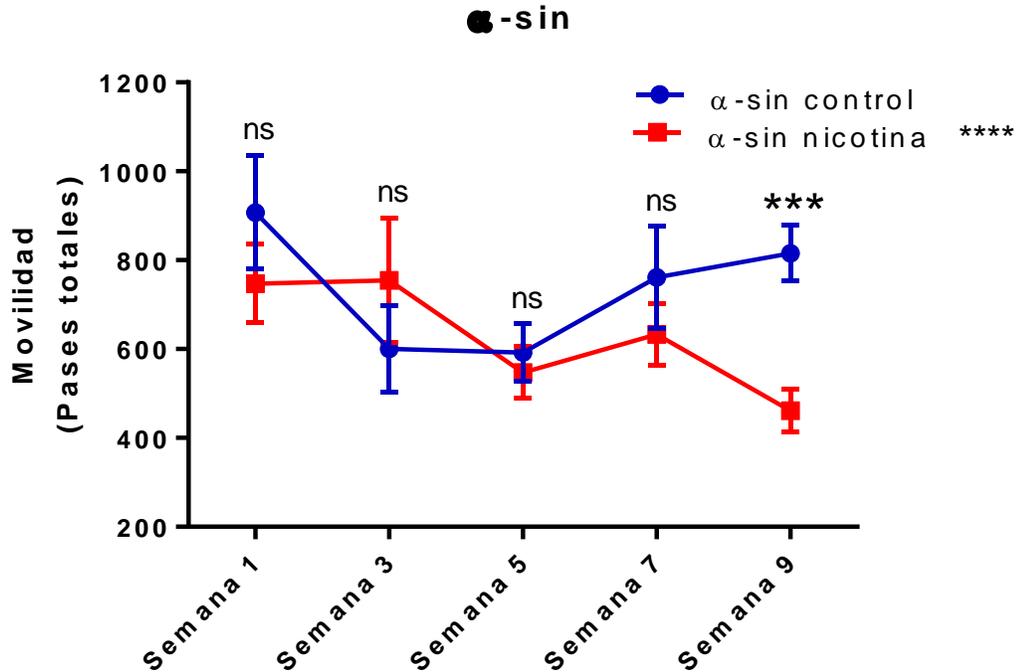


Fig. 22. Movilidad de las moscas  $\alpha$ -sin. En azul las moscas alimentadas con la comida control, en rojo las moscas alimentadas con nicotina. Se observa un efecto significativo sobre la reducción de la movilidad en el tratamiento con nicotina (ANOVA de una vía para el análisis general \*\*\*\* $p < 0.0001$  Para el análisis en cada punto se utilizaron pruebas de t \*\*\* $p < 0.001$ ).

### VIII. 10 La nicotina promueve la pérdida de la movilidad voluntaria de las moscas *sinf/α-sin*.

Al contrario de la línea de *sinf*, en la línea *sinf/α-sin*, los resultados demuestran que el tratamiento con nicotina aumenta la pérdida de la movilidad (Fig. 23) y que al igual que en la vida media, la interacción  $\alpha$ -*sinf* *per se* previene la pérdida de la movilidad, ya que se mantiene sin variaciones importantes a través de las semanas tanto en las moscas que comen comida control, como en las moscas que son alimentadas con nicotina. Esto nos habla de que la protección mediada por la interacción de ambas proteínas es importante para el mantenimiento neuronal, y que muy probablemente el funcionamiento celular en estas moscas es muy similar a las moscas control en las que también se observó reducción en la movilidad voluntaria.

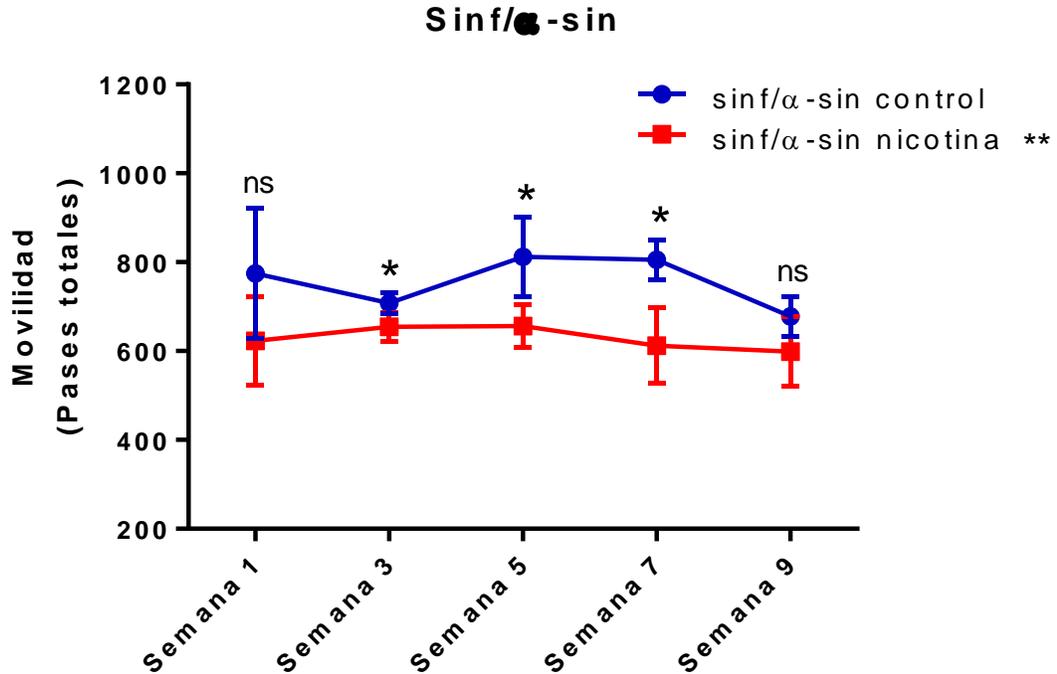


Fig. 23. **Movilidad de las moscas de *sinf/α-sin***. En azul las moscas alimentadas con la comida control, en rojo las moscas alimentadas con nicotina. Las moscas alimentadas con nicotina tienen una mayor pérdida de movilidad que las moscas con comida control. (ANOVA de una vía para el análisis general  $**p < 0.005$  Para el análisis en cada punto se utilizaron pruebas de  $t^{***}p < 0.001$ ).

### ***VIII. 11 La nicotina no promueve una protección contra la muerte de las neuronas dopaminérgicas.***

Una vez evaluado el efecto de la nicotina en la movilidad voluntaria y supervivencia de las moscas, se apuntó directamente a un posible efecto sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, esto pensando en una posible mejora en el funcionamiento de esta población neuronal. Se evaluó el número de neuronas a través del tiempo para poder relacionar los efectos fenotípicos con la supervivencia neuronal.

A nivel de neuronas totales en el cerebro de *Drosophila*, la nicotina no está otorgando ninguna protección, esto dado que a la misma edad y en ambos tratamientos, nuestros organismos no poseen diferencias significativas en el número de neuronas (*Fig. 24-27*).

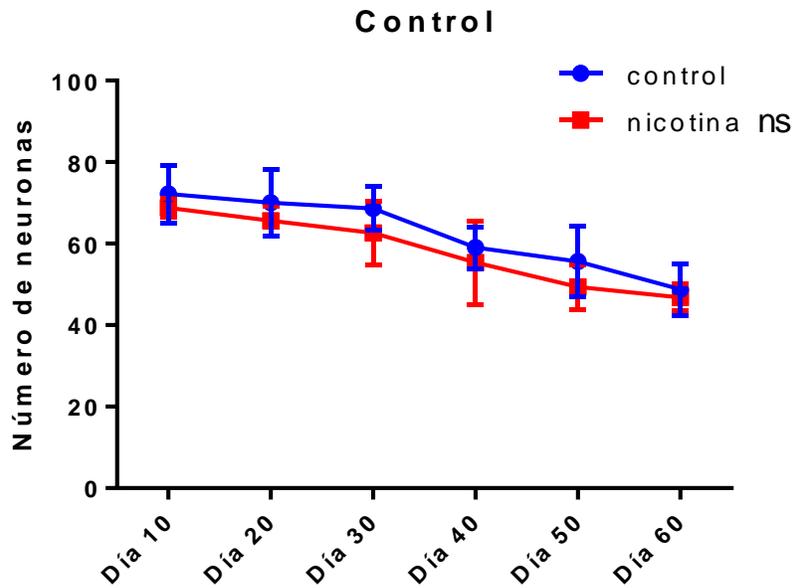


Fig. 24. Sobrevivencia de neuronas en la línea control. Se muestra en la gráfica el número de neuronas sobrevivientes a diferentes días de edad. En azul se observa el tratamiento control y en rojo el tratamiento con nicotina. No observamos diferencias significativas entre ambos tratamientos. (Prueba de t ns).

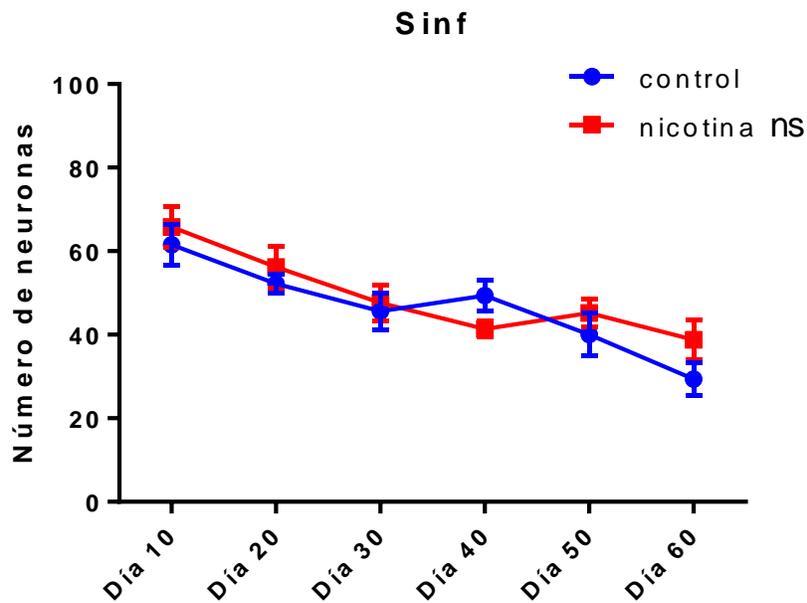


Fig. 25. Sobrevivencia de neuronas en la línea sinf. Se muestra en esta gráfica el número de neuronas sobrevivientes a diferentes días de edad. En azul se observa el tratamiento control y en rojo el tratamiento con nicotina. No observamos diferencias significativas entre ambos tratamientos. (Prueba de t ns).

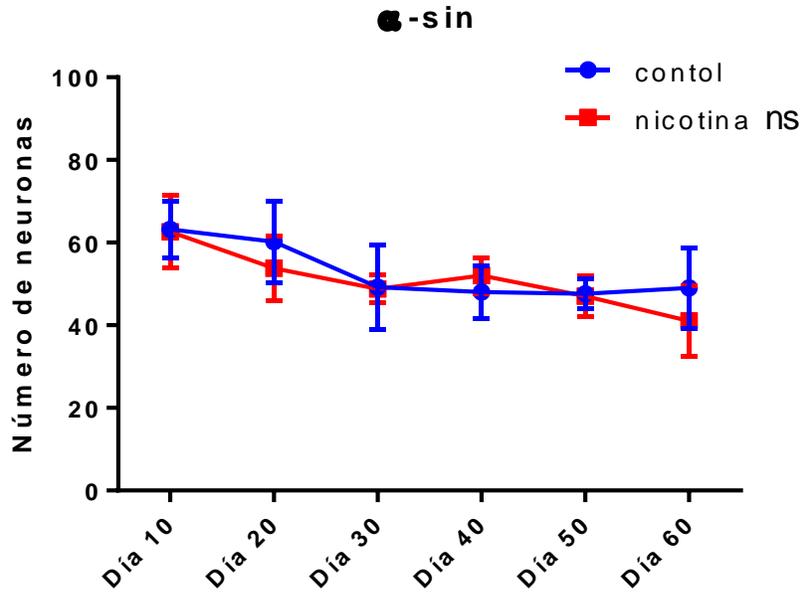


Fig. 26. Sobrevivencia de neuronas en la línea  $\alpha$ -sin. Se muestra es esta gráfica el número de neuronas sobrevivientes a diferentes días de edad. En azul se observa el tratamiento control y en rojo el tratamiento con nicotina. No observamos diferencias significativas entre ambos tratamientos. (Prueba de t ns).

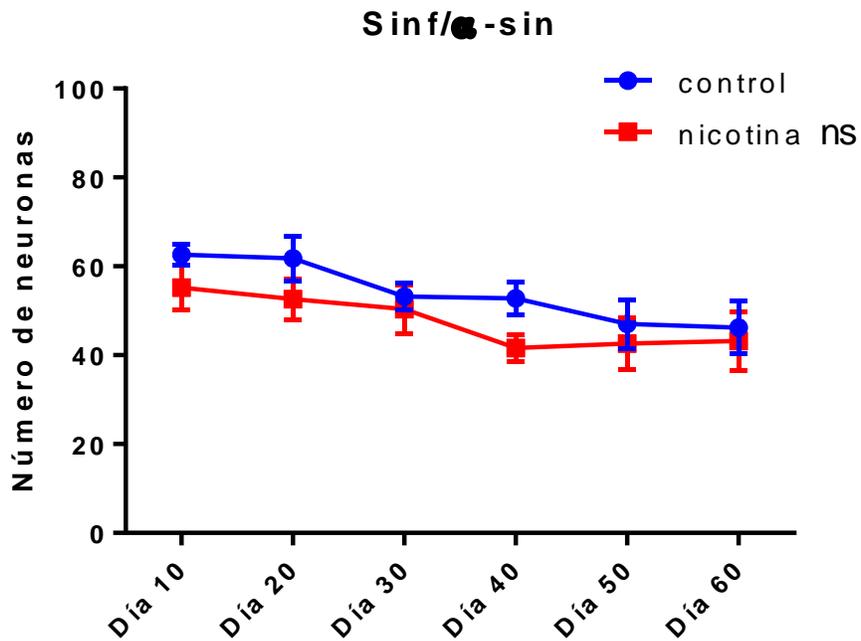


Fig. 27. Sobrevivencia de neuronas en la línea  $\text{sinf}/\alpha$ -sin. Se muestra es esta gráfica el número de neuronas sobrevivientes a diferentes días de edad. En azul se observa el tratamiento control y en rojo el tratamiento con nicotina. No observamos diferencias significativas entre ambos tratamientos. (Prueba de t ns).

Estos resultados demuestran que el retraso en los aspectos fenotípicos ocasionados por el tratamiento con nicotina no está ocasionado por un aumento en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, ya que en ambos tratamientos a través del tiempo no existe una disminución en el número de neuronas.

## IX. DISCUSIÓN.

La EP, es una enfermedad neurodegenerativa de etiología multifactorial, de la cual aún se desconocen las razones por las cuales se desarrolla. Muchas investigaciones han apuntado a diferentes razones tanto genéticas como ambientales. La mayoría de los casos de la EP se definen como esporádicos, y solo el 10% de los casos son genéticos. La importancia de  $\alpha$ -sin y sinf en el desarrollo de la EP en el Parkinson familiar, ha abierto gran especulación e interés en el estudio de este tipo de enfermedad. Como ya mencionamos estas proteínas parecen tener un papel en un gran número de funciones dentro de la célula, pero aún no se sabe su función principal, aunque toda la investigación apunta directamente a una función en la liberación de vesículas presinápticas. Ya se ha comprobado que las y mutaciones y la triplicación del gen que codifica a  $\alpha$ -sin, pueden desencadenar la formación de oligómeros, la posterior acumulación de proteínas y un incorrecto funcionamiento del metabolismo neuronal. Es por eso que en esta tesis nos hemos querido enfocar principalmente a la EP ocasionado por la presencia de esta proteína.

Contar con modelos de neurodegeneración rápidos y sencillos permite a los investigadores una mayor facilidad en el entendimiento de procesos complejos asociados a la patología de la EP. La mosca de la fruta confiere las ventajas de tener un ciclo de vida corto, una gran cantidad de descendencia, posibilidad de hacer experimentos genéticos en un corto periodo de tiempo y un sistema nervioso relativamente poco complejo, además de toda la homología que existe con genes humanos asociados a alguna enfermedad que es cerca del 70%. Todas estas ventajas de la mosca, aunado a la investigación cada vez más en aumento de las llamadas enfermedades neurodegenerativas, resultan de gran interés para el estudio de los desórdenes neuronales en este tipo de organismos modelo.

En particular, se ha discutido que  $\alpha$ -Sin en modelos de mosca parece promover la neurodegeneración, ocasionado precisamente por la formación de agregados tóxicos pero que cuando interacciona genéticamente con sinf, esta neurodegeneración se ve reducida, aunque no se ha comprobado del todo la interacción física de estas proteínas en modelos de mosca, pero si en otros modelos animales (*Hernández-Vargas, et. al. 2011*).

Se han desarrollado métodos invasivos como la estimulación cerebral profunda, aunque éstos solo ofrecen una mejoría temporal, además de que atacan solamente algunos de los problemas asociados a la enfermedad, por lo que es necesario encontrar la causa principal que da origen a la muerte de neuronas

dopaminérgicas, para así desarrollar métodos que permitan frenar o controlar el desarrollo de esta patología.

La nicotina ha resultado interesante precisamente por el papel que la involucra directamente con la estimulación neuronal y la subsecuente liberación de dopamina, además de su fácil administración; adicionalmente los reportes que indican que la aparición de la EP se ve reducida en personas que se declaran como fumadoras, hacen a esta molécula y sus derivados aún más interesantes como posibles fármacos anti-parkinsonianos. En esta tesis probamos el potencial farmacológico anti-parkinsoniano de la nicotina, además de explorar el mecanismo de acción de ésta y así tratar de identificar la manera en que podría estar protegiendo contra la neurodegeneración; todo esto con el fin de que en un futuro se puedan desarrollar fármacos que cumplan el mismo papel de la nicotina sin los efectos adversos y tóxicos de esta, tales como la adicción y sus efectos vasculares.

En el caso de la *supervivencia* de las moscas, los resultados muestran que la nicotina resulta benéfica para las moscas que expresan *sinf*, así como en las dobles transgénicas, mientras que en las moscas control y en las moscas que expresan  $\alpha$ -*sin* no tiene ningún efecto benéfico. Una posible causa de estos resultados apunta a la funcionalidad y metabolismo de las células. La nicotina estaría promoviendo una activación de los receptores nicotínicos y como consecuencia una despolarización de las neuronas, produciendo entrada de iones como calcio, y desencadenando la muerte acelerada de las neuronas. En la línea control, pudimos demostrar, de manera consistente a lo reportado en la literatura que, a largo plazo, el uso de la nicotina resulta perjudicial para las moscas no predisuestas a la EP. Esto se ve reflejado en la reducción significativa de la vida media. En el caso de la línea  $\alpha$ -*sin*, los resultados que se esperaban no fueron los obtenidos, se esperaba que siendo la proteína más involucrada con la aparición de Parkinson familiar, la nicotina mostrara un efecto más exacerbado en esta línea. Las razones por las cuales se piensa que la nicotina causa un efecto en esta línea pueden ser varias, aunque la principal es que al estar usando una proteína silvestre, es decir sin mutaciones, y una línea UAS de expresión moderada (*Carvajal-Oliveros, tesis de licenciatura, 2015*), el fenotipo parkinsoniano que estamos causando es muy poco penetrante, por lo que se plantea usar en un futuro las versiones mutantes de esta proteína asociadas a la enfermedad así como una línea de  $\alpha$ -*sin* cuya expresividad sea mayor.

En el caso del fenotipo asociado al *movimiento voluntario*, la diferencia en algunos puntos de la curva tanto en las moscas control como en las moscas de la línea SNCA, nos lleva a pensar en una posible inactivación de los nAChR asociados a las neuronas dopaminérgicas, en cuyo caso las neuronas presentes en ambas líneas se estarían comportando y funcionando de manera normal, y la nicotina estaría produciendo un efecto negativo de sobreexcitación promoviendo así una

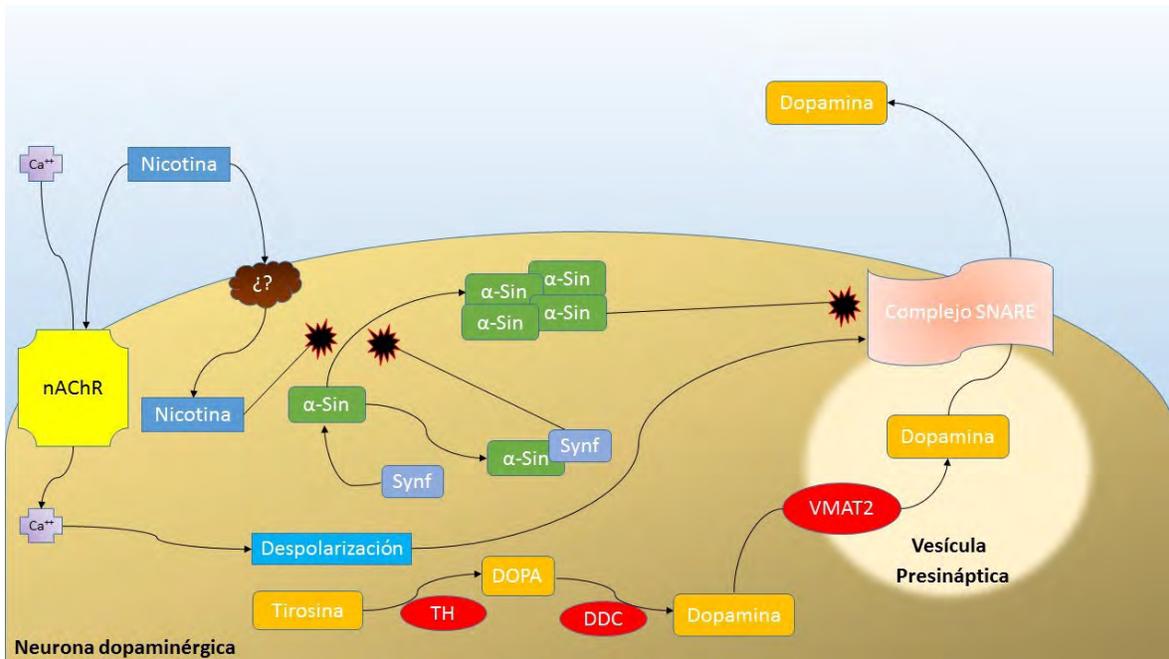
inactivación de estos receptores y por ende un cambio en la activación neuronal y subsecuente liberación de dopamina. En línea *synf/α-sin*, se ve una reducción en el movimiento causado por el tratamiento de nicotina, nos permite proponer que las interacciones de estas proteínas, permiten un funcionamiento normal del metabolismo neuronal, por lo que la nicotina más que un efecto protector, estaría promoviendo un efecto negativo, sobreexcitando a la célula y eventualmente causando un fenómeno de adaptación o inactivación por lo que las moscas quedan depletadas de dopamina secretada y por lo tanto afectando el movimiento. Por otro lado en la línea que expresa *synf*, se observa claramente que la nicotina es capaz de mejorar la capacidad motriz, lo que sugiere que la nicotina en este caso, si está promoviendo una protección a las células dopaminérgicas afectadas,

A pesar de demostrar que la nicotina tiene algunos efectos benéficos en el fenotipo parkinsoniano causado por la expresión de *synf*, fue llamativo no observar ninguna diferencia en el número de neuronas dopaminérgicas sobrevivientes a lo largo del envejecimiento entre ambos tratamientos. Estos resultados son indicativos de que la nicotina no está promoviendo la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, sino más bien sugiere que la nicotina está involucrada en estabilizar el metabolismo neuronal o la neurosecreción promoviendo un aumento de la liberación de la dopamina por las células afectadas, de esta manera se impide la formación de agregados tóxicos. Estos resultados llevan a plantear nuevas hipótesis de trabajo para esclarecer los efectos farmacológicos de la nicotina en los modelos de la EP y seguir buscando de qué manera la nicotina promueve una protección a nivel motriz y de supervivencia, ya que es interesante que caractericemos como es que esta protección está siendo mediada.

## **IX. 1 MODELO DE ACCIÓN DE LA NICOTINA.**

Se propone un modelo de acción de la nicotina relacionado directamente con la liberación de dopamina, una mayor estimulación de los nAChRs lo que lleva a una mejor función neuronal y una mayor liberación de dopamina, así como la inhibición de la formación de agregados de *α-sin* (*Fig. 28*).

Aún queda mucha investigación por hacer en el campo de la nicotina y la EP, se han visto ya muchos efectos de la nicotina relacionadas con diferentes factores clave del desarrollo de la enfermedad, pero los cuales aún no se esclarecen del todo, por lo que seguir en este campo de investigación resulta interesante e importante para entender mejor tanto a la EP, como en la búsqueda de una posible terapia adicional a las ya existentes en el tratamiento de la enfermedad.



**Fig. 28. Modelo de acción de la nicotina.** Por un lado tenemos la síntesis normal de dopamina, el cual a partir de tirosina y por medio de la tirosina hidroxilasa, pasa a DOPA la cual es reconocida por la enzima dopa descarboxilasa sintetizando la dopamina, para ser internalizada a las vesículas presinápticas por un transportador de monoaminas (VMAT2). En este modelo, la nicotina al ser una agonista de la acetilcolina, se une a los nAChRs promoviendo así la entrada de calcio que desencadena una despolarización de la neurona. Esta despolarización neuronal ocasiona que el complejo SNARE libere la dopamina. En el modelo de mosca al expresar  $\alpha$ -sin, se fomenta la formación de agregados de esta proteína que por reportes previos se sabe que está involucrada con el complejo SNARE, por lo que al no poseer una conformación funcional, los agregados impiden la liberación de dopamina. La nicotina además de actuar solamente en los nAChR, pudiese estar fomentando la actividad de los receptores e internalizándose en la célula, existen reportes que indican que la nicotina en presencia de  $\alpha$ -Sin y algunas de sus variantes, impide la formación de agregados, por lo que este sería un papel adicional, la nicotina permitiría que aun en presencia de  $\alpha$ -sin, la neurona funcione correctamente en la liberación de vesículas presinápticas. Por otro lado tenemos a synf, proteína que al interactuar con algunas de las mutantes de  $\alpha$ -sin, también impide la formación de agregados y que también estaría permitiendo un correcto funcionamiento de la neurona.

## X. CONCLUSIONES.

- La nicotina promueve una reducción en la supervivencia de las moscas de la líneas control y  $\alpha$ -sin, esto relacionado a que no existe ninguna afectación en el funcionamiento normal de las células dopaminérgicas y que la sola expresión de  $\alpha$ -sin silvestre no es suficiente para desarrollar un efecto fenotípico. Esto indica que la nicotina está ejerciendo un efecto negativo sobre la activación de este tipo celular.
- La nicotina promueve un aumento en la supervivencia de las moscas de las líneas *sinf* y *sinf*/ $\alpha$ -sin, en primer lugar esto se relaciona con los niveles de expresión más altos de *sinf* en comparación con los de  $\alpha$ -sin (*Carvajal-Oliveros, tesis de licenciatura, 2015*), esto promueve que la toxicidad de *sinf* sea mayor, por lo que la nicotina ejerce un efecto rescatando la funcionalidad de las células sobrevivientes afectadas por *sinf*.
- La interacción genética *sinf*/ $\alpha$ -sin silvestre promueve un aumento en la vida media en comparación con la línea *Synf*. Cabe destacar que este aumento no es tan remarcado como en el caso de la interacción de *sinf* con las mutantes de  $\alpha$ -sin (*Hernández-Vargas, et. al. 2011*).
- La nicotina reduce la movilidad voluntaria de las moscas de las líneas control  $\alpha$ -sin y *sinf*/ $\alpha$ -sin. Los datos preliminares de escalamiento reportan que la nicotina si ejerce un efecto positivo en la línea  $\alpha$ -sin y *sinf*/ $\alpha$ -sin, pero es importante mencionar que se trata de dos movimientos diferentes controlados por diferentes clusters dopaminérgicos.
- La nicotina promueve aumento en movilidad voluntaria de la línea *sinf*, relacionado con el mejoramiento funcional que otorga la nicotina en las neuronas dopaminérgicas afectadas por la proteína.
- La nicotina no posee efecto sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en ninguna de las líneas, esto es consistente con lo reportado en la literatura en otros modelos animales, concluyendo que la nicotina ejerce su efecto protector muy probablemente a nivel de funcionalidad neuronal.

## XI. PERSPECTIVAS.

- Medir los niveles de expresión de tirosina hidroxilasa para ver el efecto de la nicotina a nivel de transcripción de la enzima limitante en la síntesis de dopamina.
- Medir los niveles de expresión de  $\alpha$ -sin y sinf para observar la dinámica en presencia de nicotina.
- Realizar experimentos similares utilizando las mutantes de  $\alpha$ -Sin.
- Determinar el efecto de la nicotina sobre la liberación de dopamina.
- Determinar niveles de expresión de nAChRs por medio de qPCR y Western Blot.
- Realizar experimentos en los cuales se cambien los tiempos de exposición a la nicotina para corroborar si el efecto es inmediato o a largo plazo.

## XII. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). Molecular biology of the cell. 4th edn New York: Garland Science.
- 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.
- Bordia T, Grady SR, McIntosh JM, Quik M. (2007). Nigrostriatal damage preferentially decreases a subpopulation of  $\alpha_6\beta_2^*$  nAChRs in mouse, monkey and Parkinson's disease striatum. Mol Pharmacol. 2007;72:52–61.
- Bordia T, Parameswaran N, Fan H, Langston JW, McIntosh JM, Quik M. (2006) Partial recovery of striatal nicotinic receptors in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned monkeys with chronic oral nicotine. J Pharmacol Exp Ther. 2006;319:285–292.
- Carvajal-Oliveros. (2015). Estandarización de un método basado en PCR cuantitativo para determinar la pérdida de neuronas dopaminérgicas en *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el grado de Biólogo. UNAM.
- Chambers, R., Call, G., Meyer, D., Smitha, J., Techaua, J., Pearmanb K., Buhlmana, L. (2013) Nicotine increases lifespan and rescues olfactory and motor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. Behavioural Brain Research 253 (2013) 95–102.
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. Nat Med. 1998 Nov;4(11):1318-20.
- Dexter DT, Jenner P. (2013) Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. Free Radic Biol Med. 2013 Sep; 62:132-44.
- Gazewood, J. D., Richards, D. R., & Clebak, K. (2013). Parkinson disease: an update. American family physician, 87(4), 267–73.
- Hernán, M., Takkouche, B., Caamaño-Isorma, F., Gestal-Otero, J. (2002) A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. Ann Neurol 52:276-284.
- Hernández-Vargas, R., Fonseca-Ornelas, L., López-González, I., Riesgo-Escovar, J., Zurita, M., & Reynaud, E. (2011). Synphilin suppresses  $\alpha$ -Synuclein neurotoxicity in a Parkinson's disease *Drosophila* model. Genesis (New York, N.Y.: 2000), 49(5), 392–402.
- Hong DP, Fink AL, Uversky VN (2009). Smoking and Parkinson's disease: does nicotine affect alpha-synuclein fibrillation? Biochim Biophys Acta. 2009 Feb;1794(2):282-90.
- Kalia LV, Kalia SK, McLean PJ, Lozano AM, Lang AE. (2013).  $\alpha$ -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. Ann Neurol. 2013 Feb;73(2):155-69.

- Keyser RJ, Oppon E, Carr JA, Bardien S (2011). Identification of Parkinson's disease candidate genes using CAESAR and screening of MAPT and SNCAIP in South African Parkinson's disease patients. *J Neural Transm* (Vienna). 2011 Jun;118(6):889-97.
- Langston, J.W. (2006) The Parkinson's complex: Parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann. Neurol* 59: 591-596
- de Lau LM, Breteler MM. (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006; 5(6): 525-535.
- Limamanen, P., Bovito, A., Debasmita, A., Muralidhara, P., & Sarat Chandra, Y. (2014) Curcumin's Neuroprotective Efficacy in *Drosophila* Model of Idiopathic Parkinson's disease Is Phase Specific: Implication of its Therapeutic Effectiveness. *Rejuvenation Research*. 17(6): 481-489.
- Liu S, Sawada T, Lee S, Yu W, Silverio G, Alapatt P, Millan I, Shen A, Saxton W, Kanao T, Takahashi R, Hattori N, Imai Y, Lu B.(2012) Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet*. 2012;8(3).
- McFarland MA, Ellis CE, Markey SP, Nussbaum RL. (2008) Proteomics analysis identifies phosphorylation-dependent alpha-synuclein protein interactions. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Nov;7(11):2123-37.
- McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Aug;2(8):589-94.
- Pérez-Arizmendi (2015). Efecto de la nicotina sobre el fenotipo parkinsoniano de alfa-Sinucleína y Sinfilina en *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Biotecnología. UPEMOR.
- Pfeiffenberger C, Lear BC, Keegan KP, Allada R. (2010). Processing circadian data collected from the *Drosophila* Activity Monitoring (DAM) System. *Cold Spring Harb Protoc*. 1;2010(11)
- Pollanen M, Dickson D, Bergeron C. (1993). Pathology and biology of the lewy body. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 52 (3) 183-191.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997 Jun 27;276(5321):2045-7.
- Quik, M., O'Neill, M., & Perez, X. A. (2007). Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: Importance of the animal model. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28, 229–235.
- Quik, M., & Wonnacott, S. (2011). alpha6beta2 and alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors as drug targets for Parkinson's disease. *Pharmacological Reviews*, 63(4), 938–966.

- Quik, M., Perez, X. A., & Bordia, T. (2012). Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 27(8), 947–957.
- Quik, M., Mallela, A., Ly, J., Zhang, D. (2013). Nicotine reduces established levodopa-induced dyskinesias in a monkey model of Parkinson's disease. *Movement Disorders*. Volume 28, Issue 10, pages 1398–1406, September 2013.
- Rangel-Barajas & Floran-Garduño (2005). Activación de receptores dopaminérgicos por L-DOPA. De la acción terapéutica a las discinesias. *Rev Biomed* 2005; 16:273-280
- Samii, A., Nutt, J. G., & Ransom, B. R. (2004). Parkinson's disease. *Lancet*, 363(9423), 1783–93.
- Schrag, A., Quinn, N. P., Irving, R. J., Oram, S. H., Boyd, J., Rutledge, P., Bloomfield, P. (2000). Cross sectional prevalence survey of idiopathic Parkinson's disease and parkinsonism in London Ten year audit of secondary prevention in coronary bypass patients, 321, 21–22.
- Secretaria de Salud & Mora, J.F. (2006) Programa específico de enfermedad de Parkinson 2001-2006. SSA
- Siddique, Y., Naz, F. & Jyoti, S. (2014) Effect of Curcumin on Lifespan, Activity Pattern, Oxidative Stress, and Apoptosis in the Brains of Transgenic Drosophila Model of Parkinson's Disease. *BioMed Research International*, vol. 2014,
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):6469-73.
- Spinelli K., Osterberg V., Meshul C., Soumyanath A., Unni V. (2015) Curcumin Treatment Improves Motor Behavior in  $\alpha$ -Synuclein Transgenic Mice. *PLoS ONE* 10(6)
- Srinivasan, R., Henley, B., Henderson, B., Indersmitten, T., Cohen, B., Kim, C., McKinney, S., Deshpande, P., Xiao, C. & Lester, H. (2016) Smoking-relevant nicotine concentration attenuates the unfolded protein response in dopaminergic neurons. *The journal of Neuroscience*, 36(1): 65-79.
- Uversky VN, Eliezer D (2009) Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of alpha-synuclein. *Curr Protein Pept Sci*. 2009 Oct;10(5):483-99.
- Wan OW, Chung KKK (2012) The Role of Alpha-Synuclein Oligomerization and Aggregation in Cellular and Animal Models of Parkinson's Disease. *PLOS ONE* 7(6).
- Winner, B., Kohl, Z. & Gage, F.H. (2011). Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *The European journal of neuroscience*, 33(6), pp.1139–51.

- Yang J-S, Nam H-J, Seo M, Han SK, Choi Y, et al. 2011 OASIS: Online Application for the Survival Analysis of Lifespan Assays Performed in Aging Research. PLoS ONE 6(8): e23525.

### XIII. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.

- <http://flystocks.bio.indiana.edu> (Consultado el día 14 de enero de 2017).
- <http://thebiogrid.org> (Consultado el día 14 de enero de 2017).

## XIV. ANEXOS.

### Anexo 1. Genotipificación.

#### OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA LA GENOTIPIFICACIÓN.

GEN	OLIGO FORWARD	OLIGO REVERSE
SNCA	5' TCT CTA TGT AGG CTC CAA AAC 3'	5' TTC GTA GTC TTG ATA CCC TTC 3'
SNCAIP	5' CAT CAG GGG GAC GCA GGT TT 3'	5' TGT GGA GGT CCG CTG GAG AG 3'
<i>gal4</i>	5' CGT CAC AGA TAG ATT GGC TTC AGT GG 3'	5' GCG TCG GTG AGT GCA CGA TAG GGC 3'
<i>rp49</i>	5' TCA AGA TGA CCA TCC GCC CA 3'	5' GTT CTC TTG AGA ACG CAG GC 3'