

Relación entre genes reloj y fisiopatología del Parkinson en pez cebra



GRUPO DE INVESTIGACIÓN CTS-101: COMUNICACIÓN INTERCELULAR
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE TECNOLÓGICO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
Programa de Doctorado en Biomedicina
Bajo la supervisión del Dr. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO

PAULA ARANDA MARTÍNEZ
2023

Relación entre genes reloj y fisiopatología del Parkinson en pez cebra

Memoria que presenta la graduada en Biología

D^a Paula Aranda Martínez

como aspirante al grado de Doctor

Fdo: Paula Aranda Martínez

Vº Bº del Director de la Tesis Doctoral

Fdo: Dr. Darío Acuña Castroviejo

Doctor en Medicina

Catedrático de Fisiología de la UGR

Universidad de Granada

2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Paula Aranda Martínez
ISBN: 978-84-1117-976-8
URI: <https://hdl.handle.net/10481/84394>

CERTIFICACIONES

D. Darío Acuña Castroviejo, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. Paula Aranda Martínez, Graduada en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología e Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado “Relación entre genes reloj y fisiopatología del Parkinson en pez cebra” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 19 de Mayo de 2023

Vº Bº Director

La interesada

Darío Acuña Castroviejo

Paula Aranda Martínez

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de investigación CTS-101: Comunicación Intercelular, Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada.

Durante la realización del siguiente trabajo, la graduada Paula Aranda Martínez ha estado financiada por los siguientes contratos:

- **Tipo de contrato:** Contratada predoctoral adscrita al Proyecto de Investigación de la Junta de Andalucía y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (B-CTS-205-UGR18). A tiempo completo desde 1/07/2020 al 24/01/2021.
 - **Organismo:** Universidad de Granada.
 - **Centro:** Centro de Investigación Biomédica y Facultad de Medicina.
 - **Departamento:** Fisiología
-
- **Tipo de contrato:** Contratada predoctoral adscrita al Proyecto de Investigación de la Junta de Andalucía y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (P18-RT-698). A tiempo completo desde 25/01/2021 al 24/01/2023.
 - **Organismo:** Universidad de Granada.
 - **Centro:** Centro de Investigación Biomédica y Facultad de Medicina.
 - **Departamento:** Fisiología

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Rodríguez-Santana C, Rusanova I, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Chronodisruption and Loss of Melatonin Rhythm, Associated with Alterations in Daily Motor Activity and Mitochondrial Dynamics in Parkinsonian Zebrafish, Are Corrected by Melatonin Treatment. *Antioxidants*. 2023, doi: 10.3390/antiox12040954.

Aranda-Martínez P; Fernández-Martínez J; Ramírez-Casas Y; Guerra-Librero A; Rodríguez-Santana C; Escames G; Acuña-Castroviejo C. The Zebrafish, an Outstanding Model for Biomedical Research in the Field of Melatonin and Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, doi: 10.1111/jpi.12824.

Otras publicaciones:

Florido J, Martínez-Ruiz L, Rodríguez-Santana C, López-Rodríguez A, Hidalgo-Gutierrez A, Cottet-Rousselle C, Lamarche F, Schlattner U, Guerra-Librero A, Aranda-Martínez P, López LC, Escames G. Melatonin drives apoptosis in head and neck cancer by increasing mitochondrial ROS generated via reverse electron transport. *Journal of Pineal Research*. 2022, doi: 10.1111/jpi.12824.

Sayed R; Fernández-Ortiz M; Rahim I; Fernández-Martínez J; Aranda-Martínez P; Rusanova I; Martínez-Ruiz L; Alsaadawy R; Escame Gs; Acuña-Castroviejo D. The Impact of Melatonin Supplementation and NLRP3 Inflammasome Deletion on Age-Accompanied Cardiac Damage. *Antioxidants*. 2021, doi: 10.3390/antiox10081269.

Sayed R; Fernández-Ortiz M; Fernández-Martínez J; Aranda-Martínez P; Guerra-Librero A; Rodríguez-Santana C; de Haro T; Escames G; Acuña-Castroviejo D; Rusanova I. The Impact of Melatonin and NLRP3 Inflammasome on the Expression of microRNAs in Aged Muscle. *Antioxidants*. 2021, doi: 10.3390/antiox10040524.

Fueyo-González F; González Vera JA; Alkorta I; Infantes L; Jimeno ML; Aranda-Martínez P; Acuña-Castroviejo D; Ruiz-Arias A; Orte A; Herranz R. Environment-Sensitive Probes for Illuminating Amyloid Aggregation In Vitro and in Zebrafish. ACS Sensors. 2020, doi: 10.1021/acssensors.0c00587.

Rahim I; Sayed R; Fernández-Ortiz M; Aranda-Martínez P; Guerra-Librero A; Fernández-Martínez J; Rusanova I; Escames G; Djurdjura B; Acuña-Castroviejo D. Melatonin alleviates sepsis-induced heart injury through activating the Nrf2 pathway and inhibiting the NLRP3 inflammasome. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology. 2020, doi: 10.1007/s00210-020-01972-5.

Sayed R; Mokhtar D; Fernández-Ortiz M; Fernández-Martínez J; Aranda-Martínez P; Escames G; Acuña Castroviejo D. Lack of retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha accelerates and melatonin supplementation prevents testicular aging. Aging. 2020, doi: 10.18632/aging.103654.

Fernández-Ortiz M; Sayed R; Fernández-Martínez J; Cionfrini A; Aranda-Martínez P; Escames G; de Haro T; Acuña-Castroviejo D. Melatonin/Nrf2/NLRP3 Connection in Mouse Heart Mitochondria during Aging. Antioxidants. 2020, doi: 10.3390/antiox9121187.

Rusanova I; Fernández-Martínez J; Fernández-Ortiz M; Aranda-Martínez P; Escames G; García-García FJ; Mañas L; Acuña-Castroviejo D. Involvement of plasma miRNAs, muscle miRNAs and mitochondrial miRNAs in the pathophysiology of frailty. Exp Gerontol. 124, 2019. DOI: doi: 10.1016/j.exger.2019.110637.

Sayed R; Fernández-Ortiz M; Díaz-Casado ME; Aranda-Martínez P; Fernández-Martínez J; Guerra-Librero A; Escames G; López LC; Alsaadawy RM; Acuña Castroviejo D. Lack of NLRP3 inflammasome activation reduces age-dependent sarcopenia and mitochondrial dysfunction, favoring the prophylactic effect of melatonin. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2019, doi: 10.1093/14erona/glz079.

Rusanova I; Díaz-Casado ME; Fernández-Ortiz M; Aranda-Martínez P; Guerra-Librero A; García-García J; Escames; Mañas L; Acuña-Castroviejo D. Analysis of plasma microRNAs as Predictors and Biomarkers of Aging and Frailty in Humans. Oxid Med Cell Longev. 2018, doi: 10.1155/2018/7671850.

Díaz-Casado ME; Rusanova I; Aranda-Martínez P; Fernández-Ortiz M; Sayed R; Fernández-Gil BI; Hidalgo-Gutiérrez A; Escames G; López LC; Acuña Castroviejo D. In Vivo Determination of Mitochondrial Respiration in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Treated Zebrafish Reveals the Efficacy of Melatonin in Restoring Mitochondrial Normalcy. Zebrafish. 2018, doi: 10.1089/zeb.2017.1479.

López A; Ortiz F; Doerrier C; Venegas C; Fernández-Ortiz M; Aranda-Martínez P; Díaz-Casado ME; Fernández-Gil BI; Barriocanal-Casado E; Escames G; López LC; Acuña Castroviejo D. Mitochondrial impairment and melatonin protection in parkinsonian mice do not depend of inducible or neuronal nitric oxide synthases. PloS One. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0183090.

Díaz-Casado ME; Lima E; García JA; Doerrier C; Aranda-Martínez P; Sayed R; Guerra-Librero A; Escames G; López LC; Acuña-Castroviejo D. Melatonin rescues zebrafish embryos from the parkinsonian phenotype restoring the parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network. Journal Pineal Research. 2016, doi: 10.1111/jpi.12332.

Participación en proyectos:

Nombre del proyecto: Análisis de la conexión entre genes reloj, melatonina y mitocondria en el modelo de Parkinson en el pez cebra. **Referencia:** P18-RT-698. **Investigador principal:** Darío Acuña Castroviejo. **Agencia:** Consejería de Universidad, Investigación e Innovación. Junta de Andalucía. **Fecha:** 25/01/2021-24/01/2023. **Fondos:** 119.652 €.

Nombre del proyecto: Estudio de la conexión entre genes reloj y párkinson en el pez cebra. **Referencia:** B-CTS-205-UGR18. **Investigador principal:** Darío Acuña Castroviejo. **Agencia:** Consejería de Universidad, Investigación e Innovación. Junta de Andalucía. **Fecha:** 01/07/2020-24/01/2021. **Fondos:** 33.400 €.

Aportaciones a congresos relacionados con la presente Tesis Doctoral:

Comunicaciones orales

XV Jornadas de Formación CIBERES 2022. Characterization of the skeletal muscle-specific and inducible Bmal1 knockout mouse (iMS-Bmal1^{-/-}) as a model for the study of sarcopenia and evaluation of a treatment with exercise and/or melatonin. Madrid (España). Fernández-Martínez J; Ramírez-Casas Y; **Aranda-Martínez P**; Escames G; Acuña-Castroviejo D.

II Congreso de Investigadores del PTS. El pez cebra como modelo para estudiar las claves del envejecimiento del músculo esquelético. Granada (España). **Aranda-Martínez P**; Del cuerpo-Salinas N; Escames G; Acuña-Castroviejo D.

XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). Aging and sarcopenia. Roles of the innate immunity and melatonin therapy. Zaragoza (España). Fernández-Ortiz M; Sayed R; Rodríguez JA; **Aranda-Martínez P**; Acuña-Castroviejo D.

Póster

MitoNice 2022. Evaluation of mitochondrial dysfunction and the therapeutic capacity of exercise and melatonin in the iMS-Bmal1^{-/-} murine model of sarcopenia. Niza (Francia). Ramírez-Casas Y; Fernández-Martínez J; **Aranda-Martínez P**; Escames G; Acuña Castroviejo D.

MitoNice 2022. Melatonin restores normal mitochondrial function and chronodisruption in a zebrafish model of Parkinson's disease. Niza (Francia). **Aranda-Martínez P**; Fernández-Martínez J; Ramírez-Casas Y; Escames G; Acuña Castroviejo D.

7th International Myology Congress. Characterization of the skeletal muscle-specific and inducible Bmal1 knockout mouse (iMS-Bmal1^{-/-}) as a model for the study of sarcopenia and evaluation of a treatment with exercise and/or melatonin. Niza (Francia). Fernández-Martínez J; Ramírez-Casas Y; **Aranda-Martínez P**; Escames G; Acuña Castroviejo D.

7th International Myology Congress. Zebrafish as a model to study skeletal muscle aging. Niza (Francia). **Aranda-Martínez P**; Fernández-Martínez J; Ramírez-Casas Y; Escames G; Acuña Castroviejo D.

FENS forum 2022. Relationship between clock genes and Parkinson's pathophysiology in zebrafish. París (Francia). **Aranda-Martínez P**; Fernández-Martínez J; Ramírez-Casas Y; Escames G; Acuña Castroviejo D.

IV Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en Biomedicina. Development of a melatonin-deficient zebrafish model using CRISPR/Cas9. Granada (España). **Aranda-Martínez P**; Fernández-Martínez J; Ramírez-Casas Y; Acuña Castroviejo D.

I Congreso de Investigadores del PTS. La determinación de la respiración mitocondrial in vivo en el modelo de Parkinson en el pez cebra revela la eficacia de la melatonina en el restablecimiento de la normalidad mitocondria. Granada (España). **Aranda-Martínez P**; Díaz-Casado ME; Rusanova I; Fernández-Ortiz M; Fernández-Martínez J; Acuña-Castroviejo D.

XI Reunión del Grupo Español de Investigación en Radicales Libres (GEIRLI). La conexión parkin/PINK1/DJ-1/MUL1, diana molecular de la melatonina que explica sus propiedades antiparkinsonianas. Granada (España). Díaz-Casado ME; Acuña-Castroviejo D; **Aranda-Martínez P**; Fernandez-Ortiz M; Sayed R.

AGRADECIMIENTOS

Cuando empiezas la tesis todo el mundo te dice que no sabes dónde te estás metiendo, que es muy sacrificado, que no está bien reconocido...y no es para menos, pero yo he tenido la suerte de estar en un magnífico grupo con grandes profesionales pero mejores personas, que me lo han puesto bastante fácil. Ha sido como una segunda familia, todos a una, apoyándonos siempre y también disfrutando mucho. Por eso quiero dar las GRACIAS a todos los que habéis formado parte de este camino tan duro, pero a la vez tan maravilloso que te hace crecer como científica, pero también como persona.

Primero quiero dar las gracias a mi director de tesis, Darío, por darme la oportunidad de entrar en su grupo y haber confiado en mí todos estos años. Gracias por transmitirme esa pasión por la ciencia, que me ha hecho amarla aún más, por enseñarme lo que es un grupo, un equipo y por contar conmigo para todo porque eso me ha hecho crecer muchísimo como profesional. Pero quiero darte las gracias también a nivel personal por compartir tus consejos y experiencia que tanto nos ayuda para nuestro futuro.

Gracias a Germaine por tomar las riendas del grupo y continuar haciendo de nosotros unos grandes científicos. Por enseñarnos a creer en nosotros mismos y que podemos conseguir todo lo que nos propongamos. Gracias por venir siempre con una sonrisa y con tu alegría, por los brindis con champán y los bailes.

A Luis Carlos darle las gracias por estar siempre dispuesto a ayudar y resolver dudas, pero sobre todo por enseñarnos que siempre hay que aspirar a más. Con él también he aprendido que nunca hay que estar estático, que puedo ser muy buena al pádel y que me gustan las competiciones más de lo que creía.

Gracias también a una de las personas más importantes de esta etapa, Jose, mi compañero dentro y fuera del laboratorio. No tengo palabras para agradecerte toda la ayuda que me has dado siempre, por venir conmigo de madrugada a los genes reloj, por acompañarme a los peces los fines de semana...sin tu apoyo incondicional no hubiese terminado igual. Gracias por tu calma, tu paciencia, tu tranquilidad, pero también por acompañarme a todas las aventuras y seguirme el ritmo, que sé que no es fácil. Gracias por el respeto, confianza, cariño, comprensión... no terminaría nunca de agradecerte todo lo que me das, te quiero.

Mucho de lo que sé ahora se lo debo a la que me enseñó todo sobre los peces, Elena. Es una gran científica, siempre disponible para ayudar en todo y a todos, pero sobre todo una gran persona con un corazón enorme. Gracias a Iryna, quien me enseñó cómo se trabaja y se mantiene un laboratorio. Y cómo hay que disfrutar las fiestas de después, gracias por mostrarme también esa parte divertida y cachonda de ti.

Gracias a Javi, mi otra mitad, mi gran apoyo, siempre juntos a todo porque no nos perdemos una. Iniciamos este camino juntos y sé que ya es para toda la vida. Gracias por ser tan bueno, tan generoso, tan divertido y por todos tus consejos científicos y no científicos. Otro pilar fundamental en esta etapa y en mi vida ha sido Agustín, que también tengo que agradecerle todos sus sabios consejos y su practicidad. Pero también gracias por todos los buenos momentos, por enseñarme el “todo que sí”, por tu apoyo y por estar conmigo siempre, aunque sea a 8 horas de avión y un océano por delante. No me puedo olvidar de mi Eli, gracias por aguantar el coñazo que te daba con las diluciones, tus buenos días por las mañanas, tu risa por cualquier tontería, como lo echo

de menos. Gracias también por saber darnos calma y tranquilidad cuando la necesitábamos.

A Ana, por saberlo todo, porque cuando le preguntas algo siempre tiene la respuesta. Gracias por tu memoria, tu nervio, tus cantes y sobre todo tu olfato, que nos salva tantas veces. Por las fiestas, las risas y todos los grandes momentos que hemos vivido. A Laura, por su bondad, su generosidad, y por contagiarnos siempre de su ilusión y entusiasmo. Gracias por estar siempre dispuesta a todo, por los miles de planes vividos y por habernos hecho parte de tu familia. A Julia Losada, porque juntas hemos luchado contra los problemas que nos han puesto los pececillos por delante, porque hemos demostrado que la distancia y el tiempo no es nada cuando hay ganas de verse, por estar siempre. Gracias a mi niña canaria, Antonia, mi compi de batallas y de fiestas, por su alegría y su personalidad arrolladora. A Marisol, César y Pilar gracias por ser tan buenos compañeros, por los buenos ratos dentro y fuera del laboratorio, por haber compartido esta etapa conmigo.

Y como todo en la vida, siempre llegan nuevas generaciones a las que enseñar y de las que aprender. Gracias a Yolanda por saber escuchar, por querer intentar ayudar siempre, por ser tan cariñosa, entusiasta e inocente, pero a la vez la diablillo que sale a veces. A María, por aportarnos racionalidad y madurez, pero sin perder ese espíritu joven tan divertido. Al más apañado del laboratorio, Sergio, porque siempre me ayuda en todo lo que necesito, sabe de todo, es listo, divertido, sensible... desde que lo conocí sabía que debajo de esa timidez había una muy buena persona. Gracias a Alba por todas las risas, los bailes y tiktoks con los que nos hemos divertido tanto, por ser tan transparente, alegre y detallista. A Julia darle las gracias por ser una genial compi de

peces, con la que comparto los insufribles problemas que nos dan. Por tus ganas de viajar y conocer, por tan buenos momentos vividos y por enseñarnos a disfrutar de la vida como nadie. A Juanma, por nuestras charlas que me han enseñado a tomarme la vida con más calma y no preocuparme tanto por todo. Laura Jiménez y Sara gracias por vuestra experiencia, siempre dispuestas a compartirla, y gracias también por vuestra cercanía y las palabras bonitas que siempre tenéis hacia mí. Gracias al resto del CoQ team, que aportan muy buenas vibras y alegría.

No puede faltar darles las gracias a tanta gente de estancia que ha pasado por aquí, gracias a ellos aprendemos a respetar y comprender otras culturas. En especial a mi Armi, con esa sensibilidad tan especial y a mis Kazagistanas, Bota, Arailym y Aya que sin entendernos muy bien creamos un bonito vínculo.

Y por supuesto un gracias enorme a nuestros niños, que nos dan tanta vida. Juan y Víctor, gracias por ser el soplo de aire fresco, el rayito de luz que necesitaba. Inma, por ser tan bellísima persona, has sido un gran descubrimiento. África y André, el ying y el yang, gracias por hacernos reír tanto y por tener ese corazón tan puro y bueno. Mónica y Juan, gracias por ayudarnos tanto y tener tantas ganas de aprender, habéis sido nuestro salvavidas.

Gracias a los “Chufísticos” porque juntos hemos sido como un único grupo. A Chufy, gracias por haber sido un gran apoyo, porque sé que siempre voy a poder contar contigo, por cómo nos entendemos y tantas cosas que hemos compartido. Grazie Teresa porque sólo con mirarme sabes lo que siento, por estar siempre en los buenos y en los malos momentos. Gracias Antoñito, María Jesús, Laura y Patri por vuestra ayuda siempre que la he necesitado y tantos buenos ratos que hemos pasado.

Gracias Fátima, por saber escuchar, porque sé que te puedo contar todo lo que se me pase por la cabeza, por no juzgarme, por entenderme. También por compartir nuestras locuras, porque nos gusta disfrutar y pasárnoslo muy muy bien. A Josua que me ha ayudado tanto, gracias por enseñarme a cuidarme, a tener equilibrio y a sacar esa fuerza voluntad que llevaba dentro. Gracias Araceli por tu ternura y tu tranquilidad, por transmitir paz. A mi Pepa, lo mejor que me ha dado la estancia. Porque desde el primer momento conectamos y nos entendimos a la perfección. Gracias por tus risas, tus abrazos, por las ganas de vernos siempre, porque ojalá te tuviera siempre cerca. A Alana, que siempre ha sido como una hermana, y aunque entre nosotras haya unos 1000 km siempre permanecemos juntas, apoyándonos. Gracias al resto de Biólogos, Dani, Olga, Raquel, Lourdes, Sergio... por sacar siempre momentos para vernos y ponernos al día después de todos estos años.

Por último, gracias al motor de mi vida, mi familia. Gracias, papá y mamá por haberme dejado elegir libremente mi camino, siempre contando con vuestro apoyo y sintiendo lo orgullosos que estáis de mí. Todo esto lo he conseguido gracias a vosotros, por la educación que me habéis dado, porque nunca me ha faltado de nada y por el amor tan grande que me dais, sois mi mayor ejemplo a seguir. Os quiero mucho. Gracias también a mis abuelos, tíos y primos porque siempre me he sentido muy querida por todos y se han alegrado de mis logros como si fuera de ellos, porque tengo la mejor familia del mundo.

ABREVIATURAS

EP: Enfermedad de Parkinson

ROS: Especies reactivas de oxígeno

O₂⁻: Anión superóxido

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HO·: Radical hidroxilo

ETC: Cadena de transporte de electrones

SOD: Superóxido dismutasa

GPx: Glutación peroxidasa

GRd: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

MAO: Monoamino oxidasa

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

NO·: Óxido nítrico

ONOO·: Peroxinitritos

PTM: Poro de transición mitocondrial

ADNmt: ADN mitocondrial

MFN1: Mitofusina 1

MFN2: Mitofusina 2

TNF-α: Factor de necrosis tumoral-α

IL-1β: Interleuquina-1β

IFN-γ: Interferón-γ

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

TLR: Receptores tipo Toll

L-DOPA: Levodopa

IMAO: Inhibidores de la monoaminoxidasa tipo B

TPH: L-triptófano hidroxilasa

NAS: N-acetilserotonina

AANAT: Atrialquilamina N-acetiltransferasa

ASMT: N-acetilserotonina O-metiltransferasa

CYP: Citocromo P450

AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinurenamina

AMK: N-acetil-5-metoxikinurenamina

PKA: Proteína quinasa A

MTRN1: Receptor de melatonina

ROR: Receptores relacionados con retinoides huérfanos

RORE: Elementos de respuesta ROR del ADN

G6PD: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

CaMKII: Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II

GST: Glutación transferasa

LPO: Peroxidación lipídica

Dpf: Días post fertilización

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

MPDP+: 1-metil-4-fenil-2, 3-dihidropiridio

IL-6: Interleuquina 6

DAT: Transportador de la dopamina

TH: Tirosina hidroxilasa

aMT: Melatonina

DMSO: Dimetilsulfóxido

ESI: Ionización por electrospray positivo

SIM: Monitoreo de iones selectivo

MESOR: Línea media del ritmo

BSA: Albúmina de suero bovino

SEM: Error estándar de la media

“Sin dudas, no hay progreso”

Charles Darwin

A mi familia

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo que afecta al área del sistema nervioso central encargada de controlar el sistema motor y es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después del Alzheimer. Está asociada a una parte del cerebro denominada sustancia negra y la pérdida de un pigmento llamado neuromelanina presente en las neuronas de esta zona del cerebro, las neuronas dopaminérgicas. Estas neuronas producen un neurotransmisor, la dopamina, cuya falta como consecuencia de la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas, produce la EP. Sin embargo, actualmente no existe un tratamiento preventivo ni curativo para la enfermedad de Parkinson, sino un tratamiento farmacológico sintomático y crónico.

Existen dos formas de la enfermedad, el 5-10% de los enfermos presentan Parkinson familiar y el 90-95%, Parkinson idiopático. En ambos casos, la muerte neuronal se debe a la disfunción mitocondrial provocada por la inhibición del complejo I que genera estrés oxidativo y fallo bioenergético, por lo que se abre el poro de transición mitocondrial, sale el citocromo c al citosol y se activa la apoptosis. Debido a la muerte neuronal se produce una activación de la microglía y un estado inflamatorio. En cuanto a la forma familiar, está asociada, entre otras, a mutaciones en los genes PARK que codifican para las proteínas PINK1, PARKIN, DJ-1 y α -sinucleína. PINK1 y PARKIN están implicadas en la mitofagia de mitocondrias dañadas, y DJ-1 puede interaccionar con ellas y, además regula la transcripción de enzimas antioxidantes. Por otro lado, α -sinucleína forma unos agregados insolubles llamados cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas y que afectan a la integridad de membrana mitocondrial. Por tanto, mutaciones en estos genes producen una alteración de la homeostasis mitocondrial.

La melatonina es una indolamina derivada del triptófano, altamente conservada a lo largo de la evolución. Hasta hace unos años se pensaba que la melatonina solo se producía en la glándula pineal y que se liberaba a la circulación sanguínea para llegar a todos los tejidos. Sin embargo, actualmente se sabe que se sintetiza en la mayoría de los órganos y tejidos del organismo. De esta forma, distinguimos dos tipos de melatonina, pineal y extrapineal.

La melatonina extrapineal se produce a concentraciones más elevadas que la pineal, aunque se libera a la circulación y tampoco presenta un ritmo circadiano de producción. Mientras que la melatonina pineal, cronobiótica, actúa sobre los receptores de membrana tipo MT1 y MT2, disminuyendo la producción de AMPc y GMPc, la melatonina extrapineal, intracelular, actúa sobre receptores citosólicos tipo calmodulina y calreticulina, y los receptores nucleares tipo ROR α , regulando la transcripción de genes, bien inhibiendo directamente, como es el caso de la lipooxigenasa B, o mediante la inhibición de factores de transcripción como p65 frenando la respuesta inmunitaria. No obstante, también puede ejercer sus funciones de forma independiente de receptores depurando radicales libres y actuando sobre su principal diana, la mitocondria. En ésta, potencia la actividad de los complejos respiratorios I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones, aumenta la producción de ATP y modula el potencial de membrana. Además, mejora la actividad de la defensa antioxidante y el ciclo del glutatión. Estas funciones antioxidantes, antiinflamatorias y de mantenimiento de la homeostasis mitocondrial de la melatonina se han observado en numerosos modelos de Parkinson como en ratones, peces cebra y moscas.

La melatonina pineal está controlada por el fotoperiodo a través del reloj central situado en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo. Su producción está inhibida durante el día y alcanza su concentración máxima a las 2-4 de la madrugada. La melatonina pineal se libera a la circulación y ejerce su acción cronobiótica sobre el reloj central y sobre todos los relojes periféricos del cuerpo, controlando los ritmos circadianos. Tanto el reloj central como los relojes periféricos están formados por un conjunto de genes llamados genes reloj, entre los que encontramos a CLOCK y BMAL1 que forman un heterodímero y activan la transcripción de otros genes reloj como PER y CRY. Estos dimerizan y se translocan al núcleo donde inhiben la transcripción mediada por CLOCK:BMAL1. Otras proteínas reloj son ROR- α y REV-erb, que de manera independiente activan e inhiben a BMAL1 respectivamente. Dado que los pacientes con Parkinson presentan alteraciones del sueño como uno de los síntomas no motores más predominantes, debido a la alteración del ritmo circadiano de melatonina, se ha sugerido que las alteraciones de los genes reloj pueden conducir a disfunción metabólica, aumento del estrés oxidativo y de la inflamación.

El pez cebra o *Danio rerio*, es un nuevo modelo experimental cada vez más usado en investigación gracias a sus numerosas ventajas. Posee una alta similitud genética y fisiológica con el ser humano, su pequeño tamaño lo hace más fácil de manipular y más económico, su desarrollo es extrauterino y muy rápido, y su capacidad reproductiva es elevada. Además, los embriones son transparentes en las primeras etapas del desarrollo, lo que permite observar fluorescencia y también poseen la facilidad de desarrollar líneas transgénicas. Nuestro interés en el pez cebra como modelo de la enfermedad de Parkinson, viene dado porque su sistema dopaminérgico está bien caracterizado y posee gran similitud con el de los seres humanos. En nuestro laboratorio hemos desarrollado

un modelo de pez cebra parkinsoniano inducido con la neurotoxina MPTP y en trabajos anteriores hemos observado una disminución de la actividad locomotora, inhibición del complejo I y de la tirosina hidroxilasa, disminución de PARKIN, PINK1 y DJ-1 y aumento de la γ -sinucleína. De igual forma, encontramos una disminución de la respiración mitocondrial y de la producción de ATP, un elevado estado de estrés oxidativo debido al aumento de la expresión de iNOS y la reducción de la defensa antioxidante.

Por todo ello, en este estudio queremos dilucidar la relación entre la alteración de los genes reloj en el modelo de parkinsonismo inducido por MPTP en embriones de pez cebra y las alteraciones de los procesos motores y mitocondriales. Además, estudiamos si la administración de melatonina puede contrarrestar dicha cronodisrupción y si eso lleva a una normalización del fenotipo de los peces.

Los resultados de este estudio muestran una alteración del ritmo circadiano de los genes reloj que a su vez condiciona una desaparición del ritmo circadiano de melatonina, en los embriones tratados con MPTP. Específicamente, los genes *bmal1* y *clock* pierden el ritmo, cambian de acrofase y aumentan el MESOR. Los genes reguladores *per2* y *cry1* muestran un avance de sus acrofases, mientras que el gen modulador *rora* pierde su ritmo, con pequeños cambios en *rev-erba* y *crno*.

El proceso de cronodisrupción producido por el MPTP en los embriones se traduce en una significativa alteración del ritmo de actividad locomotora de los embriones, así como de la dinámica mitocondrial, ambos procesos regulados por los genes reloj y la melatonina. Los embriones parkinsonianos muestran una reducción de la fusión mitocondrial y un aumento de la fisión, lo que conduce a un aumento de la apoptosis neuronal.

El tratamiento con melatonina se hizo con el fin de conocer si ésta puede impedir el desarrollo del parkinsonismo en los embriones tratados con MPTP (tratamiento preventivo), y si además, una vez instaurado el daño, la melatonina podría contrarrestar y restablecer la normalidad fenotípica. Nuestros resultados demuestran efectivamente esas dos propiedades de la melatonina, lo que la convierte en una excelente molécula para su uso clínico.

En conclusión, nuestro estudio reveló que existe una relación entre la alteración de los genes reloj, es decir una cronodisrupción, y la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson en el modelo de pez cebra tratado con MPTP. La melatonina muestra una vez más sus capacidades neuroprotectoras, que la hacen única y de gran interés para su aplicación en la clínica humana, ya que la EP se diagnostica cuando ya el daño neuronal es muy severo.

SUMMARY

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that affects the area of the central nervous system responsible for controlling the motor system and is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's. It is associated with a part of the brain called the substantia nigra and the loss of a pigment called neuromelanin present in the neurons of this area of the brain, the dopaminergic neurons. These neurons produce a neurotransmitter, dopamine, the lack of which, as a consequence of the progressive loss of dopaminergic neurons, produces PD. However, currently there is no preventive or curative treatment for Parkinson's disease, but symptomatic and chronic drug treatment.

There are two forms of the disease, 5-10% of patients have familial Parkinson's and 90-95% idiopathic Parkinson's. In both cases, neuronal death is due to mitochondrial dysfunction caused by inhibition of complex I that generates oxidative stress and bioenergetic failure, opening the mitochondrial transition pore, leaving cytochrome c to the cytosol, and activating apoptosis. Due to neuronal death, microglia activation and an inflammatory state, occur. Regarding the familial form, it is associated, among others, with mutations in the PARK genes that code for the PINK1, PARKIN, DJ-1 and α -synuclein proteins. PINK1 and PARKIN are involved in mitophagy of damaged mitochondria, and DJ-1 can interact with them and also regulates the transcription of antioxidant enzymes. On the other hand, α -synuclein forms insoluble aggregates called Lewy bodies in dopaminergic neurons and affects the integrity of the mitochondrial membrane. Therefore, mutations in these genes produce an alteration of mitochondrial homeostasis.

Melatonin is an indolamine derived from tryptophan, highly conserved throughout evolution. Until a few years ago it was thought that melatonin was only produced in the pineal gland and that it was released into the bloodstream to reach all tissues. However, it is now known that it is synthesized in most of the organs and tissues of the body. In this way, we distinguish two types of melatonin, pineal and extrapineal.

Extrapineal melatonin is produced at higher concentrations than pineal, although it is not released into the circulation and also does not have a circadian rhythm of production. While chronobiotic pineal melatonin acts on MT1 and MT2 type membrane receptors, decreasing cAMP and cGMP production, intracellular extrapineal melatonin acts on calmodulin and calreticulin type cytosolic receptors, and ROR α type nuclear receptors, regulating gene transcription, either by directly inhibiting it, as is the case with lipoxygenase B, or by inhibiting transcription factors such as p65, slowing down the immune response. However, it can also perform its functions independently of receptors, scavenging free radicals and acting on its main target, the mitochondria. Here, melatonin enhances the activity of the respiratory complexes I, II, III and IV of the electron transport chain, increases the production of ATP and modulates the membrane potential. In addition, it improves the activity of the antioxidant defense and the glutathione cycle. These antioxidant, anti-inflammatory, and mitochondrial homeostasis-maintaining functions of melatonin have been observed in numerous Parkinson's models such as mice, zebrafish, and flies.

Pineal melatonin is controlled by photoperiod through the central clock located in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus. Its production is inhibited during the day and reaches its maximum concentration at 2-4 in the morning. Pineal melatonin is released into the circulation and exerts its chronobiotic action on the

central clock and on all the peripheral clocks of the body, controlling circadian rhythms. Both the central clock and the peripheral clocks are made up of a set of genes called clock genes, among which we find CLOCK and BMAL1, which form a heterodimer and activate the transcription of other clock genes such as PER and CRY. These dimerize and translocate to the nucleus where they inhibit median transcription by CLOCK:BMAL1. Other clock proteins are ROR- α and REV-erb, which independently activate and inhibit BMAL1, respectively. Since patients with Parkinson's have sleep disturbances as one of the most predominant non-motor symptoms, due to the disturbance of the circadian rhythm of melatonin, it has been suggested that alterations in clock genes may lead to metabolic dysfunction, increased oxidative stress and inflammation.

The zebrafish or *Danio rerio*, is a new experimental model that is increasingly used in research thanks to its numerous advantages. It has a high genetic and physiological similarity with the humans, its small size makes it easier to handle and cheaper, its development is extrauterine and very fast, and its reproductive capacity is high. In addition, the embryos are transparent in the early stages of development, which allows fluorescence to be observed, and they also have the facility to develop transgenic lines. Our interest in zebrafish as a model for Parkinson's disease depends on the fact that its dopaminergic system is well characterized and has great similarity to that of humans. In our laboratory we have developed a parkinsonian zebrafish model induced with the neurotoxin MPTP and in previous works we have observed a decrease in locomotor activity, inhibition of complex I and tyrosine hydroxylase, a decrease in PARKIN, PINK1 and DJ-1 and an increase in γ -synuclein. Similarly, we found a decrease in mitochondrial respiration and ATP production, a high state of oxidative stress due to increased iNOS expression, and reduced antioxidant defense.

For all these reasons, in this study we want to elucidate the relationship between the alteration of the clock genes in the parkinsonism model induced by MPTP in zebrafish embryos and the alterations of the motor and mitochondrial process. In addition, we studied if the administration of melatonin can counteract this chronodisruption and if this leads to a normalization of the phenotype of the fish.

The results of this study show an alteration of the circadian rhythm of the clock genes, which in turn causes a disappearance of the circadian rhythm of melatonin, in the embryos treated with MPTP. Specifically, the *bmal1* and clock genes miss-rhythm, switch acrophase, and increase MESOR. The *per2* and *cry1* regulatory genes show an advance in their acrophases, while the *ror α* modulator gene loses its rhythm, with small changes in *rev-erb α* and *chrono*.

The chronodisruption process produced by the MPTP in the embryos results in a significant alteration of the locomotor activity rhythm of the embryos, as well as of the mitochondrial dynamics, both processes regulated by the clock genes and melatonin. Parkinsonian embryos show reduced mitochondrial fusion and increased fission, leading to increased neuronal apoptosis.

Treatment with melatonin was done to find out if it can prevent the development of parkinsonism in embryos treated with MPTP (preventive treatment), and if, once the damage has been established, melatonin could counteract and restore phenotypic normality (curative treatment). Our results effectively demonstrate these two capacities of melatonin, making it an excellent molecule for clinical use.

In conclusion, our study revealed that there is a relationship between the alteration of the clock genes, that is, a chronodisruption, and the pathophysiology of Parkinson's disease in the zebrafish model incubated with MPTP. Melatonin shows once

again its neuroprotective capacities, which make it unique and of great interest for its application in the human clinic, since PD is diagnosed when neuronal damage is already very severe.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ENFERMEDAD DE PARKINSON	3
1.1 Etiología y sintomatología	4
1.2 Fisiopatología	6
1.2.1 Estrés oxidativo	6
1.2.2 Disfunción mitocondrial	8
1.2.3 Neuroinflamación	10
1.3 Tratamiento	12
2. MELATONINA, ENFERMEDAD DE PARKINSON Y GENES RELOJ.....	13
2.1 Melatonina	13
2.1.1 Síntesis y metabolismo de la melatonina	14
2.1.1 Mecanismos de acción y funciones de la melatonina	17
2.2 Melatonina y Enfermedad de Parkinson.....	22
2.3 Melatonina y genes reloj	24
2.4. Genes reloj y Enfermedad de Parkinson	26
3. EL PEZ CEBRA COMO MODELO EXPERIMENTAL	28
3.1 Ventajas del uso del pez cebra en investigación.....	29
3.2 El MPTP: Una neurotoxina para inducir parkinsonismo	32
3.3 El pez cebra como modelo de Parkinson	33
3.4 Genes reloj en el pez cebra	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Animales y tratamientos	43
1.1 Animales.....	43
1.2 Tratamientos.....	44
2. Análisis del ritmo de actividad locomotora.....	45
3. Determinación de la concentración de melatonina.....	45
4. Análisis de la expresión génica	46
4.1 Extracción de ARN	46
4.2 Reacción de transcripción inversa	47
4.3 RT-PCR Cuantitativa	47
5. Análisis del ritmo circadiano	48
6. Determinación de la concentración de proteínas	49
7. Análisis por Western Blot	49
8. Análisis estadístico	51

RESULTADOS.....	53
1. El MPTP atenúa el ritmo diurno/nocturno de melatonina, y se restablece con el tratamiento con melatonina	57
2. La melatonina restaura el ritmo de actividad motora interrumpido por MPTP.....	58
3. El MPTP altera el ritmo circadiano de los genes reloj, que se normaliza después del tratamiento con melatonina.....	60
4. Cambios en la acrofase de los ritmos de los genes del reloj en embriones de pez cebra debido a tratamientos con MPTP y/o melatonina	66
5. Cambios en el mesor del ritmo de los genes del reloj en embriones de pez cebra debido a tratamientos con MPTP y/o melatonina	68
6. Cambios en la amplitud del ritmo de los genes del reloj en embriones de pez cebra debido a tratamientos con MPTP y/o melatonina	70
7. La dinámica mitocondrial alterada en el pez cebra parkinsoniano se recupera tras el tratamiento con melatonina	71
8. La administración de MPTP altera las vías de apoptosis y autofagia y la melatonina contrarresta este efecto	73
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES.....	85
CONCLUSIONS	89
BIBLIOGRAFÍA.....	93

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo que afecta al área del sistema nervioso central encargada de controlar el sistema motor. Fue descubierta por el médico James Parkinson en el año 1817 y en 1919, Tretiakoff descubrió que estaba asociada a una parte del cerebro denominada sustancia negra (Figura 1). Dicha relación, se descubrió gracias a la observación de la pérdida de un pigmento llamado neuromelanina presente en las neuronas de esta zona del cerebro: las neuronas dopaminérgicas. Estas neuronas producen un neurotransmisor, la dopamina, cuya falta como consecuencia de la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas, produce la EP (Hornykiewicz, 1963). A pesar de este descubrimiento, se desconoce el detonante responsable de la muerte de las células dopaminérgicas y su consecuente disminución de la dopamina. Seguramente no habrá una causa única, sino una combinación de factores genéticos, ambientales y anomalías en procesos celulares.

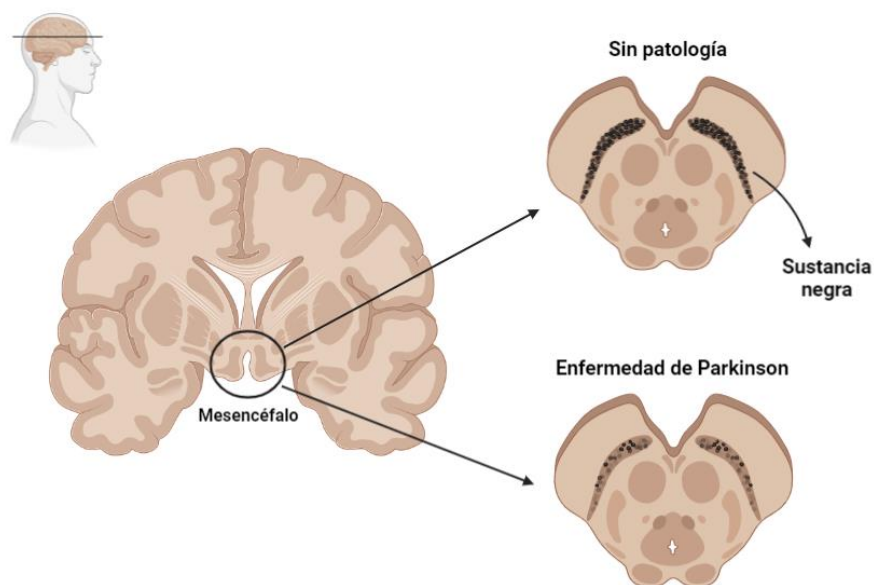


Figura 1. Representación de la pérdida de sustancia negra en los pacientes con Parkinson.

1.1 ETIOLOGÍA Y SINTOMATOLOGÍA

Esta enfermedad neurodegenerativa es la segunda más frecuente después del Alzheimer y suele aparecer a partir de los 50 años, aunque en ocasiones puede darse desde los 30 años conociéndose entonces como Parkinson de inicio temprano. La prevalencia se incrementa sustancialmente con la edad, siendo del 1% en personas mayores de 60 y del 4% en habitantes mayores de 80 años (de Lau and Breteler, 2006). Además, se prevé que el porcentaje de personas afectadas siga aumentando en los próximos años debido al aumento de la esperanza de vida y el envejecimiento de la población.

Los síntomas principales son alteraciones motoras, debido a que las neuronas dopaminérgicas se encargan de controlar el movimiento, como los temblores en reposo, bradiquinesia, hipoquinesia, aquinesia, inestabilidad o trastornos posturales y rigidez muscular. Además existen otros síntomas no motores debidos a alteraciones del sistema nervioso autónomo: depresión, estreñimiento, dificultades para tragar y masticar, problemas urinarios, alteraciones cognitivas, depresión, alteraciones de la memoria, trastornos del sueño, pérdida de expresividad, sudoración excesiva, aumento de la salivación, exceso de secreción sebácea y alteración del peso (Sveinbjornsdottir, 2016).

Existen dos formas de la enfermedad, Parkinson familiar y Parkinson idiopático. La forma hereditaria ocurre en aproximadamente un 5-10% de los enfermos de Parkinson debido a mutaciones hereditarias en los genes PARK, los cuales codifican proteínas mitocondriales o asociadas a la mitocondria. Entre los genes más conocidos se encuentra el gen PARK 1 que codifica la α -sinucleína, el componente

principal de los cuerpos de Lewy. Mutaciones en dicho gen producen la forma autosómica dominante de enfermedad de Parkinson. Consiste en agregados insolubles de la proteína que se unen a membranas y a vesículas sinápticas afectando a la liberación de neurotransmisores y causando la degeneración axonal (Boassa et al., 2013; O'Donnell et al., 2014); también provoca la despolarización de la membrana de la mitocondria conduciendo así a la disfunción mitocondrial (Banerjee et al., 2010; Bir et al., 2014; Kamp et al., 2010) y, por último, altera las vías de degradación de proteínas (Boassa et al., 2013).

La forma autosómica recesiva de la enfermedad, y la más común de Parkinson familiar de inicio temprano, se debe a mutaciones en los genes PARK2 y PARK6, que codifican para PARKIN y PINK1, respectivamente. Por tanto, mutaciones en estos genes alteran la mitofagia y favorecen la acumulación de mitocondrias dañadas (Pickrell and Youle 2015; Valente et al., 2004a). Además, ambas proteínas interaccionan con DJ-1, codificada por el gen PARK7 y cuyas mutaciones producen la misma forma de la enfermedad que las anteriores. DJ-1 protege a la célula del estrés oxidativo (Taira et al., 2004), regulando la transcripción de enzimas antioxidantes, así como de p53 y de la tirosina hidroxilasa (Ariga et al., 2013; Ishikawa et al., 2010; Ottolini et al., 2013). Del mismo modo, PARKIN interviene en los procesos de dinámica mitocondrial ya que interactúa con las proteínas de fusión mitocondrial MFN (Tanaka et al., 2010).

Por otra parte, mutaciones en los genes PARK5 y PARK8, que codifican para UCH-L1 y LRRK2 respectivamente Maraganore et al., 2004; Mondello et al., 2014; Jin et

al., 2021; Rui et al., 2018; Rocha et al., 2022), se sabe que causan Parkinson autosómico dominante, pero se desconocen las vías implicadas y su etiología.

Sin embargo, la mayor parte de los casos de Parkinson, entre el 90-95%, son de causa desconocida, aunque se cree que ciertos factores ambientales pueden incrementar el riesgo de padecer la enfermedad. Entre los factores ambientales se encuentran el uso de agentes químicos, como los pesticidas y herbicidas (Corrigan et al., 2000; Costello et al., 2009), y la exposición a solventes orgánicos (Reis et al., 2016; Nielsen et al., 2021), monóxido de carbono (Choi, 2002; Lai et al., 2015) y disulfuro de carbono (Ku et al., 2003; Huang et al., 2004). No obstante, la principal causa de Parkinson idiopático es el envejecimiento, ya que disminuyen las estrategias compensatorias que protegen frente al daño y muerte celular, se producen mutaciones en el ADN y acortamiento de telómeros (Hindle, 2010), disminuye el número de copias de ADN mitocondrial y las vías de degradación de proteínas (Reeve et al., 2014), y existe un estado inflamatorio (Calabrese et al., 2018).

1.2 FISOPATOLOGÍA

Actualmente se desconoce la principal causa de la neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson. No obstante, se sabe que, en gran parte, se debe a la disfunción mitocondrial ocasionada por el aumento del estrés oxidativo y la inflamación, tanto en el Parkinson familiar como en el idiopático (Figura 2) (Ryan et al., 2015).

1.2.1 Estrés oxidativo

La mitocondria es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a que, en la reducción de oxígeno a agua para producir ATP por la fosforilación

oxidativa, se puede producir anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$), debido al escape de electrones que reducen parcialmente el oxígeno y que ocurre principalmente en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones (ETC) (Dias et al., 2014). Durante la enfermedad de Parkinson, existe una disfunción de ETC, en concreto del complejo I, por lo que hay un aumento del escape de electrones y, como consecuencia, un aumento de la producción de ROS (Figura 2) (Puspita et al., 2019). La toxicidad de ROS radica en su capacidad para oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, afectando así a las vías moleculares, la integridad de las membranas celulares y dañando el ADN (Magder, 2006; Auten and Davis, 2009).

Asimismo, durante la EP se ve afectado el sistema de defensa antioxidante endógeno, compuesto por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd) (Díaz-Casado et al., 2017). La SOD convierte el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , el cual puede ser depurado por la catalasa o la GPx a H_2O . Para ello, la GPx oxida el glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). A continuación, la GRd restaura los niveles de GSH reduciendo el GSSG (Figura 2).

Por otro lado, el metabolismo de la dopamina es también una gran fuente de ROS, ya sea a través de las enzimas monoamino oxidasas (MAO) que generan H_2O_2 (Segura-Aguilar et al., 2014) o, de forma espontánea, interaccionando con metales (Trist et al., 2019). Ya en 1968, Earle observó un incremento de depósitos de hierro en la sustancia negra de pacientes con Parkinson (Earle, 1968), debido al cual se puede producir la oxidación de dopamina a ortoquinonas que son altamente reactivas, formando neuromelanina y otras neurotoxinas (Meiser et al., 2013). La

neuromelanina es un almacén de hierro, por lo que puede aumentar el estrés oxidativo (Double et al., 2003), puede interaccionar con la α -sinucleína (Halliday et al., 2005) y activar la microglía (Karlsson and Lindquist, 2013).

Como ya se ha comentado anteriormente, mutaciones en los genes PARK conllevan a la disfunción mitocondrial y, por tanto, al aumento del estrés oxidativo. En concreto, las mutaciones en PARKIN y PINK1, así como la acumulación de α -sinucleína alteran la actividad del complejo I, y mutaciones en DJ-1 afectan directamente a la protección frente al estrés oxidativo (Figura 2) (Blesa et al., 2015).

La alteración de los complejos de la ETC, aparte de ROS, producen especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el óxido nítrico ($\text{NO}^{\cdot}$) y peroxinitritos (ONOO^{-}). Ambos afectan a su vez a todos los complejos de la ETC produciendo disfunción mitocondrial (Acuña-Castroviejo et al., 2001).

1.2.2 Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial se asoció por primera vez en 1989 con la EP al observarse la inhibición del complejo I de la ETC en la sustancia negra post-mortem de pacientes con EP (Schapira et al., 1989). El complejo I es el complejo que más ROS genera y a la vez, el más susceptible a ellos, ya que es el principal regulador de la ETC. Su inhibición produce un escape masivo de electrones, disminución del potencial de membrana y de la producción de ATP, que conduce a la apertura del poro de transición mitocondrial (PTM) con la salida de citocromo c al citosol y el inicio de la apoptosis (Figura). Actualmente se desconoce el detonante de la inhibición del complejo I, siendo las mutaciones en el ADNmt debido a los ROS una de las causas (Schapira, 2008). Por otro lado, la α -sinucleína además de permeabilizar las

membranas de las mitocondrias, se sabe que puede interaccionar con subcomplejos del complejo I causando la disociación de este (Figura 2) (Devi et al., 2008).

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos, que incluyen eventos de fusión y fisión imprescindibles para el mantenimiento del ADNmt y la homeostasis mitocondrial. Ya que las neuronas requieren altas demandas de energía, la dinámica mitocondrial es muy importante para la supervivencia neuronal y la formación de sinapsis, siendo vulnerables al desequilibrio de la fusión/fisión mitocondrial (Santos and Cardoso, 2012). La fusión mitocondrial se realiza en dos pasos, la fusión de la membrana mitocondrial externa llevada a cabo por las mitofusinas 1 y 2 (MFN1 y MFN2), y la fusión de la membrana mitocondrial interna mediada por OPA1. Por otra parte, la fisión mitocondrial tiene lugar gracias a DRP1. La dinámica mitocondrial es necesaria para la formación de nuevas mitocondrias, intercambio de componentes de la ETC y de ADNmt, y para la eliminación de mitocondrias dañadas por mitofagia (Ni et al., 2014). Se ha observado en EP que hay una alteración de la dinámica mitocondrial, con un incremento de la fisión, que puede deberse a la interacción de α -sinucleína con las proteínas de fusión (Figura 2) (Malpartida et al., 2021).

Las mitocondrias disfuncionales son eliminadas por mitofagia, para la cual se necesita el reclutamiento de Parkina mediado por PINK1. Mutaciones en estos genes conllevan a un deterioro de la mitofagia, que da como resultado la acumulación de mitocondrias dañadas y, por consiguiente, estrés oxidativo (Figura 2). Pero la reducción de la mitofagia no es una característica solo de la forma familiar, si no que se encuentra también en el Parkinson esporádico (Ryan et al., 2015). Además, mutaciones en DJ-1 se han relacionado también con una alteración de la autofagia

(González-Polo et al., 2009), mecanismo por el cual se degrada la α -sinucleína. La pérdida de la autofagia parece estar relacionada con la acumulación de la α -sinucleína en la EP (Figura 2) (Vogiatzi et al., 2008).

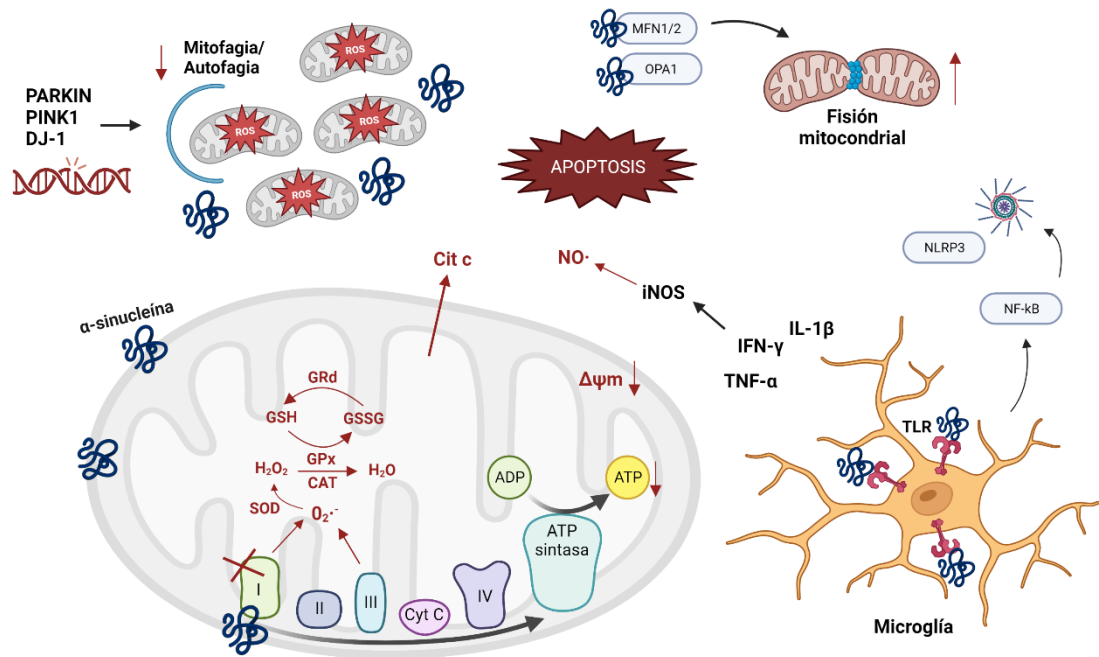
La inhibición del complejo I y la disfunción mitocondrial, con la consiguiente generación de ROS, conllevan a la apoptosis neuronal mediada por la liberación del citocromo c al citosol a través de la apertura del PTM y estimulando la vía de las caspasas (Cassarino et al., 1999). Asimismo, se ha encontrado un aumento de la proteína apoptótica BAX en la EP asociada a las mitocondrias y regulada por p53 (Perier et al., 2005; Vila et al., 2001).

1.2.3 Neuroinflamación

En la EP existe una respuesta inflamatoria exacerbada en la sustancia negra, que corresponde a la activación crónica de las células del sistema inmunitario innato del sistema nervioso central, como los astrocitos y oligodendrocitos, pero sobre todo de la microglía. La microglía se encarga de eliminar células dañadas, gracias a la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina 1-beta (IL-1 β) y el interferón gamma (IFN- γ). Estas citoquinas van a reclutar a las células mieloides periféricas, entre las que encontramos monocitos, macrófagos y células dendríticas, que a su vez atraen a los linfocitos T sobreactivando la respuesta inflamatoria (Arena et al., 2022). Además, las citoquinas proinflamatorias activan la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), aumentando así los niveles de NO $\cdot$ y provocando más muerte neuronal, lo que llevaría a mayor activación de la microglía formando un bucle de retroalimentación positiva (Figura 2) (Qin et al., 2015).

Por otro lado, la muerte de las neuronas dopaminérgicas conduce a la liberación de otras moléculas que seguirían activando la microglía. Una de esas moléculas es la neuromelanina, que acentúa la liberación de las citoquinas proinflamatorias mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B y estimulando la producción de NO $\cdot$ (Wilms et al., 2003). También, la liberación de α -sinucleína activa la microglía, ya que es reconocida por sus receptores tipo Toll-like receptors (TLR), en concreto TLR2, que activan a NF- κ B y el inflamasoma NLRP3 (Figura 2). NLRP3 estimula la vía de las caspasas, la liberación de citoquinas inflamatorias y la producción de ROS (Deyell et al., 2023).

Finalmente, mutaciones en los genes PARK parecen interferir en el estado inflamatoria en la EP. Alteraciones en PARKIN y PINK1 activan la respuesta proinflamatoria, ya que en condiciones normales inhiben las vías de señalización de NF- κ B. De la misma manera ocurre con DJ-1, además de regular otros genes involucrados en la neuroinflamación (Arena et al., 2022).



Enfermedad de Parkinson

Figura 2. Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson. Existe una inhibición del complejo I de la ETC, con la consiguiente generación de ROS y la disminución de la producción de ATP. Los ROS son depurados por la defensa antioxidante mediante el ciclo del glutatión, sin embargo, están afectadas durante la enfermedad. Esto conlleva a la disminución del potencial de membrana, la salida del citocromo c al citosol y apoptosis. Mutaciones en los genes PARKIN, PINK1 y DJ-1 conducen a la alteración de la autofagia y mitofagia, con la acumulación de mitocondrias dañadas, más ROS y α -sinucleína, que producen más muerte neuronal. Además, la α -sinucleína interactúa con el complejo I, causándole más inhibición, y con las proteínas de fusión mitocondrial, aumentando la fisión y la acumulación de mitocondrias dañadas. Esta muerte neuronal activa a la microglía, que libera citoquinas proinflamatorias, generando más estrés oxidativo y produciendo neuroinflamación.

1.3 TRATAMIENTO

Actualmente, no existe un tratamiento preventivo ni curativo para la enfermedad de Parkinson, sino un tratamiento farmacológico sintomático y crónico. El tratamiento con levodopa (L-DOPA), el precursor de la dopamina es el más usado y eficaz para corregir la sintomatología de la enfermedad. Sin embargo, este tratamiento produce efectos secundarios como movimientos involuntarios anormales, fluctuaciones motoras y también trastornos psíquicos. Debido a ello, al

principio cuando los síntomas son más leves, se suele comenzar el tratamiento con otros fármacos como inhibidores de la monoaminoxidasa tipo B (IMAO), anticolinérgicos, β -bloqueadores, amantadina y agonistas de la dopamina (Connolly and Lang, 2014).

Cuando los síntomas no se pueden seguir controlando con los tratamientos orales, se realizan tratamientos quirúrgicos. El más utilizado es la estimulación cerebral profunda (DBS), que consiste en un neuroestimulador conectado a electrodos implantados en el núcleo subtalámico o el globo pálido que modulan las redes neuronales mediante corrientes eléctricas. Este método alivia los síntomas motores de la enfermedad y ayuda a reducir la dosis de la medicación. Existen otros tipos de cirugías de tipo ablativas (LS), que implican la destrucción de parte del tejido cerebral ya sea del globo pálido (palidotomía) o del tálamo (talamotomía). La termoablación por radiofrecuencia (RF), la radiocirugía estereotáctica (SRS), ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU) y la terapia térmica intersticial con láser (LITT), son los tipos de LS que hay en la actualidad (Sharma et al., 2020).

Debido a la inexistencia de un tratamiento realmente eficaz y sin efectos secundarios, se quiere el desarrollo de alguna estrategia que detengan el avance de la enfermedad y revierta los síntomas.

2. MELATONINA, ENFERMEDAD DE PARKINSON Y GENES RELOJ

2.1 MELATONINA

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina derivada del triptófano, aislada por primera vez en 1958 por Aaron Lerner, el cual identificó su estructura química (Lerner AB et al., 1959). Es una molécula altamente conservada a

lo largo de la evolución, ya que se encuentra tanto en organismos muy primitivos como cianobacterias, algas unicelulares y parásitos, como en organismos actuales (Hardeland and Poeggeler 2003; Hardeland 2008; Macias et al., 1999; Paredes et al., 2009).

2.1.1 Síntesis y metabolismo de la melatonina

La melatonina es sintetizada a partir del triptófano que es hidroxilado por la enzima L-triptófano hidroxilasa (TPH) en la posición 5 y genera 5-hidroxitriptófano. Este es descarboxilado por la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa formando la serotonina (5-hidroxitriptamina). A continuación, se forma la N- acetilserotonina (NAS) por acetilación de la serotonina por la arialquilamina N-acetiltransferasa (AANAT). Finalmente, la N-acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) metila a NAS y da lugar a la melatonina (Figura 4) (Zhao et al., 2019). Se descubrió que la ASMT es la enzima limitante en la síntesis de melatonina (Liu and Borjigin 2005)

Hasta hace unos años se pensaba que la melatonina solo se producía en la glándula pineal y que se liberaba a la circulación sanguínea para llegar a todos los tejidos. Sin embargo, actualmente se sabe que se sintetiza en la mayoría de los órganos y tejidos del organismo (Acuña-Castroviejo et al., 2014), ya que las enzimas AANAT y ASMT se han encontrado en la mayor parte de tejidos (Stefulj et al., 2001). Por ello diferenciamos dos tipos de melatonina, pineal y extrapineal.

La melatonina pineal se sintetiza de forma rítmica, alcanzando su máxima producción a las 2-4 de la madrugada. Su ritmo diario está controlado por el fotoperiodo y su producción está inhibida durante el día. En síntesis, un pequeño grupo de células ganglionares de la retina, llamadas intrínsecamente fotosensibles,

envían información de la luz, concretamente de la longitud de onda de 360-480 nm, a través del nervio óptico a las neuronas que forman el reloj biológico en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo, liberando glutamato para activar los genes y proteínas reloj de tal forma, que inhiben la vía polisináptica que de estos núcleos va a través de los núcleos paraventriculares y médula espinal al ganglio cervical superior y de aquí, por medio de una vía postganglionar simpática, llega a la glándula pineal. Cuando la luz ambiental se va reduciendo hacia el atardecer, ese componente de luz azul de 460-480 nm desaparece, lo que activa la vía postganglionar simpática para que libere noradrenalina que activa a su vez la expresión de los enzimas de síntesis de melatonina, AANAT y ASMT (Axelrod, 1974; Vartanian et al., 2015; Tähkämö et al., 2019). La melatonina pineal es cronobiótica y cuando se libera a la circulación, es capaz de sincronizar los ritmos de todas las células y órganos del cuerpo (Figura 3) (Reiter, 1993).

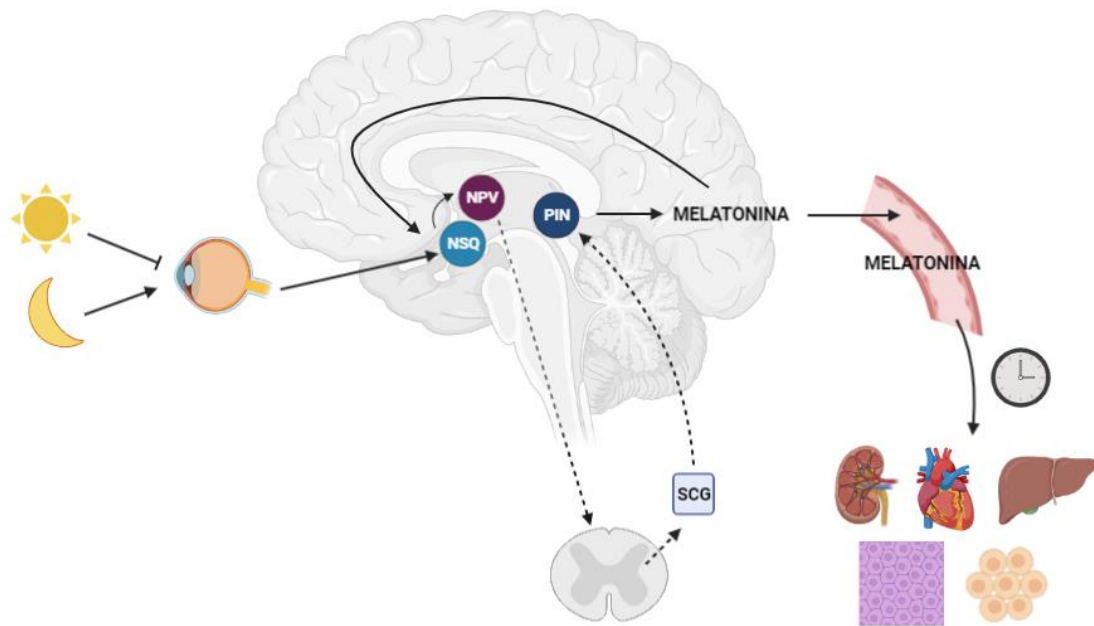


Figura 3. El ojo recibe la información del fotoperiodo, siendo la luz una señal inhibitoria y la falta de ella, estimuladora. La información llega a los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) a través del nervio óptico. A continuación, a través del núcleo paraventricular (NPV) y la médula espinal, llega al ganglio cervical superior (SCG), que manda la información a la glándula pineal (PIN). Allí se estimula o se inhibe la producción de melatonina. La melatonina pasa a la circulación y llega a todas las células, tejidos y órganos del organismo regulando los ritmos circadianos y también llega vía retroalimentación a las neuronas del reloj biológico para mantenerlas "en hora".

Sin embargo, la melatonina extrapineal se produce a unas concentraciones mucho más elevadas que la pineal, aunque permanece dentro de la célula y no es liberada a la circulación. Tampoco presenta un ritmo circadiano de producción, si no que cada tejido produce la melatonina que necesita en cada momento (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Venegas et al., 2012).

La melatonina circulante se degrada en el hígado, donde varias isoformas del citocromo P450, principalmente CYP1A2 y en menor importancia, CYP2C19 y CYP2C9 (Facciola et al., 2001) producen 6-hidroximelatonina. Ésta interacciona con sulfato formando 6-sulfatoximelatonina y finalmente es excretada en la orina (Ma et al.,

2005). La melatonina extrapineal puede degradarse por acción de la arilamina formamidasa o ser enzimáticamente independiente. En este caso, la melatonina depura un radical de oxígeno y se transforma en su primer metabolito, N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK). En segundo lugar, depura un segundo radical, formando N-acetil-5-metoxikinurenamina (AMK) (Figura 4) (Tan et al., 2007).

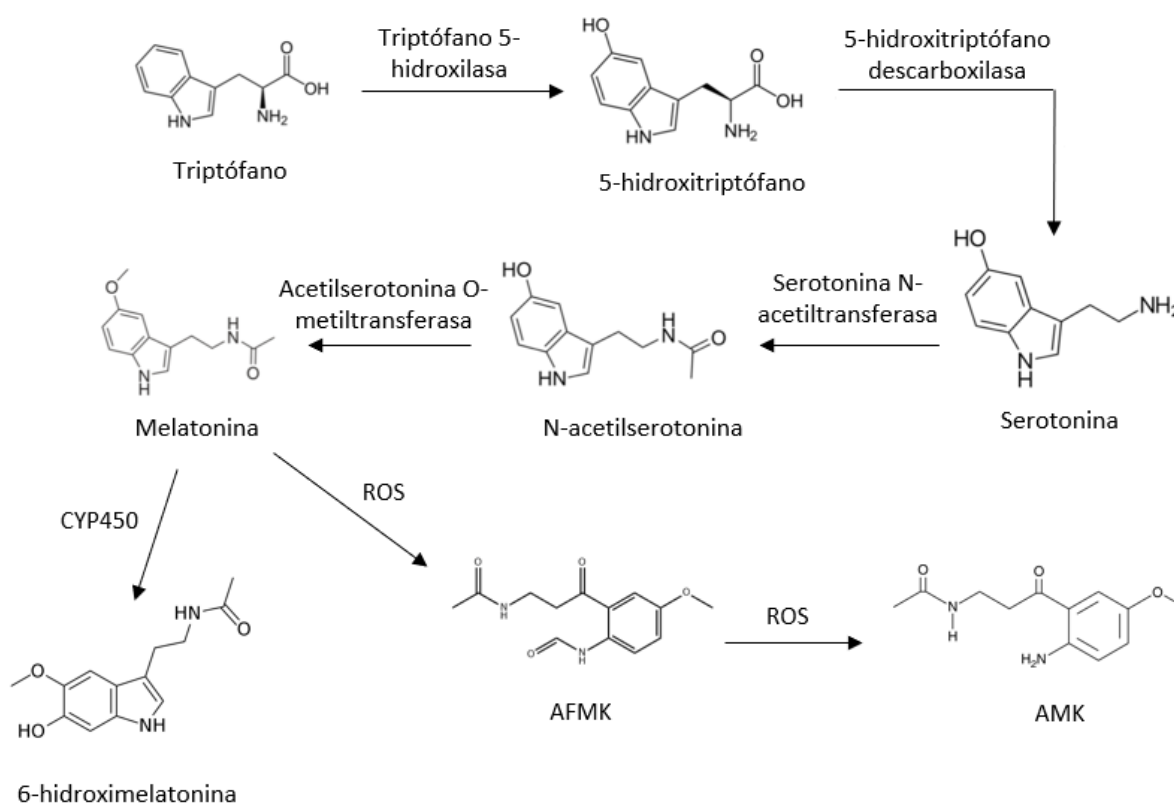


Figura 4. La melatonina se sintetiza a partir del triptófano, que por acción de la triptófano 5-hidroxilasa se forma 5-hidroxitriptófano. La 5-hidroxitriptófano descarboxilasa lo convierte en serotonina, la cual es transformada en N-acetilserotonina por la serotonina N-acetiltransferasa. Por último, se forma la melatonina gracias a la acetilserotonina O-metiltransferasa. La melatonina puede degradarse por el CYP450 y forma 6-hidroximelatonina o puede depurar radicales (ROS) formando sus metabolitos AFMK y AMK.

2.1.2 Mecanismos de acción y funciones de la melatonina

Aunque inicialmente se planteó que la melatonina podría atravesar todas las membranas biológicas debido a su carácter lipófilo, realmente esta molécula tiene

carácter anfipático, es decir, tiene un extremo de su molécula hidrofílico y otro hidrófobo, lo que condiciona su capacidad de difusión. De hecho, en nuestro laboratorio demostramos que la melatonina no atraviesa las membranas celulares con facilidad, sino que, al contrario, la melatonina extracelular se acumula en dichas membranas celulares y solamente deja pasar una pequeña parte de ella al interior de la célula, saturándose a determinadas concentraciones sus niveles intranucleares e intramitocondriales (Venegas et al., 2012). Este mecanismo de regulación es importantísimo, porque evita un exceso de melatonina en el interior de la célula que, por su efecto antioxidante, podría crear un estado hiperreducido intracelular, que interferiría con el normal metabolismo energético celular.

Se han descrito dos tipos de receptores de melatonina de membrana acoplados a proteínas G, MT1 (Mel1A) y MT2 (Mel1b) (Figura 5). Cuando la melatonina se une a ellos, la proteína G se disocia en los dímeros α y $\beta\gamma$ y, por un lado, inhibe la adenilato ciclase impidiendo la formación de AMPc, la activación de la proteína quinasa A (PKA) y disminuyendo así la fosforilación de CREB, un regulador transcripcional. Por otro lado, estimula la proteína quinasa C y aumenta el calcio intracelular. Además, la unión a MT2 disminuye el GMPc al inhibir la guanilato ciclase (Von GC et al., 2002).

También se une a receptores nucleares, que son receptores relacionados con los receptores huérfanos retinoides (ROR) y se unen por su dominio N-terminal a los elementos de respuesta ROR del ADN (RORE). Existen 3 tipos, RORA, B y C, conocidos comúnmente como ROR α , β y γ , respectivamente, pero la melatonina solo se une a ROR α regulando la transcripción génica (Figura 5) (Becker-Andre et al., 1994).

Tanto los receptores de membrana como nucleares presentan un ritmo circadiano como la melatonina, con el pico de producción a las 3 de la madrugada. Lo que sugiere que su expresión está regulada por los niveles de melatonina en sangre (Venegas et al., 2013).

La melatonina también puede actuar independiente de receptores. Por un lado, en el citosol puede interaccionar con proteínas encargadas del metabolismo del calcio y la modulación de la estructura del citoesqueleto (Figura 5), como la calmodulina (Benitez-King and Anton-Tay 1993), la calreticulina (Macias et al., 2003), la tubulina (Cardinali and Freire 1975) y la proteína quinasa C (Benitez-King et al., 1996).

Las acciones independientes de receptores también incluyen su capacidad como un potente antioxidante, ya que puede interaccionar directamente con ROS y RNS (Figura 5) (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Leon et al., 2004; Reiter et al., 2003a). La melatonina cede electrones al grupo OH formando un radical indolil (Tan et al., 2000), que a su vez puede depurar de nuevo otro hidroxilo y formar 3-hidroximelatonina cíclica o interaccionar con O₂, formando el metabolito AFMK (Hardeland et al., 1993; Poeggeler et al., 1994). Además, puede reaccionar con el oxígeno singlete (Cagnoli et al., 1995), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Tan et al., 2000) y el O₂ (Acuña-Castroviejo et al., 2007; León et al., 2004; Reiter et al., 2003b). También depura radicales de nitrógeno como los peroxinitritos (ONOO⁻) (Zhang et al., 1999); impide la peroxidación lipídica manteniendo la integridad de las membranas celulares (Escames et al., 1997), e inhibe la expresión de iNOS, evitando la producción de NO (Acuña-Castroviejo et al., 2007; Crespo et al., 1999).

Aún más, la melatonina puede actuar directamente sobre los enzimas de defensa antioxidante, estimulando su expresión y actividad (Antolin et al., 2002; Mayo et al.,

2002). Por un lado, regula la actividad de las enzimas SOD y catalasa (Acuña-Castroviejo et al., 2007; León et al., 2004; Reiter et al., 2003b), y también el ciclo del glutatión. Para ello, mantiene el índice GSSG/GSH, estimulando la actividad de GPx y GRd (Acuña-Castroviejo et al., 2001; León et al., 2004; León et al., 2005). Aumenta la actividad de la γ -glutamylcisteína sintasa (Urata et al., 1999) y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la cual genera el NADPH que necesita la GRd para aumentar la síntesis de GSH (Figura 5) (Pierrefiche and Laborit 1995).

Dado que la mitocondria es la principal fuente de ROS y se han observado concentraciones muy altas de melatonina en ella (Venegas et al., 2012), se considera que la mitocondria es su principal diana. Pero el papel de la melatonina en la mitocondria no reside sólo en su función como antioxidante, también mantiene la homeostasis mitocondrial (Acuña-Castroviejo D. et al., 2011; Garcia et al., 2011; Martin et al., 2000a). Gracias a su alto potencial redox (0.94 V), puede interaccionar con los complejos I y IV de la ECT, incrementado su actividad y el flujo de electrones (Martin et al., 2002), además de activar la transcripción de las subunidades del complejo IV codificadas por el ADNmt (Escames et al., 2006a). Así, aumenta la síntesis de ATP (López et al., 2006b), regula el potencial de membrana e inhibe la apertura del PTM (Figura 5) (Andrabi et al., 2004; Sourdeval et al., 2006).

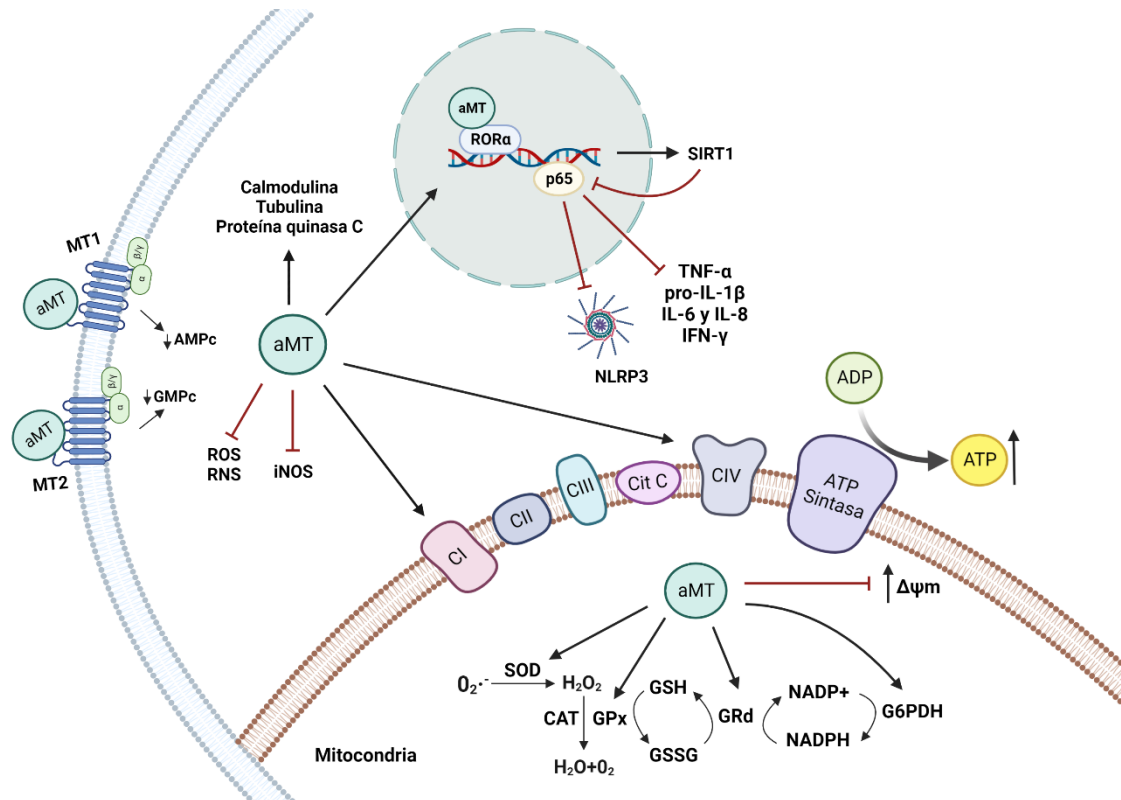


Figura 5. Mecanismos de acción de la melatonina. Las acciones de la melatonina pueden estar mediada por los receptores de membrana, MT1 y MT2. También puede ser independiente de receptores, interactuando con proteínas citosólicas como la calmodulina, la tubulina y la proteína quinasa C, depurando radicales libres (ROS y RNS) e inhibiendo la iNOS. Además, puede unirse a receptores nucleares RORα y activar la transcripción de genes, como la SIRT1 que inhibe la activación de la vía inflamatoria. Por último, su principal diana de acción es la mitocondria, mejorando la actividad de los complejos I y IV, aumentando la producción de ATP y manteniendo el potencial de membrana ($\Delta\psi_m$). También mejora la actividad de las enzimas antioxidantes y el ciclo de glutatión.

Nuestro laboratorio también demostró por primera vez que las propiedades antiinflamatorias de la melatonina se producen actuando a dos niveles principales de la inmunidad innata. Por un lado, regula la actividad del factor NF-κB y se une a su receptor nuclear RORα activando la SIRT1, que desacetila p65 unido al ADN, terminando así su actividad transcripcional (García et al., 2015; Acuña-Castroviejo et al., 2017). Esto lleva a una disminución de producción de citoquinas proinflamatorias, como el TNFα, pro-IL-1β, IL-6, IL-8 y el IFN-γ (García et al., 2015; Hardeland, 2018). La segunda diana

antiinflamatoria de la melatonina es la vía del inflamasoma NLRP3. Este inflamasoma se activa por el daño mitocondrial derivado de la activación de NF- κ B y la liberación al citosol de ADNmt y ROS de las mitocondrias. La activación del inflamasoma, a su vez, activa una caspasa 1 y ésta madura las citoquinas como la pro- IL-1 β , lo que condiciona un exceso de IL-1 β que, entre otros efectos, potencia la vía de NF- κ B, amplificando la respuesta inflamatoria. La melatonina, inactivando p65 y contrarrestando el daño mitocondrial, frena la activación del inflamasoma NLRP3 (PMID: 26045547). Estas propiedades de la melatonina la hacen la única molécula antiinflamatoria existente capaz de frenar completamente la inmunidad innata, lo que es fundamental en situaciones como la sepsis, como hemos demostrado en nuestro laboratorio (PMID: 36428216). A mayores, la melatonina potencia en estas situaciones la expresión de NRF2, un regulador transcripcional de enzimas antioxidantes (Rahim et al., 2020), que ayuda en la respuesta antiinflamatoria.

2.2 MELATONINA Y ENFERMEDAD DE PARKINSON

Desde hace unos 30 años se sabe que todas estas acciones antioxidantes y antiinflamatorias de la melatonina protegen frente a la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson, por mecanismos que reducen el estrés oxidativo y nitrosativo, la neuroinflamación, disminuyendo la iNOS y la nNOS (óxido nítrico sintasa neuronal) (Tapias et al., 2009), y la peroxidación lipídica en ratones parkinsonianos (Acuña-Castroviejo et al., 1996).

En modelos de parkinsonismo en ratones realizado en nuestro laboratorio mediante la administración de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina), la melatonina contrarrestó el fenotipo de dichos ratones, restableciendo la actividad

locomotora normal, además de restaurar a nivel molecular la actividad del complejo I inhibido por el MPTP, la actividad de la tirosina hidroxilasa y, por tanto, la función mitocondrial y la producción de dopamina. Todo ello se acompañó de un freno del proceso neuroinflamatorio (Khaldy et al., 2000; Khaldy et al., 2003; Acuña-Castroviejo et al., 1996); protegió frente a la apoptosis a las neuronas del mesencéfalo y de la fragmentación del ADN tanto en el mesencéfalo como en el cuerpo estriado (Ortiz et al., 2001). Además, junto con deprenil, un inhibidor de la MAO-B, se observó también un aumento de la actividad de TH, protección frente a la disminución de dopamina y por tanto una mejora de la actividad locomotora afectada por el Parkinson (Khaldy et al., 2000; Khaldy et al., 2003).

Para evaluar si estos efectos de la melatonina son universales en diferentes modelos de parkinsonismo, en nuestro laboratorio se empezó a estudiar la fisiopatología del Parkinson en el pez cebra. Para ello, se incubaron embriones de pez cebra con MPTP para evaluar el fenotipo y los trastornos moleculares. Se observó que el MPTP induce cambios muy similares en este modelo a los descritos en el ratón, con inhibición del complejo I mitocondrial, pérdida de tirosina hidroxilasa y producción de dopamina, neuroinflamación y alteraciones motoras típicas. La administración de melatonina restauró la actividad del complejo I y la expresión de los genes y proteínas que se encuentran mutados en la forma de Parkinson familiar, es decir, PARKIN, PINK1 y DJ-1 (Díaz-Casado et al., 2016). Se demostró por primera vez que la melatonina no sólo prevenía las alteraciones fisiopatológicas del parkinsonismo en el pez cebra, sino que también recuperaba dicho embrión una vez el fenotipo parkinsoniano se había establecido.

Igualmente, las enzimas antioxidantes afectadas en el Parkinson como GPx, GRd, SOD y el ciclo del glutatión, se recuperaron tras la administración de melatonina en embriones de pez cebra parkinsonianos (Díaz-Casado et al., 2017). Por primera vez también se demostró que los daños en las mitocondrias de dichos peces se recuperaban tras la administración de melatonina mediante la medida de la respiración mitocondrial *in vivo*, que llevaba al aumento de la producción de ATP (Díaz-Casado et al., 2017; López et al., 2017).

Se ha observado que la melatonina es capaz de contrarrestar el potencial de membrana disminuido en un modelo de Parkinson en *Drosophila* (Rasheed et al., 2023). Pero, además, la melatonina redujo la neuroinflamación al inhibir la activación del inflammasoma NLRP3 y la liberación de IL-1 β a través de SIRT1 en modelos *in vitro* e *in vivo* (Zheng et al., 2021).

Finalmente, se está estudiando el papel de la melatonina sobre los síntomas no motores de la enfermedad. Entre ellos se encuentran las alteraciones del sueño, las cuales son mejoradas por la melatonina gracias a su función pineal (Ma et al., 2022; Liguori et al., 2022).

2.3 MELATONINA Y GENES RELOJ

La producción rítmica de melatonina pineal está controlada por el fotoperiodo a través del reloj central situado en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo. Así, la melatonina pineal se libera a la circulación y ejerce su acción cronobiótica sobre todos los relojes periféricos del cuerpo, controlando los ritmos circadianos (Reiter, 1993).

Tanto el reloj central como los relojes periféricos están formados por un conjunto de genes llamados genes reloj. Estos genes codifican para dos proteínas activadoras,

BMAL1 y CLOCK, que dimerizan y se une a la región E-box del ADN activando la transcripción de otros genes reloj para inducir la síntesis citosólica de las proteínas reloj, PER y CRY, que forman homo y heterodímeros en el citosol siendo fosforilados y permitiendo su traslocación al núcleo donde se van acumulando a lo largo del día. Pero la proporción de PER depende de su degradación por una caseína quinasa, lo que regula el período del ritmo (PER indica período). PER:CRY se unen en el núcleo al heterodímero BMAL1:CLOCK, inhibiendo su actividad transcripcional. De esta forma dejan de inducir a PER y CRY, cerrando así el circuito. El complejo BMAL1:CLOCK también activa la transcripción de ROR- α y REV-erb, los cuales se trasladan al núcleo de manera independiente y se unen a la región RORE en el promotor del gen *bmal1*, alcanzando su concentración máxima al amanecer. Por un lado, ROR- α activan la expresión de BMAL1 y REV-erb la inhibe (figura 6) (Seménova et al., 2021).

Existe la evidencia de que la degradación de las proteínas reloj BMAL1, PER, CRY y REV-erb, y seguramente de los demás componentes del reloj, es llevada a cabo por el sistema ubiquitina-proteasoma (Gatfield and Schibler, 2007; Stojkovic et al., 2014). De hecho, se ha propuesto que la melatonina regula la degradación de las proteínas del reloj inhibiendo al proteasoma, ya que presenta bastantes similitudes con el inhibidor del proteasoma (Vriend and Reiter, 2014). Además, se sabe que la melatonina inhibe la actividad de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II (CaMKII) (Fukunaga et al., 2002), la cual regula la fosforilación del proteasoma (Jarome et al., 2013), por lo que podría ser la manera en la que la melatonina controle la degradación de las proteínas proporcionando estabilidad al ritmo.

Por otra parte, el dímero BMAL1:CLOCK activa la transcripción de AANAT por su unión a la región E-box del gen *aanat*, estimulando la producción de melatonina (Bell-Pedersen et al., 2005). Esta, a su vez, controla el reloj biológico de manera que funciona como un circuito de retroalimentación (Figura 6) (Cassone, 1990). Este ritmo circadiano presenta un período de 24 horas en los vertebrados.

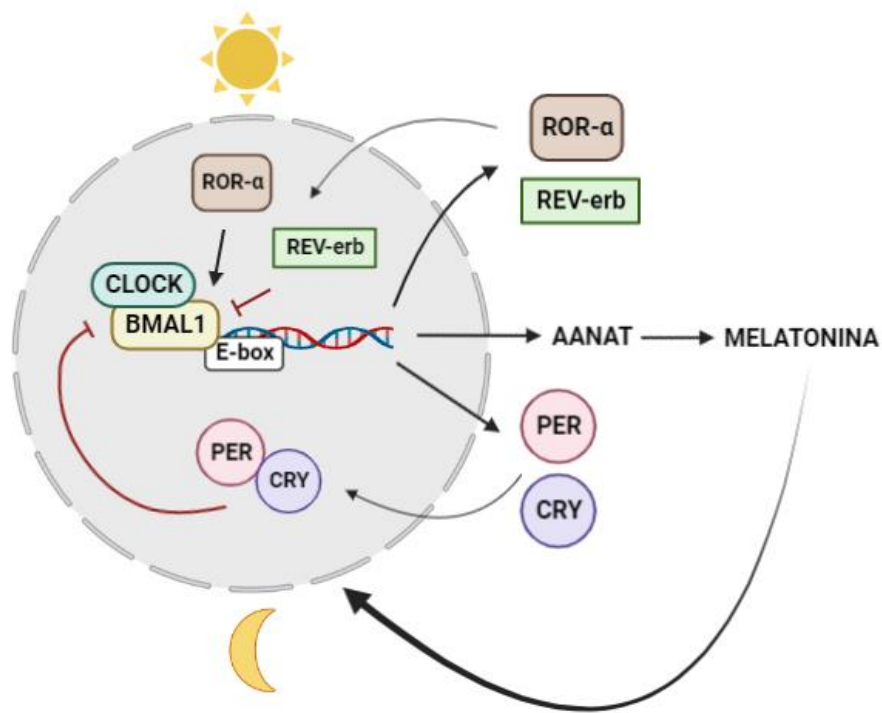


Figura 6. El reloj biológico está formado por los genes y proteínas reloj. CLOCK y BMAL1 forman un heterodímero y activan la transcripción de PER y CRY. Estos dimerizan y se translocan al núcleo donde inhiben la actividad de CLOCK:BMAL1 al final del día. También activan la transcripción de ROR- α y REV-erb, que entran al núcleo de forma independiente y activan e inhiben a BMAL1 respectivamente, al amanecer. Por otro lado, también se produce la transcripción las enzimas de síntesis de la melatonina, la cual regula a su vez el reloj biológico.

2.4 GENES RELOJ Y ENFERMEDAD DE PARKINSON

Son muchos los estudios que han observado alteraciones de los genes reloj en varios modelos animales de enfermedad de Parkinson (Hayashi et al., 2013; Li et al., 2017; Li et al., 2019; Mattam y Jagota, 2015; Tianbai et al., 2021). Se ha sugerido que

estas alteraciones pueden deberse a polimorfismos de un solo nucleótido de los genes reloj (Gu et al., 2015) y es, por tanto, un factor de riesgo para la enfermedad (Pang et al., 2019, Pihlstrøm et al., 2016). El trastorno del ritmo circadiano puede conducir a disfunción metabólica, aumento del estrés oxidativo y de inflamación (Maury, 2019), características fisiológicas de la enfermedad de Parkinson.

Los genes reloj regulan el metabolismo oxidativo a través de la vía NAMPT-NAD⁺-SIRT6, donde el NAD⁺ es necesario para la actividad de las SIRT6 (sirtuínas, desacetilasas dependientes de NAD⁺) (Peek et al., 2013) que regulan la acetilación/desacetilación de proteínas mitocondriales como el complejo I (Cela et al., 2016). Además, la SIRT1 controla la actividad transcripcional de BMAL1:CLOCK, inhibiendo este complejo y formando un ciclo de retroalimentación (Ramsey et al., 2009).

De igual forma, la dinámica mitocondrial y mitofagia están bajo el control de los genes reloj y presentan ritmicidad. Se ha observado en varios tejidos que la proteína de fisión mitocondrial FIS1, pero no DRP1, depende de BMAL1, y que esta influye también en la fusión mitocondrial pero de forma independiente de Mfn1, Mfn2 y Opa1 (Jacobi et al., 2015; Kohsaka et al., 2014). En cuanto a la mitofagia, PINK1 está regulado por BMAL1 e incluso se ha propuesto que pueda estar regulado también por la SIRT1 (Kang and Hwang 2009; Jang et al., 2012).

Las enzimas antioxidantes catalasa, SOD, GPx y glutatión transferasa (GST) poseen ritmos diarios lo que demuestra que están controlados por los genes reloj (Pablos et al., 1998). Por ello, una alteración de los genes reloj provoca un aumento de LPO y ROS (Wang et al., 2018).

Por último, los genes reloj están implicados en la regulación de la inflamación. Rev-erba controla la activación de la microglía (Griffin et al., 2020), mientras que la activación de los astrocitos depende de BMAL1 (Liu et al., 2020), y CRY regula la producción de citoquinas proinflamatorias y la señalización de NF-Kb (Narasimamurthy et al., 2012). Por lo que perturbaciones en estos genes potencian la neuroinflamación en la enfermedad de Parkinson.

Adicionalmente, la dopamina es un factor principal en la señalización de la luz y a través de su receptor D2R, media la activación del complejo BMAL1:CLOCK (Yujnovsky et al., 2006). La dopamina y sus metabolitos siguen un ritmo circadiano típico, bajo el control de la melatonina, tanto en la retina como en la sustancia negra (Khaldy et al., 2002).

Como hemos comentado anteriormente la EP cursa con aumento del estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y neuroinflamación, así como pérdida de la dopamina. Del mismo modo, los pacientes con Parkinson presentan alteraciones del sueño como uno de los síntomas no motores más predominantes (Braak and Del Tredici, 2008), ya que aparece al menos 10-15 años antes del diagnóstico. Esto principalmente se debe a la alteración del ritmo circadiano de la melatonina en ellos (Videnovic y Golombek, 2017).

3. EL PEZ CEBRA COMO MODELO EXPERIMENTAL

Danio rerio, comúnmente llamado pez cebra, es un pez teleosteo y de agua dulce, pertenecientes a la familia Cyprinidae, cuyo origen procede del sudeste asiático. En 1981 se introdujo por primera vez en el ámbito de la investigación gracias a George Streisinger (Streisinger et al., 1981).

El embrión de pez cebra a los 2 días post fertilización (dpf) posee los órganos totalmente formados y a los 5 dpf comienza a nadar, a capturar presas y a alimentarse. A los 3 meses de edad son sexualmente maduros y su esperanza de vida es de alrededor de 5 años. Esta especie presenta dimorfismo sexual, donde los machos son de menor tamaño que las hembras y poseen una tonalidad más dorada, y las hembras tienen un color más plateado.

3.1 VENTAJAS DEL USO DE PEZ CEBRA EN INVESTIGACIÓN

El pez cebra posee numerosas ventajas frente a otros modelos animales para su uso en la investigación. Howe y Clark, demostraron que hay gran similitud entre el genoma del pez cebra y el de los humanos ya que comparten el 71% de los genes y el 82% de los genes implicados en alguna enfermedad (Howe et al., 2013). Además, su genoma está completamente secuenciado. También comparte con los mamíferos los mismos mecanismos implicados en el desarrollo, envejecimiento y muerte. Por ello, la alta similitud genética y fisiológica entre el pez cebra y el ser humano ha sido de gran importancia para su uso en la investigación.

Una de las principales características que hacen al pez cebra muy útil para la investigación es su pequeño tamaño, porque lo hace más fácil de manipular y es mucho más económico puesto que requiere volúmenes más pequeños de los compuestos químicos y fármacos que son absorbidos desde el agua. Su desarrollo es extrauterino y muy rápido (Figura 7), y su capacidad reproductiva es elevada (se reproducen durante todo el año), lo que lo hace muy útil y práctico.

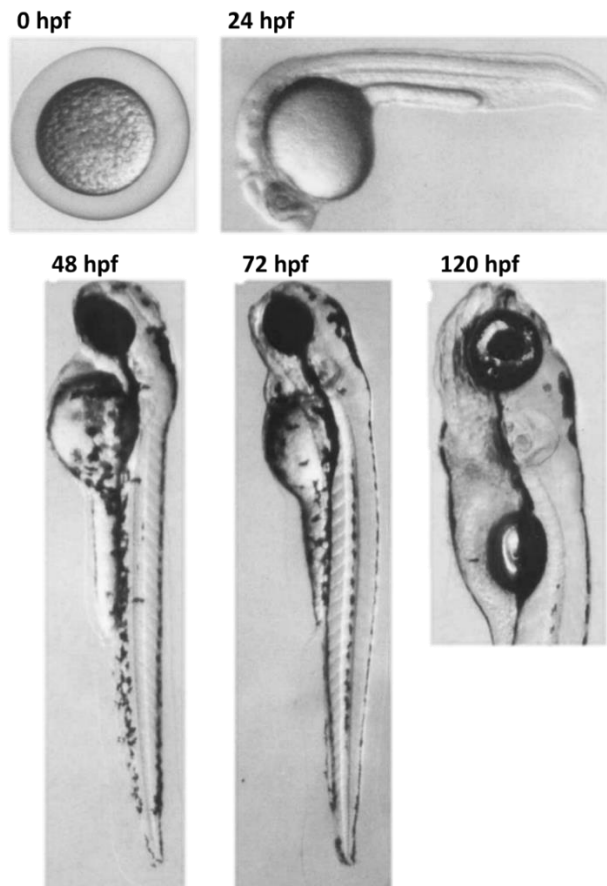


Figura 7. Desarrollo embrionario del pez cebra. A las 0 hpf se encuentra en estado de una célula denominada cigoto; a las 24 hpf, cuando es descorionizado, ya observamos el cerebro prominente; a las 48 y 72 hpf vemos la pigmentación y la disminución del saco vitelino y a las 120 hpf se contemplan la boca, la vesícula ótica y la vejiga natatoria inflada (Adaptada de Kimmel et al., 1995).

Además de la ventaja que ofrece su desarrollo extrauterino, los embriones son transparentes en las primeras etapas del desarrollo. Esta ventaja permite observar fluorescencia *in vivo* y el uso de microscopía confocal en la larva completa, sin necesidad de hacer secciones.

Pero la principal ventaja de su uso en investigación es el desarrollo de líneas transgénicas de peces mediante manipulación genética dirigida como el uso de morfolidos, la sobreexpresión de ARN, la transgénesis, el uso de nucleasas zinc-finger,

TALEN y CRISPR (Amsterdam and Becker, 2005; Meng et al., 2008; Moreno-Mateos et al., 2015; Nasevicius and Ekker, 2000; Shafizadeh et al., 2002a).

Aunque también existen algunas desventajas por ser un modelo relativamente nuevo. Una de ellas es la baja disponibilidad de anticuerpos testados frente a proteínas del pez cebra, pero este problema se solventa utilizando anticuerpos de mamíferos gracias a la alta similitud genética entre ellos. Por último, el genoma de peces teleósteos sufrió una duplicación a gran escala, de tal forma que poseen dos copias de algunos genes de mamíferos haciendo más difícil su estudio, aunque muchos de los genes duplicados han perdido su redundancia a lo largo de la evolución (Postlethwait et al., 1998).

Nuestro interés en el pez cebra viene dado por su desarrollo significativo como modelo de la enfermedad de Parkinson, ya que su sistema dopaminérgico está bien caracterizado y posee gran similitud con el de los seres humanos (Sallinen et al., 2009). Aunque el pez cebra no posee α -sinucleína, contiene tres genes llamados *sncb*, *sncga* y *sncgb* que expresan β -sinucleína y dos isoformas de γ -sinucleína respectivamente. Se ha observado que la γ -sinucleína tiene una función similar a la α -sinucleína humana y su sobreexpresión forma agregados dentro de las neuronas (O'Donnell et al., 2014; Lulla et al., 2016). El pez cebra cuenta también con PARKIN, PINK1 y DJ-1, con gran similitud genética y funcional con las proteínas de mamíferos. Una reducción en alguno de ellos produce efectos similares a la enfermedad de Parkinson, como disminución de neuronas dopaminérgicas, aumento de ROS, alteración morfológica y de actividad locomotora, daño mitocondrial, disminución de la actividad del complejo I, mayor susceptibilidad a la muerte celular inducida por estrés oxidativo, etc. (Doyle and Croll, 2022).

Todo ello hace del pez cebra un excelente modelo experimental para estudiar enfermedades humanas y cada vez más implantado en investigación.

3.2 EL MPTP: UNA NEUROTOXINA PARA INDUCIR PARKINSONISMO

El 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina o MPTP es una neurotoxina que deriva de la síntesis de la meperidina o heroína sintética. Es una molécula lipofílica que atraviesa la barrera hematoencefálica, pero por sí misma no tiene toxicidad. La toxicidad del MPTP se debe a la conversión en su metabolito MPP⁺ (ion 1-metil-4-fenilpiridina) por la MAO B (monoamino oxidasa) de neuronas serotoninérgicas, histaminérgicas y sobre todo de células gliales, que lo metaboliza a 1-metil-4-fenil-2, 3-dihidropiridio (MPDP⁺) que es muy inestable y rápidamente pasa a MPTP de nuevo, hidrogenándose o se desprotona a MPP⁺. Este metabolito estimula la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y la iNOS, que produce grandes cantidades de NO[•]. Sin embargo, el MPP⁺ es polar y no puede salir de las células gliales fácilmente, se cree que puede utilizar el transportador de las monoaminas, pero el mecanismo no está claro aún. Cuando el MPP⁺ sale al líquido extracelular es transportado por el transportador de la dopamina (DAT) a las terminales nerviosas de las neuronas dopaminérgicas, donde entra y se dirige a la mitocondria para inhibir el complejo I de la cadena de transporte de electrones (Figura 8) (Javitch and Snyder 1984; Nicklas et al., 1987. La consecuencia es la disfunción mitocondrial, producción de ROS y déficit de ATP (Jackson-Lewis and Smeyne, 2005), todo lo cual facilita la neuroinflamación y muerte de neuronas dopaminérgicas.

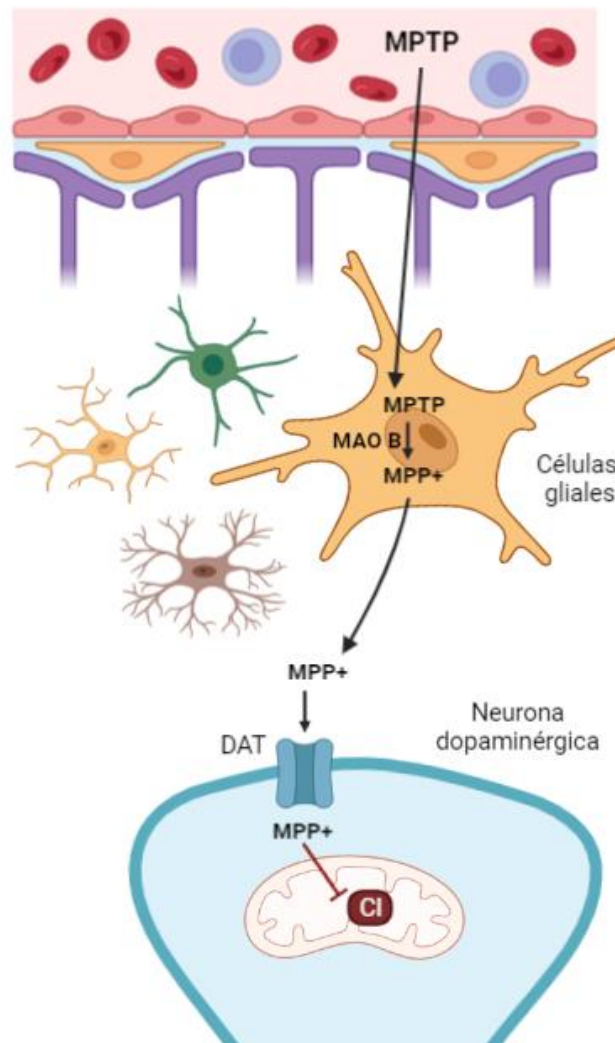


Figura 8. El MPTP atraviesa la barrera hematoencefálica y en las células gliales, la enzima MAO B lo convierte en MPP+, el cual sale al exterior por mecanismos que no se conocen aún. El MPP+ entra a las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT) y se dirige a la mitocondria donde inhibe el complejo I.

3.3 EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE PARKINSON

Los embriones de pez cebra son sensibles al MPTP, el cual produce un estado parkinsoniano con gran similitud al que se desarrolla en mamíferos. En nuestro grupo hemos observado que la administración de MPTP en embriones produce un aumento de la mortalidad de estos y también de malformaciones morfológicas como la aparición de oedema y malformaciones en el vitelo y en la cola (Díaz-Casado et al., 2017). También

encontramos una disminución de la actividad locomotora, tanto en la distancia recorrida como en la velocidad (Díaz-Casado et al., 2016).

El pez cebra parkinsoniano presenta una disminución de la actividad del complejo I, así como de la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH), la enzima clave en la síntesis de catecolaminas. Asimismo, los genes y proteínas cuyas mutaciones causan el Parkinson familiar, se vieron disminuidos, en concreto PARKIN, PINK1 y DJ-1. Por último, se estudió el gen *sncga* y la proteína codificada, la γ -sinucleína, detectando niveles muy elevados de ambos (Díaz-Casado et al., 2016).

De igual forma, el análisis de la respiración mitocondrial reveló una disminución de la respiración basal, de la capacidad máxima respiratoria y de la producción de ATP, junto con un aumento del escape de protones a la matriz mitocondrial (Díaz-Casado et al., 2017).

Finalmente, los embriones tratados con MPTP mostraron un elevado estado de estrés oxidativo, debido al aumento de la expresión de iNOS (Díaz-Casado et al., 2016) y alteración del ciclo del glutatión, con el aumento del GSSG y reducción del GSH. Además, se observó una disminución de la defensa antioxidante, con niveles bajos de GPx, GRd, SOD y también de melatonina (Díaz-Casado et al., 2017).

3.4 GENES RELOJ EN EL PEZ CEBRA

La glándula pineal está muy conservada en el pez cebra, se desarrolla muy temprano y a diferencia de los mamíferos, está formada por células fotorreceptoras (Korf et al., 1998) que funcionan como el reloj central (Falcón et al., 2003). Así, la glándula pineal recibe la información de la luz e impulsa la síntesis rítmica de melatonina, más alta durante la noche y más baja durante el día (Ziv et al., 2005).

En el pez cebra existen dos genes *aanat*, *aanat1* que se expresa en la retina y depende del fotoperiodo, y *aanat2* que se expresa en la glándula pineal, en la retina y en otros tejidos y está controlado por el reloj circadiano (Gothilf et al., 1999; Ziv et al., 2007). Esto demuestra que el pez cebra presenta síntesis de melatonina pineal y extrapineal. También se han encontrado los metabolitos de la melatonina, AFMK y AMK, en embriones de pez cebra (Díaz-Casado et al., 2017).

Acerca de los receptores de melatonina, el pez cebra contiene varios genes para *mtnr1a*: *mtnr1aa* y *mtnr1ab*, y para *mtnr1b*: *mtnr1bb* y *mtnr1ba*. Además, presenta otros dos tipos de receptores, *Mel1c* y el gen similar a *Mel1a* o *Mel1d*, que no se encuentran en mamíferos (Denker et al., 2019; Sakai et al., 2019). Los receptores de melatonina están implicados en el desarrollo del embrión y la proliferación celular, por lo que se expresan más durante el desarrollo que en el pez cebra adulto (Danilova et al., 2004).

El reloj circadiano en el pez cebra es más complejo que en otros vertebrados ya que posee varias copias de los genes reloj. Incluye tres genes *bmal*: *bmal1a*, *1b* y *2*, y tres genes *clock*: *clock1a*, *1b* y *2*. Las proteínas codificadas por estos genes forman heterodímeros en diferentes combinaciones con diferencias en la eficiencia de activación de la transcripción génica y en la susceptibilidad a ser inhibidas (Wang et al., 2008; Wang et al., 2009). Tanto *bmal1* como *clock* presentan ritmicidad, alcanzando su máxima producción después de la transición de luz a oscuridad (Vatine et al., 2011). Para *cry* se han encontrado seis genes: *cry1aa*, *1ab*, *1ba*, *1bb*, *2* y *3*. Por un lado, *cry1aa*, *cry1ab*, *cry1ba* y *cry1bb* son homólogos en secuencia y función de *cry* de mamíferos, es decir, se denominan *cry* represivo (RC) e inhiben al complejo BMAL1:CLOCK. Sin

embargo, *cry2* y *cry3* son *cry* no represivo (NRC), no reprimen al heterodímero y su función no se conoce todavía (Liu et al., 2015). Los genes *cry* también tiene diferencias en la expresión rítmica, de manera que *cry1aa* depende del fotoperiodo y los demás están regulados por el reloj. *Cry2* posee un pico de expresión por la mañana, *cry1aa*, *1ab* y *3* a medio día, y *cry1ba* y *1bb* por la noche (Kobayashi et al., 2000). Por último, existen dos homólogos de *per1*, *per1a* y *1b*, además de *per2* y *per3*, de los cuales, el único regulado por el fotoperiodo es *per2*. Al igual que en mamíferos, *per2* y *cry1*, dimerizan y funcionan juntos (Wang et al., 2008).

Los ritmos circadianos fisiológicos y de comportamiento en el pez cebra están altamente conservados y se desarrollan muy rápido, estableciéndose a los 4-5 dpf (Ben-Moshe et al., 2014). Entre ellos destaca el ritmo del ciclo celular durante el desarrollo embrionario (Dekens et al., 2003), el ritmo de actividad locomotora y sueño/vigilia que se establece a los 4 dpf (Elbazet al., 2013), la alimentación que comienza a los 5 dpf (Morbiato et al., 2019) y el ritmo reproductivo, el cual se encuentra muy influido por la luz (Blanco-Vives et al., 2009).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La EP cursa con alteraciones motoras y moleculares que se pueden resumir en: trastornos del ritmo locomotor, bradiquinesia y rigidez, junto con disfunción mitocondrial, neuroinflamación y pérdida de dopamina y de su ritmo. Todos estos fenómenos se suman al hecho de que alteraciones del ritmo de sueño son un signo precoz de la EP. Los genes reloj, además de regular los ritmos circadianos, controlan la expresión de numerosos genes relacionados con el control de la inflamación y función mitocondrial. Por ello, y dados los antecedentes antes mostrados, sugerimos que la alteración de los genes reloj puede estar relacionada con los fenómenos parkinsonianos indicados, y el restablecimiento del funcionamiento correcto del reloj biológico debe restablecer y/o contrarrestar las manifestaciones de la EP.

Objetivos

Objetivo Principal:

Evaluar la participación de los genes reloj en la enfermedad de Parkinson en el modelo de parkinsonismo inducido en embriones de pez cebra mediante su incubación con MPTP.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar la existencia de alteraciones en la expresión y/o ritmo circadiano de los genes reloj en el modelo de parkinsonismo en el embrión de pez cebra.
2. Evaluar si la alteración de los genes reloj produce una disfunción de la dinámica mitocondrial.
3. Evaluar si la alteración de los genes reloj produce cambios en las vías de autofagia y apoptosis.

4. Evaluar la capacidad de la melatonina para mejorar/contrarrestar el estado parkinsoniano en el pez cebra, gracias a la restauración del reloj biológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS

1.1 ANIMALES

Los peces cebra adultos (*Danio rerio*) de la línea AB usados en este trabajo se obtuvieron de ZFBIOLABS S.L (Madrid, España) y se mantuvieron en un sistema de recirculación de agua (Aquaneering Incorporated, Barcelona, España) en las instalaciones de la Universidad de Granada. Se establecieron $28,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para la temperatura del agua y un fotoperiodo de 14:10 hr de luz y oscuridad respectivamente (encendido de luces a las 08:00 hr, con un período de amanecer y anoecer de 30 minutos cada uno. El mantenimiento, alimentación y reproducción de los peces se realizó de acuerdo con los protocolos establecidos (Westerfield, 2007). Cuando fue necesario, la anestesia se realizó con metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (tricaina) a 15 mM y el sacrificio por exceso de sedación y decapitación. Se utilizaron peces cebra adultos como reproductores y los embriones se mantuvieron en una estufa a una temperatura de $28.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 14:10 hr y en medio E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl_2 , 0.33 mM MgSO_4). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud, la Convención Europea para la Protección de los Animales Vertebrados utilizados para Experimentación y Otros Fines Científicos (CETS # 123), y el Ley española de experimentación animal (R.D. 53/2013). El protocolo fue autorizado por el Comité Ético de Andalucía (#29/05/2020/068).

1.2 TRATAMIENTOS

Los embriones, a las 24 hpf (horas posteriores a la fecundación), se descorionizaron manualmente y se distribuyeron en una placa de 24 pocillos, repartiendo seis embriones por pocillo en 1 ml de medio E3. Así se mantuvieron los embriones hasta las 120 hpf y se administraron los tratamientos de MPTP (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y/o melatonina (Fagrón Ibérica, Barcelona, España). El MPTP se preparó en fresco a una concentración final de 600 μ M disuelto en medio E3, dosis observada que produce un estado parkinsoniano en los embriones (Díaz-Casado et al., 2016). Por otro lado, la melatonina (aMT) se utilizó a una dosis final de 1 μ M en medio E3, previamente disuelta en 1% de dimetilsulfóxido (DMSO). Cada día se renovó la mitad tanto del medio E3 como del tratamiento requerido. Por tanto, los grupos experimentales fueron los siguientes: 1) grupo control, sin tratamiento; 2) grupo aMT, tratada con melatonina desde 24 hpf hasta 120 hpf; 3) grupo MPTP, tratado con MPTP desde 24 hpf hasta 72 hpf; 4) grupo curativo MPTP+aMT₂, en el que se mantuvo MPTP de 24 hpf a 72 hpf y se administró melatonina de 72 hpf a 120 hpf y 5) grupo preventivo MPTP+aMT₅, en el que se mantuvo MPTP de 24 hpf a 120 hpf, y la melatonina se administró junto con MPTP a las 24 hpf y se mantuvo hasta las 120 hpf (Figura 9). A 120 hpf, los embriones se sacrificaron por exceso de tricaina.

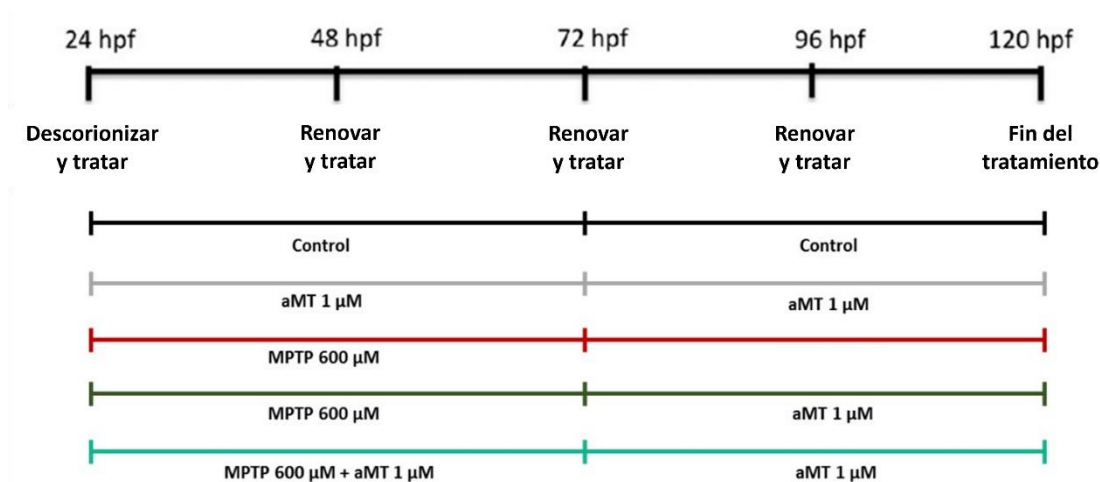


Figura 9. Esquema de las condiciones experimentales.

2. ANÁLISIS DEL RITMO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Los embriones de pez cebra a 120 hpf se dispusieron en una placa de 48 pocillos, a razón de un embrión por pocillo en 1 ml de medio E3 con o sin tratamiento. El experimento tuvo lugar durante 24 horas, con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, en el equipo ZebraBox (Viewpoint, Lyon, Francia) y se utilizó el modo “tracking live”. La noche anterior al inicio del experimento, se realizó el periodo de habituación. El umbral de detección fue 25 y se utilizó 0 mm/s como umbral de inactividad. La distancia total recorrida (mm) se registró cada 30 minutos y los datos se recopilaron con el software Zebralab.

3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MELATONINA

Los peces de 120 hpf se recolectaron al final del día (justo antes de que se apaguen las luces a las 22:00 hr) y al final de la noche (justo antes de que se enciendan las luces a las 08:00 hr) para el análisis de la concentración de melatonina por espectrometría UHPLC-MS/MS. La melatonina se extrajo de un homogenado de 20 peces en cloroformo en agitación durante 10 minutos. A continuación, se

centrifugó a 3500 rpm 10 minutos y se recogió la fase orgánica que se evaporó en un sistema SpeedVac a una presión de 5.1 Pa durante 50 minutos (SPD 2010 Speed Vac System; Fisher Scientific, Madrid, España). Posteriormente, se reconstituyó en 200 µL de acetonitrilo 5% en agitación durante 5 minutos. Se inyectaron 25 µl en el equipo UltiMate 3000 UHPLC (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) equipado con una columna de fase inversa Hypersil GOLD de 100 mm x 2,1 mm y 1,9 µm C18 (ThermoFisher Scientific, Madrid, España). La fase móvil utilizada consistió en agua con 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con 0,1% (v/v) de ácido fórmico (B). Se usó un gradiente lineal durante 7 min de 5 % a 98 % de B y se mantuvo en acetonitrilo al 98 % durante 2,1 min, seguido de 0,9 min de equilibrio a 5 % de B, lo que resultó en un tiempo de análisis total de 10 min. El flujo de la fase móvil fue de 0,4 ml/min y las temperaturas del automuestreador y del horno de columna fueron de 10 °C y 45 °C, respectivamente.

La melatonina se detectó por un espectrómetro de masas Orbitrap Q-Exactive Focus (ThermoFisher Scientific, Madrid, España), controlado por el software Xcalibur (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) en el modo de ionización por electrospray positivo (ESI). Se detectó melatonina protonada (m/z 233,12845) en un tiempo de retención de 3,98 min.

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

4.1 EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN se extrajo de un homogenado de 30 peces de 120 hpf mediante el kit RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany). Los embriones se homogenizaron en 350 µL de Buffer RLT Plus con β-mercaptoetanol al 1%, con un homogenizador

manual a motor siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para eluir el ARN, se utilizó un volumen final de 20 μ l, en dos pasos de 10 μ l cada uno. Para comprobar la integridad del ARN, se sometió a electroforesis en agarosa al 1,5% y posteriormente se cuantificó por densitometría óptica a 260/280 nm en NanoDrop (NanoDrop ND 1000 V3.5.2, NanoDrop Technologies, USA). Por último, el ARN se alicuotó y se guardó a -80°C para su retrotranscripción.

4.2 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA

Se procedió a generar el ADNc con el kit de transcripción inversa qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta bio, Beverly, Massachusetts, Estados Unidos) y se siguió el protocolo recomendado por la casa comercial. La reacción de transcripción inversa se realizó con 5 μ l de máster mix y 800 ng de ARN, añadiendo el volumen de agua libre de nucleasas correspondiente para obtener un volumen final de reacción de 20 μ l. El ADNc obtenido se disolvió en 20 μ l de agua libre de nucleasas para conseguir una concentración final de 20 ng/ μ l, se alicuotó y se guardó a -20°C.

4.3 RT-PCR CUANTITATIVA

La amplificación se realizó en el equipo Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, Madrid, España), mediante el kit PerfeCTa SYBR Green FastMix Low ROX (Quanta bio, Beverly, Massachusetts, Estados Unidos). Para la reacción se usaron 10 μ l de SYBR, primers forward y reverse a 10 μ M y una concentración de ADNc de 40 ng para un volumen final de 20 μ l. Los cebadores para cada gen se muestran en la Tabla 1. Se siguieron las especificaciones del fabricante para fijar las condiciones de la RT-PCR y como control endógeno se utilizó la β -actina.

Tabla 1. Secuencias directas e inversas de los cebadores utilizados para PCR

Gen	Forward primer	Reverse primer
<i>bmal1</i>	AGGGCAGCACCCTGAATAC	TCCCTTCCCAGTGTCTTGTC
<i>clock</i>	GCAAACATCCAGAGACAGCA	ACTCGGCTGCAGAAACATCT
<i>per2</i>	AGGCTTTGGGGAAAGTCAAT	GCAGAATATGGCGTCTGGAT
<i>cry1</i>	CACGCTCTACGATCTGGACA	GGAAGCGCTTATACGTGAGC
<i>rora</i>	TCGACCCTCAGAACAACACA	CCCAAACCTCGAAGACAGAGC
<i>rev-erba</i>	CCTCCCAAACACCTGAAAAA	CGCTGTTCATCTCTTGTCCTCA
<i>chrono</i>	CGGTTGTGGAGGTAGCATTT	GTGCTACAATGGCCGACTTT
<i>mfn1</i>	AACGAAGTGTGCTCTGCTCA	GGATTCAGAGTTCGCCACCA
<i>mfn2</i>	ACACATTTGCCACCTCTTCC	AGGCACGTGAGAGCCTAAAA
<i>opa1</i>	AGACTGGAAGCAGAGGTGGA	GGAAGTGACGTCGAAAGAGC
<i>drp1</i>	AACATCCAGGACAGCGTACC	TCACCACAAGTGCGTCTCTC
<i>dyn2</i>	CGCAGATAGCAGTTGTCCGA	TCTGCTTCAATCTCCTGCCG
<i>bax</i>	AACTGGGGAAGAGTTGTGGC	GGGTGCCAAAATAACTGCGG
<i>bcl-2</i>	CGAGTTTGGTGGGACCATGT	CGTACATCTCCACGAAGGCA
<i>p53</i>	GAATCCCCAAAACCTCCACGC	GGATGGCTGAGGCTGTTCTT
<i>lc3</i>	GGAGAGAAGCAACTGCCGAT	CCTGATTGGATGGGGAAGGG

5. ANÁLISIS DEL RITMO CIRCADIANO

El análisis de la ritmicidad de la expresión de los genes del reloj se realizó con un modelo de cosinor de un solo componente con el software Time Series Analysis-Serial Cosinor 6.3 Lab View (TSASC 6.3, Expert Soft Technologies Inc, BioMedical Computing and Applied Statistics Laboratory, Evreux, Francia). Para ello se

recogieron embriones en 8 puntos de tiempo, a lo largo de un período de 24 h (2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23 horas) que fueron usados para determinar la expresión de los genes reloj. El programa Cosinor calculó el MESOR (estadística de estimación de la línea media del ritmo, que refleja la media ajustada al ritmo), la amplitud (diferencia entre el mesor y el valor máximo o mínimo de la curva de coseno que mejor se ajusta) y la acrofase (tiempo período en el que se produce el pico de la curva del coseno). La detección del ritmo se consideró estadísticamente significativa con una $p < 0,05$ con límites de confianza del 95%. Si la amplitud es igual a cero, se confirma la hipótesis nula, es decir, no hay ritmo.

6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) se determinó la concentración de proteínas de las muestras. Se preparó una recta patrón como estándar con BSA, a concentraciones crecientes desde 0,05 hasta 0,6 mg/ml. Se añadieron 10 μ l de cada punto de la curva patrón y de cada muestra a una placa de 96 pocillos, por duplicado, y 200 μ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Posteriormente, se incubó durante 15 minutos protegida de la luz y en agitación suave. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro de placas (Bio Tek Power-Wavex Microplate Scanning Spectrophotometer) a una longitud de onda de 595 nm y los resultados se expresaron como mg de proteína/ml.

7. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

La extracción de proteínas se realizó de un homogenado de 60 peces de 120 hpf y se homogeneizaron con un homogenizador de mano a motor en una solución compuesta por: 50 mM Tris – HCl pH 7,6, 0,15 M NaCl, 1% Tritón 100X, 1 mM DTT,

1% EDTA 100X y 1% cóctel inhibidor de proteasas 100X (Thermo Scientific, Madrid, Spain). A continuación, se sonicaron las muestras en hielo durante 10 segundos al 35% y se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante de cada muestra para el análisis por western blot. De cada muestra se utilizaron 40 µg de proteínas que se mezclaron con tampón de carga (62,5 mM Tris – HCl, 2% SDS, 0,05% β-mercaptoetanol, 0,025% azul de bromofenol, 0,2% glicerol) y se llevaron al mismo volumen con tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). Las muestras ya preparadas se incubaron a 99°C durante 5 minutos y posteriormente a 4°C durante 5 minutos. La electroforesis se realizó en geles de acrilamida/bis-acrilamida con diferentes concentraciones (10 o 12%) según el peso molecular de la proteína, usando el sistema mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Madrid, España).

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVD-0,45 µm mediante el equipo mini Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con BSA 5% o leche 3% % en PBS con 0,1% Tween 20, en función del anticuerpo. Seguidamente se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en la solución de bloqueo correspondiente, a 4°C y en agitación durante toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados y las diluciones de estos se observan en la tabla 2. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora, y se usaron anti-rabbit (31460; Thermo Scientific, Madrid, España) y anti-mouse (554002; BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, EE. UU) a una dilución 1:1000 en ambos.

Por último, para la detección de la interacción proteína-anticuerpo se usó la solución Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Madrid, España) y se reveló en el

equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Madrid, España). Los datos se procesaron con el Image Lab Software (Bio-Rad, Madrid, España) y las proteínas detectadas se normalizaron con respecto a RPL13A, expresando los datos en relación al grupo control.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para western blot

Proteína	Dilución	Referencia	Fabricante
MFN2	1:500	TA344104	OriGene
OPA1	1:500	CPA3687	Cohesion biosciences
DRP1	1:500	PA-43802	Thermo Fisher scientific
BAX	1:100	sc-7480	Santa Cruz Biotechnology
P53	1:500	ab77813	Abcam
LC3	1:500	NB100-2220	Novus Biologicals
RPL13A	1:1000	ab96074	Abcam

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el software científico GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, Software, Inc. La Jolla, CA, USA). Los datos se expresaron como la media $\pm$ error estándar (SEM). Se utilizaron, según correspondiera, el *t* test no pareado, test ANOVA de una vía o de dos vías con un test *post hoc* de Tukey para comparar la media entre diferentes grupos experimentales. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Parte de los resultados mostrados en este apartado están recogidos en el siguiente trabajo publicado:

Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Rodríguez-Santana C, Rusanova I, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Chronodisruption and Loss of Melatonin Rhythm, Associated with Alterations in Daily Motor Activity and Mitochondrial Dynamics in Parkinsonian Zebrafish, Are Corrected by Melatonin Treatment. *Antioxidants* 2023; 12(4):954; doi: 10.3390/antiox12040954. Factor de impacto = 7.675, decil/cuartil: D1.

1. EL MPTP ATENÚA EL RITMO DIURNO/NOCTURNO DE MELATONINA, Y SE RESTABLECE CON EL TRATAMIENTO CON MELATONINA

El contenido diario de melatonina en embriones de pez cebra se analizó mediante espectrometría de masas (Figura 10). El grupo control tiene un ritmo típico de producción de melatonina endógena, aumentando significativamente por la noche. El pez cebra tratado con 1 μ M de melatonina (aMT) mostró un ritmo día/noche similar al control, aunque las concentraciones fueron lógicamente más altas. El contenido día/noche de melatonina se redujo significativamente en los embriones tratados con 600 μ M de MPTP en comparación con los controles, anulando también el ritmo de la indolamina, de forma similar a los pacientes con EP (Moustafa et al., 2016). La administración curativa de melatonina durante dos días (MPTP+aMT₂) contrarrestó totalmente la inhibición de la producción endógena de melatonina por parte del MPTP, restableciendo el ritmo día/noche a nivel del grupo aMT. Por su parte, el tratamiento preventivo con melatonina (MPTP+aMT₅) también aumentó significativamente sus niveles y contrarrestó totalmente los efectos del MPTP.

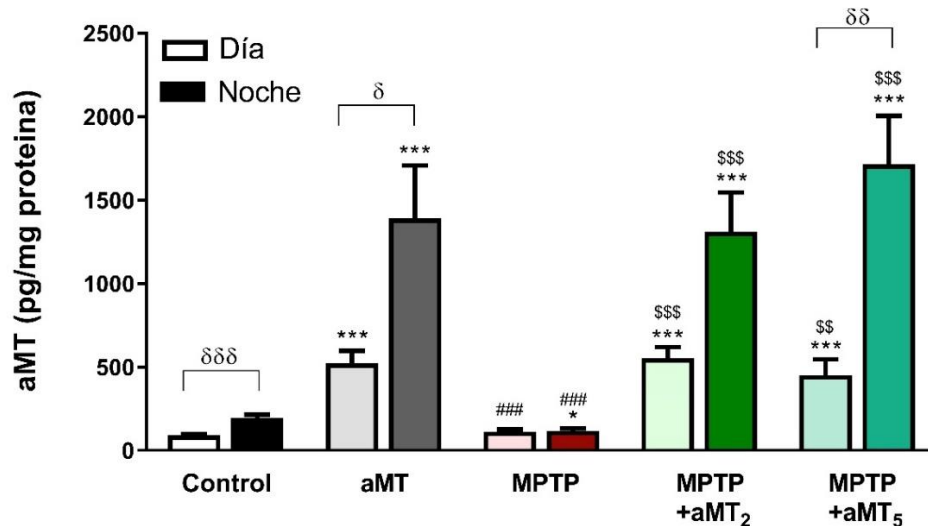


Figura 10. Niveles endógenos de melatonina en embriones de pez cebra durante el día (color claro) y durante la noche (color oscuro). Control, embriones no tratados; aMT, embriones controles tratados con melatonina 1 μM ; MPTP, embriones incubados con MPTP 600 μM ; MPTP+MT₂, embriones tratados con MPTP 600 μM de 24 hpf a 72 hpf más melatonina 1 μM de 72 hpf a 120 hpf; MPTP+aMT₅, embriones tratados con MPTP 600 μM de 24 hpf a 72 hpf más 1 μM de 24 hpf a 120 hpf. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. *** $P < 0.001$ v. control; #### $P < 0.001$ v. aMT; \$\$ $P < 0.01$ v. MPTP; \$\$\$ $P < 0.001$ v. MPTP; δ $P < 0.05$ v. día; $\delta\delta$ $P < 0.01$ v. día; $\delta\delta\delta$ $P < 0.001$ v. día. *t* test no pareado.

2. LA MELATONINA RESTAURA EL RITMO DE ACTIVIDAD MOTORA INTERRUMPIDO POR MPTP

Debido a que las habilidades motoras se ven afectadas en la EP (Moustafa et al., 2016), analizamos aquí si dicha actividad se afectó por MPTP en embriones de pez cebra. Los grupos control y aMT muestran un ritmo de actividad diurno/nocturno típico, con baja actividad por la noche (parte sombreada del gráfico) (Figs. 11A y B, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento con melatonina redujo la actividad de los embriones control durante el día (Fig. 11F). MPTP produjo un avance de la actividad hacia la fase de sueño y antes del encendido de las luces (Fig. 11C). En consecuencia, la distancia recorrida por los embriones, aunque disminuye durante el día, aumenta durante la noche en el grupo de MPTP en comparación con los

grupos control y aMT (Fig. 11F y G, respectivamente). Tanto los tratamientos curativos (aMT₂) como preventivos (aMT₅) con melatonina restauraron el ritmo de actividad locomotora a los valores control (Fig. 11D y E, respectivamente). Estos efectos se reflejan en la recuperación y normalización de las distancias recorridas de día y de noche por los embriones (Fig. 11F y G).

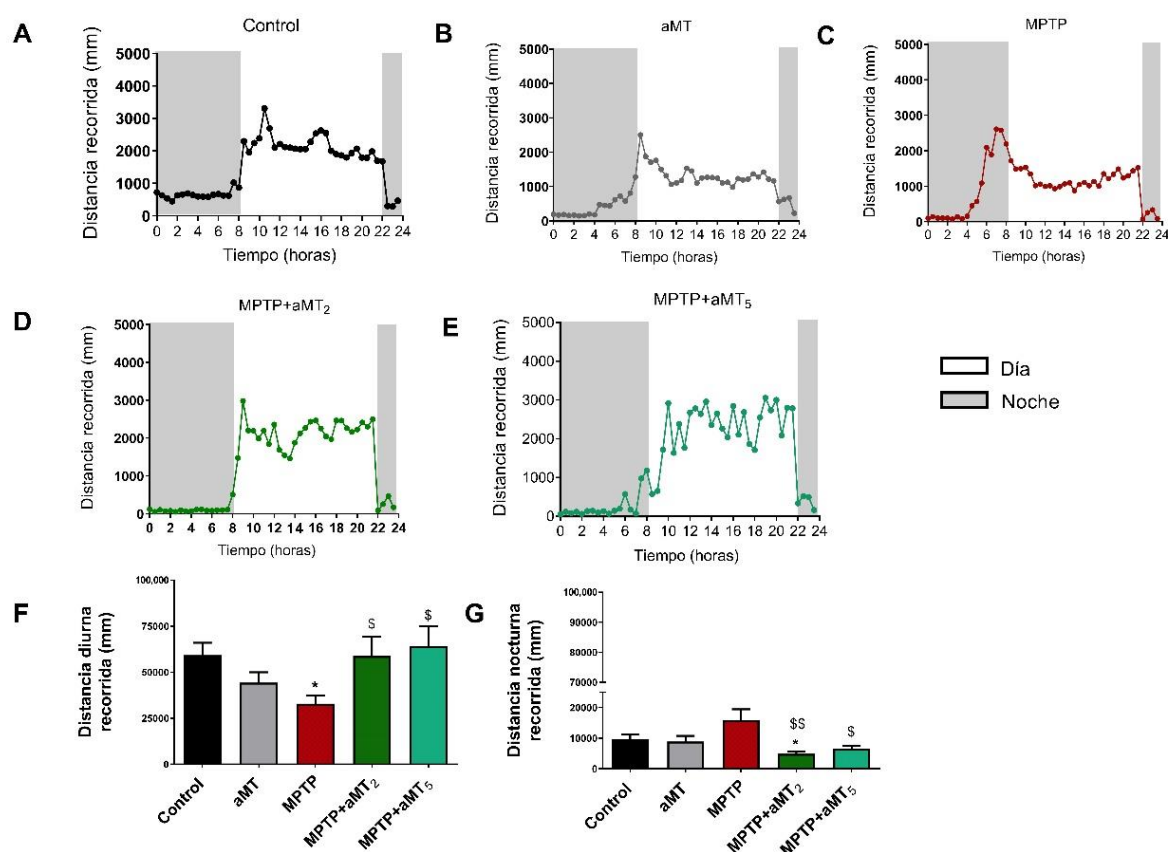


Figura 11. Distancia total recorrida durante 24 horas por embriones de pez cebra. Las condiciones de luz y oscuridad (parte sombreada) son 14:10 h respectivamente. (A) grupo control; (B) grupo aMT; (C) grupo MPTP; (D) grupo MPTP+aMT₂; (E) grupo MPTP+aMT₅; (F) distancia total recorrida durante el día y (G) distancia total recorrida durante la noche. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ v. control; $^{\$}$ $P < 0.05$ v. MPTP; $^{\$ \$}$ $P < 0.01$ v. MPTP. *t* test no pareado.

3. EL MPTP ALTERA EL RITMO CIRCADIANO DE LOS GENES RELOJ, QUE SE NORMALIZA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA

Las alteraciones en los niveles de melatonina diurna/nocturna y en el ritmo de actividad motora en embriones de pez cebra parkinsonianos pueden ser la base de la existencia de un proceso de cronodisrupción. Para obtener más información sobre este fenómeno, analizamos la expresión de los genes del reloj a diferentes horas durante un período de 24 h en los mismos grupos experimentales de embriones de pez cebra. EL ritmo de los genes reloj se muestra en la Figura 12, y los datos estadísticos del análisis del cosinor de los ritmos de los genes del reloj, incluido el porcentaje de los ritmos y la significancia, se muestran en la Tabla 3.

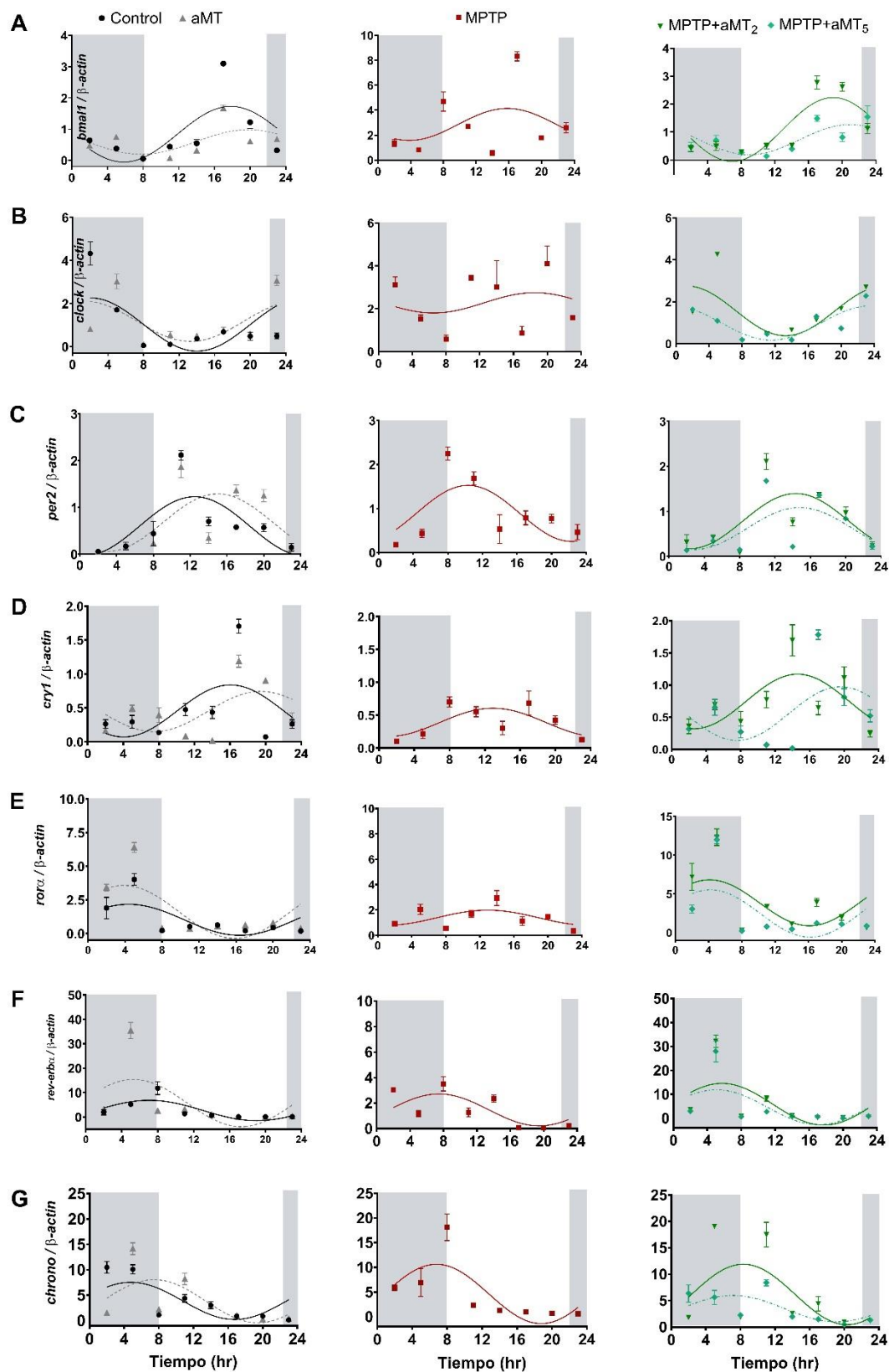


Figura 12. Expresión relativa de los genes reloj: (A) *bmal1*, (B) *clock*, (C) *per2*, (D) *cry1*, (E) *rora*, (F) *rev-erba*, y (G) *chrono* en control, tratamiento con aMT, MPTP y MPTP+aMT de embriones de pez cebra. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM.

Tabla 3. Análisis Cosinor de los genes reloj

Transcrito	Grupo	p	PR	Acrofase (hr)	Mesor	Amplitud
<i>bmal1</i>	Control	0,0013	47,04%	18,87 (16,93-20,73)	0,835 (0,531-1,14)	0,892 (0,463-1,32)
	aMT	0,0129	33,95%	20,80 (18,20-23,47)	0,586 (0,409-0,762)	0,394 (0,145-0,643)
	MPTP	0,2129	13,70%	16,80 (12,53-21,13)	2,86 (1,83-3,89)	1,28 (-0,179-2,74)
	MPTP+aMT ₂	0,0000	68,64%	20,07 (18,87-21,20)	1,07 (0,823-1,32)	1,15 (0,795-1,50)
	MPTP+aMT ₅	0,0063	38,32%	21,47 (19,13-23,80)	0,676 (0,491-0,861)	0,454 (0,193-0,716)
<i>clock</i>	Control	0,0041	40,81%	3,01 (0,81-5,22)	1,03 (0,550-1,51)	1,24 (0,561-1,91)
	aMT	0,0033	42,04%	2,25 (0,11-4,40)	1,10 (0,722-1,49)	1,01 (0,473-1,55)
	MPTP	0,7323	2,92%	18,47 (15,33-21,60)	2,26 (1,56-2,96)	0,379 (-0,611-1,37)
	MPTP+aMT ₂	0,0263	29,28%	2,03 (0,96-5,02)	1,61 (0,980-2,24)	1,26 (0,371-2,15)
	MPTP+aMT ₅	0,0013	46,78%	0,62 (-2,55-1,31)	0,872 (0,663-1,08)	0,610 (0,315-0,906)
<i>per2</i>	Control	0,0018	45,08%	13,87 (11,87-15,87)	0,558 (0,331-0,786)	0,643 (0,321-0,965)
	aMT	0,0195	31,28%	16,00 (13,13-18,80)	0,677 (0,400-0,953)	0,581 (0,190-0,972)
	MPTP	0,0083	36,64%	10,60 (8,20-13,07)	0,801 (0,560-1,04)	0,571 (0,230-0,911)
	MPTP+aMT ₂	0,0019	44,88%	15,33 (13,27-17,33)	0,780 (0,539-1,02)	0,680 (0,338-1,02)
	MPTP+aMT ₅	0,0141	33,36%	15,80 (13,13-18,47)	0,616 (0,404-0,827)	0,467 (0,168-0,767)
<i>cry1</i>	Control	0,0256	29,46%	17,07 (14,07-20,00)	0,455 (0,265-0,646)	0,384 (0,114-0,653)
	aMT	0,0291	28,59%	20,47 (17,40-23,53)	0,446 (0,296-0,597)	0,298 (0,0841-0,511)
	MPTP	0,0493	24,92%	13,80 (10,33-17,27)	0,394 (0,279-0,508)	0,205 (0,0436-0,367)
	MPTP+aMT ₂	0,0044	40,31%	14,80 (12,53-17,00)	0,720 (0,555-0,886)	0,423 (0,190-0,657)
	MPTP+aMT ₅	0,0254	29,51%	20,60 (17,60-23,53)	0,556 (0,349-0,763)	0,418 (0,125-0,711)
<i>rora</i>	Control	0,0042	40,63%	5,41 (3,19-7,60)	1,01 (0,568-1,46)	1,15 (0,520-1,79)
	aMT	0,0017	45,45%	4,85 (2,87-6,87)	1,60 (0,912-2,30)	1,97 (0,990-2,95)
	MPTP	0,1753	15,28%	13,93 (9,27-18,67)	1,38 (0,961-1,80)	0,555 (-0,0381-1,15)
	MPTP+aMT ₂	0,0331	27,72%	5,11 (1,97-8,27)	3,85 (2,31-5,38)	2,96 (0,792- 5,14)
	MPTP+aMT ₅	0,0254	29,51%	5,59 (2,53-8,67)	2,37 (0,945-3,79)	2,78 (0,830-4,74)
<i>rev-erba</i>	Control	0,0005	51,14%	7,80 (6,05-9,53)	2,48 (1,30-3,66)	3,77 (2,10-5,44)
	aMT	0,0120	34,37%	6,25 (3,66-8,87)	5,53 (1,39-9,68)	9,35 (3,49-15,2)
	MPTP	0,0040	40,91%	8,27 (6,05-10,47)	1,40 (0,966-1,84)	1,14 (0,516-1,75)
	MPTP+aMT ₂	0,0243	29,81%	8,47 (5,62-11,33)	6,73 (2,73-10,7)	8,32 (2,50-14,1)
	MPTP+aMT ₅	0,0251	29,59%	5,93 (2,97-8,87)	4,55 (0,820-8,29)	7,54 (2,26-12,8)
<i>chrono</i>	Control	0,0029	42,65%	5,60 (3,39-7,80)	3,74 (2,36-5,13)	3,62 (1,72-5,53)
	aMT	0,0044	40,37%	8,40 (6,15-10,60)	3,95 (2,24-5,66)	4,38 (1,97-6,80)
	MPTP	0,0003	54,61%	7,80 (6,19-9,47)	5,12 (3,09-7,16)	6,96 (4,08-9,84)
	MPTP+aMT ₂	0,0266	29,22%	9,60 (6,59-12,60)	6,22 (3,39-9,06)	5,68 (1,67-9,69)
	MPTP+aMT ₅	0,0170	32,18%	7,60 (4,87-10,40)	3,48 (2,29-4,66)	2,55 (0,870-4,23)

Con respecto a los genes reguladores, el grupo control muestra un ritmo de *bmal1* que no se modificó con aMT (Tabla 4) pero se redujo después de la administración de MPTP (Figura 12). Ambos tipos de tratamientos con melatonina, aMT₂ y aMT₅, recuperaron el ritmo de *bmal1* normal (Figura 12). No hubo diferencias significativas relevantes entre ambos tratamientos con melatonina y con los grupos control y aMT (Tabla 4).

Tabla 4. Transcrito: *bmal1*. Test post-hoc: Tukey, comparación múltiple de las medias

Tratamientos	P valor							
	2h	5h	8h	11h	14h	17h	20h	23h
Control vs aMT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.001	ns
Control vs MPTP	ns	ns	P < 0.001	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	P < 0.001
Control vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.05	P < 0.01	ns
aMT vs MPTP	ns	ns	P < 0.001	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	P < 0.01
aMT vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.001	ns
aMT vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	P < 0.001	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	P < 0.05
MPTP vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	P < 0.001	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	ns
MPTP+aMT ₂ vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.05	P < 0.01	ns

El ritmo en el otro gen regulador, *clock*, también se detectó en el grupo de control (Figura 12) y tampoco se vio afectado por aMT (Tabla 5). Al igual que con *bmal1*, con el tratamiento con MPTP se pierde el ritmo de *clock* (Figura 12), invirtiendo sus valores durante el día (Tabla 5). Aquí, las terapias con melatonina restauraron el ritmo de *clock* a los valores de los grupos control y aMT (Figura 12).

Tabla 5. Transcrito: *clock*. Test post-hoc: Tukey, comparación múltiple de las medias

Tratamientos	P valor							
	2h	5h	8h	11h	14h	17h	20h	23h
Control vs aMT	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.05
Control vs MPTP	ns	ns	ns	P < 0.01	P < 0.05	P < 0.001	P < 0.001	ns
Control vs MPTP+aMT ₂	P < 0.05	P < 0.05	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP+aMT ₅	P < 0.05	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP	P < 0.05	ns	ns	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.001	P < 0.001	ns
aMT vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₂	ns	P < 0.01	ns	P < 0.01	P < 0.05	P < 0.001	P < 0.05	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.001	P < 0.001	ns
MPTP+aMT ₂ vs MPTP+aMT ₅	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Los genes inhibidores, *per2* y *cry1*, también expresan ritmos. El grupo de control muestra un ritmo de *per2* significativo (Figura 12). Aquí, aMT y, a diferencia de los genes anteriores, los tratamientos con MPTP mantuvieron el ritmo, aunque este último indujo un aumento de la expresión génica significativa por la mañana (Tabla

6). La administración de melatonina a embriones tratados con MPTP normalizó el ritmo (Tabla 6).

Tabla 6. Transcrito: *per2*. Test post-hoc: Tukey, comparación múltiple de las medias

Tratamientos	P valor							
	2h	5h	8h	11h	14h	17h	20h	23h
Control vs aMT	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.01	P < 0.01	ns
Control vs MPTP	ns	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.01	ns	ns
Control vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	P < 0.05	ns	P < 0.01	ns	P < 0.001
aMT vs MPTP	ns	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.05	P < 0.001
MPTP vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns
MPTP+aMT ₂ vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	P < 0.05	ns	ns	ns	P < 0.01

El otro inhibidor, *cry1*, también mostró ritmo en el grupo control y se mantuvo después del tratamiento con aMT o MPTP (Figura 12), aunque con algunas diferencias en ciertos puntos del día (Tabla 7). Los tratamientos preventivos y curativos con aMT refuerzan estos ritmos (Tabla 7).

Tabla 7. Transcrito: *cry1*. Test post-hoc: Tukey, comparación múltiple de las medias

Tratamientos	P valor							
	2h	5h	8h	11h	14h	17h	20h	23h
Control vs aMT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.001
Control vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.001
aMT vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.001
MPTP vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MPTP+aMT ₂ vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P < 0.001

El gen modulador, *rorα*, muestra ritmo en los embriones control, que no se vio afectado después del tratamiento con aMT (Figura 12 y Tabla 8). MPTP amortigua e invierte el ritmo, lo que da como resultado la ausencia de este, pero se restableció con ambas terapias de aMT.

Tabla 8. Transcrito: *rorα*. Test post-hoc: Tukey, comparación múltiple de las medias

Tratamientos	P valor							
	2h	5h	8h	11h	14h	17h	20h	23h
Control vs aMT	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP	ns	ns	ns	ns	P < 0.001	ns	ns	ns
Control vs MPTP+aMT ₂	P < 0.001	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	ns
Control vs MPTP+aMT ₅	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP	ns	P < 0.001	ns	ns	P < 0.01	ns	ns	ns
aMT vs MPTP+aMT ₂	P < 0.001	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	ns
aMT vs MPTP+aMT ₅	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₂	P < 0.001	P < 0.001	ns	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.001	ns	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₅	ns	P < 0.001	ns	ns	P < 0.001	ns	ns	ns
MPTP+aMT ₂ vs MPTP+aMT ₅	P < 0.001	ns	ns	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	ns

Los embriones controles también tenían un ritmo significativo del otro gen modulador, *rev-erba* que se mantuvo después de los tratamientos con aMT y MPTP, aunque este último disminuye la expresión del gen (Figura 12 y Tabla 9). El ritmo de *rev-erba* en el grupo MPTP se restauró al valor control después de los tratamientos curativos y preventivos con aMT.

Tabla 9. Transcrito: *rev-erba*. Test post-hoc: Tukey, comparación múltiple de las medias

Tratamientos	P valor							
	2h	5h	8h	11h	14h	17h	20h	23h
Control vs aMT	ns	P < 0.001	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP	ns	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP+aMT ₂	ns	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP+aMT ₅	ns	P < 0.001	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP+aMT ₂	ns	P < 0.001	ns	P < 0.01	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP+aMT ₅	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₂	ns	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₅	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MPTP+aMT ₂ vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	ns	P < 0.01	ns	ns	ns	ns

Por último, observamos el ritmo del modulador *crono* en los embriones de control, que se vio mínimamente afectado por los tratamientos con aMT y MPTP (Figura 12 y Tabla 10). Ambos tratamientos aMT en embriones MPTP mantienen el ritmo normal de *crono*.

Tabla 10. Transcrito: *chrono*. Test post-hoc: Tukey, comparación múltiple de las medias

Tratamientos	P valor							
	2h	5h	8h	11h	14h	17h	20h	23h
Control vs aMT	P < 0.01	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	P < 0.05
Control vs MPTP+aMT ₂	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.001	P < 0.001	ns	ns	ns	ns
Control vs MPTP+aMT ₅	ns	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP	P < 0.001	P < 0.001	ns	P < 0.05	ns	ns	ns	P < 0.05
aMT vs MPTP+aMT ₂	ns	ns	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns
aMT vs MPTP+aMT ₅	ns	P < 0.01	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₂	P < 0.001	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns
MPTP vs MPTP+aMT ₅	P < 0.001	ns	ns	P < 0.01	ns	ns	ns	ns
MPTP+aMT ₂ vs MPTP+aMT ₅	ns	P < 0.001	ns	P < 0.001	ns	ns	ns	ns

4. CAMBIOS EN LA ACROFASE DE LOS RITMOS DE LOS GENES DEL RELOJ EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA DEBIDO A TRATAMIENTOS CON MPTP Y/O MELATONINA

El análisis de cosinor de la acrofase de los ritmos de los genes del reloj se representa en la Tabla 3 y gráficamente en la Figura 13.

La acrofase en *bmal1* alcanzó su punto máximo a las 19:00 h en el grupo control, y no se modificó significativamente con aMT. Sin embargo, la acrofase se retrasó ligeramente con MPTP, mientras que los embriones tratados con MPTP que se les administró melatonina, restablecieron la acrofase al control.

La acrofase de *clock* ocurre a las 03:00 h en los embriones del grupo control y se mantuvo después del tratamiento con aMT. El tratamiento con MPTP, en cambio, provocó un retraso de fase significativo hasta las 18:00 h, que se recuperó mediante las terapias con aMT.

Los embriones control muestran una acrofase para *per2* a las 14:00 h, y se mantiene después de la administración de aMT, mientras que los embriones con

MPTP presentan un ligero avance de fase no significativo a las 10:00 h. Las terapias con aMT en embriones tratados con MPTP restauraron absolutamente la acrofase del ritmo.

La acrofase de *cry1* ocurrió a las 17:00 h en los controles y la melatonina indujo un avance de fase no significativo a las 20:00 h. En este caso, MPTP produce un retraso de fase con un pico de ritmo a las 14:00 h, que se restableció a la acrofase de los controles después de las terapias con aMT.

En cuanto a *rora*, su ritmo alcanzó su punto máximo a las 06:00 h en los controles y en los embriones tratados con aMT, adelantándose a las 13:00 h después de la administración de MPTP. Ambas terapias con aMT restauraron la acrofase de los embriones tratados con MPTP.

La acrofase de *rev-erba* se produce a las 08:00 h y se adelantó ligeramente a las 06:00 h después de la administración de aMT. En este caso, ni el MPTP ni la administración de aMT modificaron significativamente la acrofase.

La acrofase de *crno* sólo muestra mínimos cambios entre todos los grupos.

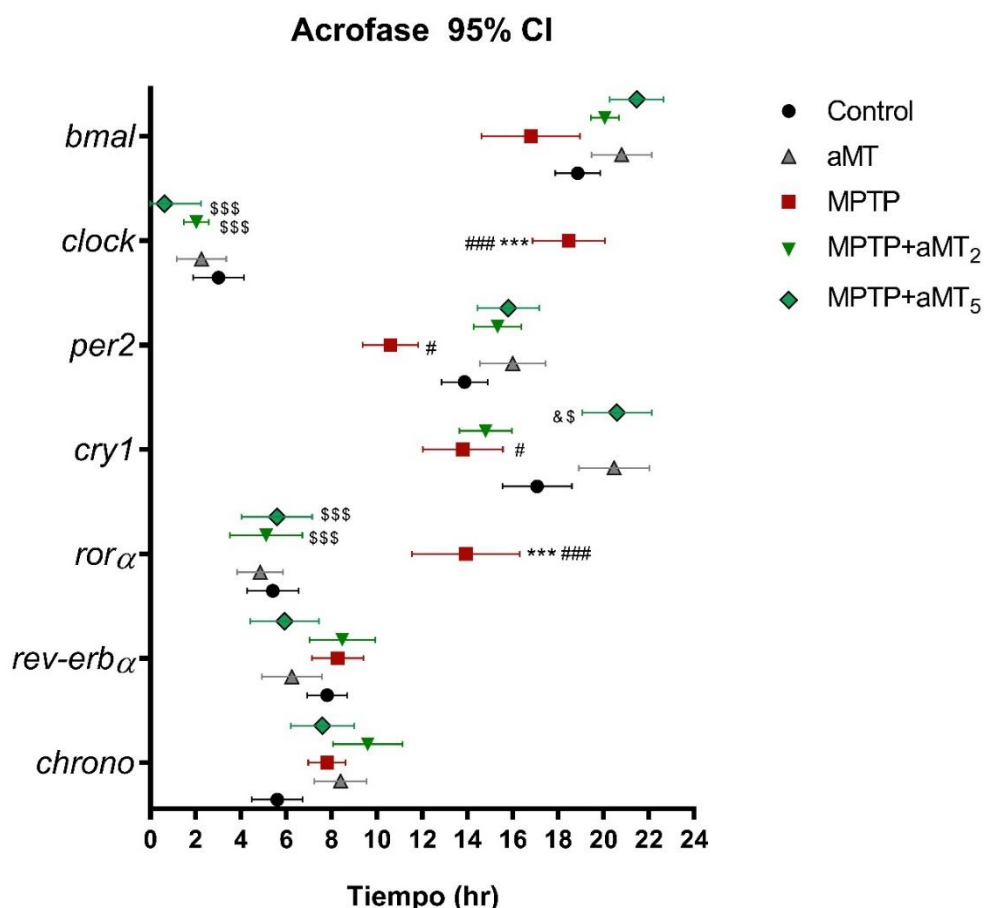


Figura 13. Representación gráfica de las acrofases de los genes reloj estudiados. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM. # $P < 0,05$ v. aMT; ### $P < 0,001$ v. aMT; \$ $P < 0,05$ v. MPTP; \$\$\$ $P < 0,001$ v. MPTP+aMT₂; &\$ $P < 0,05$ v. MPTP+aMT₅. ANOVA de 2 vías y test post hoc de Tukey.

5. CAMBIOS EN EL MESOR DEL RITMO DE LOS GENES DEL RELOJ EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA DEBIDO A TRATAMIENTOS CON MPTP Y/O MELATONINA

El análisis de cosinor del MESOR de los ritmos de los genes del reloj se representa en la Tabla 3 y gráficamente en la Fig. 6. Los valores del MESOR del grupo control de *bmal1* y *clock* no se modificaron por aMT, pero aumentaron después de la administración de MPTP, restableciéndose tras las terapias con aMT (Figura 14). Por

el contrario, el MESOR de *per2* y *cry1* no cambiaron con ningún tratamiento (Figura 14).

Encontramos que el MESOR de *rorα* fue levemente mayor en los grupos de MPTP tratados con melatonina (Figura 14). Además, el control y el grupo de MPTP mostraron una disminución en el MESOR de *rev-erbα* frente a los tratamientos con melatonina, siendo significativa con respecto al grupo aMT (Figura 14). Por último, ninguno de los tratamientos afectó significativamente el MESOR de *crono* (Figura 14).

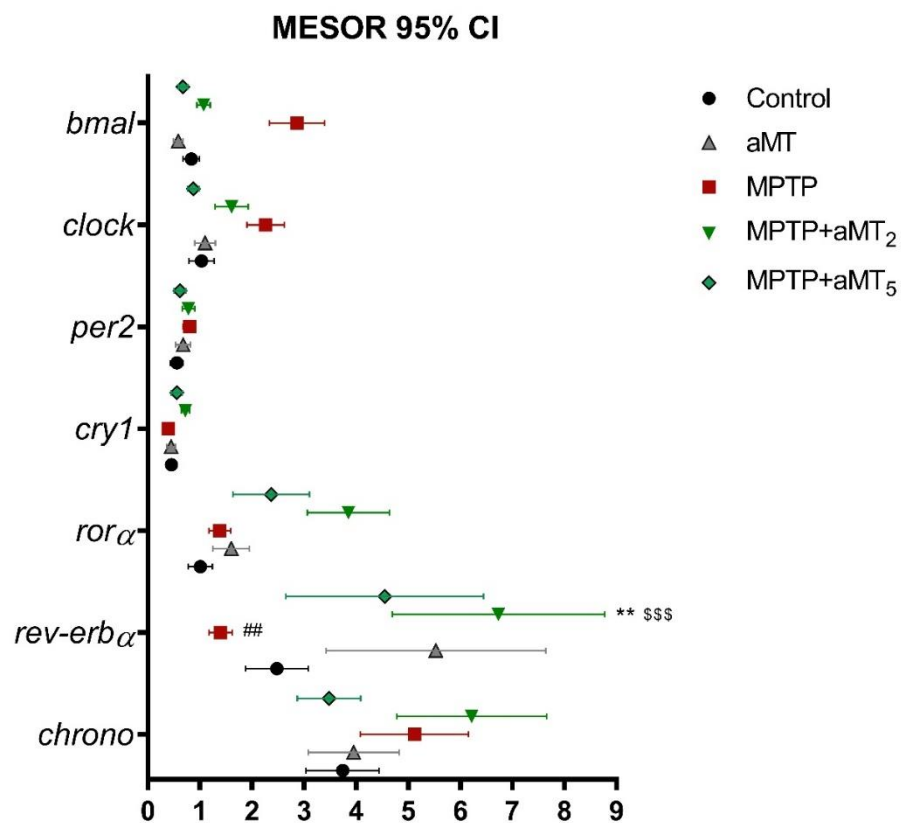


Figura 14. Presentación gráfica del MESOR. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM. ** $P < 0,01$ v. control; ## $P < 0,01$ v. aMT; \$\$\$ $P < 0,001$ v. MPTP. ANOVA de 2 vías y test post hoc de Tukey.

6. CAMBIOS EN LA AMPLITUD DEL RITMO DE LOS GENES DEL RELOJ EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA DEBIDO A TRATAMIENTOS CON MPTP Y/O MELATONINA

El análisis de cosinor de la amplitud de los ritmos de los genes del reloj se representa en la Tabla 3 y gráficamente en la Figura 14. Se encontraron resultados similares a los observados en el análisis del MESOR. La administración de MPTP provocó cambios en la amplitud de *bmal1* y *clock* con respecto al grupo control y los tratamientos de melatonina, pero no significativos (Figura 15). Sin embargo, no hubo diferencias entre los grupos en la amplitud de *per2* y *cry1* (Figura 15). En cuanto a la amplitud de *rora*, el MPTP produjo una leve disminución en comparación con el control y el grupo de aMT, y, por el contrario, ambos tratamientos con melatonina la aumentaron ligeramente (Figura 15). Por su parte, *rev-erba* presentó una amplitud significativamente menor en el grupo control y MPTP frente a aMT, además el grupo con MPTP frente a sus equivalentes más melatonina también presentaron diferencias significativas (Figura 15). Finalmente, la amplitud de *crno* no tuvo diferencias significativas entre ningún grupo (Figura 15).

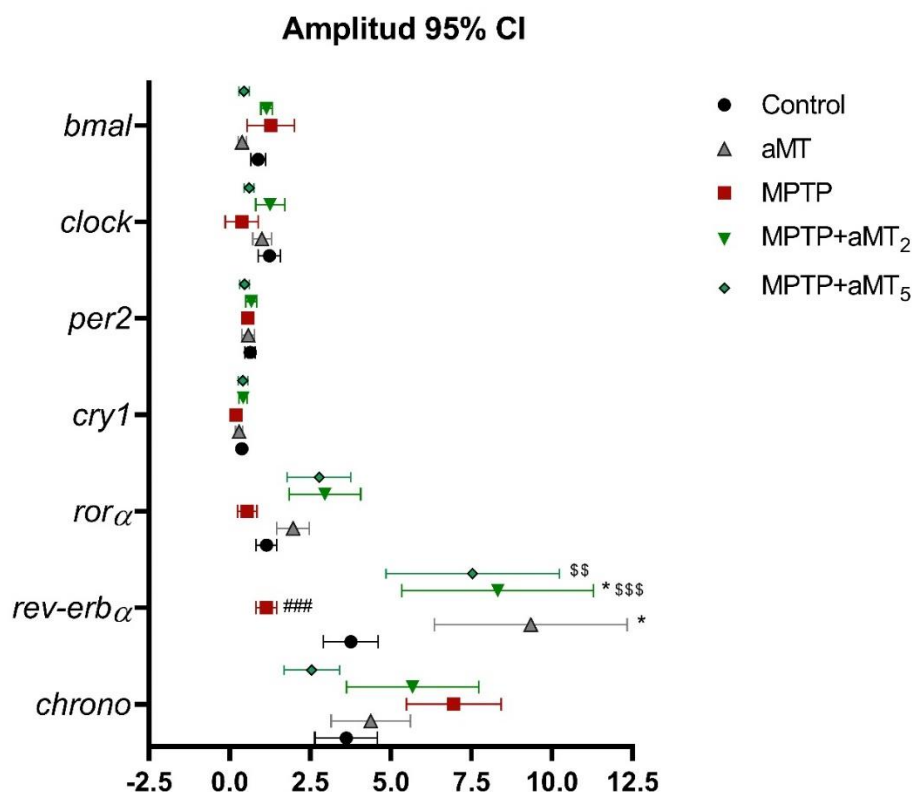


Figura 15. Presentación gráfica de la amplitud. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM. * $P < 0,05$ v. control; ### $P < 0,001$ v. aMT; \$\$ $P < 0,01$ v. MPTP; \$\$\$ $P < 0,001$ v. MPTP. ANOVA de 2 vías y test post hoc de Tukey.

7. LA DINÁMICA MITOCONDRIAL ALTERADA EN EL PEZ CEBRA PARKINSONIANO SE RECUPERA TRAS EL TRATAMIENTO CON MELATONINA

Debido a que las mitocondrias están bajo el control de los genes del reloj, y la disfunción mitocondrial está involucrada en la patogenia de la EP (Phillipson, 2017; Scrima et al., 2016), analizamos los mecanismos de fusión y fisión que reflejan la dinámica mitocondrial.

Con respecto a la fisión, encontramos que la expresión de ambas mitofusinas, *mfn1* y *mfn2*, en los embriones de control no se modificaron con el tratamiento con aMT. Su expresión, sin embargo, disminuyó significativamente con la administración

de MPTP (Figura 16^a y B). El tratamiento con ambos grupos de melatonina a embriones con MPTP, recuperó la expresión de *mf1* y, principalmente, de *mf2*, esta última incluso por encima del control (Figura 16 y B). Los niveles de proteína de MFN2 también se redujeron con MPTP y se recuperaron con las terapias de aMT (Figura 16C).

También observamos una expresión similar de *opa1* en embriones control y tratados con aMT, que se redujo por el MPTP. Aquí, ambos tratamientos con melatonina en embriones con MPTP recuperaron la expresión de *opa1* (Figura 16D). Los niveles de proteína de OPA1 no fueron modificados por MPTP o aMT, pero aumentaron después del tratamiento con MPTP+aMT₂ (Figura 16E).

En relación con la fisión mitocondrial, encontramos que la expresión de *dyn2* no se modificó por aMT y si se redujo por MPTP, efecto que fue contrarrestado por los dos tratamientos con melatonina, siendo significativo con aMT₅ (Figura 16F).

A su vez, la expresión de ARNm de *drp1* y el contenido de proteína de DRP1 no se modificaron con el tratamiento con aMT respecto al control, pero aumentaron significativamente después de MPTP. La expresión de ARNm y del contenido de proteína se redujeron significativamente con la administración de aMT en embriones tratados con MPTP (Figura 16G y H).

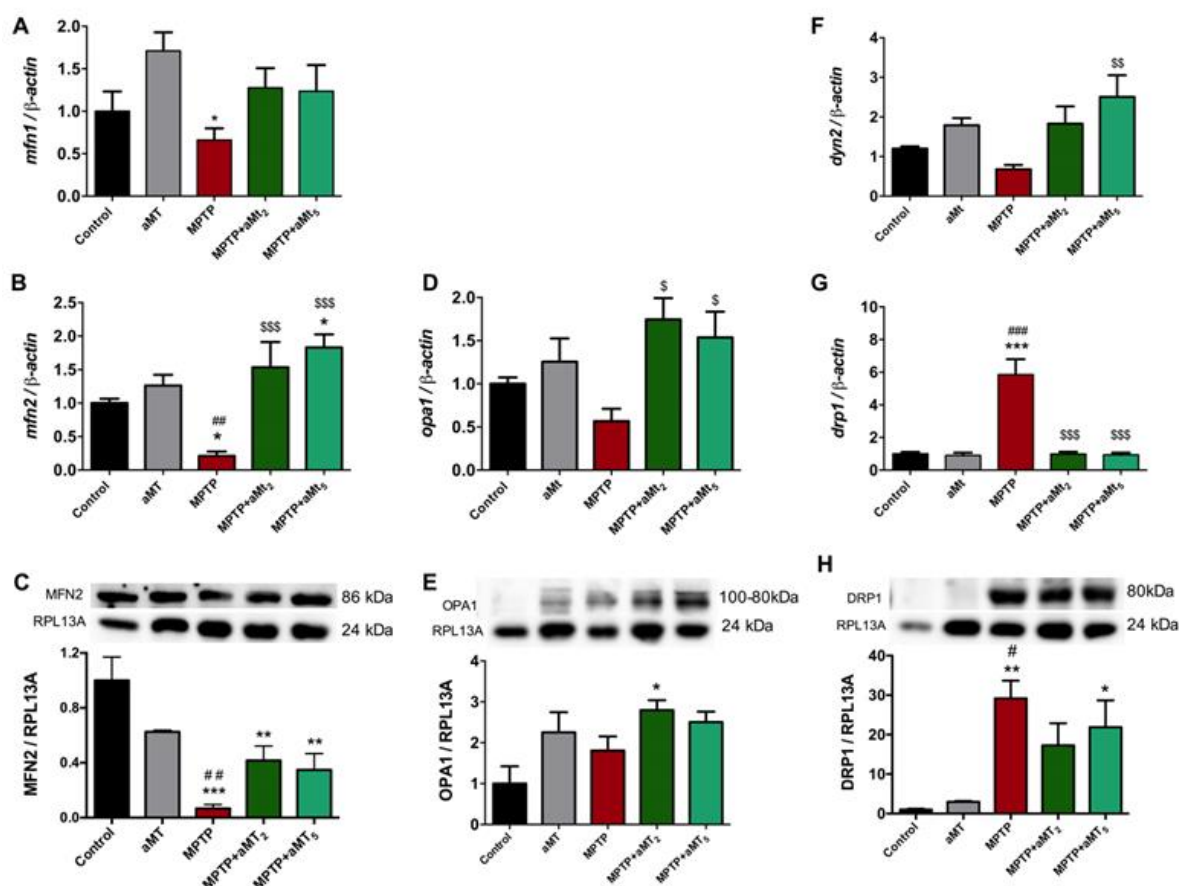


Figura 16. Análisis de los genes y proteínas implicados en la dinámica mitocondrial. En cuanto a la fisión, se analizaron los siguientes marcadores: (A) Expresión de ARNm de *mf1*; (B) Expresión de ARNm de *mf2* y (C) niveles de proteína MFN2 en los mismos grupos experimentales; (D) Expresión de ARNm de *opa1* y (E) niveles de proteína OPA1 en los mismos grupos experimentales. Los marcadores de fusión analizados fueron: (F) expresión de ARNm de *dyn2*; (G) expresión de ARNm de *drp1* y (H) niveles de proteína DRP1 en los mismos grupos experimentales. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ v. control; ** $P < 0.01$ v. control; *** $P < 0.001$ v. control; # $P < 0.05$ v. aMT; ## $P < 0.01$ v. aMT; \$ $P < 0.05$ v. MPTP; \$\$ $P < 0.01$ v. MPTP; \$\$\$ $P < 0.001$ v. MPTP. ANOVA de una vía y test post hoc de Tukey.

8. LA ADMINISTRACIÓN DE MPTP ALTERA LAS VÍAS DE APOPTOSIS Y AUTOFAGIA Y LA MELATONINA CONTRARRESTA ESTE EFECTO

La disfunción mitocondrial finalmente conduce a la autofagia y la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas (Wang et al., 2016). La expresión del ARNm de *bax* y el contenido de proteína BAX aumentaron ligeramente con aMT y MPTP, mientras que los tratamientos curativos y preventivos con aMT, principalmente aMT₅, lo redujeron

al nivel de control (Figura 17A). *bcl-2*, en cambio, no se modificó por la melatonina y fue reducido drásticamente por MPTP; aquí, aMT₂ y aMT₅ restauraron su expresión (Figura 17B). La relación *bax/bcl-2* aumentó en embriones parkinsonianos y fue totalmente contrarrestada por ambos tratamientos con aMT (Figura 17C). Por otro lado, hemos observado una tendencia a aumentar la expresión del ARNm de *p53* en el grupo tratado con MPTP y a disminuir tras el tratamiento con melatonina, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 17E). Sin embargo, el contenido de proteína de P53 aumentó significativamente con MPTP y se redujo después de los tratamientos con aMT₂ y aMT₅ (Figura 17F). Nuestros resultados no mostraron cambios significativos en la expresión del ARNm de *lc3* excepto para el tratamiento con aMT₅, que aumentó significativamente y en la relación LC3II/LC3I (Figura 17H).

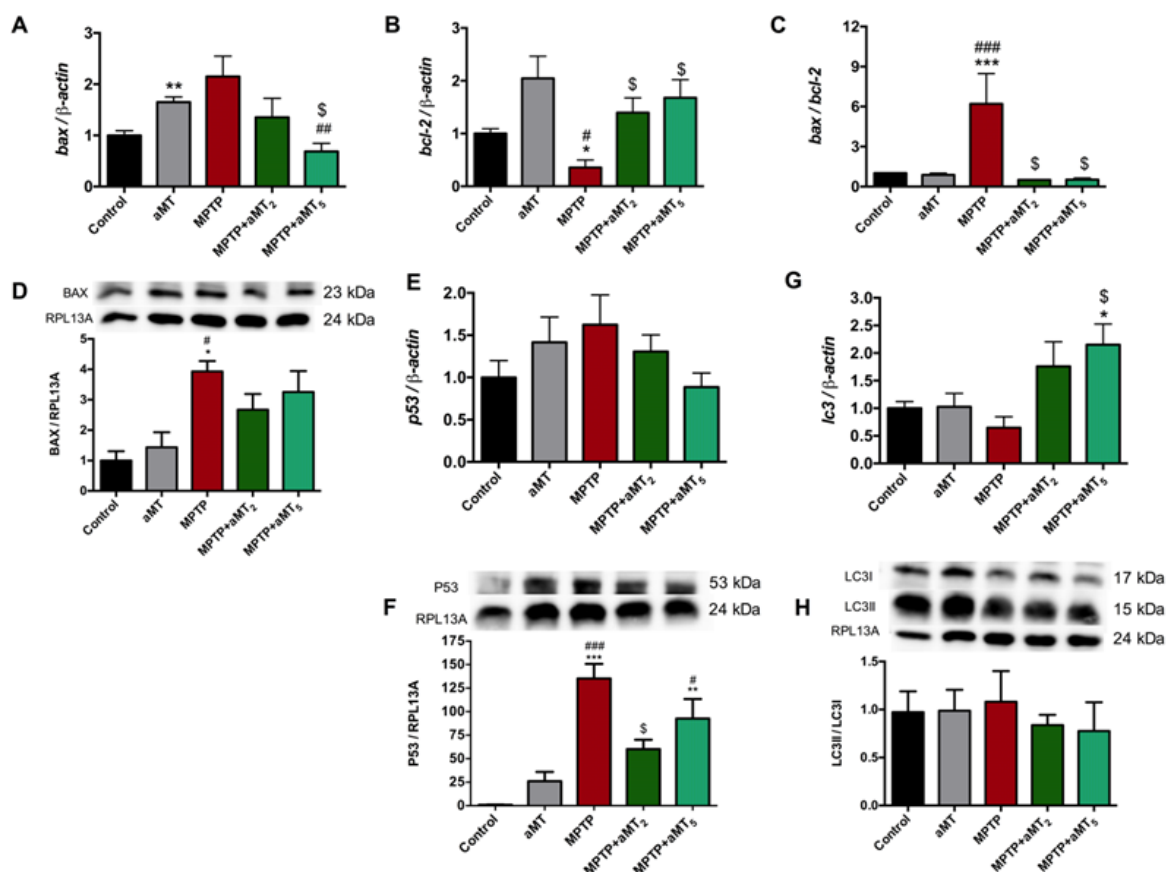


Figura 17. Análisis de vías apoptóticas y de autofagia. (A) expresión de ARNm de bax y (B) bcl-2 en los grupos estudiados, y la relación bax/bcl-2 (C). (D) niveles de proteína de BAX. (E) expresión de ARNm de p53 y (F) niveles de proteína de P53. (G) expresión de ARNm de lc3 y (H) proporción de proteínas de LC3II/LC3I. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ v. control; ** $P < 0.01$ v. control; *** $P < 0.001$ v. control; # $P < 0.05$ v. aMT; ## $P < 0.01$ v. aMT; ### $P < 0.001$ v. aMT; \$ $P < 0.05$ v. MPTP; & $P < 0.05$ v. MPTP+aMT₂. *t* test no pareado y ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados respaldan por primera vez que el parkinsonismo inducido por MPTP en embriones de pez cebra altera el funcionamiento normal del reloj biológico, alterando la expresión de los principales genes reloj, incluidos *bmal1*, *clock*, *per2*, *cry1*, *rora*, *rev-erba* y *crono*.

Se sabe que la interrupción del reloj en el pez cebra afecta el comportamiento circadiano (Ben-Moshe Livne et al., 2016) y la motilidad (Basti et al., 2020); altera la inmunidad (Sacksteder & Kimmey, 2022) y la respuesta inflamatoria (Ren et al., 2018); afecta el estado oxidativo (Alifu et al., 2021); altera la autofagia (Huang et al., 2016), y la función mitocondrial (Dao et al., 2022). Por lo tanto, la cronodisrupción observada aquí en el pez cebra parkinsoniano explica los hallazgos previos que demuestran la alteración de la actividad locomotora, la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la pérdida neuronal dopaminérgica, y la disfunción mitocondrial identificadas en el mismo modelo experimental de la EP (Díaz-Casado et al., 2016, 2018). Aquí, ampliamos estos hallazgos mostrando cómo la cronodisrupción causada por MPTP da como resultado una alteración del ritmo diurno/nocturno de melatonina y los ritmos de actividad motora, en la dinámica mitocondrial y en los eventos apoptóticos/autofágicos, mientras que la administración de melatonina es capaz de restaurar el ritmo normal de los genes del reloj, evitando estas alteraciones relacionadas con los genes del reloj.

La melatonina tiene propiedades neuroprotectoras significativas en diferentes modelos de EP, incluidos ratones y peces cebra (Díaz-Casado et al., 2016; Khaldy et al., 2003), por lo que primero analizamos si el tratamiento con MPTP puede afectar los niveles endógenos de melatonina en embriones parkinsonianos. Como era de esperar, los niveles de melatonina muestran la típica oscilación día/noche con niveles más altos

durante la fase de oscuridad en animales controles. La administración de MPTP no afecta los niveles diurnos de melatonina, pero reduce significativamente sus niveles nocturnos, bloqueando el ritmo diario de la indolamina. Debido a que el ritmo diario de la dopamina en el cuerpo estriado está controlado por la melatonina (Khaldy et al., 2002), la alteración en el sistema dopaminérgico endógeno en los cerebros de los embriones de pez cebra tratados con MPTP puede estar relacionada con la falta de melatonina por la noche. El tratamiento con melatonina en embriones control o tratados con MPTP no sólo produce un aumento significativo en los niveles de melatonina diurnos/nocturnos, sino que los aumenta significativamente durante la noche, restableciendo su ritmo circadiano. El mayor aumento de melatonina por la noche tras su administración en comparación con sus niveles durante el día no es fácil de explicar, pero cambios en su adsorción o en su catabolismo podrían explicar estos hallazgos, a pesar de que los embriones se exponen a melatonina exógena durante 24 horas. Sin embargo, la exposición a la melatonina durante 24 h es una condición experimental común capaz de restaurar los déficits cognitivos y endocrinos en el pez cebra con cronodisrupción (Giacomini et al., 2020).

La alteración de los niveles de melatonina está relacionada con alteraciones de los ritmos circadianos, incluido el ritmo de la actividad locomotora, que se pierde en el pez cebra con EP (Díaz-Casado et al., 2016). El pez cebra, un animal nocturno, está activo durante el día, mostrando un ritmo típico de actividad motora de 24 horas que comienza cuando se encienden las luces (08:00) (HURD et al., 1998). Este ritmo se vio afectado por el tratamiento con MPTP, induciendo un avance de fase de 3-4 horas, iniciando la actividad a las 5 am en lugar de las 8 am. Probablemente, el avance se deba a la alteración en la producción de melatonina, ya que ésta controla el ritmo de actividad en

el pez cebra (Aranda-Martínez et al., 2022). En consecuencia, los embriones son más activos durante la noche que durante el día. También se informaron alteraciones motoras y falta de coordinación después de MPTP (Razali et al., 2022). La melatonina contrarresta absolutamente este trastorno del ritmo que probablemente se deba a las propiedades de sincronización del reloj biológico (Acuña-Castroviejo et al., 2017), aunque la reducción en la actividad total también puede depender en parte de que la melatonina promueve un estado de sueño en el pez cebra (Zhdanova et al., 2001). Este efecto de la melatonina para restaurar la actividad motora se ha observado en otros modelos de neurodegeneración (Bavithra et al., 2017; Yildirim et al., 2014; Zheng et al., 2021).

Por lo tanto, las alteraciones en el ritmo de la melatonina y en la actividad motora de los embriones aquí reflejados apuntan a una alteración en el control circadiano de estas actividades, que puede ser causada por una alteración del reloj biológico durante el estado parkinsoniano. Por lo tanto, realizamos un análisis de cosinor de la expresión de los genes del reloj durante el período de 24 horas, para verificar el ritmo. Nuestros resultados respaldan el ritmo normal de los genes *bmal1*, *clock*, *per2*, *cry1*, *rora* y *rev-erba* en los embriones controles (Sacksteder & Kimmey, 2022). Los embriones parkinsonianos pierden el ritmo de *bmal1*, *clock* y *rora*, promueven un avance de la acrofase *per2*, mientras que disminuyen la expresión de los genes *cry1* y *rev-erba*. Por el contrario, el ritmo de *crno* no se vio afectado. No hubo diferencias notables en MESOR y amplitud a excepción de *bmal1* y *clock*, que aumentaron en los peces parkinsonianos. En todos los casos, ambos tratamientos con melatonina restauraron el ritmo normal de los genes del reloj. En general, MPTP causa una condición parkinsoniana en embriones de pez cebra en paralelo a un proceso de cronodisrupción que afecta a la mayoría de los

genes reloj, lo que explica la alteración en el ritmo de la actividad motora y probablemente la producción de melatonina, pero puede tener otras importantes consecuencias relacionadas con la neuroinflamación, la pérdida de dopamina y la disfunción mitocondrial.

En primer lugar, los genes reloj modulan la inmunidad innata, incluida la vía dependiente de NF- κ B y la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF α , INF- γ (Ren et al., 2018; Sacksteder & Kimmey, 2022) de tal forma que la cronodisrupción provoca un estado proinflamatorio. La neuroinflamación posterior (Díaz-Casado et al., 2016) participa en la acumulación de γ -sinucleína, en el caso del pez cebra, y activa el inflamasoma NLRP3, la otra vía de la inmunidad innata, que exagera la producción de citoquinas proinflamatorias e inhibe la actividad de las enzimas antioxidantes (Dongjie et al., 2022). Estas citoquinas inhiben la actividad transcripcional de BMAL1/CLOCK formando un bucle de retroalimentación característico de la EP (Li et al., 2021).

Además de la muerte neuronal dopaminérgica (Díaz-Casado et al., 2016), MPTP también promueve la fragmentación mitocondrial en el pez cebra (Kalyn & Ekker, 2021), un hallazgo que puede estar relacionado con la alteración de los genes del reloj y la dinámica mitocondrial, como ocurre en otras especies animales (Schmitt et al., 2018; Xu et al., 2022). Nuestros resultados informan una disminución en la fusión mitocondrial a través de la inhibición de *mfn1* y *mfn2*, y un aumento en la fisión mitocondrial indicado por el aumento de *drp1* en embriones tratados con MPTP. Estos cambios en la dinámica mitocondrial apuntan a un aumento de la mitofagia que colabora en el proceso de neurodegeneración (Kalyn & Ekker, 2021). La melatonina recuperó la actividad de la

dinámica mitocondrial normal, lo cual es consistente con nuestros datos sobre la función mitocondrial publicados previamente en el mismo modelo experimental (Díaz-Casado et al., 2018).

El reloj circadiano también está implicado en la regulación de las enzimas antioxidantes que se ven significativamente afectadas en la enfermedad de Parkinson en el pez cebra (Díaz-Casado et al., 2018; Dongjie et al., 2022; Kim et al., 2018; Kou et al., 2022). El estrés oxidativo junto con la inflamación y el daño mitocondrial mencionados anteriormente conducen a la muerte celular y a la neurodegeneración dopaminérgica. Aquí mostramos una mayor proporción de *bax/bcl-2*, así como un aumento en las proteínas BAX y P53, lo que indica una mayor apoptosis en los embriones tratados con MPTP, junto con cambios menores en la autofagia. Los tratamientos con melatonina revirtieron estos cambios a los valores del control.

En resumen, este estudio refleja la alteración de los principales genes reloj en embriones de pez cebra parkinsonianos, que se acompaña de alteraciones típicas en el ritmo y las habilidades motoras de estos embriones, incluido el ritmo de melatonina y alteraciones mitocondriales, la mayoría de las veces asociadas a la perturbación de los genes del reloj. La administración de melatonina, cuyos niveles fueron reducidos por MPTP, restablece el normal funcionamiento del reloj cronobiológico, contrarrestando el parkinsonismo.

CONSLUSIONES

1. El parkinsonismo inducido por MPTP en embriones de pez cebra provocó un proceso de cronodisrupción, que se manifiesta claramente en la alteración significativa del ritmo diario de la expresión de los genes reloj.
2. Específicamente, los genes *bmal1* y *clock* pierden su ritmo, los genes reguladores *per2* y *cry1* muestran un avance de fase, y el gen modulador *rora* pierde su ritmo, con pequeños cambios en *rev-erba* y *crno*.
3. Este proceso de cronodisrupción afecta primariamente al ritmo circadiano de la melatonina, que se encuentra absolutamente anulado en esta situación.
4. Secundariamente, el ritmo de la actividad locomotora, que está controlado por los genes reloj y la melatonina, se altera, afectando a las capacidades motoras de los peces.
5. La dinámica mitocondrial, también regulada por los genes del reloj y la melatonina, se alterada significativamente, con una reducción del cociente fusión/fisión, que conduce a la apoptosis neuronal.
6. La administración de melatonina tiene un beneficio significativo en el pez parkinsoniano, restaurando la función normal del bucle de los genes del reloj y el ritmo de la melatonina. En consecuencia, se normalizó la actividad locomotora y la dinámica mitocondrial, previniendo la apoptosis neuronal.
7. Es de destacar que la melatonina no solo previno el desarrollo de parkinsonismo inducido por MPTP, sino que también recuperó el daño una vez que éste se desarrolló. Este último efecto de la melatonina puede tener un gran significado clínico, puesto que el Parkinson se diagnostica cuando ya está presente un daño neuronal importante.

CONCLUSIONS

1. The parkinsonism induced by MPTP in zebrafish embryos caused chronodisruption, that is clearly manifested in the significant alteration in the daily expression of clock genes.
2. Specifically, *bmal1* and *clock* genes loss their rhythm, the regulatory genes *per2* and *cry1* show an advance of the acrophase, and the modulatory gene *rora* loss its rhythm, with small changes in *rev-erba* and *chrono*.
3. This process of chronodisruption affects primarily to the circadian rhythm of melatonin, that is absolutely blunted in this situation.
4. Secondly, the locomotor activity rhythm, which is controlled by the clock genes and melatonin, is disturbed, altering the motor capabilities of the embryos.
5. Mitochondrial dynamics, also regulated by the clock genes and melatonin, is significantly affected in parkinsonian embryos, with a reduction in the fusion/fission ratio, which leads to a neuronal apoptosis.
6. Melatonin administration has significant benefit in this pathological condition, restoring the normal function of the clock genes loop and the melatonin rhythm. Consequently, locomotor activity and mitochondrial dynamics were normalized, preventing neuronal apoptosis.
7. Of note, melatonin was able does not only to prevent the development of parkinsonism induced by MPTP, but also recovered the damage once it was developed. This latter effect of melatonin may have great clinical significance since Parkinson's disease is diagnosed when important neuronal damage is already present.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia Monti M, Ortiz GG, Reiter RJ. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci* 1997; 60(2):PL23-9, doi: 10.1016/s0024-3205(96)00606-6.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Rodriguez MI, Lopez LC. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci* 2007; 12: 947-963, doi: 10.2741/2116.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(16):2997-3025, doi: 10.1007/s00018-014-1579-2.
- Acuña-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; 30: 65-74, doi: 10.1034/j.1600-079x.2001.300201.x.
- Acuña-Castroviejo D, Rahim I, Acuña-Fernández C, Fernández-Ortiz M, Solera-Marín J, Sayed RKA, Díaz-Casado ME, Rusanova I, López LC, Escames G. Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(21):3965-3987, doi: 10.1007/s00018-017-2610-1.
- Acuña-Castroviejo D., Lopez LC, Escames G, Lopez A, Garcia JA, Reiter RJ. Melatonin mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 221-240, doi: 10.2174/156802611794863517.
- Alifu Y, Kofuji S, Sunaga S, Kusaba M, Hirayama J, Nishina H. The Light-Inducible Genes Per2, Cry1a, and Cry2a Regulate Oxidative Status in Zebrafish. *Biol Pharm Bull* 2021; 44(8):1160-1165, doi: 10.1248/bpb.b21-00432.
- Amsterdam A, Becker TS. Transgenes as screening tools to probe and manipulate the zebrafish genome. *Dev Dyn* 2005; 234(2):255-68, doi: 10.1002/dvdy.20541.
- Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J* 2004; 18: 869-871, doi: 10.1096/fj.03-1031fe.
- Antolin I, Mayo JC, Sainz RM, del Brio ML, Herrera F, Martin V et al. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2002; 943: 163-173, doi: 10.1016/s0006-8993(02)02551-9.
- Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Guerra-Librero A, Rodríguez-Santana C, Escames G, Acuña-Castroviejo D. The Zebrafish, an Outstanding Model for Biomedical Research in the Field of Melatonin and Human Diseases. *Int J Mol Sci* 20220; 23(13):7438, doi: 10.3390/ijms23137438.

Arena G, Sharma K, Agyeah G, Krüger R, Grünewald A, Fitzgerald JC. Neurodegeneration and Neuroinflammation in Parkinson's Disease: a Self-Sustained Loop. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2022; 22(8):427-440, doi: 10.1007/s11910-022-01207-5.

Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-Ariga SM. Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 683920, doi: 10.1155/2013/683920.

Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res* 2009; 66(2):121-7, doi: 10.1203/PDR.0b013e3181a9eafb.

Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 1974; 184(4144):1341-8, doi: 10.1126/science.184.4144.1341.

Banerjee K, Sinha M, Pham CL, Jana S, Chanda D, Cappai R et al. Alpha-synuclein induced membrane depolarization and loss of phosphorylation capacity of isolated rat brain mitochondria: implications in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 2010; 584:1571-1576, doi: 10.1016/j.febslet.2010.03.012.

Bavithra S, Selvakumar K, Sundareswaran L, Arunakaran J. Neuroprotective Effect of Melatonin Against PCBs Induced Behavioural, Molecular and Histological Changes in Cerebral Cortex of Adult Male Wistar Rats. *Neurochem Res* 2017; 42(2):428-438, doi: 10.1007/s11064-016-2087-6.

Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 269: 28531-28534.

Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* 2005; 6(7):544-56, doi: 10.1038/nrg1633.

Benitez-King G and Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 15-8-1993; 49: 635-641, doi: 10.1007/BF01923944.

Benitez-King G, Rios A, Martinez A, Anton-Tay F. In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1290: 191-196, doi: 10.1016/0304-4165(96)00025-6.

Ben-Moshe Z, Foulkes NS, Gothilf Y. Functional development of the circadian clock in the zebrafish pineal gland. *Biomed Res Int* 2014; 2014:235781, doi: 10.1155/2014/235781.

Bir A, Sen O, Anand S, Khemka VK, Banerjee P, Cappai R et al. alpha-Synuclein-induced mitochondrial dysfunction in isolated preparation and intact cells: implications in the

pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2014; 131: 868-877, doi: 10.1111/jnc.12966.

Blanco-Vives B, Sánchez-Vázquez FJ. Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiol Behav* 2009; 98(3):268-75, doi: 10.1016/j.physbeh.2009.05.015.

Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat* 2015; 9:91, doi: 10.3389/fnana.2015.00091.

Boassa D, Berlanga ML, Yang MA, Terada M, Hu J, Bushong EA, Hwang M, Masliah E, George JM, Ellisman MH. Mapping the subcellular distribution of α -synuclein in neurons using genetically encoded probes for correlated light and electron microscopy: implications for Parkinson's disease pathogenesis. *J Neurosci* 2013; 33(6):2605-15, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2898-12.2013.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* 1995; 18: 222-226, doi: 10.1111/j.1600-079x.1995.tb00163.x.

Calabrese V, Santoro A, Monti D, Crupi R, Di Paola R, Latteri S, Cuzzocrea S, Zappia M, Giordano J, Calabrese EJ, Franceschi C. Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Radic Biol Med*; 115:80-91, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.379.

Cardinali DP and Freire F. Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formations in the hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol* 1975; 2: 317-330, doi: 10.1016/0303-7207(75)90019-2.

Cassarino DS, Parks JK, Parker WD Jr, Bennett JP Jr. The parkinsonian neurotoxin MPP+ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1453(1):49-62, doi: 10.1016/s0925-4439(98)00083-0.

Cassone VM. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci* 1990; 13(11):457-64, doi: 10.1016/0166-2236(90)90099-v.

Cela O, Scrima R, Pazienza V, Merla G, Benegiamo G, Augello B, Fugetto S, Menga M, Rubino R, Fuhr L, Relógio A, Piccoli C, Mazzocchi G, Capitanio N. Clock genes-dependent

acetylation of complex I sets rhythmic activity of mitochondrial OxPhos. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(4):596-606, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.12.018.

Choi IS. Parkinsonism after carbon monoxide poisoning. *Eur Neurol* 2002; 48(1):30-3, doi: 10.1159/000064954.

Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA* 2014; 311(16):1670-83, doi: 10.1001/jama.2014.3654.

Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE, Mann D. Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 59: 229-234, doi: 10.1080/009841000156907.

Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol* 2009; 169: 919-926, doi: 10.1093/aje/kwp006.

Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 1999; 13: 1537-1546.

Danilova N, Krupnik VE, Sugden D, Zhdanova IV. Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development. *FASEB J* 2004; 18(6):751-3, doi: 10.1096/fj.03-0544fje.

Dao P, Hajny S, Mekis R, Orel L, Dinhol N, Tessmar-Raible K, Nowikovsky K. The cation exchanger Letm1, circadian rhythms, and NAD(H) levels interconnect in diurnal zebrafish. *Life Sci Alliance* 2022; 5(9):e202101194, doi: 10.26508/lsa.202101194.

de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5(6):525-35, doi: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.

Dekens MP, Santoriello C, Vallone D, Grassi G, Whitmore D, Foulkes NS. Light regulates the cell cycle in zebrafish. *Curr Biol* 2003; 13(23):2051-7, doi: 10.1016/j.cub.2003.10.022.

Del Tredici K, Braak H. A not entirely benign procedure: progression of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2008; 115(4):379-84, doi: 10.1007/s00401-008-0355-5.

Denker E, Ebbesson LOE, Hazlerigg DG, Macqueen DJ. Phylogenetic Reclassification of Vertebrate Melatonin Receptors To Include Mel1d. *G3 (Bethesda)* 2019; 9(10):3225-3238, doi: 10.1534/g3.119.400170.

- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* 2008; 283: 9089-9100, doi: 10.1074/jbc.M710012200.
- Deyell JS, Sriparna M, Ying M, Mao X. The Interplay between α -Synuclein and Microglia in α -Synucleinopathies. *Int J Mol Sci* 2023; 24(3):2477, doi: 10.3390/ijms24032477.
- Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2013; 3: 461-491, doi: 10.3233/JPD-130230.
- Díaz-Casado ME, Lima E, García JA, Doerrier C, Aranda P, Sayed RK, Guerra-Librero A, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Melatonin rescues zebrafish embryos from the parkinsonian phenotype restoring the parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network. *J Pineal Res* 2016; 61(1):96-107, doi: 10.1111/jpi.12332.
- Díaz-Casado ME, Rusanova I, Aranda P, Fernández-Ortiz M, Sayed RKA, Fernández-Gil BI, Hidalgo-Gutiérrez A, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. In Vivo Determination of Mitochondrial Respiration in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Treated Zebrafish Reveals the Efficacy of Melatonin in Restoring Mitochondrial Normalcy. *Zebrafish* 2018; 15(1):15-26, doi: 10.1089/zeb.2017.1479.
- Dongjie S, Rajendran RS, Xia Q, She G, Tu P, Zhang Y, Liu K. Neuroprotective effects of Tongtian oral liquid, a Traditional Chinese Medicine in the Parkinson's disease-induced zebrafish model. *Biomed Pharmacother* 2022; 148:112706, doi: 10.1016/j.biopha.2022.112706.
- Double KL, Gerlach M, Schünemann V, Trautwein AX, Zecca L, Gallorini M, Youdim MB, Riederer P, Ben-Shachar D. Iron-binding characteristics of neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(3):489-94, doi: 10.1016/s0006-2952(03)00293-4.
- Doyle JM, Croll RP. A Critical Review of Zebrafish Models of Parkinson's Disease. *Front Pharmacol* 2022; 13:835827, doi: 10.3389/fphar.2022.835827.
- Earle KM. Studies on Parkinson's disease including x-ray fluorescent spectroscopy of formalin fixed brain tissue. *J Neuropathol Exp Neurol* 1968; 27(1):1-14, doi: 10.1097/00005072-196801000-00001.
- Elbaz I, Foulkes NS, Gothilf Y, Appelbaum L. Circadian clocks, rhythmic synaptic plasticity and the sleep-wake cycle in zebrafish. *Front Neural Circuits* 2013; 7:9, doi: 10.3389/fncir.2013.00009.

Escames G, Acuna-Castroviejo D, Lopez LC, Tan DX, Maldonado MD, Sanchez-Hidalgo M et al. Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol* 2006a; 58: 1153-1165, doi: 10.1211/jpp.58.9.0001.

Escames G, Guerrero JM, Reiter RJ, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A, Ortiz GG et al. Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci Lett* 1997; 230: 147-150, doi: 10.1016/s0304-3940(97)00498-9.

Facciola G, Hidestrand M, von Bahr C, Tybring G. Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 56(12):881-8, doi: 10.1007/s002280000245.

Falcón J, Gothilf Y, Coon SL, Boeuf G, Klein DC. Genetic, temporal and developmental differences between melatonin rhythm generating systems in the teleost fish pineal organ and retina. *J Neuroendocrinol* 2003; 15(4):378-82, doi: 10.1046/j.1365-2826.2003.00993.x.

Fukunaga K, Horikawa K, Shibata S, Takeuchi Y, Miyamoto E. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. *J Neurosci Res* 2002; 70(6):799-807, doi: 10.1002/jnr.10400.

García JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Disruption of the NF- κ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- α and blocks the septic response in mice. *FASEB J* 2015; 29(9):3863-75, doi: 10.1096/fj.15-273656.

Garcia JJ, Pinol-Ripoll G, Martinez-Ballarín E, Fuentes-Broto L, Miana-Mena FJ, Venegas C et al. Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 2011; 32: 2045-2054, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.013.

Gatfield D, Schibler U. Physiology. Proteasomes keep the circadian clock ticking. *Science* 2007; 316(5828):1135-6, doi: 10.1126/science.1144165.

Giacomini ACVV, Teixeira KH, Marcon L, Scolari N, Bueno BW, Genario R, de Abreu NS, Demin KA, Galstyan DS, Kalueff AV, de Abreu MS. Melatonin treatment reverses cognitive and endocrine deficits evoked by a 24-h light exposure in adult zebrafish. *Neurosci Lett* 2020; 733:135073, doi: 10.1016/j.neulet.2020.135073.

González-Polo R, Niso-Santano M, Morán JM, Ortiz-Ortiz MA, Bravo-San Pedro JM, Soler G, Fuentes JM. Silencing DJ-1 reveals its contribution in paraquat-induced autophagy. *J Neurochem* 2009; 109(3):889-98, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06020.x.

- Gothilf Y, Coon SL, Toyama R, Chitnis A, Namboodiri MA, Klein DC. Zebrafish serotonin N-acetyltransferase-2: marker for development of pineal photoreceptors and circadian clock function. *Endocrinology* 1999; 140(10):4895-903, doi: 10.1210/endo.140.10.6975.
- Griffin P, Sheehan PW, Dimitry JM, Guo C, Kanan MF, Lee J, Zhang J, Musiek ES. REV-ERB α mediates complement expression and diurnal regulation of microglial synaptic phagocytosis. *Elife* 2020; 9:e58765, doi: 10.7554/eLife.58765.
- Gu Z, Wang B, Zhang YB, Ding H, Zhang Y, Yu J, Gu M, Chan P, Cai Y. Association of ARNTL and PER1 genes with Parkinson's disease: a case-control study of Han Chinese. *Sci Rep* 2015; 5:15891, doi: 10.1038/srep15891.
- Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 2005; 20(5):391-403, doi: 10.1177/0748730405277232.
- Halliday GM, Ophof A, Broe M, Jensen PH, Kettle E, Fedorow H, Cartwright MI, Griffiths FM, Shepherd CE, Double KL. Alpha-synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease. *Brain* 2005; 128(Pt 11):2654-64, doi: 10.1093/brain/awh584.
- Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 2003; 34(4):233-41, doi: 10.1034/j.1600-079x.2003.00040.x.
- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17: 347-357, doi: 10.1016/s0149-7634(05)80016-8.
- Hardeland R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. *J Pineal Res* 2018; 65(4):e12525, doi: 10.1111/jpi.12525. Epub 2018 Oct 12.
- Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(13):2001-18, doi: 10.1007/s00018-008-8001-x.
- Hayashi A, Matsunaga N, Okazaki H, Kakimoto K, Kimura Y, Azuma H, Ikeda E, Shiba T, Yamato M, Yamada K, Koyanagi S, Ohdo S. A disruption mechanism of the molecular clock in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med* 2013; 15(2):238-51, doi: 10.1007/s12017-012-8214-x.
- Hindle JV. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing* 2010; 39(2):156-61, doi: 10.1093/ageing/afp223.

- Hornykiewicz O. The tropical localization and content of noradrenalin and dopamine (3-hydroxytyramine) in the substantia nigra of normal persons and patients with Parkinson's disease. *Wien Klin Wochenschr* 1963; 75:309-12.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013; 496(7446):498-503, doi: 10.1038/nature12111.
- Huang CC. Carbon disulfide neurotoxicity: Taiwan experience. *Acta Neurol Taiwan* 2004; 13(1):3-9.
- Huang G, Zhang F, Ye Q, Wang H. The circadian clock regulates autophagy directly through the nuclear hormone receptor Nr1d1/Rev-erb α and indirectly via Cebpb/(C/ebp β) in zebrafish. *Autophagy* 2016; 12(8):1292-309, doi: 10.1080/15548627.2016.1183843.
- Hurd MW, Debruyne J, Straume M, Cahill GM. Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiol Behav* 1998; 65(3):465-72, doi: 10.1016/s0031-9384(98)00183-8.
- Ishikawa S, Taira T, Takahashi-Niki K, Niki T, Ariga H, Iguchi-Ariga SM. Human DJ-1-specific transcriptional activation of tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem* 2010; 285: 39718-39731, doi: 10.1074/jbc.M110.137034.
- Jackson-Lewis V, Smeyne RJ. MPTP and SNpc DA neuronal vulnerability: role of dopamine, superoxide and nitric oxide in neurotoxicity. Minireview. *Neurotox Res* 2005; 7(3):193-202, doi: 10.1007/BF03036449.
- Jacobi D, Liu S, Burkewitz K, Kory N, Knudsen NH, Alexander RK, Unluturk U, Li X, Kong X, Hyde AL, Gangl MR, Mair WB, Lee CH. Hepatic Bmal1 Regulates Rhythmic Mitochondrial Dynamics and Promotes Metabolic Fitness. *Cell Metab* 2015; 22(4):709-20, doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.006.
- Jang SY, Kang HT, Hwang ES. Nicotinamide-induced mitophagy: event mediated by high NAD⁺/NADH ratio and SIRT1 protein activation. *J Biol Chem* 2012; 287(23):19304-14, doi: 10.1074/jbc.M112.363747.
- Jarome TJ, Kwapis JL, Ruenzel WL, Helmstetter FJ. CaMKII, but not protein kinase A, regulates Rpt6 phosphorylation and proteasome activity during the formation of long-term memories. *Front Behav Neurosci* 2013; 7:115, doi: 10.3389/fnbeh.2013.00115.
- Javitch JA, Snyder SH. Uptake of MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur J Pharmacol* 1984; 106(2):455-6, doi: 10.1016/0014-2999(84)90740-4.

Kalyn M, Ekker M. Cerebroventricular Microinjections of MPTP on Adult Zebrafish Induces Dopaminergic Neuronal Death, Mitochondrial Fragmentation, and Sensorimotor Impairments. *Front Neurosci* 2021; 15:718244, doi: 10.3389/fnins.2021.718244.

Kamp F, Exner N, Lutz AK, Wender N, Hegermann J, Brunner B et al. Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J* 2010; 29: 3571-3589, doi: 10.1038/emboj.2010.223.

Kang HT, Hwang ES. Nicotinamide enhances mitochondria quality through autophagy activation in human cells. *Aging Cell* 2009; 8(4):426-38, doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00487.x.

Karlsson O, Lindquist NG. Melanin affinity and its possible role in neurodegeneration. *J Neural Transm (Vienna)* 2013; 120(12):1623-30, doi: 10.1007/s00702-013-1062-5.

Khaldy H, Escames G, León J, Bikjdaouene L, Acuña-Castroviejo D. Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiol Aging* 2003; 24(3):491-500, doi: 10.1016/s0197-4580(02)00133-1.

Khaldy H, Escames G, León J, Vives F, Luna JD, Acuña-Castroviejo D. Comparative effects of melatonin, L-deprenyl, Trolox and ascorbate in the suppression of hydroxyl radical formation during dopamine autoxidation in vitro. *J Pineal Res* 2000; 29(2):100, doi: 10.1034/j.1600-079x.2000.290206.x.

Khaldy H, León J, Escames G, Bikjdaouene L, García JJ, Acuña-Castroviejo D. Circadian rhythms of dopamine and dihydroxyphenyl acetic acid in the mouse striatum: effects of pinealectomy and of melatonin treatment. *Neuroendocrinology* 2002; 75(3):201-8, doi: 10.1159/000048238.

Kim J., Jang S., Choi M., Chung S., Choe Y., Choe H.K., Son G.H., Rhee K., Kim K. Abrogation of the Circadian Nuclear Receptor REV-ERB α Exacerbates 6-Hydroxydopamine-Induced Dopaminergic Neurodegeneration. *Mol. Cells* 2018; 41:742–752, doi: 10.14348/molcells.2018.0201.

Kobayashi Y, Ishikawa T, Hirayama J, Daiyasu H, Kanai S, Toh H, Fukuda I, Tsujimura T, Terada N, Kamei Y, Yuba S, Iwai S, Todo T. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells* 2000; 5(9):725-3, doi: 10.1046/j.1365-2443.2000.00364.x.

Kohsaka A, Das P, Hashimoto I, Nakao T, Deguchi Y, Gouraud SS, Waki H, Muragaki Y, Maeda M. The circadian clock maintains cardiac function by regulating mitochondrial metabolism in mice. *PLoS One* 2014; 9(11):e112811, doi: 10.1371/journal.pone.0112811.

- Korf HW, Schomerus C, Stehle JH. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1998; 146:1-100, doi: 10.1007/978-3-642-58932-4.
- Kou L., Chi X., Sun Y., Han C., Wan F., Hu J., Yin S., Wu J., Li Y., Zhou Q., et al. The Circadian Clock Protein Rev-Erb α Provides Neuroprotection and Attenuates Neuroinflammation against Parkinson's Disease via the Microglial NLRP3 Inflammasome. *J. Neuroinflammation* 2022; 19:133, doi: 10.1186/s12974-022-02494-y.
- Lai CY, Chou MC, Lin CL, Kao CH. Increased risk of Parkinson disease in patients with carbon monoxide intoxication: a population-based cohort study. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(19):e869, doi: 10.1097/MD.0000000000000869.
- León J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38: 1-9, doi: 10.1111/j.1600-079X.2004.00181.x.
- León J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004; 75: 765-790, doi: 10.1016/j.lfs.2004.03.003.
- Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. Structure of melatonin. *J A Chem Soc* 1959; 81:6084-6085.
- Li H, Song S, Wang Y, Huang C, Zhang F, Liu J, Hong JS. Low-Grade Inflammation Aggravates Rotenone Neurotoxicity and Disrupts Circadian Clock Gene Expression in Rats. *Neurotox Res* 2019; 35(2):421-431, doi: 10.1007/s12640-018-9968-1.
- Li SY, Wang YL, Liu WW, Lyu DJ, Wang F, Mao CJ, Yang YP, Hu LF, Liu CF. Long-term Levodopa Treatment Accelerates the Circadian Rhythm Dysfunction in a 6-hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease. *Chin Med J (Engl)* 2017; 130(9):1085-1092, doi: 10.4103/0366-6999.204920.
- Li T, Cheng C, Jia C, Leng Y, Qian J, Yu H, Liu Y, Wang N, Yang Y, Al-Nusaif M, Le W. Peripheral Clock System Abnormalities in Patients With Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 2021; 13:736026, doi: 10.3389/fnagi.2021.736026.
- Li Y., Xia Y., Yin S., Wan F., Hu J., Kou L., Sun Y., Wu J., Zhou Q., Huang J., et al. Targeting Microglial α -Synuclein/TLRs/NF-KappaB/NLRP3 Inflammasome Axis in Parkinson's Disease. *Front. Immunol* 2021; 12:719807, doi: 10.3389/fimmu.2021.719807.
- Liguori C, Fernandes M, Cerroni R, Ludovisi R, Mercuri NB, Stefani A, Pierantozzi M. Effects of melatonin prolonged-release on both sleep and motor symptoms in Parkinson's disease: a preliminary evidence. *Neurol Sci* 2022; 43(9):5355-5362, doi: 10.1007/s10072-022-06111-x.

- Liu C, Hu J, Qu C, Wang L, Huang G, Niu P, Zhong Z, Hong F, Wang G, Postlethwait JH, Wang H. Molecular evolution and functional divergence of zebrafish (*Danio rerio*) cryptochrome genes. *Sci Rep* 2015; 5:8113, doi: 10.1038/srep08113.
- Liu T, Borjigin J. Free-running rhythms of pineal circadian output. *J Biol Rhythms* 2005; 20(5):430-40, doi: 10.1177/0748730405277868.
- Liu WW, Wei SZ, Huang GD, Liu LB, Gu C, Shen Y, Wang XH, Xia ST, Xie AM, Hu LF, Wang F, Liu CF. BMAL1 regulation of microglia-mediated neuroinflammation in MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *FASEB J* 2020; 34(5):6570-6581, doi: 10.1096/fj.201901565RR.
- López A, Ortiz F, Doerrier C, Venegas C, Fernández-Ortiz M, Aranda P, Díaz-Casado ME, Fernández-Gil B, Barriocanal-Casado E, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Mitochondrial impairment and melatonin protection in parkinsonian mice do not depend of inducible or neuronal nitric oxide synthases. *PLoS One* 2017; 12(8):e0183090, doi: 10.1371/journal.pone.0183090.
- López LC, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuña-Castroviejo D. Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* 2006b; 27: 623-630.
- Lulla A, Barnhill L, Bitan G, Ivanova MI, Nguyen B, O'Donnell K, Stahl MC, Yamashiro C, Klärner FG, Schrader T, Sagasti A, Bronstein JM. Neurotoxicity of the Parkinson Disease-Associated Pesticide Ziram Is Synuclein-Dependent in Zebrafish Embryos. *Environ Health Perspect* 2016; 124(11):1766-1775, doi: 10.1289/EHP141.
- Ma H, Yan J, Sun W, Jiang M, Zhang Y. Melatonin Treatment for Sleep Disorders in Parkinson's Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Front Aging Neurosci* 2022; 14:784314, doi: 10.3389/fnagi.2022.784314.
- Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(4):489-94, doi: 10.1124/dmd.104.002410.
- Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A et al. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270: 832-840, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03430.x.
- Macías M, Rodríguez-Cabezas MN, Reiter RJ, Osuna A, Acuña-Castroviejo D. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* 1999; 27(2):86-94, doi: 10.1111/j.1600-079x.1999.tb00601.x.
- Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care* 2006; 10(1):208, doi: 10.1186/cc3992.

Malpartida AB, Williamson M, Narendra DP, Wade-Martins R, Ryan BJ. Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's Disease: From Mechanism to Therapy. *Trends Biochem Sci* 2021; 46(4):329-343, doi: 10.1016/j.tibs.2020.11.007.

Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Krüger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JP, de Andrade M, Rocca WA. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 2004; 55(4):512-21, doi: 10.1002/ana.20017.

Martín M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuna-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000a; 14: 1677-1679, doi: 10.1016/s1357-2725(01)00138-8.

Martín M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 348-357, doi: 10.1016/s1357-2725(01)00138-8.

Mattam U, Jagota A. Daily rhythms of serotonin metabolism and the expression of clock genes in suprachiasmatic nucleus of rotenone-induced Parkinson's disease male Wistar rat model and effect of melatonin administration. *Biogerontology* 2015; 16(1):109-23, doi: 10.1007/s10522-014-9541-0.

Maury E. Off the Clock: From Circadian Disruption to Metabolic Disease. *Int J Mol Sci* 2019; 20(7):1597, doi: 10.3390/ijms20071597.

Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, Herrera F, Martin V, Rodriguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1706-1713, doi: 10.1007/pl00012498.

Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal* 2013; 11(1):34, doi: 10.1186/1478-811X-11-34.

Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2008; 26(6):695-701, doi: 10.1038/nbt1398.

Morbiato E, Frigato E, Dinarello A, Maradonna F, Facchinello N, Argenton F, Carnevali O, Dalla Valle L, Bertolucci C. Feeding Entrainment of the Zebrafish Circadian Clock Is Regulated by the Glucocorticoid Receptor. *Cells* 2019; 8(11):1342, doi: 10.3390/cells8111342.

- Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, Giraldez AJ. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods* 2015; 12(10):982-8, doi: 10.1038/nmeth.3543.
- Moustafa AA, Chakravarthy S, Phillips JR, Crouse JJ, Gupta A, Frank MJ, Hall JM, Jahanshahi M. Interrelations between cognitive dysfunction and motor symptoms of Parkinson's disease: behavioral and neural studies. *Rev Neurosci* 2016; 27(5):535-48, doi: 10.1515/revneuro-2015-0070.
- Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S, Verma IM. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(31):12662-7, doi: 10.1073/pnas.1209965109.
- Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 2000; 26(2):216-20, doi: 10.1038/79951.
- Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol* 2015; 4:6-13, doi: 10.1016/j.redox.2014.11.006.
- Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE. MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci* 1987; 40(8):721-9, doi: 10.1016/0024-3205(87)90299-2.
- Nielsen SS, Warden MN, Sallmén M, Sainio M, Uuksulainen S, Checkoway H, Hublin C, Racette BA. Solvent exposed occupations and risk of Parkinson disease in Finland. *Clin Park Relat Disord* 2021; 4:100092, doi: 10.1016/j.prdoa.2021.100092.
- O'Donnell KC, Lulla A, Stahl MC, Wheat ND, Bronstein JM, Sagasti A. Axon degeneration and PGC-1 α -mediated protection in a zebrafish model of α -synuclein toxicity. *Dis Model Mech* 2014; 7(5):571-82, doi: 10.1242/dmm.013185.
- Ortiz GG, Crespo-Lopez ME, Moran-Moguel C, Garcia JJ, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D. Protective role of melatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo. *Neuro Endocrinol Lett* 2001; 22: 101-108.
- Ottolini D, Cali T, Negro A, Brini M. The Parkinson disease-related protein DJ-1 counteracts mitochondrial impairment induced by the tumour suppressor protein p53 by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria tethering. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 2152-2168, doi: 10.1093/hmg/ddt068.
- Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int* 1998; 32(1):69-75, doi: 10.1016/s0197-0186(97)00043-0.

Pang SY, Ho PW, Liu HF, Leung CT, Li L, Chang EES, Ramsden DB, Ho SL. The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* 2019; 8:23, doi: 10.1186/s40035-019-0165-9.

Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Reiter RJ. Phytomelatonin: a review. *J Exp Bot* 2009; 60(1):57-69, doi: 10.1093/jxb/ern284. Epub 2008 Nov 25.

pathogenesis. *J Neurosci* 2013; 33: 2605-2615, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2898-12.2013.

Peek CB, Affinati AH, Ramsey KM, Kuo HY, Yu W, Sena LA, Ilkayeva O, Marcheva B, Kobayashi Y, Omura C, Levine DC, Bacsik DJ, Gius D, Newgard CB, Goetzman E, Chandel NS, Denu JM, Mrksich M, Bass J. Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science* 2013; 342(6158):1243417, doi: 10.1126/science.1243417.

Perier C, Tieu K, Guégan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, Martinuzzi A, Hirano M, Przedborski S, Vila M. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage.

Phillipson OT. Alpha-synuclein, epigenetics, mitochondria, metabolism, calcium traffic, & circadian dysfunction in Parkinson's disease. An integrated strategy for management. *Ageing Res Rev* 2017; 40:149-167, doi: 10.1016/j.arr.2017.09.006.

Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* 2015; 85(2):257-73, doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.007.

Pierrefiche G and Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol* 1995; 30: 213-227, doi: 10.1016/0531-5565(94)00036-3.

Pihlstrøm L, Morset KR, Grimstad E, Vitelli V, Toft M. A cumulative genetic risk score predicts progression in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2016; 31(4):487-90, doi: 10.1002/mds.26505.

Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC et al. Melatonin a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:419-420, doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb21831.x.

Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao E, Paw B, Ransom D, Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick P, Beier D, Joly JS, Larhammar D, Rosa F, Westerfield M, Zon LI, Johnson SL, Talbot WS. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet* 1998; 18(4):345-9, doi: 10.1038/ng0498-345.

Puspita L, Chung SY, Shim JW. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Mol Brain* 2017; 10(1):53, doi: 10.1186/s13041-017-0340-9.

Rahim I, Sayed RK, Fernández-Ortiz M, Aranda-Martínez P, Guerra-Librero A, Fernández-Martínez J, Rusanova I, Escames G, Djerdjouri B, Acuña-Castroviejo D. Melatonin alleviates sepsis-induced heart injury through activating the Nrf2 pathway and inhibiting the NLRP3 inflammasome. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2021; 394(2):261-277, doi: 10.1007/s00210-020-01972-5.

Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, Abrassart D, Kobayashi Y, Marcheva B, Hong HK, Chong JL, Buhr ED, Lee C, Takahashi JS, Imai S, Bass J. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science* 2009; 324(5927):651-4, doi: 10.1126/science.1171641.

Rasheed MZ, Khatoon R, Talat F, Alam MM, Tabassum H, Parvez S. Melatonin Mitigates Rotenone-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the *Drosophila melanogaster* Model of Parkinson's Disease-like Symptoms. *ACS Omega* 2023; 8(8):7279-7288, doi: 10.1021/acsomega.2c03992.

Razali K, Mohd Nasir MH, Othman N, Doolaanea AA, Kumar J, Nabeel Ibrahim W, Mohamed WMY. Characterization of neurobehavioral pattern in a zebrafish 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced model: A 96-hour behavioral study. *PLoS One* 2022; 17(10):e0274844, doi: 10.1371/journal.pone.0274844.

Reeve A, Simcox E, Turnbull D. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev* 2014; 14(100):19-30, doi: 10.1016/j.arr.2014.01.004.

Reis J, Benbrick E, Bonnetterre V, Spencer PS. Parkinson's disease and solvents: Is there a causal link? *Rev Neurol* 2016;172(12):761-765, doi: 10.1016/j.neurol.2016.09.012.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 539-548, doi: 10.1007/978-1-4615-0135-0_62.

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1129-1146.

Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 49(8):654-64, doi: 10.1007/BF01923947.

Ren DL, Wang XB, Hu B. Circadian gene period1b regulates proinflammatory cytokine expression through NF- κ B signalling in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol* 2018; 80:528-533, doi: 10.1016/j.fsi.2018.06.040.

- Ren DL, Zhang JL, Yang LQ, Wang XB, Wang ZY, Huang DF, Tian C, Hu B. Circadian genes *period1b* and *period2* differentially regulate inflammatory responses in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol* 2018; 77:139-146, doi: 10.1016/j.fsi.2018.03.048.
- Rocha EM, Keeney MT, Di Maio R, De Miranda BR, Greenamyre JT. LRRK2 and idiopathic Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2022; 45(3):224-236, doi: 10.1016/j.tins.2021.12.002.
- Rui Q, Ni H, Li D, Gao R, Chen G. The Role of LRRK2 in Neurodegeneration of Parkinson Disease. *Curr Neuroparmacol* 2018; 16(9):1348-1357; doi: 10.2174/1570159X16666180222165418.
- Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci* 2015; 40(4):200-10, doi: 10.1016/j.tibs.2015.02.003.
- Sacksteder RE, Kimmey JM. Immunity, Infection, and the Zebrafish Clock. *Infect Immun* 2022; 90(9):e0058821, doi: 10.1128/iai.00588-21.
- Sakai K, Yamamoto Y, Ikeuchi T. Vertebrates originally possess four functional subtypes of G protein-coupled melatonin receptor. *Sci Rep* 2019; 9(1):9465, doi: 10.1038/s41598-019-45925-2.
- Sallinen V, Torkko V, Sundvik M, Reenilä I, Khrustalyov D, Kaslin J, Panula P. MPTP and MPP⁺ target specific aminergic cell populations in larval zebrafish. *J Neurochem* 2009; 108(3):719-31, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05793.x.
- Santos D, Cardoso SM. Mitochondrial dynamics and neuronal fate in Parkinson's disease. *Mitochondrion* 2012; 12(4):428-37, doi: 10.1016/j.mito.2012.05.002.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; 1: 1269, doi: 10.1016/s0140-6736(89)92366-0.
- Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008; 7: 97-109, doi: 10.1016/S1474-4422(07)70327-7.
- Schmitt K, Grimm A, Dallmann R, Oettinghaus B, Restelli L.M., Witzig M., Ishihara N., Mihara K., Ripberger J.A., Albrecht U., et al. Circadian Control of DRP1 Activity Regulates Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics. *Cell Meta* 2018; 27:657–666.e5, doi: 10.1016/j.cmet.2018.01.011.
- Scrima R, Cela O, Merla G, Augello B, Rubino R, Quarato G, Fugetto S, Menga M, Fuhr L, Relógio A, Piccoli C, Mazzocchi G, Capitanio N. Clock-genes and mitochondrial

respiratory activity: Evidence of a reciprocal interplay. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1857(8):1344-1351, doi: 10.1016/j.bbabbio.2016.03.035.

Segura-Aguilar J, Paris I, Muñoz P, Ferrari E, Zecca L, Zucca FA. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2014; 129(6):898-915, doi: 10.1111/jnc.12686.

Shafizadeh E, Huang H, Lin S. Transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein. *Methods Mol Biol* 2002; 183:225-33, doi: 10.1385/1-59259-280-5:225.

Sharma VD, Patel M, Miocinovic S. Surgical Treatment of Parkinson's Disease: Devices and Lesion Approaches. *Neurotherapeutics* 2020; 17(4):1525-1538, doi: 10.1007/s13311-020-00939-x.

Sourdeval M, Lemaire C, Deniaud A, Taysse L, Daulon S, Breton P et al. Inhibition of caspase-dependent mitochondrial permeability transition protects airway epithelial cells against mustard-induced apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11: 1545-1559, doi: 10.1007/s10495-006-8764-1.

Stefulj J, Hörtnner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wölfler A, Semmler J, Liebmann PM. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *Chronobiol Int* 2010; 27(6):1178-201, doi: 10.3109/07420528.2010.496911.

Stojkovic K, Wing SS, Cermakian N. A central role for ubiquitination within a circadian clock protein modification code. *Front Mol Neurosci* 2014; 7:69, doi: 10.3389/fnmol.2014.00069.

Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 1981; 291(5813):293-6, doi: 10.1038/291293a0.

Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2016; 1:318-324, doi: 10.1111/jnc.13691.

Tähkämö L, Partonen T, Pesonen AK. Systematic review of light exposure impact on human circadian rhythm. *Chronobiol Int* 2019; 36(2):151-170, doi: 10.1080/07420528.2018.1527773.

Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 2004; 5: 213-218, doi: 10.1038/sj.embor.7400074.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of

melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1177-1185, doi: 10.1016/s0891-5849(00)00435-4.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; 42(1):28-42, doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x.

Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen DF, Karbowski M et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* 2010; 191: 1367-1380, doi: 10.1083/jcb.201007013.

Tapias V, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Camacho E, Carrion MD et al. Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 2009; 87: 3002-3010, doi: 10.1002/jnr.22123.

Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell* 2019; 18(6):e13031, doi: 10.1111/acer.13031.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S et al. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 838-847, doi: 10.1016/s0891-5849(99)00131-8.

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304: 1158-1160, doi: 10.1126/science.1096284.

Vartanian GV, Li BY, Chervenak AP, Walch OJ, Pack W, Ala-Laurila P, Wong KY. Melatonin Suppression by Light in Humans Is More Sensitive Than Previously Reported. *J Biol Rhythms* 2015; 30(4):351-4, doi: 10.1177/0748730415585413.

Vatine G, Vallone D, Gothilf Y, Foulkes NS. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett* 2011; 585(10):1485-94, doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.007.

Venegas C, Garcia JA, Doerrier C, Volt H, Escames G, Lopez LC et al. Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. *J Pineal Res* 2013; 54: 313-321, doi: 10.1111/jpi.12019.

Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García-Corzo L, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res* 2012; 52(2):217-27, doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x.

Videnovic A, Golombek D. Circadian Dysregulation in Parkinson's Disease. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms* 2017; 2:53-58, doi: 10.1016/j.nbscr.2016.11.001.

Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ, Przedborski S. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(5):2837-42, doi: 10.1073/pnas.051633998.

Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem* 2008; 283(35):23542-56, doi: 10.1074/jbc.M801992200.

Von GC, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 2002; 309: 151-162, doi: 10.1007/s00441-002-0581 4.

Vriend J, Reiter RJ. Melatonin as a proteasome inhibitor. Is there any clinical evidence? *Life Sci* 2014; 115(1-2):8-14, doi: 10.1016/j.lfs.2014.08.024.

Wang H, Ye Y, Zhu Z, Mo L, Lin C, Wang Q, Wang H, Gong X, He X, Lu G, Lu F, Zhang S. MiR-124 Regulates Apoptosis and Autophagy Process in MPTP Model of Parkinson's Disease by Targeting to Bim. *Brain Pathol* 2016; 26(2):167-76, doi: 10.1111/bpa.12267.

Wang H. Comparative analysis of teleost fish genomes reveals preservation of different ancient clock duplicates in different fishes. *Mar Genomics* 2008; 1(2):69-78, doi: 10.1016/j.margen.2008.06.003.

Wang H. Comparative genomic analysis of teleost fish *bmal* genes. *Genetica* 2009; 136(1):149-61, doi: 10.1007/s10709-008-9328-9.

Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener* 2015; 4:19, doi: 10.1186/s40035-015-0042-0.

Wang Y, Lv D, Liu W, Li S, Chen J, Shen Y, Wang F, Hu LF, Liu CF. Disruption of the Circadian Clock Alters Antioxidative Defense via the SIRT1-BMAL1 Pathway in 6-OHDA-Induced Models of Parkinson's Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018:4854732, doi: 10.1155/2018/4854732.

Westerfield M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). Oregon: 2007.

Wilms H, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Zecca L, Lucius R. Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated

protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 2003; 17(3):500-2, doi: 10.1096/fj.02-0314fje.

Xu L., Lin J., Liu Y., Hua B., Cheng Q., Lin C., Yan Z., Wang Y., Sun N., Qian R., et al. CLOCK Regulates Drp1 mRNA Stability and Mitochondrial Homeostasis by Interacting with PUF60. *Cell Rep* 2022; 39:110635, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110635.

Yildirim FB, Ozsoy O, Tanriover G, Kaya Y, Ogut E, Gemici B, Dilmac S, Ozkan A, Agar A, Aslan M. Mechanism of the beneficial effect of melatonin in experimental Parkinson's disease. *Neurochem Int* 2014; 79:1-11, doi: 10.1016/j.neuint.2014.09.005.

Yujnovsky I, Hirayama J, Doi M, Borrelli E, Sassone-Corsi P. Signaling mediated by the dopamine D2 receptor potentiates circadian regulation by CLOCK:BMAL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(16):6386-91, doi: 10.1073/pnas.0510691103.

Zhang H, Squadrito GL, Uppu R, Pryor WA. Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study. *Chem Res Toxicol* 1999; 12: 526-534, doi: 10.1021/tx980243t.

Zhao D, Yu Y, Shen Y, Liu Q, Zhao Z, Sharma R, Reiter RJ. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; 10:249, doi: 10.3389/fendo.2019.00249.

Zhdanova IV, Wang SY, Leclair OU, Danilova NP. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res* 2001; 903(1-2):263-8, doi: 10.1016/s0006-8993(01)02444-1.

Zheng R, Ruan Y, Yan Y, Lin Z, Xue N, Yan Y, Tian J, Yin X, Pu J, Zhang B. Melatonin Attenuates Neuroinflammation by Down-Regulating NLRP3 Inflammasome via a SIRT1-Dependent Pathway in MPTP-Induced Models of Parkinson's Disease. *J Inflamm Res* 2021; 14:3063-3075, doi: 10.2147/JIR.S317672.

Ziv L, Levkovitz S, Toyama R, Falcon J, Gothilf Y. Functional development of the zebrafish pineal gland: light-induced expression of period2 is required for onset of the circadian clock. *J Neuroendocrinol* 2005; 17(5):314-20, doi: 10.1111/j.1365-2826.2005.01315.x.

Ziv L, Tovim A, Strasser D, Gothilf Y. Spectral sensitivity of melatonin suppression in the zebrafish pineal gland. *Exp Eye Res* 2007; 84(1):92-9, doi: 10.1016/j.exer.2006.09.004.