

**EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE PARKINSON.
EVALUACIÓN DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y DE
LA CAPACIDAD TERAPÉUTICA DE LA MELATONINA.**



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

MARÍA ELENA DÍAZ CASADO

2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: María Elena Díaz Casado

ISBN: 978-84-9125-987-9

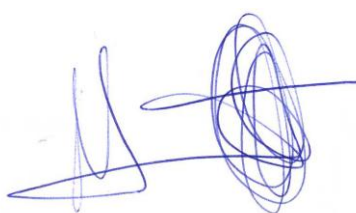
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44079>

EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE PARKINSON. EVALUACIÓN DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y DE LA CAPACIDAD TERAPÉUTICA DE LA MELATONINA.

Memoria que presenta la licenciada en Biología

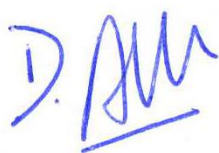
D^a María Elena Díaz Casado

como aspirante al grado de Doctor



Fdo: María Elena Díaz Casado

Vº Bº de los Directores de la Tesis Doctoral



Fdo: Dr. Darío Acuña Castroviejo

Doctor en Medicina

Catedrático de Fisiología de la UGR



Fdo: Dra. Germaine Escames Rosa

Doctor en Farmacia

Catedrática de Fisiología de la UGR

Universidad de Granada

2016

El doctorando **María Elena Díaz Casado** y los directores de la tesis **D. Darío Acuña Castroviejo** y **Dña. Germaine Escames Rosa** Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 6 de junio de 2016

Director/es de la Tesis



Fdo.: D. Darío Acuña Castroviejo

Doctorando



Fdo.: María Elena Díaz Casado



Fdo.: Dña. Germaine Escames Rosa

CERTIFICACIONES

D. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **María Elena Díaz Casado**, Licenciada 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 **“El pez cebra como modelo de Parkinson. Evaluación de la disfunción mitocondrial y de la capacidad terapéutica de la melatonina”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

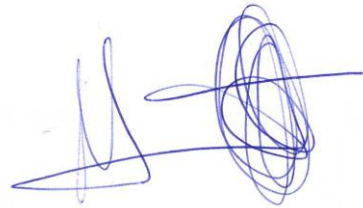
Granada, 06 de Junio de 2016

VºBº Director



Darío Acuña Castroviejo

La interesada



María Elena Díaz Casado

D. Germaine Escames Rosa, Catedrática de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **María Elena Díaz Casado**, Licenciada 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 **“El pez cebra como modelo de Parkinson. Evaluación de la disfunción mitocondrial y de la capacidad terapéutica de la melatonina”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 06 de Junio de 2016

VºBº Director



Germaine Escames Rosa

La interesada



María Elena Díaz Casado

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

Durante la realización del siguiente trabajo, la Ldo. María Elena Díaz Casado fue financiada por el siguiente contrato predoctoral:

- **Tipo de contrato:** Contratada predoctoral adscrita al Proyecto de Investigación de Excelencia de la Junta de Andalucía (P10-CTS-5784). A tiempo completo desde 1/02/2012 al 31/01/2016.
- **Organismo.** Universidad de Granada.
- **Centro:** Centro de Investigación Biomédica y Facultad de Medicina.
- **Departamento:** Fisiología.

Proyecto de investigación que ha financiado este estudio:

- **Título del proyecto:** Uso del pez cebra como modelo experimental de PD: Evaluación de la disfunción mitocondrial y búsqueda de compuestos neuroprotectores a partir de extractos de productos naturales de origen microbiano.
- **Entidad Financiadora:** Proyecto de Excelencia Junta de Andalucía
- **Entidades de realización:** Universidad de Granada
- **Referencia del proyecto:** P10-CTS-5784
- **Duración:** 01-01-2011 al 31-12-2016
- **Investigador Principal:** Darío Acuña Castroviejo

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

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, doi: 10.1111/jpi.12332

Otras publicaciones:

Doerrier C, García JA, Volt H, Díaz-Casado ME, Luna-Sánchez M, Fernández-Gil B, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Permeabilized myocardial fibers as model to detect mitochondrial dysfunction during sepsis and melatonin effects without disruption of mitochondrial network. *Mitochondrion.*, 2016, doi: 10.1016/J.mito2015.12.010

Volt H, García JA, Doerrier C, Díaz-Casado ME, Guerra-Librero A, López LC, Escames G, Tresguerres JA, Acuña-Castroviejo D. Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP13 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res.*, 2016, doi: 10.1111/jpi.12303

Luna-Sánchez M, Díaz-Casado E, Barca E, Tejada MA, Montilla-García A, Cobos EJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Quinzii CM, López LC. The clinical heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency results from genotypic differences in the Coq9 gene. *EMBO Mol Med.*, 2015, doi:10.15252/emmm.201404632

Doerrier C, García Ja, Volt H, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Ortiz F, Luna-Sánchez M, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Identification of mitochondrial deficits and melatonin targets in liver of septic mice by high-resolution respirometry. *Life Sci.*, 2015, doi: 10.1016/j.lfs.2014.11.031

Escames G, Díaz-Casado ME, Doerrier C, Luna-Sánchez M, López LC, Acuña-Castroviejo D. Early gender differences in the redox status of the brain mitochondria

with age: effects of melatonin therapy. *Horm Mol Biol Clin Investig.*, 2013, doi: 10.1515/hmbci-2013-0026.

Lima-Cabello E, Díaz-Casado Me, Guerrero JA, Otalora BB, Escames G, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. A review of the melatonin functions in zebrafish physiology. *J Pineal Res.* 2014, doi: 10.1111/jpi.12149.

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, doi: 10.1007/s00018-014-1579-2

Aportaciones a congresos relacionados con la presente Tesis Doctoral:

Comunicación Oral

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). Melatonin restores mitochondrial regulatory gene expression and function in the zebrafish model of parkinsonism. 2014. Granada (España). **Díaz-Casado ME**, Lima-Cabello E, Doerrier C, García JA, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

7th European Zebrafish Meeting. Melatonin restores mitochondrial function and locomotor activity in parkinsonian zebrafish. 2015 Oslo (Noruega). Acuña-Castroviejo D, **Díaz-Casado ME**, Escames G, García JA, López A, Rusanova I, Guerrero-Martinez JA.

II Reunión Anual Científica del Instituto de Investigación Biosanitaria Granada. Melatonin restores mitochondrial regulatory gene expression and function in parkinsonian zebrafish. 2015. Granada (España). Premio a la mejor comunicación. **Díaz-Casado ME**, Lima-Cabello E, García Santos JA, Volt Valdivia H, Doerrier Velasco C, Escames Rosa G, Acuña-Castroviejo D.

Póster

7th European Zebrafish Meeting. Melatonin restores mitochondrial regulatory gene expression and function in parkinsonian zebrafish. 2015 Oslo (Noruega) **Díaz-Casado ME**, Lima-Cabello E, García Santos JA, Volt Valdivia H, Doerrier Velasco C, Escames Rosa G, Acuña-Castroviejo D.

16 National Congress of the Spanish Society of Neuroscience. Melatonin restores mitochondrial regulatory gene expression and function in parkinsonian zebrafish. 2015. Granada (España). **Díaz-Casado ME**, Lima-Cabello E, García Santos JA, Volt Valdivia H, Doerrier Velasco C, Escames Rosa G, Acuña-Castroviejo D.

16 National Congress of the Spanish Society of Neuroscience. Melatonin restores mitochondrial function and locomotor activity in parkinsonian zebrafish. 2015. Granada (España). **Díaz-Casado ME**, García Santos JA, Guerrero-Martínez J, López A, Rusanova I, Escames Rosa G, Acuña-Castroviejo D.

A MI FAMILIA

ABREVIATURAS

aMT: melatonina

BSA: bovine serum albumin

DA: dopamina

DMSO: dimetil sulfoxido

Dpf: días post fecundación

FCCP: carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazon

GPx: glutathion peroxidasa

GRd: glutathion reductasa

GSH: glutathion reducido

GSSG: glutathion oxidado

Hpf: horas post fecundación

Ig: immonoglobulina

MAO B: monoamina oxidasa B

MPP+: metil-4-fenilpiridina

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

NADH: nicotinamida-adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

OCR: tasa de consume de oxígeno (oxygen consumption rates)

PBS-T: tampon fosfato salino-Triton X-100

PFA: paraformaldehido

PTU: feniltiourea

RT = temperatura ambiente

SOD = superóxido dismutasa

TCA = ácido tricloroacético

TH = tirosina hidroxilasa

TNB = ácido 5-tio-2- nitrobenzoico

WST-1 = water-soluble formazan dye

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa, la segunda con mayor incidencia tras el Alzheimer, cuyos síntomas más frecuentes son la rigidez, la bradiquinesia y el temblor en reposo. Estos síntomas aparecen como consecuencia de la muerte neuronal en una zona muy concreta del cerebro, la pars compacta de la sustancia negra. El resultado de la muerte de neuronas dopaminérgicas en esta zona es una disminución en la cantidad de dopamina que alcanza el estriado, lo que da lugar a una alteración entre las múltiples conexiones establecidas entre los diferentes ganglios basales, siendo la consecuencia final una mayor inhibición sobre el tálamo, que junto con la corteza motora y el cerebelo, regulan la actividad motora. Esta alteración provoca una desregulación en el control del movimiento voluntario, dando lugar a los síntomas motores característicos de la enfermedad.

El 90-95% de los casos de Parkinson son de causa desconocida, se habla por tanto de Parkinson idiopático, mientras que solo 5-10% están asociados a factores genéticos, en este caso se habla de Parkinson familiar. En ambos casos la muerte neuronal está asociada a la disfunción mitocondrial, estando esta condicionada por procesos fisiopatológicos comunes en la enfermedad de Parkinson, como son el estrés oxidativo/nitrosativo y la inhibición del complejo I mitocondrial. El aumento de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno contribuyen al daño mitocondrial que, junto con el fallo bioenergético provocado por la inhibición del complejo I, conducen a la apertura del poro de transición mitocondrial, con la consiguiente salida de citocromo c y la inducción de la apoptosis. El Parkinson familiar está asociado a mutaciones en genes cuyos productos son proteínas relacionadas con el mantenimiento de la función y homeostasis mitocondriales. Los principales genes relacionados con casos de Parkinson familiar son PINK1, Parkina, DJ-1 y α -sinucleína. PINK1 es una ubiquitin quinasa que detecta y se une a mitocondrias dañadas. En esta posición es capaz de fosforilar a Parkina, una ubiquitin E3 ligasa, que una vez activa por PINK1 y reclutada a la mitocondria inicia procesos de mitofagia para eliminar a las mitocondrias dañadas. DJ-1 puede interaccionar con parkina y PINK1, pero sobre todo tiene funciones antioxidantes, regulando la expresión de genes antioxidantes y de la tiroxina hidroxilasa, enzima involucrada en la ruta de biosíntesis de la dopamina. Por lo tanto, los tres genes participan en una vía común relacionada con el mantenimiento de

la homeostasis mitocondrial. Recientemente, se ha identificado otro gen, MUL1, que codifica una E3 ligasa mitocondrial y que puede contrarrestar los fenotipos mutantes de PINK1/Parkina, al intervenir junto con parkina en la ubiquitinización de Mfn. Finalmente, la α -sinucleína, que es el principal componente de los cuerpos de Lewy, inclusiones citoplasmáticas características de esta enfermedad y que aparecen en las neuronas dopaminérgicas, constituye una parte importante de la fisiopatología de la disfunción mitocondrial.

El pez cebra se presenta como un modelo en auge para el estudio de la enfermedad de Parkinson, al tratarse de un animal vertebrado, cuyo sistema dopaminérgico está bien caracterizado, donde las neuronas dopaminérgicas se localizan en el diencéfalo ventral, bulbo olfatorio y núcleo coeruleus, por tanto una disposición diferente pero con un sistema nigroestriar comparable al de humanos. Además el pez cebra es sensible al MPTP, neurotoxina utilizada que induce las principales características de la enfermedad de Parkinson afectando primariamente a la mitocondria, y permite analizar la función mitocondrial in vivo, siendo este aspecto determinante para el estudio de la fisiopatología parkinsoniana. Por último, todos los genes, comentados anteriormente y cuyas mutaciones afectan a la homeostasis mitocondrial, están también presentes en el cerebro del pez cebra, excepto la α -sinucleína. En su lugar el pez cebra contiene tres genes, *sncb*, *sncga* y *sncgb* que expresan las isoformas β -, γ 1- y γ 2-sinucleínas, respectivamente. La γ 1-sinucleína es una proteína abundantemente expresada en cerebro del pez cebra, y su función podría ser similar a la humana, interviniendo en funciones dopaminérgicas.

La melatonina es una indolamina altamente conservada que también está presente en el pez cebra. Debido a sus capacidades antioxidantes y antiinflamatorias, la melatonina mantiene la homeostasis mitocondrial en diferentes patologías debidas a alteraciones mitocondriales, incluyendo diferentes modelos de parkinsonismo. Estos datos hacen pensar en que esta indolamina podría tener un efecto protector frente al desarrollo de la enfermedad de Parkinson, aunque no existe información con respecto a si es capaz de recuperar el estado parkinsoniano una vez establecido, ni sobre si sus efectos protectores están relacionados con la regulación de la expresión de los genes implicados en la homeostasis mitocondrial anteriormente comentados. El tratamiento

actual de la enfermedad de Parkinson, es puramente sintomático, por lo que el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que frenen el avance de la enfermedad serían de gran interés clínico.

De acuerdo con estos precedentes, y para mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la disfunción mitocondrial en la enfermedad de Parkinson, en el presente estudio hemos analizado desde un punto de vista bioquímico, molecular, genético y fenotípico el modelo parkinsoniano de pez cebra tratado con MPTP. Además, se ha estudiado el posible efecto neuroprotector de la melatonina en este modelo parkinsoniano, evaluando la capacidad de prevención y curación de la administración de esta indolamina mediante una evaluación molecular, genética y fenotípica.

Los resultados de esta tesis muestran que los embriones de pez cebra tratados con MPTP a una dosis de 600 μ M durante dos días, desarrollan todas las alteraciones fisiopatológicas características de la enfermedad de Parkinson. El MPTP induce, en los embriones de pez cebra, una inhibición de la actividad del complejo I similar a la registrada en el cerebro de pacientes con la enfermedad, y acompañada por un aumento del estrés oxidativo, caracterizado por un aumento del ratio GSSG/GSH y por una disminución de la actividad de las principales enzimas antioxidantes, SOD, GPx y GRd, y un aumento del estrés nitrosativo, caracterizado por un aumento de la iNOS. El análisis de la respiración mitocondrial *in vivo*, pone de manifiesto el fallo bioenergético existente, caracterizado por una disminución en la producción de ATP y un aumento del escape de protones, lo que conduce a la muerte de las neuronas dopaminérgicas localizadas en el diencéfalo ventral y el bulbo olfatorio, coincidiendo con las zonas donde hemos registrado una mayor inducción de iNOS.

En este modelo parkinsoniano de pez cebra, el análisis molecular de los genes implicados en la función mitocondrial, PINK1, Parkina, DJ-1, MUL1 y γ 1-sinucleína, muestra que el tratamiento con MPTP produce alteraciones en la expresión de estos genes. Estas alteraciones conducen a la ausencia de las proteínas parkina y DJ-1, lo que impide que estas lleven a cabo la inducción de mitofagia y el control del estrés oxidativo, respectivamente, y que MUL1 sea incapaz de compensar la ausencia de

parkina. Todas estas alteraciones contribuyen a la disfunción mitocondrial y a mantener un pool de mitocondrias dañadas en la célula, que a su vez seguirán contribuyendo en aumentar el estrés oxidativo/nitrosativo y conduciendo finalmente a la muerte neuronal. Estos cambios moleculares se manifiestan fenotípicamente con una disminución de la actividad locomotora en los embriones de pez cebra.

Ante esta situación de disfunción mitocondrial y muerte neuronal, el tratamiento con melatonina tiene un potente efecto neuroprotector. Este efecto se debe a que la mitocondria es diana celular de la melatonina, donde gracias a sus propiedades disminuye el estrés oxidativo, normalizando el índice GSSG/GSH y potenciando la actividad de las enzimas antioxidantes antes mencionadas. También tiene un potente efecto antiinflamatorio inhibiendo la iNOS. Todas estas acciones suponen una mejora de la función mitocondrial, con un aumento de la actividad del complejo I mitocondrial y, como muestran los análisis *in vivo*, con un aumento de la producción de ATP y una disminución del escape de protones. Por todo ello, la melatonina es capaz de evitar el fracaso bioenergético y por lo tanto la muerte neuronal dopaminérgica en las zonas del diencefalo ventral y el bulbo olfatorio que están significativamente afectadas por el MPTP. Pero quizás, lo más interesante de todo es que la melatonina tiene este mismo efecto una vez que el estado parkinsoniano se ha establecido, es decir su efecto no es sólo preventivo sino que tiene efecto curativo.

Por último, demostramos por primera vez que, los efectos beneficiosos de la melatonina sobre la función mitocondrial también se deben a que esta indolamina modifica la expresión de los genes relacionados con el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial alterados por el MPTP. El tratamiento con melatonina aumenta la expresión de parkina, permitiendo que esta sea fosforilada por PINK1, reclutada a la mitocondria e induciendo la mitofagia para eliminar las mitocondrias dañadas. También aumenta la expresión de PINK1, DJ-1 y MUL1, favoreciendo un correcto funcionamiento mitocondrial y protegiendo a las neuronas de la muerte. Todos estos efectos se ven reflejados fenotípicamente en una recuperación de la actividad locomotora.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el daño mitocondrial en la enfermedad de Parkinson está determinado por diferentes eventos fisiopatológicos, estrés oxidativo, neuroinflamación, inhibición del complejo I y alteración de genes relacionados con el mantenimiento de la calidad mitocondrial, y que todos ellos confluyen en la disfunción mitocondrial que provoca la muerte neuronal. Ante esta situación, la melatonina se presenta como una estrategia farmacológica a tener en cuenta, puesto que actúa a nivel de todos y cada uno de estos eventos patofisiológicos.

Summary

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative illness, the second most common disease after Alzheimer's. The main symptoms of PD are rigidity, bradykinesia and resting tremor. These symptoms occur as a result of neuronal death in substantia nigra. The consequence of the death of dopaminergic neurons in this area is a reduction in the amount of dopamine in the striatum, which leads to an alteration between multiple established connections among basal ganglia, leading to a greater inhibition on the thalamus. This condition causes an alteration in the control of voluntary movement, which explains the typical symptoms of this disease.

Among 90-95% of PD cases are of unknown cause, and are called idiopathic PD; only 5-10% are associated with genetic factors, and they are called familial PD. In both types of PD, neuronal death is associated with mitochondrial dysfunction, oxidative and nitrosative stress, and inhibition of complex I. The increase in reactive oxygen and nitrogen species contribute to mitochondrial damage and bioenergetic failure due to the inhibition of complex I, leading to the opening of the mitochondrial transition pore, cytochrome c release and apoptosis. Familial PD is associated with mutations in genes whose products are related to the mitochondrial homeostasis. The main genes associated with familial PD are PINK1, Parkin, DJ-1 and α -synuclein. PINK1 is a ubiquitin kinase which detects and binds to damaged mitochondria. In this position, it phosphorylates Parkin, a E3 ubiquitin ligase that, once activated by PINK1 and recruited to mitochondria, triggers mitophagy to eliminate damaged mitochondria. DJ-1 can interact with parkin and PINK1, and it has antioxidant functions, regulating the expression of antioxidant genes and thyroxine hydroxylase, the enzyme involved in the biosynthesis of dopamine. Therefore, these genes are involved in a common pathway related to maintaining mitochondrial homeostasis. It has recently been identified *MUL1*, which encodes MUL1, and is a mitochondrial E3 protein ligase that may counteract the *PINK/parkin* mutant phenotypes. Finally, the α -synuclein is the major component of Lewy bodies, cytoplasmic inclusions that appear on dopaminergic neurons, and is also involved in mitochondrial dysfunction.

The zebrafish is presented as an excellent model for the study of PD. It is a vertebrate animal, whose dopaminergic system is well characterized, and with dopaminergic neurons located in the ventral diencephalon, olfactory bulb and

coeruleus nucleus, comparable to human nigrostriatal system. Furthermore, zebrafish is sensitive to MPTP neurotoxin used to induce the main features of PD, and this model allows us to analyze the mitochondrial function of zebrafish embryos *in vivo*, a feature that is decisive for the study of the pathophysiology of PD. Finally, except for α -synuclein, all genes discussed above, whose mutations affecting mitochondrial homeostasis, are also present in the brain of zebrafish. Instead of α -synuclein, zebrafish contains three genes, *sncb*, *sncga* and *sncgb* expressing β -, γ 1- and γ 2-synuclein, respectively. The γ 1-synuclein is a protein abundantly expressed in zebrafish brain, and its role seems to be similar to that in human brain.

Melatonin is a highly conserved indoleamine, which is also present in zebrafish. Due to its antioxidant and antiinflammatory capacity, melatonin maintains mitochondrial homeostasis in different pathologies including different models of Parkinsonism. These data suggest that this indoleamine could have a protective effect against the development of PD, although there is no information regarding whether it is able to retrieve the parkinsonian state once established, or whether its protective effects are related to regulating the expression of genes involved in mitochondrial homeostasis discussed above. The treatment of PD is only symptomatic and, so, the development of new therapeutic strategies to slow the progression of the disease would be of great clinical interest.

Thus, to improve the understanding of the molecular mechanisms involved in mitochondrial dysfunction in PD, we have analyzed here the biochemical, molecular, genetic and phenotypic PD basis in a MPTP model of parkinsonian zebrafish. In addition, we studied the potential neuroprotective effect of melatonin in this parkinsonian model, evaluating its ability to prevent and recover zebrafish from parkinsonism by molecular, genetic and phenotypic evaluation.

The results of this thesis show that, zebrafish embryos treated with MPTP at a dose of 600 μ M for two days, develop all pathophysiological characteristics of PD. MPTP induces, in zebrafish embryos, inhibition activity I similar to inhibition in the brains of patients. This inhibition is accompanied by an increased oxidative stress, reflected by an increased GSSG/GSH ratio and by a reduction in the activity of the main

antioxidant enzymes, SOD, GPx and GRd, together with an increase nitrosative stress, characterized by iNOS induction. The analysis of mitochondrial activity *in vivo* shows the existing bioenergetic failure, characterized by a decrease in ATP production and increased in proton leak, leading to the death of dopaminergic neurons located in the ventral diencephalon and olfactory bulb, which coincide with the areas where we have recorded a greater induction of iNOS.

In this Parkinsonian zebrafish model, molecular analysis of genes involved in mitochondrial function, PINK1, Parkin, DJ-1, MUL1 and γ 1-synuclein shows that MPTP treatment produce an altered expression of these genes. These alterations lead to the lack of parkin and DJ-1 protein, failing the mechanisms of mitophagy and control of oxidative stress, respectively. In this condition, MUL1 becomes unable to compensate the absence of parkin. Together, these changes contribute to mitochondrial dysfunction and accumulation of a pool of damaged mitochondria in the cell, which further contribute to enhance oxidative/nitrosative stress and neuronal death. All these changes are phenotypically manifested with decreased locomotor activity in zebrafish embryos.

In this situation, with mitochondrial dysfunction and neuronal death, the administration of melatonin has potent neuroprotective effects. This is because mitochondria are cellular target of melatonin that, due to its antioxidant effects, decreases oxidative stress, normalizing the GSSG/GSH ratio and enhances the activity of the antioxidant enzymes. Also, melatonin displays a potent antiinflammatory effect, inhibiting iNOS induced by MPTP. The administration of melatonin improves full mitochondrial function, increasing the activity of the mitochondrial complex I and, as shown *in vivo* analysis, increasing the ATP production and reducing the proton leak. Melatonin is able to avoid the bioenergetic failure and it prevents dopaminergic neuronal death in the ventral diencephalon and olfactory bulb. Overall, the most interesting result here reported is that melatonin has the same effect once the parkinsonian state has been established, then it has preventive and curative effects.

Finally, we show for the first time that, the beneficial effects of melatonin on mitochondrial function depend on the modification of the expression of mitochondrial

homeostasis genes altered by MPTP. Treatment with melatonin increases the expression of parkin, allowing its phosphorylation by PINK1 and induction the mitophagy to remove the pool of damaged mitochondria. Melatonin also increases the expression of PINK1, DJ-1 and MUL1, promoting proper mitochondrial function and protecting neurons from death. All these effects are phenotypically reflected in the recovery of locomotor activity.

In summary, our results suggest that mitochondrial damage and cell death in PD is determined by different pathophysiological events, including oxidative stress, neuroinflammation, inhibition of complex I and alteration of mitochondrial homeostasis genes. In this situation, melatonin is presented as a pharmacological strategy to consider, since it counteracts every one of these pathophysiological events.

Índice

I. INTRODUCCIÓN	9
1. ENFERMEDAD DE PARKINSON	3
1.1 <i>Epidemiología y Síntomas Clínicos</i>	3
1.2 <i>Ganglios basales y enfermedad de parkinson</i>	5
1.3 <i>Etiología</i>	9
1.4 <i>Fisiopatología</i>	14
1.5 <i>Tratamiento</i>	29
2. EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON	30
2.1 <i>Ventajas del uso del pez cebra como modelo experimental</i>	30
2.2 <i>El pez cebra como modelo de enfermedades humanas</i>	32
2.3 <i>toxinas usadas para inducir modelos animales de parkinsonismo</i>	34
2.4 <i>Mecanismos de acción del MPTP</i>	35
2.4 <i>El pez cebra como modelo de enfermedad de Parkinson</i>	37
3. MELATONINA	39
3.1 <i>Síntesis y metabolismo de la melatonina</i>	41
3.2 <i>Mecanismos de acción de la melatonina</i>	44
3.3 <i>Melatonina y neurodegeneración</i>	51
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
III. MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS	63
1.1 <i>Animales</i>	63
1.2 <i>Tratamiento con MPTP y melatonina</i>	63
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	65
2.1 <i>Extracción de RNA</i>	65
2.2 <i>Reacción de transcripción inversa</i>	65
2.3 <i>RT-PCR cuantitativa</i>	65
3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS EMBRIONES.....	66
4. INMUNOHISTOQUÍMICA	67
5. RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL	68
6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL	70
7. ANÁLISIS DEL ESTADO REDOX.....	71
8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA.....	72
9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MELATONINA, AFMK Y AMK MEDIANTE ESPECTOMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN.	73
10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	73
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	74
IV. RESULTADOS	75
PARTE DE LOS RESULTADOS MOSTRADOS EN ESTE APARTADO CORRESPONDEN AL TRABAJO:	77
1. LA MELATONINA PROTEGE A LA MITOCONDRIA DEL FALLO BIONERGÉTICO PRODUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON MPTP.	79
2. LA MELATONINA PROTEGE A LOS EMBRIONES DEL DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR EL MPTP.	86
3. LA MELATONINA PROTEGE A LOS EMBRIONES DE LA INFLAMACIÓN Y DE LA NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA INDUCIDA POR EL MPTP.	89
4. LA MELATONINA PREVIENE LOS EFECTOS DEL MPTP SOBRE LA EXPRESIÓN DE γ -SINUCLÉINA Y SOBRE LOS GENES RELACIONADOS CON LA HOMEOSTASIS MITOCONDRIAL.....	93

5. LA MELATONINA RECUPERA EL DAÑO PRODUCIDO POR EL MPTP EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA DE 5 DPF.....	98
6. EL DAÑO PRODUCIDO POR EL MPTP SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA EN LOS EMBRIONES DE PEZ CEBRA ES PREVENIDO Y RECUPERADO POR LA MELATONINA.....	103
V. DISCUSIÓN.....	105
VI. CONCLUSIONES.....	119
VII CONCLUSIONS	123
VIII BIBLIOGRAFÍA.....	127
ANEXO	161

I. Introducción

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo progresivo. Su nombre se debe a James Parkinson, quien describió por primera vez en 1817 los síntomas característicos de la enfermedad en cinco pacientes. En 1919, Tretiakoff relacionó la enfermedad de Parkinson con una zona muy concreta del cerebro, la sustancia negra, al observar la pérdida de pigmento que acontecía en esta zona cerebral como consecuencia de la muerte de las neuronas que contienen dicho pigmento, la neuromelanina. Estas neuronas son llamadas neuronas dopaminérgicas porque producen un neurotransmisor denominado dopamina, el 80% de éste neurotransmisor se encuentra en los ganglios basales (CARLSON 1955). Fue en 1961 cuando Oleh Hornykiewicz desentrañó la clave de la enfermedad, que está debida a la disminución de la dopamina en el cuerpo estriado y el putamen, como consecuencia de la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (Hornykiewicz 1963).

1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y SÍNTOMAS CLÍNICOS.

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer, afectando a una de cada mil personas en todo el mundo; actualmente se estima que más de seis millones de personas en el mundo sufren esta enfermedad (según un informe de la Global Declaration for Parkinson's Disease). En España, esta enfermedad afecta a más de 160.000 personas, en la que uno de cinco afectados es menor de 50 años (datos obtenidos del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad). La cifra de afectados previsiblemente crezca en los próximos años, debido al envejecimiento de la población y al aumento de la esperanza de vida, que pone de manifiesto enfermedades asociadas al envejecimiento, entre las que se encuentra la enfermedad de Parkinson.

La incidencia estimada se sitúa entre 8-18/100.000 habitantes año, cuando el estudio se ajusta a la población adulta, mayores de 55 ó 65 años, la tasa de incidencia se sitúa entre 410-529/100.000 habitantes año. La edad media de comienzo de los

síntomas se establece entre 60-65 años, pero en ocasiones puede presentarse en una franja de edad entre los 30 y los 50 años, en lo que se denomina Parkinson de inicio temprano. La prevalencia se incrementa sustancialmente con la edad, pasando del 1% en personas mayores de 60, a más del 4% en habitantes mayores de 80 años (de Lau and Breteler 2006).

Se estima que el riesgo de padecer la enfermedad es de un 1,3% para las mujeres y de un 2% para los hombres, en los que además la enfermedad progresa con mayor rapidez con respecto a las mujeres. Algunas de las explicaciones que se han sugerido para explicar esta mayor incidencia en hombres que en mujeres incluyen un efecto protector de los estrógenos y mayor frecuencia de exposición a tóxicos en hombres (Taylor *et al.*, 2007; Wooten *et al.*, 2004).

Esta enfermedad se manifiesta en todos los grupos étnicos y continentes, con pequeñas variaciones que pueden ser debidas a diferencias en la exposición ambiental o variaciones genéticas; a pesar de ello, los escasos y limitados estudios realizados sobre la incidencia del Parkinson no muestran diferencias étnicas en su incidencia. Sin embargo, si se ha registrado una mayor incidencia de Parkinson en el medio rural, especialmente entre los varones, quizás debido a la exposición medioambiental a pesticidas e insecticidas (Brown *et al.*, 2006), aunque también se ha relacionado con la exposición a determinados productos industriales o a metales (plomo, mercurio, aluminio, cobre, etc).

Desde un punto de vista clínico, los principales síntomas asociados a la enfermedad de Parkinson incluyen el temblor en reposo, la inestabilidad postural, bradiquinesia (movimientos lentos), hipoquinesia (movimientos reducidos), aquinesia (ausencia de movimiento) y rigidez de la musculatura o aumento del tono muscular en áreas extensas del cuerpo o en áreas aisladas, acompañado de trastornos posturales. Estos síntomas son causados por la degeneración progresiva y selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia negra, provocando la pérdida de señal dopaminérgica en el estriado (Hirsch *et al.*, 1988). Estas neuronas son las encargadas de controlar el movimiento voluntario, es por ello que su degeneración conduce a la aparición de los principales síntomas motores.

Además de los síntomas motores, a lo largo de la enfermedad aparecen otros síntomas no motores, como sudoración excesiva, aumento de la salivación y exceso de secreción sebácea, todos ellos debidos a alteraciones del sistema nervioso autónomo por la acción de los ganglios basales. Y ya en edades avanzadas pueden aparecer alteraciones cognitivas, depresión, alteraciones de la memoria y del sueño.

1.2 GANGLIOS BASALES Y ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Los ganglios basales, junto con el cerebelo, constituyen los principales centros de procesamiento de la información motora, necesarios para la planificación y control de los movimientos, así como para la regulación de los ajustes posturales requeridos en relación a estos movimientos, actuando siempre en íntima relación con la corteza motora y las vías corticoespinales. La diferencia entre ambos centros de control, radica en que, si bien el cerebelo regula directamente la ejecución del movimiento, los ganglios basales están implicados en aspectos de orden superior del control motor, contribuyendo a planificar y regular los patrones complejos de movimiento muscular, mediante el control de la intensidad relativa de movimientos secuenciales, de la dirección de los movimientos y de la secuencia de los movimientos para conseguir complicados objetivos motores. Además, debido a las extensas conexiones de la corteza asociativa y estructuras límbicas, los ganglios basales participan en aspectos no relacionados con el movimiento, como las funciones afectiva y cognitiva.

Los ganglios basales son un conjunto estructural formados por la sustancia negra (*locus niger, substantia nigra*), el estriado, el globo pálido y el núcleo subtalámico. La sustancia negra se subdivide en dos partes, pars reticulada y pars compacta, en esta última es dónde se hallan las neuronas pigmentadas que contienen neuromelanina, un pigmento negro que le da la coloración característica, y donde se originan los axones dopaminérgicos que constituyen la vía nigroestriatal que ascienden hasta el estriado. El conjunto de los ganglios basales se halla ricamente interconectado, y sus conexiones incluyen la corteza cerebral, el tálamo, otros núcleos subcorticales y núcleos del tallo cerebral. Los ganglios basales reciben casi todas sus señales de entrada desde la corteza motora, a través de la vía cortico-estriatal. La señal proveniente de la corteza cerebral se dirige a la porción motora del estriado,

concretamente al putamen. Se trata de fibras excitatorias que alcanzan el estriado estableciendo sinapsis excitatorias de tipo glutamínérgico. Las neuronas del estriado dan lugar a dos vías que conectan al estriado con los núcleos externo e interno del globo pálido (Escobar A 2003; Graybiel 1990). Por un lado, pueden proyectar directamente a la sustancia negra y al segmento interno del globo pálido, mediante conexiones de tipo inhibitorio utilizando GABA como neurotransmisor. Por otro lado, las neuronas estriales pueden alcanzar la sustancia negra de forma indirecta, primero proyectando al segmento externo del globo pálido, el cual a su vez proyecta a los núcleos subtalámicos. Estas conexiones también son de tipo inhibitorio, utilizando GABA como neurotransmisor. Los núcleos subtalámicos, por su parte, envían aferencias excitadoras glutamínérgicas a la sustancia negra pars reticulata y al globo pálido interno. Las fibras de la vía indirecta producen, por lo tanto, inhibición del globo pálido externo, desinhibición del núcleo subtalámico y excitación de la sustancia negra pars reticulata (Figura 1).

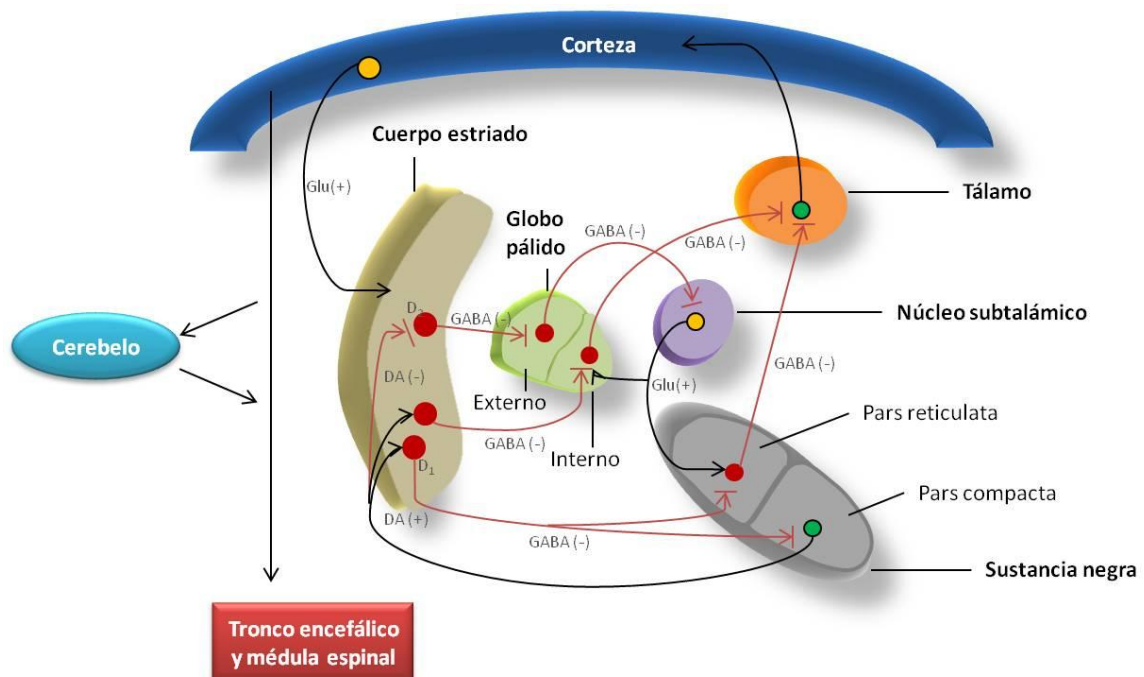


Figura 1. Circuito de conexiones de los ganglios basales con la corteza cerebral y la sustancia negra. Glu: glutamato; GABA: ácido gama amino butírico; DA: dopamina.

A nivel del estriado, la dopamina (DA) liberada por la pars compacta de la sustancia negra a través de la vía nigroestriatal, modula el efecto glutamatérgico de la proyección cortico-estriada por medio de un efecto dual sobre las neuronas del estriado. Este efecto es debido a dos tipos de receptores dopaminérgicos D_1 y D_2 , situados en diferentes poblaciones neuronales del estriado (Gerfen *et al.*, 1995). Los receptores D_1 , excitadores, se encuentran localizados en las neuronas del estriado que forman la vía directa, mientras que los receptores D_2 , inhibidores, se localizan en las neuronas del estriado que participan en la vía indirecta (Ariano *et al.*, 1992; Bertorello and Aperia 1990). De esta forma, la dopamina liberada excita las neuronas del estriado que expresan receptores D_1 en la vía directa, e inhibe a las neuronas que expresan receptores D_2 en la vía indirecta. El equilibrio entre las acciones de estas dos vías sobre la sustancia negra y el globo pálido, depende en gran medida de la acción de la dopamina sobre los receptores D_1 y D_2 (Obeso *et al.*, 2000; Parent *et al.*, 1999).

Ambas vías, directa e indirecta, proyectan desde el globo pálido interno y la pars reticulata de la sustancia negra hacia el tálamo, que a su vez proyecta fibras excitatorias glutamatérgicas tálamo-corticales hacia las cortezas motora y premotora. Las neuronas del globo pálido interno y de la pars reticulata de la sustancia negra producen la inhibición de las células talámicas que devuelven la proyección a las zonas de la corteza implicadas en el control motor (Escobar A2003).

La interacción entre los componentes de este complejo circuito neuronal forma parte de los mecanismos que mantienen el equilibrio necesario para que el movimiento se genere de forma adecuada. La alteración de la vía nigroestriatal debida a la muerte neuronal en la parte compacta de la sustancia negra característica de la enfermedad de Parkinson, genera un desequilibrio entre los componentes de este circuito neuronal que desencadena movimientos anormales. La depleción de dopamina en el estriado produce desinhibición de las neuronas del estriado que expresan receptores D_2 de dopamina en la vía indirecta que, a su vez, produce aumento de la inhibición en el globo pálido externo y desinhibición del núcleo subtalámico. La hiperactividad de las neuronas glutaminérgicas del núcleo subtalámico produce un incremento de la actividad sobre las neuronas del globo pálido interno y la pars reticulata de la sustancia negra, lo cual inhibe exageradamente el tálamo y por

enfermedad progresa, la patología se extiende a otras áreas de los ganglios basales y del tronco cerebral, afectando a las neuronas setoninérgicas y catecolaminérgicas.

1.3 ETIOLOGÍA.

A pesar del progreso realizado desde la descripción original de los cambios patológicos y bioquímicos en la enfermedad de Parkinson, la causa primaria del proceso degenerativo en la sustancia negra permanece desconocida. Hasta ahora no se ha identificado una causa única, y varios mecanismos, incluyendo defectos mitocondriales, estrés oxidativo, y factores genéticos, entre otros, parecen jugar un papel importante (Schapira 2008). Existen diversas teorías que tratan de dilucidar los mecanismos implicados en la degeneración del sistema dopaminérgico, sugiriendo que la etiopatogénesis del Parkinson es multifactorial, pudiendo estar implicados tanto factores ambientales como factores genéticos en la patogénesis de esta enfermedad.

Existen dos formas de la enfermedad de Parkinson, la familiar y la idiopática. Aproximadamente un 10% de los enfermos de Parkinson padecen la forma familiar de la enfermedad, en la que están implicadas mutaciones genéticas hereditarias. Sin embargo, la mayoría de los casos, entre 90-95%, de esta enfermedad no son de causa genética, se desconoce su causa, por lo que se engloba dentro del grupo de patologías idiopáticas.

1.3.1 Parkinson Familiar

Entre un 5-10% de los casos con síntomas clínicos de enfermedad de Parkinson tienen un historial familiar positivo y compatible con la herencia mendeliana (autosómica dominante o autosómica recesiva). Sin embargo, el genotipo de la enfermedad de Parkinson es heterogéneo, y son varios los genes asociados a las formas familiares de Parkinson (Tabla 1). En conjunto, a todos los genes asociados con las formas familiares de la enfermedad se les conoce como genes PARK, todos ellos codifican proteínas mitocondriales o asociadas con la mitocondria y sus mutaciones son causa directa de la enfermedad al conducir a anomalías bioquímicas como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y cambios inflamatorios, que comprometen la supervivencia neuronal.

El gen PARK 1 codifica la proteína denominada α -sinucleína. Esta proteína es el componente principal de los cuerpos de Lewy (CL), que son unas inclusiones citoplasmáticas eosinófilas esféricas localizadas en las neuronas monoaminérgicas de la sustancia negra y otros núcleos del tronco, diencefalo y prosencefalo (Spillantini *et al.*, 1997). Al microscopio electrónico, los cuerpos de Lewy se muestran compuestos de un núcleo denso, rodeado por un halo, y aparecen en las neuronas supervivientes de los cerebros de pacientes con la enfermedad de Parkinson (Shults 2006). La función fisiológica de la α -sinucleína es aún desconocida, aunque se la relaciona con sistemas de membrana, clasificación, canalización, embalaje y transporte de material sináptico destinado a la degradación, es por tanto una proteína presináptica. Esta proteína puede interactuar con membranas a través de su extremo N-terminal (α -hélice anfipática) que se estabiliza por interacciones con fosfolípidos de membrana, ácidos grasos o micelas. Una vez incorporada a la membrana, la α -sinucleína podría interactuar con proteínas celulares y modular el tráfico de vesículas sinápticas (Boassa *et al.*, 2013).

	TIPO DE HERENCIA	EDAD DE APARICIÓN	CUERPOS DE LEWY	PROTEÍNA
PARK 1	AD	40s	Si	α -sinucleína
PARK 2	AR	20s+	No	Parkin
PARK 3	AD	60s	Si	...
PARK 5	AD	50s	Si	UCH-L1
PARK 6	AR	30s	...	PINK1
PARK 7	AR	30s	...	DJ-1
PARK 8	AD	Variable	Si/no	LRRK2

Tabla 1. Principales causas genéticas de la enfermedad de Parkinson. AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva.

Mutaciones en el gen que codifica la α -sinucleína así como duplicaciones o triplicaciones de dicho gen, son causa de enfermedad de Parkinson autosómica

dominante. La toxicidad se asocia con la formación de oligómeros y de depósitos insolubles que se unen a membranas y a vesículas sinápticas, afectando a la dinámica de las vesículas, y provocando degeneración axonal previa a la degeneración neuronal y a la liberación de neurotransmisor (Boassa *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2014). Además, la acumulación de α -sinucleína intracelular conduce a la interacción de ésta proteína con la mitocondria, causando despolarización de la membrana, pérdida de la capacidad fosforilativa y activación del poro de transición mitocondrial, es decir, una disfunción mitocondrial que conduce a la muerte celular (Banerjee *et al.*, 2010; Bir *et al.*, 2014; Kamp *et al.*, 2010). Por último, la acumulación de α -sinucleína puede provocar daños en las vías de degradación de proteínas (Boassa *et al.*, 2013), que junto con las demás alteraciones comentadas pueden ser los mecanismos por los cuales esta proteína ejerza su toxicidad.

PARK2 codifica la proteína parkina, una ubiquitin E3 ligasa citosólica, y PARK6 codifica una serina/treonina quinasa mitocondrial conocida como PINK1. Ambas proteínas participan en una vía común implicada en la regulación de la fisiología mitocondrial. Mutaciones en PARK2 y PARK6 son la causa más frecuente de Parkinson familiar de inicio temprano (Erpapazoglou and Corti 2015). Estas proteínas intervienen en aspectos mitocondriales como dinámica y transporte mitocondrial, biogénesis y bioenergética, renovación de organelas dañadas por mitofagia y apoptosis (Johnson *et al.*, 2012; Pisl and Winklhofer 2012). El papel de PINK1 y parkina en la renovación mitocondrial es, de todos los mencionados, el mejor conocido en la actualidad, siendo considerado como la principal ruta por la que estas proteínas ayudan a mantener la calidad mitocondrial. Ante mitocondrias dañadas, con pérdida del potencial de membrana, se bloquea la importación y procesamiento de PINK1 en la matriz mitocondrial, lo que resulta en la acumulación de moléculas de PINK1 sin procesar en la membrana mitocondrial externa de la mitocondria dañada. En esta posición PINK1 recluta a la proteína citosólica parkina, y la activa por fosforilación. Una vez activa, parkina ubiquitina proteínas de la superficie mitocondrial, resultando en la activación del proceso de mitofagia y en la degradación por el proteosoma de los substratos mitocondriales ubiquitinizados (Pickrell and Youle 2015; Tanaka *et al.*, 2010; Yoshii *et al.*, 2011).

Mutaciones que afecten a PINK1 y/o parkina, resultan en la alteración de este mecanismo de control de la calidad mitocondrial y en la acumulación de mitocondrias dañadas en las neuronas, produciendo muerte neuronal y contribuyendo a la patogénesis del Parkinson (Pickrell and Youle 2015; Valente *et al.*, 2004a). La ubiquitinización de proteínas de la membrana mitocondrial externa que lleva a cabo parkina, interviene en el control de procesos de motilidad y dinámica mitocondrial, siendo Mfn (Mfn1 y Mfn2), que interviene en procesos de fusión mitocondrial, uno de los sustratos ubiquitinizados y marcados para degradación proteosómica dependiente de parkina (Tanaka *et al.*, 2010).

MITOCONDRIA DAÑADA

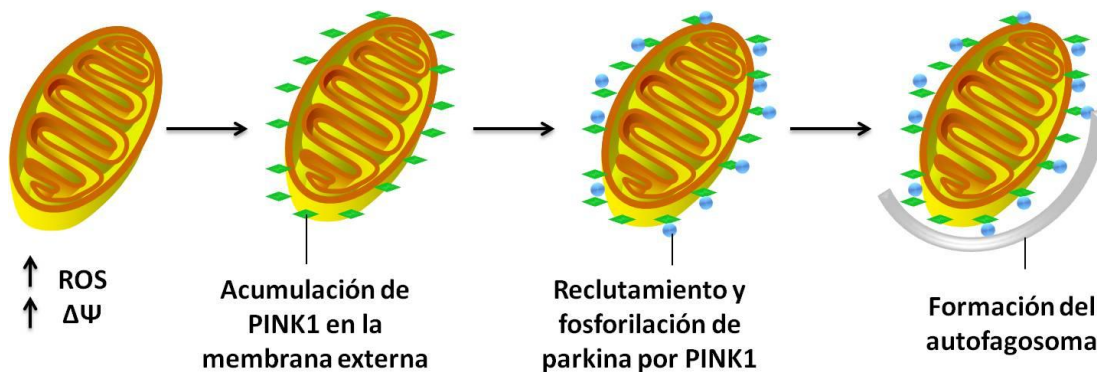


Figura 3. Modelo de mitofagia inducido por la vía PINK1-parkina. La disfunción mitocondrial, caracterizada por la pérdida del potencial de membrana, provoca la acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial externa. PINK1 que a su vez fosforila y activa a parkina. Parkina activa ubiquitina substratos en la membrana mitocondrial externa iniciando el reclutamiento del autofagosoma y la degradación proteosómica de los sustratos mitocondriales ubiquitinizados.

PARK 7 codifica para la proteína DJ-1, mutaciones en este gen son, junto con mutaciones en PARK 2 y PARK 6, la causa de la mayoría de los casos de enfermedad de Parkinson autosómica recesiva de inicio temprano (<50 años). DJ-1 es un proteína multifuncional que participa, predominantemente, en la protección de la célula frente al estrés oxidativo (Taira *et al.*, 2004). Además, DJ-1 puede regular diferentes funciones celulares dependiendo de su localización subcelular, fundamentalmente DJ-1 se localiza en el citosol y el núcleo, y en menor grado en la mitocondria. Cuando se desplaza al núcleo juega un papel esencial en la regulación de la transcripción,

fundamentalmente, de genes antioxidantes, de la proteína p53 y del gen de la tirosina hidroxilasa que participa en la síntesis de la dopamina (Ariga *et al.*, 2013; Ishikawa *et al.*, 2010; Ottolini *et al.*, 2013). DJ-1 localizado en la membrana mitocondrial externa de células sometidas a estrés oxidativo, participa en el mantenimiento de un ambiente mitocondrial adecuado (Kahle *et al.*, 2009), donde además puede interactuar con parkina, interacción que conduce a un aumento de los niveles de DJ-1 y por tanto a una disminución en el estrés oxidativo (van der Merwe *et al.*, 2015). DJ-1 también interacciona de forma directa con PINK1, ambos son reclutados a la membrana mitocondrial externa cuando disminuye el potencial de membrana, resultando en la regulación de la fusión y fisión mitocondrial.

Por tanto, estas tres proteínas, PINK1, parkina y DJ-1, participan en una vía común para el mantenimiento de la integridad y homeostasis mitocondrial, y cuando una mutación causa la disfunción de una de estas proteínas, las interacciones se ven comprometidas apareciendo la enfermedad (van der Merwe *et al.*, 2015).

1.3.2 Parkinson idiopático

La mayoría de los casos de Parkinson no son de causa genética, desconociéndose su causa, se engloban dentro del grupo de patologías idiopáticas. No obstante, ciertos factores ambientales juegan un papel importante, incrementando el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson. De esta observación, surge la “hipótesis ambiental”, en la cual agentes químicos presentes en el ambiente podrían dañar de forma selectiva las neuronas dopaminérgicas, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad.

La idea de que los factores ambientales están involucrados en la enfermedad de Parkinson surge con el descubrimiento de una neurotoxina, el 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina o MPTP (Langston and Ballard, Jr. 1983), que produce muerte de neuronas dopaminérgicas reproduciendo los síntomas típicos de la enfermedad (Richardson *et al.*, 2007). Además del MPTP, la rotenona, un insecticida lipofílico, que también produce inhibición del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial como el MPTP, y despolimerización de microtúbulos, puede afectar al sistema dopaminérgico produciendo lesiones neuronales (Ren and Feng

2007). Dieldrina y Maneb son otros dos pesticidas que inhiben de forma selectiva el complejo III mitocondrial. Se ha visto que la concentración de Dieldrina en el cerebro de pacientes con Parkinson es mayor que en el cerebro de controles (Corrigan *et al.*, 2000), y que la exposición crónica a Maneb provoca síndrome parkinsoniano crónico (Costello *et al.*, 2009). La exposición crónica a Paraquat, un herbicida, también incrementa el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson, ejerciendo toxicidad mediante la producción de ROS (Costello *et al.*, 2009). Por tanto, existe una fuerte asociación entre el uso prolongado de pesticidas y herbicidas, y el desarrollo de la enfermedad, pero ninguno de ellos es considerado ser el responsable de la mayoría de casos de Parkinson.

La exposición a solventes orgánicos, monóxido de carbono, disulfuro de carbono, toxinas derivadas de plantas e infecciones virales y bacterianas también se cree que pueden desempeñar algún papel en la etiología de la enfermedad (Schapira and Jenner 2011). Es posible, por tanto, que compuestos tanto exógenos como endógenos puedan inducir Parkinson cuando existe un ambiente o historial susceptibles (Blum *et al.*, 2001).

Por último, el envejecimiento es, obviamente, un factor asociado a la enfermedad de Parkinson, el fallo de los procesos celulares que acontecen durante el envejecimiento causa un incremento en la vulnerabilidad en las neuronas dopaminérgicas (Rodríguez *et al.*, 2014; Schapira and Jenner2011).

1.4 FISIOPATOLOGÍA

Aunque actualmente la causa primaria de la muerte neuronal es aún desconocida, procesos como el estrés oxidativo/nitrosativo y la inflamación están consistentemente descritos en la enfermedad de Parkinson, siendo claves en la fisiopatología de esta enfermedad. Ambos mecanismos están directamente relacionados con la disfunción mitocondrial y el fracaso bioenergético, que condiciona en gran medida la muerte neuronal en esta patología neurodegenerativa. La disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la neuroinflamación, son procesos comunes en las

dos formas de la enfermedad de Parkinson, tanto idiopático como familiar, y conducen a la disfunción celular (Ryan *et al.*, 2015).

1.4.1 El estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se forman continuamente en todos los tejidos del organismo, como consecuencia de la utilización del oxígeno para producir ATP. Debido a la presencia de uno o más electrones desapareados, estos compuestos son moléculas extremadamente reactivas que se estabilizan al oxidar componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, afectando negativamente a la función celular. Estas reacciones oxidativas son la base de la toxicidad de los radicales libres. La aparición del estrés oxidativo ocurre cuando se produce un aumento de la producción de radicales libres y/o un descenso de la eficiencia de los sistemas antioxidantes endógenos como la superóxido dismutasa, la catalasa, el glutatión y los enzimas del ciclo redox del glutatión, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Figura 4).

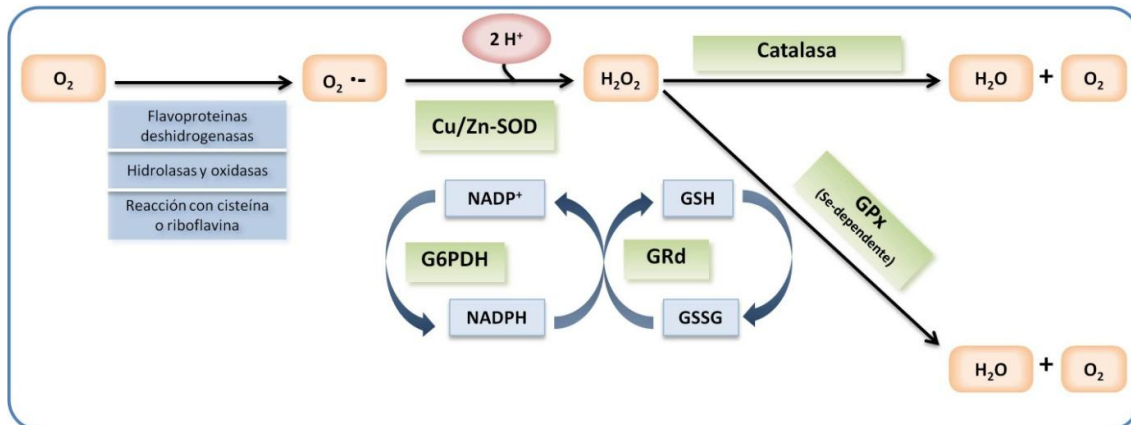


Figura 4. Sistemas antioxidantes enzimáticos. La reducción univalente del oxígeno molecular origina la formación del $O_2^{\cdot -}$, el cual será dismutado a H_2O_2 por acción de la superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn (Cu/Zn-SOD). Este H_2O_2 puede ser depurado a H_2O y O_2 bien por acción de la catalasa o bien por acción de la glutatión peroxidasa (GPx). Esta última utiliza GSH para tal conversión y, en consecuencia, se oxida a GSSG, siendo necesario un sistema de reciclaje que restaure los niveles de GSH. Así, la glutatión reductasa (GRd) reduce el GSSG a GSH, requiriendo para ello el poder reductor del NADPH que pasa a NAD, restableciéndose nuevamente los niveles de NADPH por acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Una de las mayores fuentes productoras de radicales libres en la célula es la mitocondria, debido a que más del 95% del O_2 es utilizado en esta organela para producir ATP por fosforilación oxidativa, la cual se encuentra acoplada a la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTE) (Nathan and Singer 1999). Bajo condiciones fisiológicas, la mayoría del oxígeno es reducido con cuatro electrones a dos moléculas de agua por la citocromo C oxidasa, y un pequeño porcentaje de oxígeno, aproximadamente el 2% del total consumido, puede ser reducido por uno, dos o tres electrones, dando lugar a anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\cdot}) respectivamente (Orrenius 2007). Los complejos I y III son los principales responsables de formación de ROS en la mitocondria, y bajo condiciones patológicas, como las enfermedades neurodegenerativas, es el complejo I el principal involucrado en la producción de ROS.

Para protegerse frente a la generación de radicales libres, la mitocondria dispone de diferentes mecanismos antioxidantes. La primera línea de defensa de la mitocondria consiste en la oxidación del $O_2^{\cdot-}$ por el citocromo c soluble en el espacio intermembranal, recuperando así el O_2 , aunque su capacidad es limitada por la pequeña concentración del citocromo. La siguiente línea de defensa consiste en un leve desacoplamiento mitocondrial, que evita un aumento excesivo de la fuerza protón motriz y por tanto reduce la generación de $O_2^{\cdot-}$. Otra línea de defensa mitocondrial implicada en la eliminación de $O_2^{\cdot-}$, principal radical que se forma en la mitocondria, es su dismutación a H_2O_2 , por parte de la SOD, y su posterior conversión a agua por medio de la glutatión peroxidasa (GPx) (Skulachev 1999). De esta forma, los sistemas antioxidantes intramitocondriales eliminarían los radicales libres, evitando el daño oxidativo que conduciría a daños en la producción de ATP.

Alteraciones en la ETC, como la inhibición de la actividad de algunos de sus complejos respiratorios, tal y como ocurre durante el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas, entre ellas el Parkinson (inhibición del complejo I), conduce a un incremento en la producción de ROS y de especies reactivas del nitrógeno (RNS), que a su vez producen más inhibición sobre los complejos de la ETC y daño oxidativo sobre la propia mitocondria (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001). Las RNS engloban principalmente

al NO^\cdot y el producto de su reacción con el O_2^\cdot , ONOO^\cdot , que presentan un alto poder oxidante y son enormemente citotóxicos ya que inhiben irreversiblemente todos los complejos de la ETC, incluyendo la ATP sintasa, pudiendo ocasionar daño directo a las proteínas y DNA. Además, el NO^\cdot , compete con el oxígeno por su sitio de unión al complejo IV, inhibiendo por tanto la citocromo oxidasa.

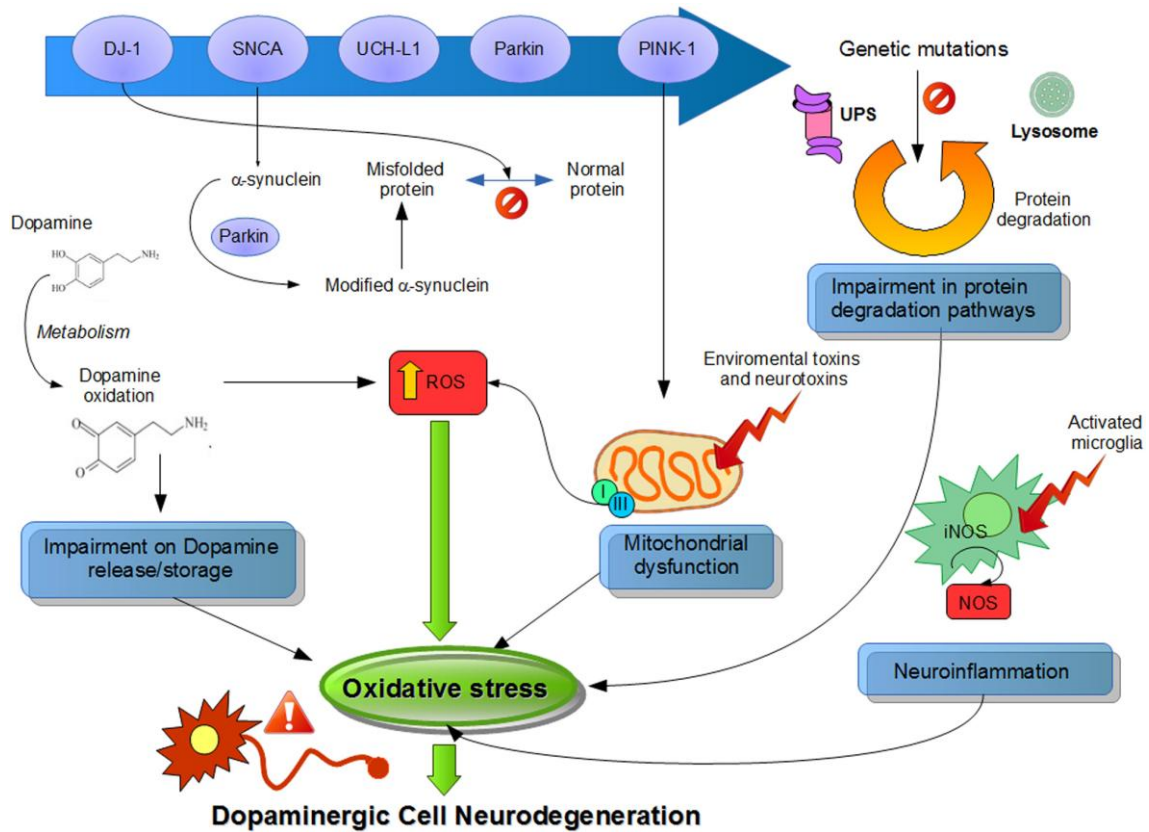


Figura 5. Procesos fisiopatológicos relacionados con la enfermedad de Parkinson.

Modificaciones genéticas de genes implicados en el Parkinson, conducen a un incremento del estrés oxidativo, daño mitocondrial y agregación de α -sinucleína. El metabolismo de la dopamina puede conducir a formas de quinonas de dopamina que contribuyen a incrementar el estrés oxidativo. Toxinas ambientales pueden producir disfunción mitocondrial por inhibición del complejo I, incrementando el estrés oxidativo, disminuyendo la producción de ATP. También los mecanismos neuroinflamatorios pueden contribuir a aumentar el estrés oxidativo. En resumen, existen muchos mecanismos celulares que al alterarse pueden contribuir al estrés oxidativo, estando implicados en la selectiva degeneración de las neuronas dopaminérgicas. (Blesa *et al.*, 2015)

Aunque, como se ha mencionado anteriormente, los mecanismos exactos por los que se produce la muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra durante la enfermedad de Parkinson no se conocen todavía, el estrés oxidativo ha sido considerado como uno de los principales mecanismos fisiopatológicos en esta enfermedad. Comparado con el resto del cerebro, la sustancia negra pars compacta está expuesta a unos niveles elevados de estrés oxidativo. Son varias las fuentes y mecanismos que pueden generar ROS en las neuronas dopaminérgicas, incluyendo el metabolismo de la dopamina, la disfunción mitocondrial, la neuroinflamación, la presencia de altos niveles de hierro y el envejecimiento (Blesa *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015) (Figura 5).

Está bien documentado en la bibliografía, la inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial en la sustancia negra de pacientes con Parkinson, lo que contribuiría a una excesiva producción de ROS (Blesa *et al.*, 2015; Schapira 2008). En los casos de Parkinson familiar, las mutaciones en los genes que codifican para α -sinucleína, parkina, PINK1 y DJ-1, también provocarían un incremento del estrés oxidativo al afectar negativamente a la función mitocondrial, como se ha analizado previamente (Blesa *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015).

La producción de radicales libres es, por tanto, un proceso acelerado en la enfermedad de Parkinson, siendo varios los marcadores de estrés oxidativo, tales como la peroxidación lipídica, el daño oxidativo a proteínas y al ADN, los que están elevados en la sustancia negra de pacientes con la Parkinson (Yoritaka *et al.*, 1996).

METABOLISMO DE LA DOPAMINA

La selectiva pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta, sugiere que por sí mismo el metabolismo de la dopamina puede ser fuente de estrés oxidativo ya que tanto en su biosíntesis como en su degradación enzimática, las enzimas involucradas producen peróxido de hidrógeno.

La dopamina se sintetiza a partir del aminoácido L-tirosina que es hidroxilado a L-DOPA por acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), después la L-DOPA es descarboxilada por la enzima dopa-descarboxilasa para producir dopamina (Figura 6).

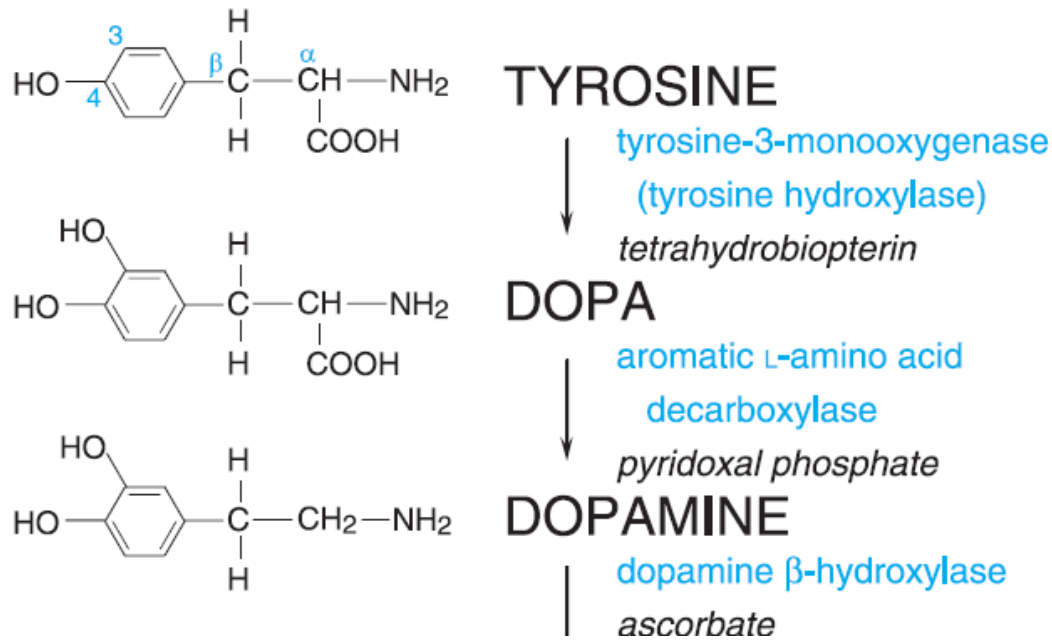


Figura 6. Biosíntesis de la dopamina.

Una vez sintetizada la dopamina es empaquetada en vesículas sinápticas, que se liberan en la sinapsis tras un impulso eléctrico. La inactivación de este neurotransmisor se realiza mediante el reingreso del mismo a la neurona dopaminérgica, por medio del transportador de dopamina. Una vez en la célula, la dopamina puede ser degradada enzimáticamente por la catecol-O-metil transferasa (COMT) y la monoamino oxidasa (MAO) o no enzimáticamente. MAO-A y MAO-B están localizadas en la membrana mitocondrial, se encargan de degradar el exceso de dopamina en el citosol catalizando su deaminación oxidativa (Munoz *et al.*, 2012). Bajo condiciones normales, los niveles de dopamina son regulados a través del metabolismo oxidativo por la MAO-A, localizada fundamentalmente en las neuronas catecolaminérgicas. Pero cuando, como en el caso de la enfermedad de Parkinson, existe degeneración neuronal, la MAO-B localizada en las células gliales se convierte en la principal enzima involucrada en el metabolismo de la dopamina, produciendo durante su degradación H_2O_2 . El peróxido de hidrógeno producido puede pasar a las

neuronas dopaminérgicas donde puede reaccionar con el Fe^{2+} para formar radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Kumar and Andersen 2004) (Figura 7).

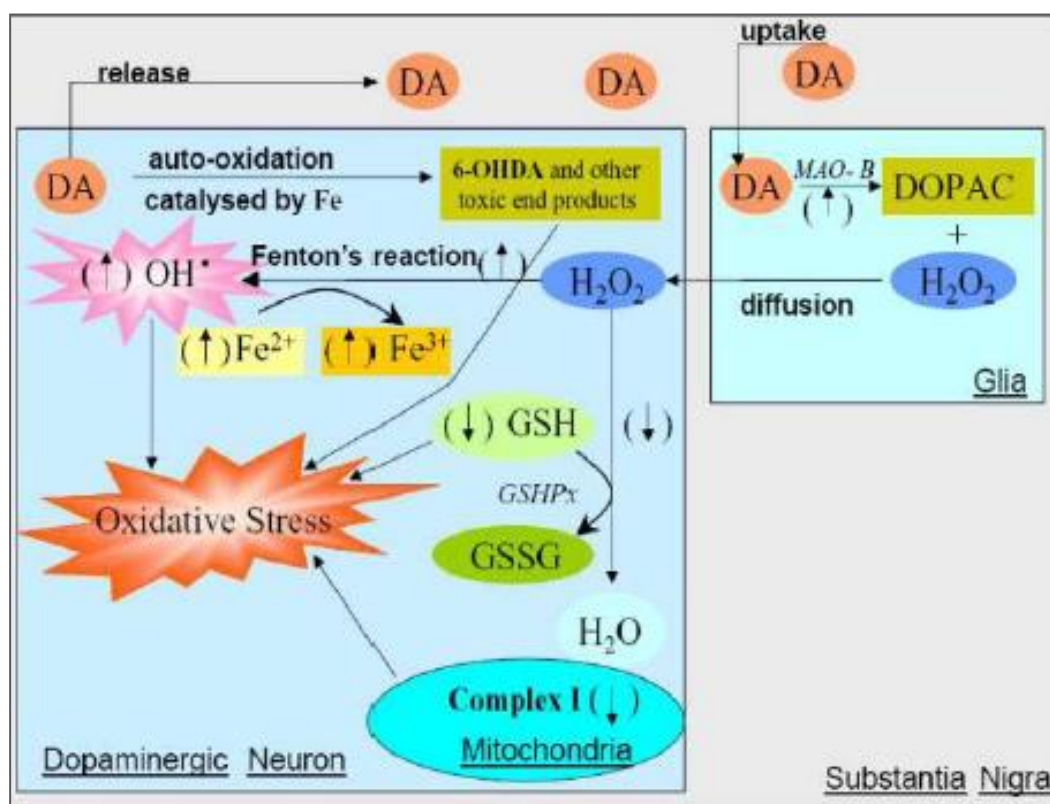


Figura 7. Catabolismo de la dopamina. Vulnerabilidad de la sustancia negra pars compacta al estrés oxidativo.

La dopamina también puede sufrir autooxidación no enzimática, al presentar un grupo catecol inestable, generando semiquinonas o quinonas de dopamina que también contribuyen a la neurodegeneración. Estas quinonas y semiquinonas pueden modificar proteínas relacionadas con la enfermedad de Parkinson, tales como la α -sinucleína, parkina y DJ-1 (Giroto *et al.*, 2012). También causan inactivación del neurotransmisor de la dopamina (DAT) y de la enzima TH (Kuhn *et al.*, 1999; Whitehead *et al.*, 2001) y disfunción del complejo I mitocondrial (Jana *et al.*, 2011).

Adicionalmente, las quinonas pueden ciclarse generando compuestos altamente reactivos que conducen a la formación de radical superóxido, a la depleción celular de NADPH y son el precursor de la neuromelanina, pigmento que contribuye a la neurodegeneración al inducir neuroinflamación (Zecca *et al.*, 2008). La

neuromelanina es un pigmento sintetizado por las neuronas catecolaminérgicas que contiene compuestos tales como dopamina oxidada, metabolitos de la dopamina así como proteínas y lípidos. Diferentes teorías sugieren que la neuromelanina incrementa la vulnerabilidad celular debido a cambios en el propio pigmento como aumento de la densidad, modificaciones en su estructura y disminución en el contenido proteico del mismo (Fasano *et al.*, 2006). Análisis de neuromelanina en pacientes con Parkinson, muestran una acumulación y sobrecarga de hierro, que también resultaría en un incremento del estrés oxidativo (Faucheux *et al.*, 2003).

1.4.2 Disfunción mitocondrial.

La disfunción mitocondrial dependiente del estrés oxidativo/nitrosativo y de la inhibición del complejo I de la ETC, es un proceso fisiopatológico inherente a la neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson. La primera relación directa entre enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial se realizó en 1989, cuando el defecto en la actividad del complejo I mitocondrial fue identificado en la sustancia negra de pacientes con Parkinson (Schapira *et al.*, 1989). En esta patología, se ha observado que tiene lugar una disminución en la actividad del complejo I de la ETC aproximadamente de un 35% en la pars compacta de la sustancia negra, lo cual contribuye a la degeneración celular al disminuir la síntesis de ATP, por tanto, a un defecto en la bioenergética, además de ser considerado la principal fuente de ROS en el Parkinson.

La mitocondria es la principal fuente de energía de la célula, en ella tiene lugar la fosforilación oxidativa sintetizando entre el 90-95% del ATP de la célula (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Leon *et al.*, 2004). Pero la mitocondria juega una función doble con respecto al estrés oxidativo, ya que es fuente y diana de las ROS, lo que sugiere que una desregulación mitocondrial juega un papel crítico en la patogénesis del Parkinson, por lo que defectos mitocondriales pueden estar implicados en la patogénesis de la enfermedad (Schapira2008). Cualquier alteración en la capacidad de la mitocondria para producir dicha energía puede tener consecuencias fatales, pero no sólo debido a la falta primaria de ATP, sino también al desequilibrio indirecto que se ocasionaría en las funciones derivadas, como la producción de ROS, el mantenimiento

del orgánulo, la regulación de la apoptosis y la homeostasis celular del Ca^{2+} y la glucosa (Leon *et al.*, 2004; Leon *et al.*, 2005).

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es la mayor fuente de de ROS, produciendo anión superóxido a través de los complejos I y III. Los complejos I y II de la cadena de transporte electrónico reciben electrones de la oxidación del NADH y del succinato, respectivamente, y los donan a la coenzima Q (CoQ), transportador electrónico lipídico, generando ubiquinol, que transporta los electrones hasta el complejo III (Brandt 2006). Este complejo III reduce a su vez al citocromo c, transportador electrónico que puede desplazarse por el interior de la membrana interna hasta el complejo IV. Por último, el complejo IV acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del O_2 a agua (Crofts 2004). Las reacciones de los complejos I, III y IV proporcionan energía para bombear protones a través de la membrana interna, originando un gradiente protónico en la membrana interna asociado a una diferencia de potencial ($\Delta\Psi$ 0.15 V). Los protones vuelven a entrar en la membrana a través de un canal específico en el complejo V. La energía liberada por este proceso impulsa la síntesis endergónica de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico.

La inhibición de cada complejo respiratorio produce un bloqueo en la transferencia de electrones a través de la ETC, de modo que el bombeo de protones asociado al funcionamiento de la cadena cesa parcial o totalmente. Mientras que una inhibición parcial del complejo I en determinadas condiciones puede reducir ligeramente el potencial de membrana mitocondrial y por consiguiente el escape de electrones, disminuyendo la generación de anión superóxido y por tanto de radicales libres, sin reducir la producción de ATP (Andrews *et al.*, 2005), la inhibición excesiva del complejo I reduce la producción de ATP, eleva la generación de radicales libres y acelera la neurodegeneración (Devi *et al.*, 2008). El complejo I es además el que mayor control ejerce sobre la respiración mitocondrial y su inhibición hace que tenga lugar un escape masivo de electrones con la consiguiente generación de ROS. La inhibición del complejo I no impide la entrada de electrones al complejo II procedentes del FADH_2 . La entrada de electrones a través del complejo II permite la reducción del complejo III y

que el flujo electrónico continúe hasta la oxidasa terminal de la ETC, pero con un flujo mermado puesto que el poder reductor procede sólo del FADH₂. Todo esto hace que el complejo I sea más vulnerable que el resto de complejos de la ETC al estrés oxidativo y que, al mismo tiempo actúe como fuente de ROS (Beal 2003). Hoy en día todavía no se sabe si el déficit del complejo I mitocondrial es la causa o la consecuencia del estrés oxidativo y la neurodegeneración en esta patología. Lo que está claro es que, la disfunción del complejo I mitocondrial ocasiona una disminución del potencial de membrana, con la consiguiente disminución en la producción de ATP, todo ello son señales que condicionan la apertura del poro de transición mitocondrial (PTM) que conduce a la salida de citocromo c de la mitocondria al citosol y el inicio de la apoptosis vía mitocondrial (Figura 8).

El origen del daño en el complejo I aún no se conoce con certeza. Se ha sugerido la posibilidad de mutaciones en el ADNmt como responsables de tal defecto, y a su vez, se señala al estrés oxidativo como causante de los daños en el ADNmt. Algunas evidencias sugieren que determinados haplotipos de ADNmt pueden influir en el pH citosólico y en la regulación del calcio mitocondrial, lo cual influye en la función neuronal aumentando el riesgo de padecer la enfermedad (Schapira2008). La proximidad de la MAO, ubicada en la membrana mitocondrial, apoya esta hipótesis, ya que puede actuar como fuente de radicales libres a este nivel. Por otra parte también se ha propuesto que la exposición a agentes ambientales tóxicos, como el MPTP, el paraquat o la rotenona, pueden ser la causa de la inhibición de este complejo respiratorio, estos compuestos muestran una citotoxicidad preferencial hacia las neuronas dopaminérgicas (Blesa and Przedborski 2014).

Otra evidencia de que la disfunción mitocondrial está relacionada con el estrés oxidativo y la muerte de neuronas dopaminérgicas procede de que, mutaciones de determinados factores genéticos como PARK1, PARK2, PARK6 y PARK7, que como se ha comentado anteriormente codifican proteínas con funciones específicas en la mitocondria, están relacionadas con déficits del complejo I, estrés oxidativo y apoptosis, siendo las causantes de algunas formas de Parkinson familiar (Zuo and Motherwell 2013).

Se ha asociado la acumulación de α -sinucleína en las mitocondrias de diversas áreas del cerebro, como el estriado y la sustancia negra, con la inhibición del complejo I en la enfermedad de Parkinson, observándose una asociación directa entre la concentración de α -sinucleína en el citosol y su acumulación en la mitocondria, y la inhibición de dicho complejo (Devi *et al.*, 2008). Los sistemas de degradación de proteínas pueden ser dañados por las ROS, comprometiendo la eliminación de proteínas dañadas o perjudiciales como la α -sinucleína, lo que resulta importante en la aparición de eventos deletéreos implicados en los procesos neurodegenerativos implicados en la enfermedad de Parkinson (Schapira *et al.*, 2014). Como consecuencia, la α -sinucleína induce la liberación de citocromo c, aumenta el contenido mitocondrial de calcio y de NO, y causa alteraciones oxidativas de componentes mitocondriales, llevando a la apoptosis (Parihar *et al.*, 2008).

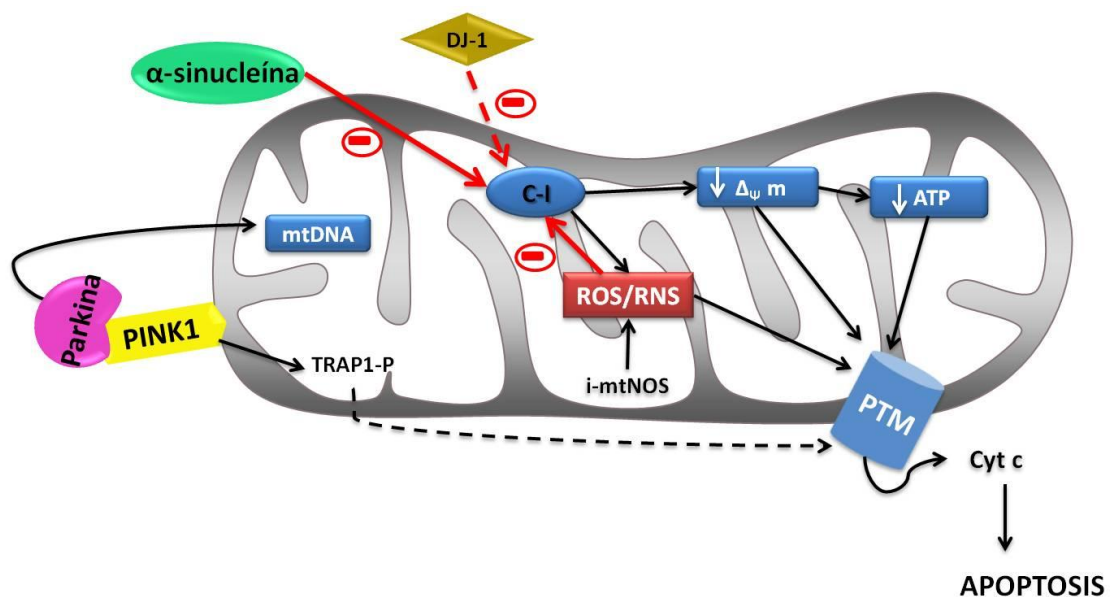


Figura 8. Vías implicadas en la disfunción mitocondrial.

Parkina también es un factor protector mitocondrial muy importante, aumenta la expresión de las subunidades mitocondriales del complejo I, reduce la producción de radicales libres y aumenta la biogénesis mitocondrial (Kuroda *et al.*, 2006b; Kuroda *et al.*, 2006a). En contra, la deficiencia en parkina reduce la capacidad respiratorio

mitocondrial y disminuye el contenido de las subunidades mitocondriales de los complejos I y IV (Figura 8).

Mutaciones en PINK1 causan disminución de la actividad respiratoria mitocondrial y aumento de peroxidación lipídica. Una de las dianas de PINK1 es TRAP1, la fosforilación de TRAP1 por PINK1 previene de la liberación de citocromo c de la mitocondria y la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Pridgeon *et al.*, 2007). Defectos en la expresión de PINK1 resultan, entre otros, en alteraciones morfológicas de la mitocondria, con disminución/ausencia de crestas y potencial de membrana reducido, alteraciones de los complejos respiratorios I y II, reducción en la actividad del complejo I, aumento de ROS y disminución del potencial de membrana (Bueler 2009; Clark *et al.*, 2006; Wood-Kaczmar *et al.*, 2008) (Figura 8).

DJ-1 que se localiza principalmente en el citosol, bajo condiciones de estrés oxidativo se distribuye hacia la mitocondria y el núcleo, asociado a fenómenos de neuroprotección (Canet-Aviles *et al.*, 2004). En la mitocondria, DJ-1 puede unirse a subunidades del complejo I mitocondrial regulando su actividad (Hayashi *et al.*, 2009). En consecuencia, en el proceso neurodegenerativo de la enfermedad de Parkinson ligado a la disfunción mitocondrial, se produce la intersección de al menos, α -sinucleína, parkina, PINK1 y DJ-1.

1.4.2. Inflamación.

Las células gliales, y fundamentalmente la microglía, son las principales encargadas de llevar a cabo los procesos inflamatorios en el cerebro (Benveniste *et al.*, 2001). Se trata de células fagocíticas que forman parte del sistema inmune innato del sistema nervioso central, que se activan bajo daño cerebral o cambios inmunes como mecanismo de defensa para eliminar las células dañadas o infectadas y los agentes patógenos (Block *et al.*, 2007). Estas células al activarse son capaces de liberar al medio citoquinas como TNF- α , quimioquinas o factores de crecimiento, que pueden ser beneficiosos o bien ocasionar efectos dañinos (Benveniste *et al.*, 2004). Además la microglía activa también es una fuente importante de superóxido y óxido nítrico, que

puede contribuir al estrés oxidativo y nitrosativo en el microambiente del cerebro al difundir a las neuronas vecinas (Block *et al.*, 2007) (Figura 9).

La sobreactivación o el estado de activación crónico de la microglía, como sucede en la sustancia negra en degeneración durante el Parkinson, causa una excesiva e incontrolada respuesta neuroinflamatoria que provoca daño neuronal (Qian *et al.*, 2010). La muerte neuronal a su vez activaría la microglía, aumentando de nuevo la respuesta inflamatoria a través de la liberación de sustancias, proliferación de células astrogiales, reclutamiento de células del torrente sanguíneo o aumento de la vascularización. Eventos que podrían ocasionar nueva muerte neuronal, por lo que este evento que se podría presentar de forma cíclica, activando y perpetuando la muerte neuronal (Barcia and Herrero Ezquerro 2004).

La pérdida de neuronas en la enfermedad de Parkinson está asociada con la neuroinflamación crónica, la cual es controlada principalmente por la microglía y, en menor medida, por astrocitos y oligodendrocitos (Perry 2012). Se ha registrado microglía activa en la sustancia negra y bulbo olfatorio de pacientes, tanto con Parkinson idiopático como con Parkinson familiar, así como en el estriado y/o en la sustancia negra en modelos animales de Parkinson inducido con MPTP (Pisanu *et al.*, 2014; Stott and Barker 2014). Se han descrito diferentes marcadores inflamatorios en cerebros parkinsonianos (Hunot and Hirsch 2003), en estudios postmortem se han encontrado importantes proliferaciones de macrófagos ameboides y microglía reactivos en la sustancia negra de pacientes con Parkinson. Aparecen también, en la sustancia negra de este tipo de pacientes células gliales activadas que expresan distintas citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la interleuquina (IL)-1 β y el interferón (IFN)- γ , junto con un aumento en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Por último, se han encontrado niveles elevados de IL-1 y 6, y TNF- α en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con la enfermedad (Hirsch *et al.*, 2003).

Se piensa que este proceso cíclico de activación de la microglía y muerte neuronal, podría ser, además, alimentado por señales inflamatorias generadas por las neuronas dañadas, que conducirían a potenciar más el efecto de la microglía. Estas

señales consistirían en sustancias liberadas al espacio extracelular por las neuronas dopaminérgicas dañadas, tales como proteínas oxidadas, lípidos y ADN, en definitiva moléculas dañadas que serían reconocidas por la microglía causando su activación. De nuevo la activación de la microglía conduciría a la formación de ROS y RNS que agravaría la muerte neuronal, cerrando el ciclo neurotóxico vicioso (Block *et al.*, 2007). Además las neuronas dopaminérgicas dañadas también liberan al medio extracelular neuromelanina y α -sinucleína, que activarían la microglía participando de este ciclo vicioso induciendo neuroinflamación crónica en el Parkinson (Hwang 2013).

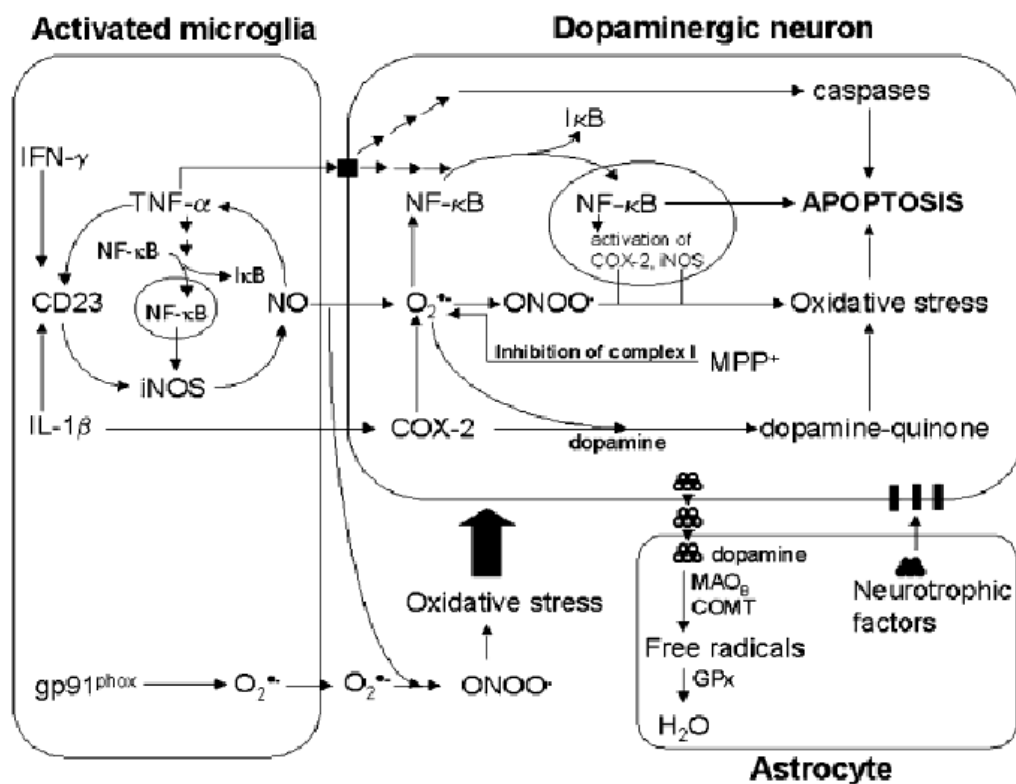


Figura 9. Participación de la microglía en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.

La activación de las células de la microglía contribuyen a la neurodegeneración dopaminérgica por la liberación de compuestos citotóxicos como las citoquinas, que inducen la expresión de la iNOS y por tanto la liberación de NO[•], el cual puede difundir hacia las neuronas dopaminérgicas circundantes donde puede reaccionar con el O₂⁻ (procedente de la COX-2 o de la inhibición del complejo I) formando ONOO[•]. Todo ello conduce a la muerte de las neuronas. Los astrocitos pueden liberar factores neurotróficos, o metabolizar dopamina, eliminando radicales libres a través de la GPx, presentando un efecto neuroprotector.

La neuromelanina, pigmento producido por la oxidación de la dopamina y que le da el color característico a la sustancia negra, añadida a cultivos de microglía, causa un incremento del NO (Zecca *et al.*, 2008). In vivo, inyecciones intracerebrales de neuromelanina causan activación de la microglía y pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (Wilms *et al.*, 2003). Estas observaciones en conjunto, y teniendo en cuenta que la neuromelanina permanece durante largos periodos de tiempo en el espacio extracelular, hace pensar que sea una de las moléculas responsables de la inducción crónica de la inflamación en la enfermedad de Parkinson (Hwang2013). La α -sinucleína es otra de las moléculas que parece estar implicada en el proceso inflamatorio de esta enfermedad. Se ha demostrado que la adicción de α -sinucleína a cultivos de neuronas y células gliales, causa activación de la microglía y neurodegeneración dopaminérgica (Zhang *et al.*, 2005). De hecho, la α -sinucleína liberada por las células neuronales es un agonista endógeno de los receptores TLR2 (Toll-like receptor 2), los cuales activan la respuesta inflamatoria microglial (Kim *et al.*, 2013), aumentando los niveles de TNF- α en el estirado y en la sustancia negra pars compacta de ratones (Watson *et al.*, 2012).

Aunque la activación de la microglía y los cambios inflamatorios son considerados generalmente como una consecuencia de la destrucción neuronal, hallazgos como que variaciones en regiones del antígeno leucocitario humano (HLA) son un factor de riesgo en la enfermedad Parkinson, ponen de manifiesto la posibilidad de que un estado proinflamatorio general pueda ser causa de la muerte neuronal en algunos casos de esta enfermedad o al menos aumentar el riesgo de padecerla. De hecho, se ha demostrado que la inflamación periférica en ratas, incrementa el riesgo inflamatorio en la sustancia negra, con una mayor pérdida de neuronas dopaminérgicas. (Hamza *et al.*, 2010; Hernandez-Romero *et al.*, 2012). Todas estas observaciones sugieren que la neuroinflamación crónica, con sus consecuencias sobre el estrés oxidativo y nitrosativo, es un componente crítico en la patogénesis del Parkinson.

1.5 TRATAMIENTO.

El tratamiento actual de la enfermedad de Parkinson es sintomático, no es preventivo ni curativo, siendo los anticolinérgicos, la amantadina y la L-DOPA los fármacos más usados. Estos fármacos son administrados durante el resto de la vida del paciente, siendo variable el grado de mejoría alcanzado en cada caso.

El tratamiento con L-DOPA, un precursor de la dopamina, es el tratamiento farmacológico utilizado por excelencia, y con mayor eficacia para corregir el déficit dopaminérgico que existe en el estriado. El principal problema del tratamiento con L-DOPA son los frecuentes efectos secundarios que provoca, siendo los más comunes los movimientos involuntarios anormales y los trastornos psíquicos, que afectan entre el 10-20% de los pacientes. Otro problema es que cuando la L-DOPA es administrada durante largos periodos de tiempo, produce fluctuaciones motoras y disquinesias, de tal modo que a los 6 ó 7 años de tratamiento continuado, la incapacidad funcional es igual o mayor que el nivel de incapacidad anterior al tratamiento, por este motivo, el tratamiento farmacológico suele comenzarse, generalmente, con otros fármacos. Estos incluyen amantadina, inhibidores de la monoamino oxidasa B (MAO B), anticolinérgicos y antagonistas de los receptores de dopamina.

También existen opciones de tratamientos neuroquirúrgicos, como la estimulación cerebral profunda (deep brain stimulation, DBS) tanto del globo pálido como del núcleo subtalámico, que permiten disminuir la dosis de medicación, resultando una técnica efectiva en el control de los síntomas del pacientes con la enfermedad, así como mejora de su funcionalidad y calidad de vida (Roper *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2016). El tratamiento quirúrgico se aplica cuando los síntomas motores ya no pueden ser controlados con el tratamiento farmacológico.

Por lo tanto, existe la necesidad clínica urgente de desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas para hacer frente a esta enfermedad, y no sólo de estrategias sintomáticas sino de tratamientos que detengan el avance de la enfermedad.

2. EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez pequeño de agua dulce, originario de las aguas tropicales del sur de Asia. Fue introducido por primera vez en investigación biomédica por George Streisinger en el 1981, elegido por su ideal combinación de propiedades.

2.1 VENTAJAS DEL USO DEL PEZ CEBRA COMO MODELO EXPERIMENTAL

El modelo de pez cebra ofrece muchas ventajas frente a otros modelos animales vertebrados. En primer lugar, el desarrollo del pez cebra es extrauterino, lo que hace particularmente fácil el estudio y observación de las primeras etapas del desarrollo así como su manipulación en estos estadios tempranos. Gracias a estas posibilidades los peces cebra fueron inicialmente reconocidos como un excelente modelo para el estudio de la biología del desarrollo.

Existe una amplia variedad de métodos que pueden aplicarse en la manipulación temprana de las larvas de pez cebra, por ejemplo el uso de técnicas de manipulación genética dirigida, siendo las más comunes la utilización de morfolinos, la sobreexpresión de ARN, la transgénesis, el uso de nucleasas zinc-finger, TALEN y más recientemente el uso de CRISPR (Amsterdam and Becker 2005; Meng *et al.*, 2008; Moreno-Mateos *et al.*, 2015; Nasevicius and Ekker 2000; Shafizadeh *et al.*, 2002a). La posibilidad de llevar a cabo experimentos genéticos eficientes, como la mutagénesis dirigida, quizás sea la mayor ventaja que presenta el uso en investigación de este modelo animal.

También son muy comunes en este modelo experimental las manipulaciones químicas, físicas y farmacológicas. Las manipulaciones farmacológicas de las larvas son relativamente fáciles, ya que las drogas son absorbidas por el pez desde el agua.

En el mismo sentido, la organogénesis en las larvas de pez cebra es un proceso rápido, y la mayoría de los órganos están totalmente formados a los 2 días post-fertilización (dpf). Otra ventaja es que las larvas son totalmente transparentes hasta los

5 dpf, lo que permite fácilmente la visualización de la organogénesis. A partir de los 5dpf, la pigmentación de la piel en las larvas se va haciendo más intensa, y ya a esta edad las larvas comienzan a nadar, a capturar presas y alimentarse (Borla *et al.*, 2002; Brustein *et al.*, 2003a; Budick and O'malley 2000; Gahtan *et al.*, 2005).

La transparencia de las larvas también permite el seguimiento durante el desarrollo de un determinado tipo de células o estructuras *in vivo*, mediante el desarrollo de transgénicos marcados por fluorescencia, uno de los marcajes por fluorescencia más usados es por GFP. También es posible aplicar técnicas de microscopía confocal a la larva completa, sin necesidad de hacer secciones, pero como es un modelo animal relativamente nuevo, sólo hay disponibles un limitado número de anticuerpos testados frente a proteínas de pez cebra. Esta limitación puede ser solventada en parte porque muchos de los anticuerpos funcionales en mamíferos pueden ser usados en el pez cebra ya que existe una alta similitud genética de los peces cebra con los mamíferos. Debido a esas limitaciones de anticuerpos, las hibridaciones *in situ* han sido una técnicas ampliamente usadas para estudiar la expresión de los genes, fundamentalmente las hibridaciones *in situ* utilizando fluorescencia, que permiten una localización anatómica exacta (Welten *et al.*, 2006).

El pequeño tamaño de estos animales hace posible, además, que el mantenimiento de la colonia tenga un coste relativamente bajo en comparación con el mantenimiento de colonias de roedores por ejemplo. Además de cada hembra adulta, en condiciones óptimas, se puede obtener entre 100-300 huevos semanalmente, lo que permite tener un progenie grande incluso partiendo de una colonia pequeña.

Otra ventaja es que el genoma del pez cebra está completamente secuenciado. Sin embargo, cuando el linaje de los peces divergió de los vertebrados terrestres, hace más de 300 millones de años, el genoma de los peces ancestrales sufrió una duplicación a gran escala. De forma que, aunque muchos de los genes duplicados han perdido su redundancia a lo largo de la evolución en los peces, el pez cebra posee dos copias de algunos genes de mamíferos (ca. 20%), haciendo un poco más complicado el estudio de estos genes (Postlethwait *et al.*, 1998), aunque existen disponibles, como se

ha mencionado anteriormente, muchas técnicas de manipulación para investigar sus funciones.

En conclusión, su pequeño tamaño, el reducido coste económico, los relativamente cortos tiempos de generación, el rápido desarrollo embrionario, la fácil manipulación genética y la similitud con vertebrados superiores, hacen del pez cebra un excelente modelo experimental, cada vez más implantado y de mayor uso en experimentación. Indudablemente, cualquier hallazgo novedoso en esta especie animal debe confirmarse en otros animales vertebrados como los pequeños mamíferos de laboratorio.

2.2 EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE ENFERMEDADES HUMANAS

Un amplio rango de especies animales, desde gusanos hasta monos, se usan como modelo de enfermedades humanas. Todos ellos presentan ventajas e inconvenientes. Modelos animales clásicos como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, pueden manipularse genéticamente de forma sencilla, tienen progenies grandes y los costes de mantenimiento son reducidos. Sin embargo, al tratarse de animales invertebrados son farmacológica y anatómicamente muy diferentes de los vertebrados. Por otro lado, modelos como los roedores o primates son muy similares a los humanos pero más difíciles y caros de mantener.

En una posición intermedia se sitúan los peces cebra, que por un lado comparten características de los modelos invertebrados, como tiempos cortos de generación, fácil manipulación genética, progenies grandes y costes pequeños en su mantenimiento, y por otro lado al tratarse de animales vertebrados son similares en muchos aspectos a los mamíferos. Por estos motivos, el pez cebra se ha convertido en un modelo emergente para el estudio de enfermedades humanas. Hasta la fecha son muchos los estudios sobre enfermedades humanas en los que se ha utilizado el pez cebra como modelo experimental. Alteraciones neurológicas complejas, alteraciones genéticas, enfermedades cardiovasculares, son ejemplos de alteraciones para las que se usa de forma satisfactoria este modelo animal (Tabla 2).

ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS O PSQUIATRICAS	ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS
Enfermedad de Parkinson (Anichtchik <i>et al.</i> , 2008; Bretaud <i>et al.</i> , 2004; Flinn <i>et al.</i> , 2009; Lam <i>et al.</i> , 2005; McKinley <i>et al.</i> , 2005; Sallinen <i>et al.</i> , 2009; Sallinen <i>et al.</i> , 2010)	Anemia sideroblástica congénita (Ninkovic <i>et al.</i> , 2006)
Enfermedad de Alzheimer (Tomasiewicz <i>et al.</i> , 2002)	Anemia congénita severa (Shafizadeh <i>et al.</i> , 2002b)
Enfermedad de Huntington (Lumsden <i>et al.</i> , 2007)	ENFERMEDADES MUSCULARES
Ansiedad (Levin <i>et al.</i> , 2007)	Distrofia muscular de Duchenne (Guyon <i>et al.</i> , 2003)
Epilepsia (Berghmans <i>et al.</i> , 2007)	Atrofia muscular espinal (Winkler <i>et al.</i> , 2005)
Esquizofrenia (Burgess and Granato 2007)	ALTERACIONES NEFROLÓGICAS
Alteraciones del sueño (Prober <i>et al.</i> , 2006)	Fallo renal agudo (Hentschel <i>et al.</i> , 2005)
ENFERMEDADES CARIDOVASCULARES	Síndrome nefrótico (Hinkes <i>et al.</i> , 2006)
Fibrilación cardíaca (Langenbacher <i>et al.</i> , 2005)	NEOPLASIAS
Cardiomiopatía (Schonberger <i>et al.</i> , 2005)	Leucemia linfoblástica aguda (Langenau <i>et al.</i> , 2005)
Trombosis (Jagadeeswaran <i>et al.</i> , 2006)	Cáncer de hígado (Lam and Gong 2006)
ENFERMEDADES ENDOCRINAS	Carcinoma neuroendocrino (Yang <i>et al.</i> , 2004)
Osteoporosis inducida por glucocorticoides (Barrett <i>et al.</i> , 2006)	SÍNDROMES GENÉTICOS
Obesidad (Song and Cone 2007)	Síndrome Bardet-Bield (Tobin <i>et al.</i> , 2008)
ENFERMEDADES DEL DESARROLLO	Síndrome de Barth (Khuchua <i>et al.</i> , 2006)
Displasia estructural (Boyadjiev <i>et al.</i> , 2006)	Síndrome de Joubert (Sayer <i>et al.</i> , 2006)
Síndrome X frágil (Tucker <i>et al.</i> , 2006)	Síndrome Hermansky-Pudlak (Bahadori <i>et al.</i> , 2006)
Síndrome fetal del alcohol (Bilotta <i>et al.</i> , 2004)	Síndrome Matthew-Wood (Isken <i>et al.</i> , 2008)

Tabla 2. Ejemplos de estudios con el pez cebra como modelo de enfermedades humanas.

2.3 TOXINAS USADAS PARA INDUCIR MODELOS ANIMALES DE PARKINSONISMO

Existen varios modelos animales de enfermedad de Parkinson, a los que se les induce un estado parkinsoniano mediante la administración de diferentes sustancias tóxicas. Las toxinas más comúnmente utilizadas para producir experimentalmente parkinsonismo son la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), rotenona, y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrapiridina (MPTP).

Una de las más usadas, la 6-OHDA, es una neurotoxina catecolaminérgica que fue introducida hace más de 45 años (Ungerstedt 1968), capaz de llegar hasta las neuronas catecolaminérgicas a través de transportadores de dopamina (DAT) o de noradrenalina (NAT), y que destruye las neuronas dopaminérgicas por efecto de los radicales libres, fundamentalmente por un aumento de H_2O_2 y del radical $HO\bullet$, y por las quinonas (Cohen 1984). La 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que suele administrarse intracerebralmente para producir el daño en la sustancia negra. Puede ser inyectada de dos formas, o directamente en la sustancia negra, comenzando la neurodegeneración a las 24 horas, o inyectarse en el estriado para causar una degeneración retrógrada prolongada de la sustancia negra pars compacta en 1-3 semanas (Javoy *et al.*, 1976; Sauer and Oertel 1994).

Existen determinados productos químicos usados en agricultura, como el paraquat y la rotenona, que reproducen situaciones características de la enfermedad de Parkinson cuando son administrados sistemáticamente (Petrovitch *et al.*, 2002). La rotenona, ampliamente usada como pesticida, accede fácilmente a todos los órganos incluido el cerebro donde ejerce un efecto inhibitor, altamente selectivo, sobre el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Pero sin duda alguna, el modelo animal de enfermedad de Parkinson por fallo mitocondrial más habitualmente usado, es el basado en la administración de MPTP, una toxina muy potente que causa parkinsonismo en muchas especies, incluidos los humanos. El principal efecto tóxico de este compuesto es la inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial (ver más detalles sobre los mecanismos de acción del MPTP en la siguiente sección).

La neurotoxicidad del MPTP fue descubierta en humanos en los años 80, a raíz del hallazgo de que heroinómanos que consumían droga adulterada con MPTP, presentaban síntomas clínicos semejantes a los síntomas característicos de las primeras etapas del Parkinson (Langston and Ballard, Jr.1983). El MPTP produce síntomas parkinsonianos irreversibles en humanos y en monos, siendo indistinguibles a los del Parkinson. Además la respuesta a levodopa en humanos y monos expuestos a MPTP es idéntica a la que presentan pacientes con Parkinson idiopático. Su selectividad sobre las neuronas dopaminérgicas se debe a su captación en las terminales nerviosas del sistema dopaminérgico a través del transportador de dopamina, con su posterior acumulación en la mitocondria. Por estos motivos el MPTP es usado ampliamente para inducir un estado parkinsoniano en múltiples especies, entre las que se incluyen primates, ratones, gatos, peces y gusanos (Beal 2001).

2.4 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL MPTP

El MPTP es una sustancia lipofílica que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica. El MPTP *per se* no es tóxico, necesita convertirse en su metabolito activo el MPP+ (ión 1-metil-4-fenilpiridina) mediante la MAO B (Heikkila *et al.*, 1984). La MAO B existe en la células endoteliales de la barrera hematoencefálica, de forma que los niveles de MAO B están correlacionados con los niveles de muerte neuronal inducida por MPTP (Kalaria and Harik 1987a; Kalaria and Harik 1987b), ya que, debido a que el MPP+ no puede atravesar la barrera hematoencefálica, la conversión de MPTP a MPP+ a este nivel es una línea de defensa frente a la toxicidad por el MPTP. En ratas y en algunas cepas de ratón hay alta expresión de MAO B en la barrera hematoencefálica, por lo que el MPTP es metabolizado y el MPP+ no llega al cerebro, por lo que estas cepas no son sensibles al MPTP (Riachi and Harik 1988).

En el cerebro la MAO B se encuentra en células gliales, serotoninérgicas e histaminérgicas, no en células dopaminérgicas (Westlund *et al.*, 1985). La conversión de MPTP a MPP+ se realiza fundamentalmente en las células gliales, de forma que la inhibición de la actividad de la MAO B elimina la toxicidad del MPTP (Brooks *et al.*, 1989). En las células gliales, el MPP+ activa la iNOS, que en condiciones normales su expresión es mínima, pero en la sustancia negra de pacientes de Parkinson y en

ratones tratados con MPTP está inducida (Brooks *et al.*, 1989). El NO producido por la iNOS puede pasar fácilmente a las neuronas vecinas.

El MPP⁺ producido en el astrocito no puede salir libremente de la célula glial debido a su naturaleza polar; aunque podría utilizar el transportador para monoaminas, el mecanismo exacto por el que sale al espacio extracelular no está claro (Inazu *et al.*, 2003). El MPP⁺, una vez liberado al espacio extracelular, entra en las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT) (Javitch and Snyder 1984). La captura del MPP⁺ por DAT junto con la conversión del MPTP a MPP⁺, son los pasos críticos que determinan la toxicidad del MPTP, de forma que si se inhiben se elimina la toxicidad de esta neurotoxina (Gainetdinov *et al.*, 1997; Heikkila *et al.*, 1984; Heikkila *et al.*, 1984); en este sentido, diversos estudios muestran que ratones knockout para DAT están protegidos de la toxicidad del MPTP.

Una vez que el MPP⁺ está dentro de la neurona dopaminérgica puede dirigirse a la mitocondria, donde inhibe el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Javitch and Snyder 1984; Nicklas *et al.*, 1987), y por tanto aumento de ROS y descenso de la producción de ATP. Fundamentalmente, el aumento de anión superóxido puede reaccionar con NO formando peroxinitritos, altamente tóxicos y causantes de un mayor fracaso bioenergético y muerte neuronal (Figura 10).

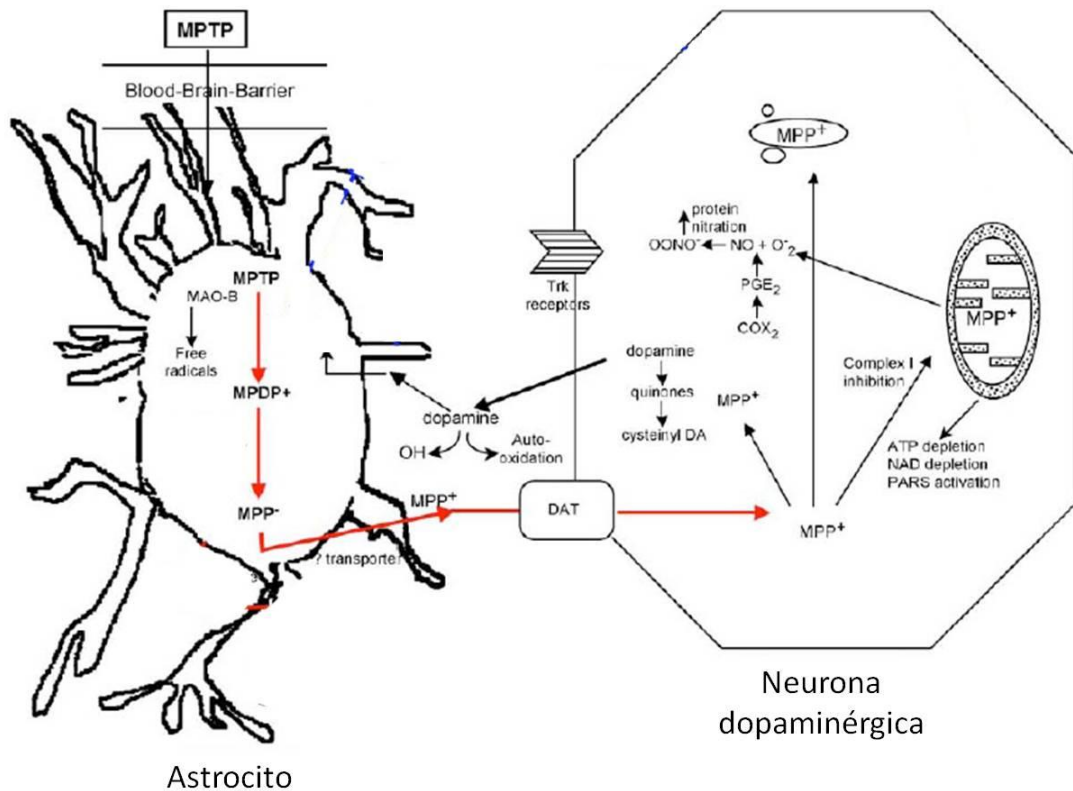


Figura 10. Mecanismos de acción del MPTP. El MPTP atraviesa la barrera hematoencefálica y se transforma en MPP⁺ por las MAO B de las células gliales. El MPP⁺ entra en las neuronas dopaminérgicas a través de DAT y una vez en la neurona actúa sobre la mitocondria produciendo inhibición del complejo I, que conduce a una disminución en la producción de ATP y un aumento en la producción de ROS. Todas estas alteraciones conducen a la muerte celular (Smeyne and Jackson-Lewis 2005).

2.4 EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

En los últimos años el pez cebra está cobrando especial importancia en estudios de la fisiopatología de los procesos neurodegenerativos y para la evaluación de nuevos fármacos neuroprotectores, convirtiéndose el pez cebra en un modelo atractivo para el estudio de enfermedades neurológicas (Panula *et al.*, 2006). Ello se debe a que estos peces presentan fenotipos neuropatológicos y conductuales cuantificables y similares a los observados en humanos (Lieschke and Currie 2007).

La primera característica que hace a este modelo experimental muy útil en el estudio de la enfermedad de Parkinson, es la presencia de algunos de los genes cuyas mutaciones están relacionados con el Parkinson idiopático, entre ellos PINK1, Parkina y DJ-1. Estos genes están presentes en el pez cebra, se expresan, y sus productos tienen las mismas funciones que en humanos (Abeliovich and Flint 2006). Otros de los genes cuya mutación está implicada en el Parkinson idiopático es la α -sinucleína, proteína que en mamíferos está codificada por el gen PARK1, y que sin embargo no está presente en el pez cebra (Flinn *et al.*, 2009; Sallinen *et al.*, 2009). En su lugar, el pez cebra contiene tres genes *sncb*, *sncga* y *sncgb*, que codifican para las isoformas β -, γ 1- y γ 2-sinucleína respectivamente (Milanese *et al.*, 2012; Sun and Gitler 2008). La γ 1- y β -sinucleína son requeridas para los movimientos espontáneos y las funciones dopaminérgicas, teniendo funciones similares a las humanas (Milanese *et al.*, 2012; Toni and Cioni 2015).

Otra característica importante para el uso de los peces cebra en el estudio del Parkinson, es que los embriones de pez cebra son sensibles a neurotoxinas como el MPTP, que como se ha explicado previamente de forma detallada induce un estado parkinsoniano, siendo éste en los peces cebra muy similar al que se desarrolla en mamíferos, presentando alteraciones moleculares y motoras similares a las de estos. La incubación de embriones de pez cebra con MPTP en el medio de cultivo reduce significativamente su motilidad, la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) y del transportador de dopamina (DAT) en el diencéfalo ventral (McKinley *et al.*, 2005). La inhibición del DAT demostró una menor sensibilidad de las larvas de pez cebra al MPTP, lo que indica la dependencia del DAT también en los peces para introducir MPP+ en las neuronas dopaminérgicas. Por otro lado, la co-incubación con MPTP y deprenilo, un inhibidor de la MAO-B, previene la neurotoxicidad del MPTP, al estar inhibida la metabolización de MPTP a MPP+ (Sallinen *et al.*, 2009). Todo ello sugiere un comportamiento similar del pez cebra y el cerebro del mamífero (McKinley *et al.*, 2005). Otros estudios demuestran que el MPTP y su metabolito activo, MPP+, actúan específicamente sobre las neuronas dopaminérgicas en las larvas de pez cebra (Flinn *et al.*, 2009), que desarrollan una sintomatología parkinsoniana caracterizada por la

disfunción mitocondrial típica de la enfermedad de Parkinson, con aumento de radicales libres y disminución de la actividad del complejo I (Sallinen *et al.*, 2009).

Finalmente, una característica esencial y que respalda el uso del pez cebra como modelo de enfermedad de Parkinson, es que el desarrollo del sistema catecolaminérgico en el pez cebra es similar al de otros vertebrados, convirtiéndolo, por tanto, a este pequeño pez en un buen modelo de estudio de enfermedades que afecten al sistema noradrenérgico y dopaminérgico, como es el caso del Parkinson. Todas las poblaciones de células catecolaminérgicas presentes en el pez cebra adulto pueden detectarse a las 72 hpf (Sallinen *et al.*, 2009). El desarrollo del sistema catecolaminérgico en el pez cebra es muy similar, espacial y temporalmente, al desarrollo en otros peces teleósteos (Manso *et al.*, 1993). Las primeras células dopaminérgicas se detectan en el diencéfalo y en el núcleo coeruleus, seguido por células en el área supraquiasmática y rombencéfalo. Por lo que se considera que las neuronas tiroxina hidroxilasa positivas localizadas en el diencéfalo ventral y tubérculo posterior de los peces cebra son el equivalente a las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo en mamíferos (Wen *et al.*, 2008).

3. MELATONINA

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (aMT) es una indolamina descrita inicialmente por McCord y Allen (McCord C.P. and Allen F.B. 1917), fueron los primeros en sugerir la relación entre la función de la pineal y pigmentación. La melatonina como tal, se aisló por primera vez a partir de extractos de glándula pineal de vaca por Lerner en 1958 (Lerner AB *et al.*, 1958). En 1959 se identificó la estructura química de esta indolamina, y se propuso el nombre de melatonina por derivar de la serotonina y por referencia a la melanina (Lerner AB *et al.*, 1959) (Figura 11).

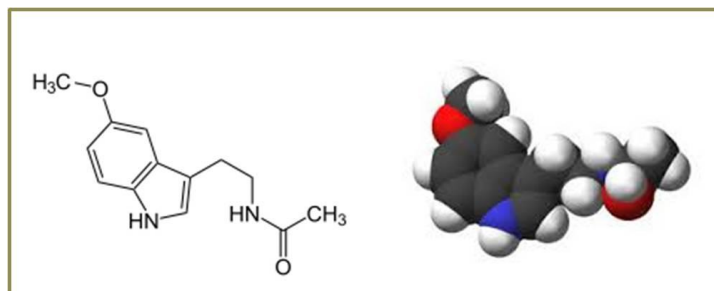


Figura 11. Estructura química de la melatonina.

Desde un punto de vista químico, la melatonina es un cristal orgánico, de color blanco, con un peso molecular de 232,38 g/mol, cuyo punto de fusión se encuentra entre 116 y 118°C, poco soluble en agua y fácilmente soluble en etanol (Szmuskowicz AW and Heinzelman RV 1960).

La melatonina es una molécula muy conservada a lo largo de la evolución ya que se encuentra desde organismos muy primitivos como cianobacterias, algas unicelulares y parásitos, hasta organismos actuales (Hardeland and Poeggeler 2003; Hardeland 2008; Macias *et al.*, 1999; Paredes *et al.*, 2009). Esta indolamina se distribuye ubicuamente a través de todo el organismo, ya que su naturaleza anfipática le permite atravesar las barreras celulares, aunque con ciertas limitaciones (Venegas *et al.*, 2012). En base a estas características, se cree que la aparición de la melatonina podría deberse a una adaptación de los organismos para contrarrestar la toxicidad del oxígeno, dada su demostrada habilidad para neutralizar el efecto dañino que ejerce este gas sobre las diferentes estructuras celulares mediante la producción de radicales libres.

En origen la melatonina se consideró exclusivamente como un elemento regulador en la fisiología circadiana y reproducción, estudios posteriores permitieron relacionarla con aspectos de la fisiología intracelular independientes de su acción hormonal. Se demostró que la melatonina es un potente depurador de radicales libres (Tan *et al.*, 1999), y actualmente se sabe que las principales dianas celulares de la melatonina, donde previene este daño oxidativo-nitrosativo, son la mitocondria y el núcleo (Acuña-Castroviejo D. *et al.*, 2011; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2003; Menendez-

Pelaez *et al.*, 1993; Venegas *et al.*, 2012). En este sentido se han identificado y caracterizado receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1994) y células del sistema nervioso central (Becker-Andre *et al.*, 1994; Carlberg and Wiesenberg 1995). Diversos trabajos han demostrado el importante papel de la melatonina en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Acuña-Castroviejo D. *et al.*, 2011; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2003; Leon *et al.*, 2004; Leon *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2000a).

3.1 SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA MELATONINA.

La producción de melatonina muestra variaciones a lo largo del día, variaciones que están vinculadas al ritmo circadiano generado por un “reloj” o marcapasos interno situado en el hipotálamo, el núcleo supraquiasmático (NQS). Este núcleo está sincronizado con el ciclo luz-oscuridad las 24 horas del día (Moore RY 2016). Es un ciclo que influye de forma decisiva en los seres vivos ya que determinan sus actividades vitales y comportamiento. A medida que la melatonina se sintetiza, se libera a la circulación, por lo que sus niveles plasmáticos son un buen indicador de su producción, del orden de picomolar/nanomolar (Reiter 1991).

En un principio, se pensaba que la melatonina se originaba únicamente en la glándula pineal, desde donde se liberaba rápidamente al torrente sanguíneo, accediendo a todos los tejidos, compartimentos celulares y fluidos corporales. No obstante, más tarde se ha demostrado que además de la producción pineal, la melatonina es sintetizada en prácticamente todos los órganos y tejidos del organismo, entre los que se incluyen retina, riñón, piel, hígado, timo, tiroides, páncreas, cerebelo, epitelio intestinal, epitelio respiratorio, ovarios, placenta, endometrio, hígado, cerebro, corazón, así como en células no endocrinas tales como eosinófilos, plaquetas, células endoteliales y células natural killer (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014; Kvetnoy *et al.*, 2002). También se ha demostrado la expresión de los genes que codifican los enzimas clave de la síntesis de la melatonina (AANAT y ASMT) en prácticamente todos los tejidos del organismo (Stefulj *et al.*, 2001), lo que sugiere que cada tejido puede producir la melatonina que necesita en cada momento, sin depender de la melatonina circulante.

Cabe destacar que la producción de melatonina extrapineal es mucho mayor que la pineal, variando en función del tejido y alcanzando valores de rango micromolar (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014; Venegas *et al.*, 2012). Además, no exhibe el ritmo característico de la melatonina pineal, la cual presenta un ritmo circadiano que alcanza sus niveles máximos durante la noche, sobre las 2-4 de la madrugada. Por otro lado, una característica a destacar es que la melatonina extrapineal permanece en el interior de la célula y no sale a la circulación, a pesar de encontrarse en concentraciones muy elevadas, lo que sugiere que su acción biológica deber ser diferente a la de origen pineal (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014; Venegas *et al.*, 2012).

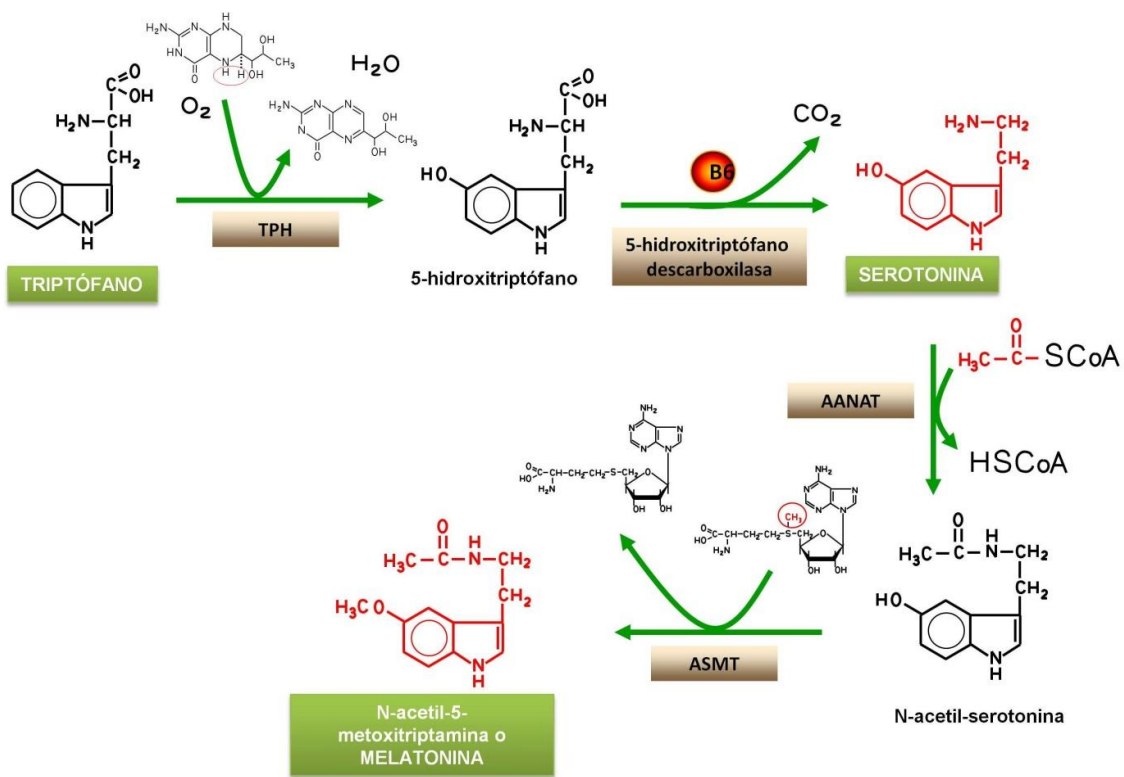


Figura 12. Síntesis de la melatonina a partir del triptófano en la glándula pineal. TPH: L-triptófano hidroxilasa; AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa; ASMT: N-acetilserotonina O-metiltransferasa.

A nivel de la glándula pineal, la biosíntesis de la melatonina comienza a partir del triptófano, aminoácido esencial captado del torrente circulatorio por los pinealocitos a través de un mecanismo de transporte activo bajo control adrenérgico. Este triptófano es hidroxilado en posición 5 por el enzima L-triptófano hidroxilasa (TPH) generándose 5-hidroxitriptófano, el cual sufre una descarboxilación mediada por

la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa transformándose en serotonina (5-hidroxitriptamina). Las concentraciones de serotonina en la glándula pineal son mucho mayores que en el resto del cerebro, y son especialmente elevadas durante el día, pero durante la noche caen marcadamente como consecuencia de su conversión a melatonina (Figura 12).

Una vez sintetizada, la serotonina sufre una acetilación por acción de la arilquilamina N-acetiltransferasa (AANAT), originándose en consecuencia la N-acetilserotonina (NAS), que finalmente será metilada por la N-acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) produciendo la molécula de melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (Figura 12). Si bien inicialmente se identificó a la AANAT como el enzima limitante de todo este proceso, al exhibir el mismo ritmo circadiano que la melatonina e inhibirse igualmente su actividad con la luz, estudios recientes demuestran que la síntesis de melatonina no se ve afectada tanto por una notable disminución o incremento mantenido en la actividad de la AANAT, lo que pone de manifiesto que el enzima limitante de la biosíntesis de esta hormona podría ser la ASMT (Liu and Borjigin 2005). Una vez producida en la glándula pineal, la melatonina pasa rápidamente al torrente sanguíneo, distribuyéndose por todo el organismo. Debido a esa característica, los niveles de esta hormona en sangre son considerados la principal señal de su síntesis pineal (Reiter 1991).

Respecto a la melatonina no pineal, cabe mencionar que se sintetiza a través de la misma vía metabólica que la en la glándula pineal, y en la cantidad necesaria para el tejido en cuestión, sin difundir al exterior celular.

La degradación de la melatonina en el cerebro tiene lugar en el plexo coroideo y pineal. En este caso, la melatonina se transforma primero en N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK) y después en N-acetil-5-metoxikinurenamina (AMK) (Hirata *et al.*, 1974; Josefa León *et al.*, 2000), siendo esta una de las vías más importantes de metabolización de la melatonina en cerebro de mamíferos. La melatonina puede transformarse de forma no enzimática en AFMK y AMK, cuando depura en primer lugar un OH[·] y en segundo lugar un radical O₂⁻ (Fujiwara *et al.*, 1978). Es interesante el hecho de que los metabolitos cerebrales de la melatonina, el

AFMK y su metabolito deformilado, el AMK (Hardeland and Pandi-Perumal 2005) manifiestan importantes propiedades antioxidantes, mayores que la melatonina (Mayo *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2001). El AMK es más potente para inhibir *in vitro* la actividad de la NOS estriatal que la melatonina (Hirata *et al.*, 1974; Josefa León *et al.*, 2006).

3.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA.

La naturaleza altamente lipofílica de la melatonina, gracias a la cual es capaz de atravesar membranas celulares, así como la presencia de diferentes dianas celulares para esta indolamina, sugiere que sus acciones fisiológicas van a estar mediadas por una amplia variedad de mecanismos de acción que pueden o no estar mediados por su unión a receptores (Reiter *et al.*, 2007).

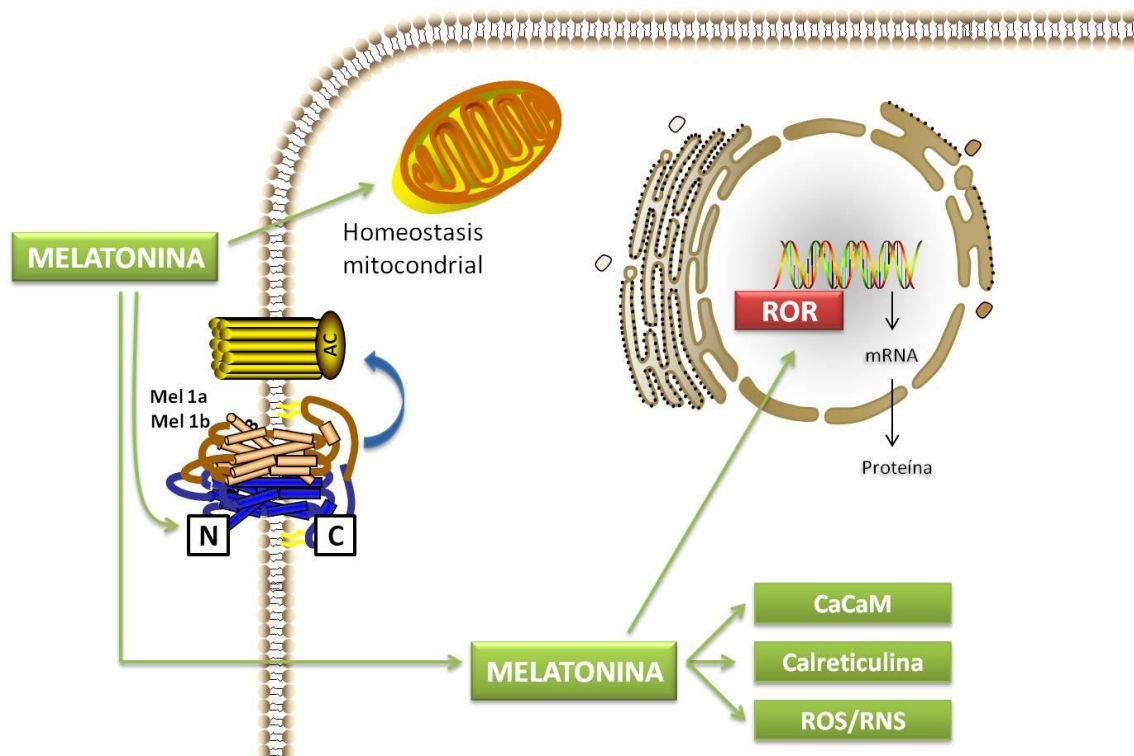


Figura 13. Mecanismos de acción de la melatonina. La melatonina puede actuar a través de la interacción con receptores de membrana (MT1 y MT2) y nucleares (ROR), mostrando en algunos casos un efecto cooperativo. Además, la melatonina ejerce funciones no mediadas por receptor, interaccionando con algunas proteínas citosólicas, como el complejo calcio-calmodulina, depurando directa o indirectamente ROS/RNS e interviniendo en la regulación de la homeostasis mitocondrial. Mel 1a o MT1 y Mel 1b o MT2. AC adenilato ciclasa; ROR del inglés Retinoid-related Orphan Receptor.

Los mecanismos de la melatonina mediados por receptor engloban su unión tanto a receptores de membrana como a receptores nucleares. Entre las acciones de la melatonina que no están mediadas por receptor se encuentran su interacción con proteínas citosólicas, su acción antioxidante directa e indirecta y su interacción con la mitocondria (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007) (Figura 13).

3.2.1 Unión a receptores.

A nivel de la membrana han sido identificados y caracterizados dos receptores de melatonina acoplados a proteínas G, denominados como MT1 (Mel 1a) y MT2 (Mel 1b) (Figura 13). Ambos receptores se expresan por separado o conjuntamente en varios tejidos del cuerpo, estando la distribución de MT2 más limitada al cerebro. El reconocimiento de la melatonina por cada uno de estos receptores causa distintos efectos, mientras que MT1 está asociado a proteínas G que median la inactivación de la adenilato ciclasa y activación de la fosfolipasa C β , MT2 adicionalmente inhibe la vía de la guanilato ciclasa soluble (Von GC *et al.*, 2002).

Recientemente, esta familia de receptores de membrana ha sido ampliada con el descubrimiento del receptor MT3 en hámster pero no en humanos (Nosjean *et al.*, 2001), caracterizándose posteriormente como una quinona reductasa 2, con un papel clave en la protección contra el estrés oxidativo al evitar las reacciones de transferencia de electrones entre las quinonas (Nosjean *et al.*, 2000); a pesar del poco conocimiento que se tiene hoy en día de su funcionamiento, ha sido identificado en una gran variedad de órganos incluidos hígado, riñón, cerebro, corazón, pulmón, intestino, músculo, tejido adiposo pardo y ojo, aunque en este último caso sólo se disponen de evidencias farmacológicas (Pintor *et al.*, 2003).

Finalmente, se debe tener en cuenta que los mecanismos que regulan la expresión los receptores de membrana son muy complejos, por lo que no es sorprendente que las respuestas mediadas por la melatonina sean dependientes de la fase del ritmo circadiano, duración de la exposición, presencia de melatonina endógena y sensibilidad funcional del receptor (Venegas *et al.*, 2013). Asimismo, es importante conocer donde se localizan estos receptores y qué funciones ejerce la

melatonina a través de ellos, ya que nos permitirá la posibilidad de establecer terapias contra diversas patologías en las que se encuentran implicados

En lo que se refiere a los receptores nucleares, el primer indicio de una posible interacción de la melatonina con el material nuclear se obtuvo al encontrarse una elevada concentración de dicha hormona asociada a la cromatina (Withyachumnarnkul *et al.*, 1986). Posteriormente Menéndez-Peláez y colaboradores demostraron la presencia de melatonina en el núcleo (Menendez-Pelaez *et al.*, 1993) y, mediante el uso de ¹²⁵I-iodomelatonina, Acuña-Castroviejo y colaboradores demostraron su unión específica a la fracción proteica del núcleo de hígado de rata (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1993; Acuña-Castroviejo *et al.*, 1994), sugiriendo la existencia de receptores nucleares para la melatonina. En 1994 Becker-Andre y colaboradores (Becker-Andre *et al.*, 1994) demostraron una acción genómica de la melatonina a través de los receptores nucleares ROR α , una subfamilia de receptores nucleares o factores de transcripción dependientes de ligando, que proporcionan a los organismos la capacidad para controlar la expresión génica en respuesta a un amplio rango de factores ambientales, fisiológicos y de desarrollo.

3.2.2 Unión a proteínas citoplasmáticas.

La naturaleza lipofílica de la melatonina y la existencia de mecanismos activos de captura de la molécula, permiten que determinadas acciones de la misma pudieran llevarse a cabo sin la intermediación de sus receptores (Finocchiaro and Glikin 1998). Asimismo, la melatonina puede interactuar con proteínas citosólicas como: la calmodulina, modulando la actividad del enzima fosfodiesterasa y, por tanto, las señales intracelulares del calcio (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). Todas estas proteínas participan en el metabolismo del calcio así como en la modulación de la estructura del citoesqueleto (Benitez-King and Anton-Tay 1993; Benitez-King 2006).

3.2.3 Actividad antioxidante.

La importancia de la melatonina como antioxidante se debe a muchas de sus características, como su capacidad para atravesar barreras con relativa facilidad, su disponibilidad en todos los tejidos y células, y su distribución en todos los compartimentos celulares (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007). Esta indolamina, así como algunos de sus metabolitos como AMK y AFMK, generados por la interacción de la melatonina con ROS y RNS, son capaces de depurar directamente ROS/RNS (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Leon *et al.*, 2004; Reiter *et al.*, 2003a).

La melatonina puede reaccionar con $\text{HO}\cdot$, al ser una molécula rica en electrones, puede ceder electrones al grupo hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (Tan *et al.*, 2000), originándose un radical indolil, éste a su vez, puede volver a depurar otro $\text{OH}\cdot$, transformándose en 3-hidroximelatonina cíclica, o bien depurar un radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) y originar el metabolito activo AFMK (Hardeland *et al.*, 1993; Poeggeler *et al.*, 1994). Tanto la 3-hidroximelatonina cíclica como el AFMK muestran una alta capacidad antioxidante, aumentando el valor de la melatonina como potente depurador de radicales libres (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Reiter *et al.*, 2003b).

Asimismo, la melatonina es capaz de reaccionar con otros radicales de oxígeno, como el oxígeno singlete (Cagnoli *et al.*, 1995), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Tan *et al.*, 2000) y el $\text{O}_2^{\cdot -}$, si bien este último hecho aún está por confirmar, especialmente *in vivo*, ya que la reacción por la cual la melatonina ejercería esta acción no es conocida (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007; Leon *et al.*, 2004; Reiter *et al.*, 2003b).

Por otro lado, la melatonina también puede depurar radicales de nitrógeno como los peroxinitritos ($\text{ONOO}\cdot$) (Zhang *et al.*, 1999) o radicales peróxido ($\text{LOO}\cdot$), interfiriendo así en la propagación de la peroxidación lipídica. No obstante, este hecho podría deberse más a la acción depuradora que ejerce sobre todas aquellas especies reactivas que puedan provocar peroxidación lipídica más que a la depuración en sí de $\text{LOO}\cdot$. Previendo la peroxidación lipídica, la melatonina mantiene la función y la permeabilidad de la membrana (Escames *et al.*, 1997). Bajo una condición de estrés oxidativo, la reacción inflamatoria sigue al daño oxidativo induciendo la expresión de iNOS y la producción de NO. La melatonina también inhibe la expresión de la iNOS,

disminuyendo por tanto la producción de óxido nítrico (NO) que reacciona con O_2^- para formar $ONOO^-$, siendo esta otra vía importante para disminuir RNS e inflamación (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007; Crespo *et al.*, 1999).

La capacidad para depurar radicales libres que tiene la melatonina depende exclusivamente de la estructura química de la hormona, es una acción directa, pero la melatonina también posee la habilidad para estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para reducir el estrés oxidativo (Antolin *et al.*, 2002; Mayo *et al.*, 2002), se trata de un efecto genómico que si podría estar mediado por su receptor nuclear (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1994). En primer lugar, la melatonina estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la GPx y GRd (Escames *et al.*, 2006b; Martin *et al.*, 2000a; Ortiz *et al.*, 2014), manteniendo así el balance GSSG/GSH tanto en condiciones normales como bajo estrés oxidativo (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Leon *et al.*, 2004; Leon *et al.*, 2005). Además, la melatonina aumenta la producción de GSH, estimulando la γ -glutamylcisteína sintasa, enzima limitante en la ruta de la biosíntesis de este compuesto (Urata *et al.*, 1999), y la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la cual genera el NADPH requerido por la GRd (Pierrefiche and Laborit 1995). En el mismo sentido, se ha descrito el efecto de la melatonina sobre otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007; Leon *et al.*, 2004; Reiter *et al.*, 2003b).

En definitiva, ya sea por acción directa y/o indirecta, la melatonina es un potente antioxidante con importantes propiedades para regular el estado redox celular, especialmente a nivel de la mitocondria al ser ésta la principal fuente de ROS/RNS, y proteger, en consecuencia, macromoléculas como el DNA, lípidos y proteínas del daño oxidativo. Asimismo, y dadas las características del grupo N-acetil presente en la melatonina, ésta va a aumentar la eficacia de otros antioxidantes naturales, mostrando una acción sinérgica con las vitaminas C y E (Reiter *et al.*, 2003a).

3.2.4 Acción sobre la mitocondria.

La melatonina, gracias a su carácter lipofílico e hidrofílico, puede atravesar las membranas celulares y subcelulares con relativa facilidad, concentrándose en los

distintos compartimentos, incluida la mitocondria donde alcanza unas altas concentraciones (Venegas *et al.*, 2012), por lo que parece razonable pensar que la acumulación de melatonina a este nivel se debe a la mera protección frente a los radicales libres, teniendo en cuenta que la mitocondria es la principal fuente de ROS. Sin embargo, la influencia de la melatonina en la mitocondria no se limita a su poder antioxidante dentro de ella, ya que recientes estudios han demostrado que la melatonina juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Acuña-Castroviejo D. *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2000a), demostrando que preserva la estabilidad, integridad y función de las membranas mitocondriales; interactúa directamente con la cadena de transporte electrónico, incrementando la actividad de los complejos respiratorios I y IV, tanto en mitocondrias sanas (Lopez *et al.*, 2009) como especialmente en mitocondrias previamente dañadas (Doerrier *et al.*, 2015; Escames *et al.*, 2003; Escames *et al.*, 2006b; Martin *et al.*, 2000a; Ortiz *et al.*, 2014).

En diversos experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha demostrado que la melatonina estimula la transcripción del ADNmt, aumentando la expresión del ARNm correspondiente a las subunidades I, II y III del complejo IV de la ETC que están codificadas por el ADNmt (Escames *et al.*, 2006a). También se ha demostrado que la melatonina inhibe la i-mtNOS, reduciendo la producción de NO y por tanto el estrés oxidativo/nitrosativo (Escames *et al.*, 2006b; Lopez *et al.*, 2006a).

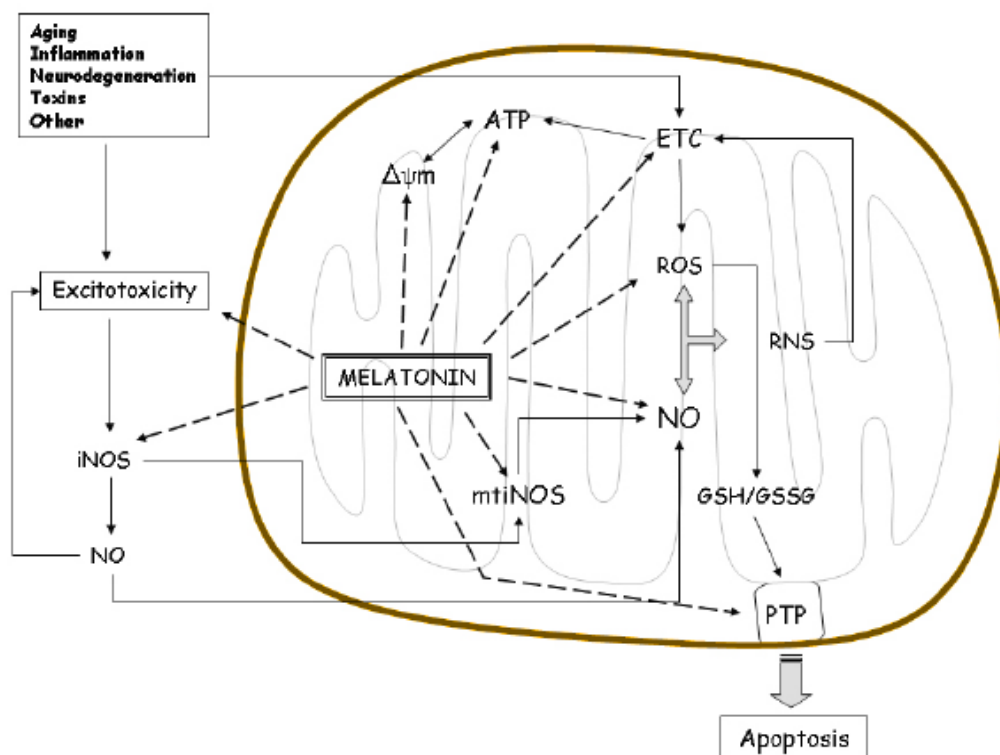


Figura 14. Efectos de la melatonina en la mitocondria. La melatonina ejerce una serie de acciones en la mitocondria que reflejan su papel protector. La melatonina puede contrarrestar la excitotoxicidad reduciendo la expresión de iNOS; incrementa la actividad de la cadena de transporte electrónico y la producción de ATP, lo que conduce a la regulación del potencial de membrana mitocondrial y la reducción de la producción de ROS y RNS; inhibe la actividad de i-mtNOS disminuyendo la producción de RNS. Estas acciones, en conjunto, recuperan el pool de GSH y el cierre del poro de transición mitocondrial previniendo la apoptosis. (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007).

Basado en estos resultados, es razonable pensar que el efecto de la melatonina en la regulación de la actividad de los complejos de la ETC no sólo se basa en el papel antioxidante de la indolamina. En efecto, el alto potencial redox de la melatonina (0.94 V) sugiere que ésta puede interaccionar con los complejos de la ETC donando y aceptando electrones y de esta manera aumentar el flujo electrónico, un efecto que no poseen otros antioxidantes (Martin *et al.*, 2002).

Como consecuencia, mejora la función mitocondrial y aumenta la síntesis de ATP (Lopez *et al.*, 2006b), modulando el potencial de membrana mitocondrial e inhibiendo la apertura del poro de transición mitocondrial (Andrabi *et al.*, 2004;

Sourdeval *et al.*, 2006). En algunas circunstancias, la melatonina puede disminuir el consumo de oxígeno por la mitocondria, reduciendo el potencial de membrana y la producción de ROS (Lopez *et al.*, 2009; Reyes-Toso *et al.*, 2003) (Figura 14). Estas acciones, junto con sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, hacen que la melatonina muestre una gran importancia desde el punto de vista terapéutico en todas aquellas patologías dónde la función mitocondrial se ve alterada.

3.3 MELATONINA Y NEURODEGENERACIÓN

La producción endógena de melatonina, tanto pineal como extrapineal, disminuye con la edad, este descenso comienza a partir de los 35-40 años y se va haciendo cada vez más significativo, de forma que a los 55 años ya producimos un 40% menos de melatonina. Estos hechos han conducido a la teoría de que el descenso de melatonina con la edad, puede tener una relación funcional específica con la aparición de procesos degenerativos, debido en parte a sus funciones tanto de sincronizador del ritmo circadiano como a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, en particular en procesos degenerativos que afectan a la función cerebral (Reiter *et al.*, 1994). El cerebro es un órgano especialmente sensible al daño oxidativo debido al mayor consumo de oxígeno que realiza con respecto a otros órganos, al relativamente escaso desarrollo de defensas antioxidantes y el hecho de que contiene una gran cantidad de ácidos grasos fácilmente oxidables. El daño oxidativo en el cerebro ha sido considerado como un evento fisiopatológico común a diferentes enfermedades neurodegenerativas, donde un incremento de ROS y RNS participan del daño neuronal y la muerte celular con la que cursan estas patologías. Como consecuencia de la muerte neuronal se activa la microglía iniciando una reacción inflamatoria crónica, que junto con el estrés oxidativo, participan de la disfunción mitocondrial característica de las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Parkinson (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007).

En base a la fisiopatología del Parkinson y a las propiedades y acciones de la melatonina, parece obvio que la administración farmacológica de la esta indolamina podría tener efectos beneficiosos en esta enfermedad neurodegenerativa, de hecho la melatonina ha sido testada como potencial agente neuroprotector en varios modelos

experimentales, siendo numerosas los estudios que ponen de manifiesto los beneficios de la melatonina en modelos animales de enfermedad de Parkinson (Saravanan *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2006).

En primer lugar, la melatonina protege frente a la excitotoxicidad mediada por la autooxidación de la dopamina, teniendo mayor eficacia frente a estos efectos prooxidantes de la dopamina que otros antioxidantes como la vitamina E y C (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1997; Khaldy *et al.*, 2000).

Otros estudios han demostrado que la administración de melatonina contrarresta la reducción de fibras tiroxina hidroxilasa positivas, normaliza la expresión de iNOS, previene la inhibición de la actividad del complejo I y el estrés oxidativo en mitocondrias de la sustancia negra y estriado en ratones tratados con MPTP (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1997; Escames *et al.*, 2006b; Khaldy *et al.*, 2000; Ortiz *et al.*, 2001). Como consecuencia de todos estos efectos derivados de la administración de melatonina, esta indolamina fue capaz de normalizar la actividad locomotora de los ratones (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1997; Escames *et al.*, 2006b; Khaldy *et al.*, 2000). Otros estudios más recientes, demuestran que ratones modelo de Parkinson pretratados con melatonina mantienen la función mitocondrial, la producción de ATP y los niveles de enzimas antioxidantes en niveles normales (Patki and Lau 2011).

Estos efectos protectores de la melatonina parecen estar relacionados con la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de esta indolamina, previniendo así la inhibición de la respiración mitocondrial característica de la enfermedad de Parkinson. Además la melatonina puede interactuar con los complejos respiratorios, como se ha mencionado anteriormente intercambiando electrones con ellos, y unirse con alta afinidad al complejo I, pudiendo estar estas acciones de la melatonina involucradas también en la protección que esta indolamina ejerce sobre los complejos mitocondriales en el Parkinson (Hardeland 2005; Paradies *et al.*, 2015; Srinivasan *et al.*, 2011a; Srinivasan *et al.*, 2011b).

Todos estos efectos a nivel mitocondrial conducen a una reducción de la muerte neuronal dopaminérgica. Estudios *in vitro*, llevados a cabo en cultivos de células dopaminérgicas, mostraron las primeras evidencias de que la melatonina

protegía frente a la muerte neuronal (Iacovitti *et al.*, 1997). Posteriormente, estudios realizados en ratas tratadas con MPP+, demuestran que la melatonina protege a las neuronas dopaminérgicas, contrarrestando el incremento de los productos de la peroxidación lipídica en la sustancia negra y manteniendo la actividad de la TH (Jin *et al.*, 1998). Resultados semejantes son los observados por Antolin y colaboradores en el 2002, que registraron una reducción en la pérdida de inmunoreactividad para la tiroxina hidroxilasa en la sustancia negra pars compacta de ratones tratados con MPTP (Antolin *et al.*, 2002).

II. Hipótesis y objetivos

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia en la población tras la de Alzheimer. Su etiología es actualmente desconocida, aunque se cree que podría deberse a un proceso multifactorial, en el que intervienen tanto factores genéticos como factores ambientales. La sintomatología de esta enfermedad es causada por la disminución de la producción de dopamina, debida a la muerte de neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia negra. La muerte de estas neuronas se asocia con la disfunción mitocondrial, que provocaría fallo bioenergético y conduciría a la muerte neuronal por apoptosis. La disfunción mitocondrial, considerada actualmente como un proceso inherente a la neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson, tanto en el Parkinson familiar como en el idiopático, se debe fundamentalmente a dos procesos fisiopatológicos, el estrés oxidativo/nitrosativo y la inhibición del complejo I. Además, actualmente están tomando especial interés determinados genes cuyas mutaciones están asociadas a las formas familiares de la enfermedad de Parkinson, como son *PINK1*, *Parkina*, *DJ-1* y *α -sinucleína*, y cuyos productos intervienen en el control de la homeostasis y la función mitocondrial. En este sentido, nuestra hipótesis es que la disfunción mitocondrial responsable de la muerte neuronal y condicionada por el estrés oxidativo/nitrosativo y por la inhibición de la actividad del complejo I, pueda afectar o estar afectada por la expresión de los genes, *PINK1*, *Parkina*, *DJ-1* y *α -sinucleína*, que codifican estas proteínas con funciones mitocondriales, conduciendo a la incapacidad funcional de la red *PINK1/parkina/DJ-1* para mantener la calidad y función mitocondrial.

Por otro lado, mediante estudios previos en diversos modelos experimentales, se ha comprobado que la melatonina previene la disfunción mitocondrial en patologías donde la mitocondria también juega un papel fundamental en su fisiopatología. El efecto de la melatonina es múltiple, debido a sus acciones antioxidantes y antiinflamatorias, que llevan a una inhibición de la expresión de la iNOS/i-mtNOS, reduciendo el estrés oxidativo/nitrosativo mitocondrial y normalizando la actividad del complejo I y la producción de ATP. Los metabolitos de la melatonina también ejercen efectos a este nivel, incluso más potentes que la propia melatonina. En este sentido, nuestra hipótesis sostiene que si no podemos actuar sobre el origen de la enfermedad para curarla, porque desconocemos su causa, podríamos actuar frente al daño

mitocondrial para evitar la disfunción mitocondrial, previniendo la muerte neuronal dopaminérgica y como consecuencia mejorando el estado clínico del paciente. La melatonina, debido a su capacidad para actuar directamente sobre la mitocondria y debido a su papel como antioxidante y antiinflamatorio, pensamos que podría suponer un excelente tratamiento neuroprotector de aplicación en esta enfermedad neurodegenerativa.

El desarrollo de fármacos neuroprotectores para la enfermedad de Parkinson está frenado por el limitado conocimiento que se tiene sobre la etiología de esta enfermedad, si el tratamiento con melatonina puede reducir de forma considerable el daño mitocondrial y por tanto la muerte neuronal, proporcionaría una herramienta farmacológica muy interesante, ya que no existe ningún fármaco neuroprotector para el tratamiento de esta enfermedad, y por lo tanto, susceptible de ser usada en clínica.

Para comprobar estas hipótesis nos planteamos los siguientes

Objetivos:

1. Evaluar los déficits moleculares y funcionales inducidos por el MPTP en el embrión de pez cebra. Esta evaluación pondrá especial énfasis en la función mitocondrial, determinando la actividad del complejo I y la respiración mitocondrial *in vivo*, y sobre el estado oxidativo y nitrosativo. Además, se realizará un estudio de la expresión de genes relacionados con la síntesis de dopamina y la homeostasis mitocondrial, así como del contenido de las proteínas codificadas por dichos genes, especialmente PINK1, parkina, DJ-1, γ 1-sinucleína y MUL1.
2. Evaluar las alteraciones fenotípicas inducidas por la administración de MPTP en el embrión de pez cebra, valorando la motilidad, la mortalidad y la aparición de malformaciones en los embriones de pez cebra.
3. Valorar si la administración de melatonina a los embriones tratados con MPTP tiene un efecto neuroprotector, tanto para prevenir como para curar el estado parkinsoniano. Para ello se estudiará el efecto de esta indolamina sobre la

actividad del complejo I y la respiración mitocondrial in vivo; expresión de genes; estrés oxidativo/nitrosativo y actividad locomotora.

III. Material y métodos

1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS

1.1 ANIMALES

Los peces cebra (*Danio rerio*) adultos de la cepa AB se obtuvieron de ZFBiolabs S.L (Madrid, España), utilizándose como reproductores para obtener los embriones necesarios para llevar a cabo los objetivos planteados en el presente estudio. Los peces se mantuvieron a una temperatura de $28.5 \pm 1^\circ \text{C}$ y bajo un fotoperiodo de 14:10 (luz/oscuridad, siendo la hora de encendido las 08:00) en un sistema de peceras con el agua en recirculación (Aquaneering Incorporated, Barcelona, España), dentro del animalario de la Universidad de Granada. La alimentación, mantenimiento y cruces de los mismos, se llevaron a cabo de acuerdo con la guía de uso del pez cebr (Westerfield 2007). Los embriones obtenidos por los cruces entre parejas de adultos, se recogieron y mantuvieron en medio E3 (5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33mM CaCl₂, 0.33mM MgSO₄) en estufa a una temperatura media de $28.5 \pm 1^\circ \text{C}$ y con un fotoperiodo de 14:10 (luz/oscuridad). La sedación de los animales, cuando fue necesaria, se realizó con tricaina 15 mM (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt) y el sacrificio se realizó por exceso de sedación con el mismo anestésico y posterior decapitación. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a los protocolos aprobados por la Institución de Cuidado Animal de la Universidad de Granada (CEEA 2009-254 y 2010-275) y de acuerdo con la European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS #123) y las leyes españolas (R.D.53/2013).

1.2 TRATAMIENTO CON MPTP Y MELATONINA

Los embriones obtenidos fueron descorionizados manualmente a las 24 hpf (horas post fecundación) y repartidos al azar en placas de 24 pocillos, a razón de 6 embriones por pocillo, en un volumen final de 1 ml de medio E3. En estas placas se llevaron a cabo los tratamientos con MPTP (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y/o con melatonina (Fagrón Ibérica, Barcelona, España) que se administraron siempre a partir de las 24 hpf. El MPTP fue preparado en fresco en medio E3 a una concentración inicial de 50 mM, y usado a diferentes concentraciones finales: 300, 600 y 800 μM ; así como a

diferentes periodos de tiempo: 24 y 48 horas de tratamiento, para establecer la dosis/tiempo óptimos para desarrollar en los embriones un estado parkinsoniano, como se muestra en la figura 1. Para los experimentos de neuroprotección, la melatonina fue disuelta en 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) y usada a unas concentraciones finales de 0.2 y 1 μM en el medio E3. La melatonina y el MPTP se añadieron a los pocillos que contenían los embriones, el tratamiento se mantuvo desde las 24 hpf hasta las 72 hpf. Para los experimentos de recuperación, un grupo de embriones se estudió hasta las 120 hpf. En estos experimentos el MPTP se mantuvo, al igual que en los anteriores experimentos, desde las 24 hpf hasta las 72 hpf; la melatonina se añadió en un grupo de embriones desde las 24 hpf hasta las 120 hpf, denominándose éste como tratamiento preventivo, y en otro grupo la melatonina se añadió desde las 72 hasta las 120 hpf, denominándose a éste como tratamiento curativo, ya que en éste último grupo la melatonina se añade una vez que el estado parkinsoniano ya está instaurado. En todos los experimentos, la mitad del medio E3 de cada pocillo se reemplazó diariamente por nuevo medio precalentado y se añadió la cantidad necesaria de tratamiento para mantener las concentraciones adecuadas de melatonina y/o MPTP. Tras completar los protocolos experimentales, 72 hpf y 120 hpf, los embriones se anestesiaron con tricaina y se sacrificaron.

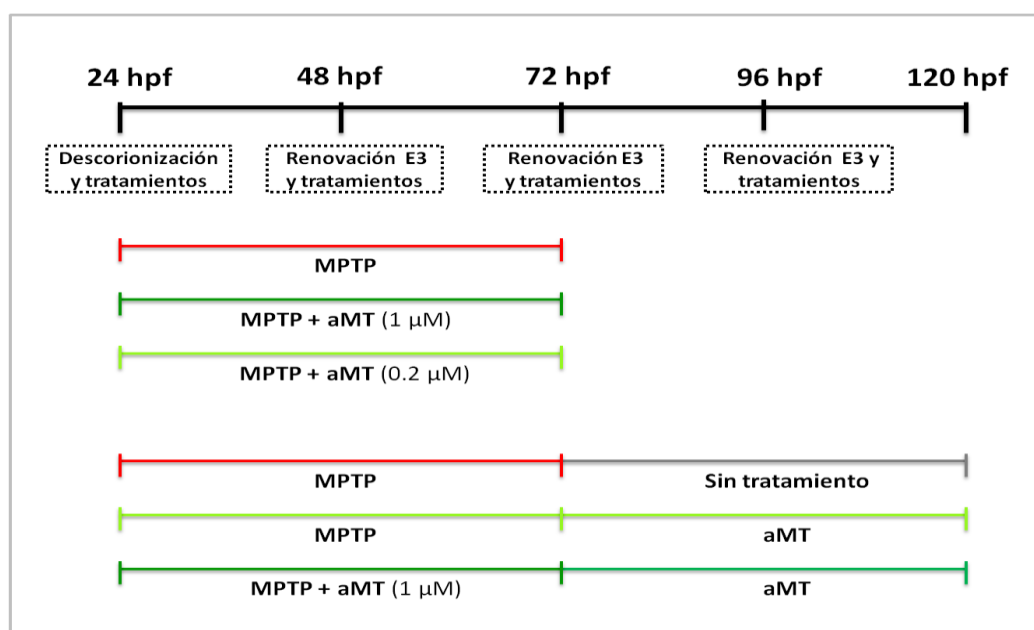


Figura 1. Esquema representativo del diseño experimental utilizado.

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

2.1 EXTRACCIÓN DE RNA

El ARN celular se obtuvo a partir de un pooled de 35 embriones de pez cebra de 72 y 120 hpf. Para la extracción del ARN se utilizó el kit de RNeasy Lipid Tissue Mini (Quiagen, Hilden, Germany). Los embriones se homogenizaron, con un homogenizador manual a motor, en 1 ml de QIAzol Lysis y se siguió el protocolo recomendado por la casa comercial para la extracción del ARN. Finalmente el ARN fue eludido en 60 µl de agua libre de nucleasas, en dos pasos de 30 µl cada uno. Una vez obtenido el ARN se cuantificó por densitometría óptica a 260/280 nm en NanoDrop (NanoDrop ND 1000 V3.5.2, NanoDrop Technologies, USA) y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Por último, el ARN se alicuotó y se guardó a -80°C para su retrotranscripción.

2.2 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA

Para la obtención de cADN se usó el kit de transcripción inversa “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, Foster City, California, United States) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La reacción de transcripción inversa se constituyó en base a 10 µl de máster mix a los que se le añadió un volumen variable de ARN (2,5 µg) y agua libre de nucleasas de manera que el volumen final de reacción fue de 20 µl. El cADN obtenido se alicuotó y se guardó a -20°C hasta su posterior uso.

2.3 RT-PCR CUANTITATIVA

La amplificación se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real en el equipo Stratagene Mx3005P APCR System (Agilent Technologies, Madrid, España), usando una curva estándar y mediante sondas Taqman específicas (Applied Biosystems) para el gen park2 (Dr03135273_m1); park7 (Dr03083195_m1); pink1 (Dr03423116_m1); th (Dr03437804_m1); nos2a (Dr03124752_m1); sncga (Dr03181390_s1); mul1a (Dr03135397_g1); sod2 (Dr03100019_m1); gpx1a (Dr03071768_m1); gsr (Dr03109438_m1), y el gen actb1 (Dr03432610_m1) como control endógeno de carga. Las condiciones de la RT-PCR fueron las especificadas por el fabricante. Finalmente, los

niveles de expresión se normalizaron con respecto a los valores de expresión de la β -actina para cada muestra y se refirieron frente a los valores de las muestras de embriones control (calibrador).

3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS EMBRIONES.

Los análisis por western blot se realizaron en homogenados de 50 embriones de 72 hpf. Las muestras se homogenizaron en solución de homogenización A (50 mM Tris – HCl, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100, 1mM dithiothreitol, pH 7.6 con un cocktail inhibidor de proteasas (Thermo Scientific, Madrid, Spain)) usando un homogenizador de mano con motor. El homogenado se sonicó en hielo durante 10 segundos al 35% y se centrifugó a 1000 *g* durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se preparó para el análisis por western blot. Para ello, 40 μ g de proteína de cada muestra 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 incubó la mezcla a 99°C durante 5 minutos y posteriormente a 4°C durante el mismo período de tiempo. Las muestras una vez preparadas fueron utilizadas para llevar a cabo la electroforesis, la cual se realizó en geles con diferentes concentraciones de acrilamida/bis-acrilamida (10-17%) en función del peso molecular de la proteína a analizar, usando el equipo de electroforesis específico mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Madrid, España).

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVD-0,45 μ m mediante el sistema mini Trans-Blot SD Transer Cell (Bio-Rad) y se hibridaron con anticuerpos específicos para las proteínas de interés. La incubación con el anticuerpo primario se realizó a 4°C toda la noche y el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados así como las diluciones en las que se usaron cada uno fueron las siguientes: anti-PINK1 dilución 1:200 (10006283, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, United States), anti-PARK7/DJ1 dilución 1:500 (ab11251, Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-Parkin dilución 1:1000 (ab15954, Abcam), anti-E3 ubiquitin-protein ligase MUL1 dilución 1:1000 (ab99096, Abcam), anti-Tyrosine Hydroxylase dilución 1:1000 (MAB318, Millipore, Madrid, Spain), anti- γ -Synuclein dilución 1:500 (ab55424, Abcam), anti-Mouse iNOS

dilución 1:2000 (610432, BD Biosciences Pharmigen) y anti-RPL13A dilución 1:2000 (ab96074, Abcam) como control de carga.

La interacción proteína-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia usando el reactivo ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (Ge Healthcare Life Sciences, Buckingham-shire, UK) según las instrucciones del fabricante. La imagen se digitalizó con el equipo de imagen Kodak Image Station 2000R (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA) y se cuantificaron las bandas mediante el uso del software 1D Image Analysis (versión 3.6). la intensidad de las bandas obtenidas en la detección de las proteínas de interés se normalizó con respecto a RPL13A y los datos se expresaron en relación al grupo control.

4. INMUNOHISTOQUÍMICA

Para los ensayos de inmunohistoquímica todos los embriones se trataron desde las 24 hpf hasta el momento del sacrificio con feniltiourea al 0.003% (PTU) para evitar la pigmentación. Tras la finalización de los correspondientes tratamientos, según el grupo experimental, los embriones se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 3 horas a temperatura ambiente en agitación, posteriormente se lavaron en tampón fosfato salino (PBS) con 0.3% de Tritón X-100 (PBS-T) tres veces durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. A continuación los embriones se bloquearon en suero de oveja al 10% en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. El siguiente paso fue la incubación con el anticuerpo primario, para lo que se usaron los anticuerpo anti-Tyrosine Hydroxylase a una dilución 1:200 (MAB318, Millipore, Madrid, Spain) y anti-mouse iNOS a una dilución 1:200 (610432, BD Biosciences Pharmigen) y se incubaron en suero al 1% en PBS-T toda la noche a 4°C en agitación. Al siguiente día, los embriones se lavaron en PBS-T 3 x 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Para la detección de la proteína, los embriones se incubaron con el anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (A11029, Life technology, Carlsbad, California, Estados Unidos) en PBS-T con suero de oveja al 1% durante dos horas a temperatura ambiente en agitación, y después fueron lavadas en PBS-T 3 x 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Los embriones marcados se observaron en el microscopio confocal

enteros, para ello fueron montados en agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% sobre cubreobjetos (Macdonald 1999; Sallinen *et al.*, 2009).

5. RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

El oxígeno consumido por la célula puede ser utilizado a nivel mitocondrial, lo que conocemos como respiración mitocondrial o puede ser consumido sin la participación de la mitocondria, conocido como respiración no-mitocondrial. El consumo de oxígeno no mitocondrial puede tener varios orígenes, como los peroxisomas o la actividad oxidasa de la NADPH de la membrana plasmática. En lo relativo a la respiración mitocondrial, parte del oxígeno que consume la mitocondria es usado para la producción de ATP, a través de la ATP-sintasa y parte es usado para mantener el gradiente de protones entre la membrana mitocondrial interna y la matriz mitocondrial (Proton Leak), como se muestra en la figura 2.

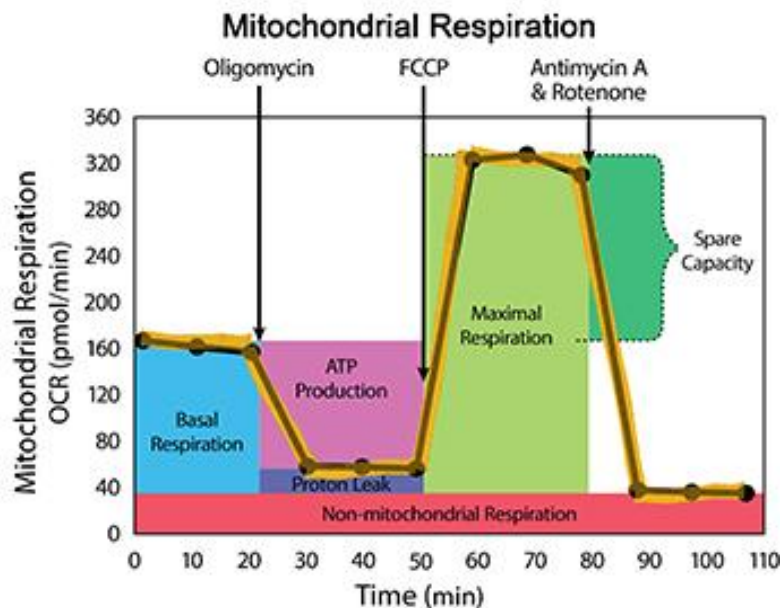


Figura 2. Esquema representativo del diseño experimental usado en los experimentos de respiración. Se muestran los parámetros fundamentales de la función mitocondrial: respiración basal, producción de ATP, proton leak, respiración máxima y respiración no mitocondrial (<http://www.seahorsebio.com/>).

El consumo de oxígeno se midió con el equipo XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Copenage, Dinamarca), mediante un sistema no invasivo que

nos permitió determinar la bioenergética mitocondrial en embriones *in vivo*. Para llevar a cabo estas determinaciones se usaron microplacas XF24 “islet capture” y se dispuso un embrión por pocillo, excepto en los pocillos destinados a las correcciones internas del Seahorse. Sobre cada embrión se colocó una red, para mantenerlo posicionado en el fondo del pocillo impidiendo así la libre natación del mismo por el pocillo y protegiéndolo de los posibles daños ocasionados por los electrodos durante el transcurso del experimento (Stackley *et al.*, 2011). A cada uno de los pocillos se les añadió 700 μ l de medio E3 al inicio del experimento. Para medir los diferentes aspectos relacionados con la bioenergética mitocondrial se planeó el siguiente experimento: en primer lugar se determinó el consumo basal de oxígeno, durante siete medidas se determinó el consumo de oxígeno sin la adición de ningún compuesto; en segundo lugar se midió el escape de protones (proton leak), es decir, el consumo de oxígeno mitocondrial independiente de la fosforilación oxidativa, para lo que se inyectó en el pocillo oligomicina, que inhibe al complejo V mitocondrial (ATP-sintasa). A partir de esta medida de proton leak se estimó la producción de ATP, como el porcentaje de la respiración mitocondrial basal que no es destinado al mantenimiento de dicho proton leak. En tercer lugar se determinó la máxima capacidad respiratoria o capacidad del sistema de transferencia de electrones (electron transfer system capacity, ETS), para lo que se añadió carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), un desacoplante de la fosforilación oxidativa. Por último, se determinó el consumo de oxígeno no dependiente de la mitocondria, para lo que se inyectó en el pocillo antimicina A y rotenona, inhibidores del complejo III y complejo I respectivamente. Este conjunto de inhibidores se dispusieron en la microplaca de la siguiente manera:

-Puerto A: 50 μ l de 150 μ M oligomicina para una concentración final en el pocillo de 10 μ M.

-Puerto B: 100 μ l de 21.25 μ M FCCP para una concentración final en el pocillo de 2.5 μ M.

-Puerto C: 100 μ l de 4.75 μ M FCCP para una concentración final en el pocillo de 3 μ M.

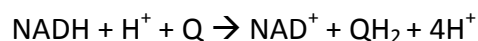
-Puerto D: 50 μ l de 200 μ M antimicina A y 200 μ M rotenona para una concentración final en el pocillo de 10 μ M.

Las medidas realizadas se expresan como tasa de oxígeno consumido (OCR, in pmol O₂/min/embrión).

6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL

El método utilizado para la determinación de la actividad del complejo I se basa en el desarrollado por Birch-Machin (Birch-Machin *et al.*, 1994), con ligeras modificaciones para el uso de homogenado en lugar de mitocondrias aisladas. Así, embriones de 72 hpf (70 embriones por muestra) se homogenizaron en 200 μ l de medio CPT frío (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M KCl, pH 7.5) con un homogenizador de mano a motor. El homogenado resultante se sonicó mediante el sonicador de ultrasonidos Sonoplus HD-2070 (Bandelin electrónica GmbH & Co. KG, Berlín, Alemania) a 3 ciclos, 35%, durante 10 segundos, y se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se alicuotaron y congelaron a -80°C. La medida de la actividad de los complejos respiratorios se llevó a cabo en un espectrofotómetro de cubeta (UV-1700 Shimadzu spectrophotometer).

El complejo I (NADH deshidrogenasa o NADH: ubiquinona oxidoreductasa, EC 1.6.5.3) cataliza la captación de dos electrones del NADH y los transfiere a un transportador liposoluble denominado ubiquinona (Q), reduciéndolo a ubiquinol (QH₂), el cual difunde libremente por la membrana. Al mismo tiempo el complejo I transloca cuatro protones al espacio intermembrana, produciendo un gradiente de protones:



La actividad del complejo I fue espectrofotométricamente medida siguiendo la tasa de oxidación del NADH durante 3 minutos a 340 nm. Para ello, 35 μ l de muestra se incubaron durante 3 minutos a 30 °C, en un medio que contenía 250 μ l de fosfato potásico 50 mM, pH 7,4, 50 μ l de KCN 20 mM, 50 μ l de BSA 25 mg/ml, 5 μ l de antimicina A 0,2 mg/ml, 5 μ l de decil-ubiquinona 5 mM y 50 μ l de MgCl₂ 50 mM. Tras la incubación, la reacción se inició al añadir 50 μ l de NADH 1,3 mM. En todas las

determinaciones se restó la oxidación del NADH no dependiente del complejo I mediante su inhibición con 10 μ l de rotenona 100 μ g/ml. La actividad del complejo I se expresó en nmol oxidados de NADH/min/mg de proteína en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{(\Delta \text{Abs} - \Delta \text{Abs rot}) \times 1000}{5.6 \text{ (C.E para NADH)}} / \frac{\text{mg prot} \times 35}{500}$$

7. ANÁLISIS DEL ESTADO REDOX

Se determinaron las actividades de la glutathion peroxidasa (GPx), glutathion reductasa (GRd), superoxido dismutasa (SOD) y los niveles de glutathion (GSH) y glutathion disulfuro (GSSG), para hacer una valoración del estado redox de los embriones. La determinación de la actividad de la GPx se realizó usando el kit de ensayo Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric (BioVision Incorporated, Milpitas, California, Estados Unidos). Las medidas se realizaron en homogenados de 100 embriones de 72 hpf, conforme a las indicaciones del fabricante, siguiendo la oxidación del NADPH durante 5 minutos a 340 nm en el espectofluorímetro Power Wave_x (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, Estados Unidos).

La GRd también se determinó por espectofotometría en homogenados de embriones de 72 hpf siguiendo la generación de ácido 5-thio-2-nitrobenzoico (TNB) durante 10 minutos a 405 nm, de acuerdo a las indicaciones del kit de ensayo Glutathione Reductase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision Incorporated, Milpitas, California, Estados Unidos).

Para la actividad de la SOD se utilizó el kit Superoxide Dismutase Activity Assay Kit (BioVision Incorporated, Milpitas, California, Estados Unidos). Esta actividad también se midió en homogenado de embriones de 72 hpf, en este caso siguiendo la reacción de generación del compuesto water-soluble formazan dye (WST-1), y para la curva estándar se usó SOD de eritrocitos bovinos (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos). La actividad de estas enzimas se expresó como $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$.

El GSH y el GSSG se midieron mediante el método colorimétrico de Hissin and Hilf (Hissin and Hilf 1976) con ligeras modificaciones, en homogenado de embriones de 72 hpf. El homogenado se desproteinizó con ácido tricloroacético (TCA) al 10% y centrifugó a 20.000 *g* durante 15 minutos a 4°C. Para la determinación del GSH se usaron 10 µl del sobrenadante que se incubaron con 10 µl de solución o-phthalaldehído etanólico (1mg/ml) y 180 µl de tampón fosfato (100 mM fosfato sódico, 5 mM EDTA-Na₂, pH 8.0) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se midió la fluorescencia de las muestras a 340 nm de excitación y 420 nm de emisión en el lector de placas FLX800 (Bio-Teck Instruments Inc., Winooski, VT, Estados Unidos). Para la medida del GSSG, se partió de 30 µl de sobrenadante que se preincubó con 12 µl de una solución de N-etilmaleimida (5 mg/ml en agua destilada) durante 40 minutos a temperatura ambiente, para después ser alcalinizado con NaOH 0.15 N. De esta dilución se tomaron alícuotas de 45 µl que se incubaron con 10 µl de la solución o-phthalaldehído (1 mg/ml) y con 145 µl de NaOH 0.1 M durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se midió la fluorescencia. Las concentraciones de GSSG y GSH se calcularon de acuerdo a la curva estándar y se expresaron como nmol/mg prot.

8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

La actividad locomotora fue testada en embriones con 120 hpf puesto que a edades más tempranas los movimientos de los embriones se deben a respuestas al tacto o son sacudidas de la cola. Para llevar a cabo estos experimentos, los embriones se mantuvieron en placas de 24 pocillos conteniendo 1 ml de medio E3 con o sin tratamiento. En estas mismas placas donde se administraron los tratamientos se llevaron a cabo los experimentos de comportamiento, siempre a la misma hora, las 11:00 de la mañana y tras previamente dejarlos 1 hora de habituación en el lugar de la medida. Sólo los peces con un fenotipo normal fueron utilizados para llevar a cabo estos análisis. El comportamiento de los embriones se analizó utilizando un sistema de grabación consistente en una cámara CCD conectada a un ordenador, y las imágenes adquiridas fueron procesadas usando el equipo SMART 3.0 (Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, España). Se cuantificó la distancia recorrida (cm) y la velocidad (cm/s) en

cada uno de los embriones. Los patrones de movimiento de los embriones se grabaron durante 5 minutos, con 6-13 réplicas por grupo.

9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MELATONINA, AFMK Y AMK MEDIANTE ESPECTOMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN.

La melatonina, la N1-acetil-5-metoxikinuramina (AMK) y la N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina (AFMK) se extrajeron a partir de homogenados de 40 embriones de 72 hpf. La extracción de las muestras se realizó con cloroformo en agitación durante 10 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3800 g durante 10 minutos y se retiró la fase acuosa por aspiración. A continuación se procedió a otro paso de agitación de 10 minutos junto con NaOH 0.1N, tras lo cual de nuevo las muestras se centrifugaron 10 minutos a 3.800 g y la fase acuosa aspirada. Finalmente la fase orgánica se evaporó en un sistema Speed Back a una presión de 5.1 Pa durante 45 minutos (SPD 2010 Speed Vac System; Fisher Scientific, Madrid, España). Las muestras se analizaron usando un cromatógrafo de líquidos de ultra-alta presión (UPLC) WATERS modelo ACQUITY H CLASS acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (triple-quad) WATERS modelo XEVO TQ-S. Se usó una columna de tipo ACQUITY UPLCr BEH C18 1.7 μm . La separación se realizó usando un programa en gradiente (Wang *et al.*, 2012) con un flujo de 0.4 ml/min (solvente A: 0.1% ácido fórmico en agua, solvente B: acetonitrilo 0.1% ácido fórmico). El voltaje de capilaridad fue de 2.5 kV; la tasa de flujo del cono de gas y gas de desolvatación fueron de 150 y 800 L/hr respectivamente; la source temperatura y temperatura de desolvatación fueron 150 y 350 °C respectivamente. Los datos fueron adquiridos con el programa MassLynx 4.0 y calibrados y cuantificados con QuanLynx.

10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford 1976). Se preparó una recta patrón con BSA (albúmina de suero bovino) como estándar, a concentraciones crecientes comprendidas entre 0,05 - 0,6 mg/ml. Cada punto de la curva y cada muestra se midieron por duplicado en placas de 96

pocillos, donde se añadieron 200 μ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y 10 μ l de cada una de las concentraciones de la curva patrón así como de cada una de las muestras. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, en suave agitación y protegida de la luz para que se produzca la reacción. La medida de absorbancia se llevó a cabo en un espectrofotómetro de placas (Bio Tek Power-Wavex Microplate Scanning Spectrophotometer) a una longitud de onda de 595 nm, expresándose los resultados como mg de proteína/ml.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software científico GraphPad Prism 6 (GraphPad, Software, Inc. La Jolla, CA, USA). Para comparar la media entre diferentes grupos experimentales se utilizó una ANOVA de una vía con un test *post hoc* de Tukey, considerando un valor de *P* menor de 0,05 como estadísticamente significativo.

IV. RESULTADOS

Parte de los resultados mostrados en este apartado corresponden al trabajo:

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, doi: 10.1111/jpi.12332

1. LA MELATONINA PROTEGE A LA MITOCONDRIA DEL FALLO BIONERGÉTICO PRODUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON MPTP.

Debido a la amplia variedad de concentraciones de MPTP usadas para inducir parkinsonismo en embriones de pez cebra (Bretaud *et al.*, 2004; Lam *et al.*, 2005; McKinley *et al.*, 2005; Sallinen *et al.*, 2009; Sallinen *et al.*, 2010), comenzamos el estudio realizando unos experimentos preliminares para establecer la dosis efectiva en nuestro modelo experimental. En primer lugar, medimos la actividad del complejo I (CI) mitocondrial en estado fisiológico, en embriones controles desde las 24 hpf hasta 120 hpf. La actividad del CI comienza a aumentar a partir de las 72 hpf, aumentado al doble a las 96 hpf y siendo cuatro veces mayor a las 120 hpf ($P < 0.01$, $P < 0.001$ respectivamente, Figura 1A).

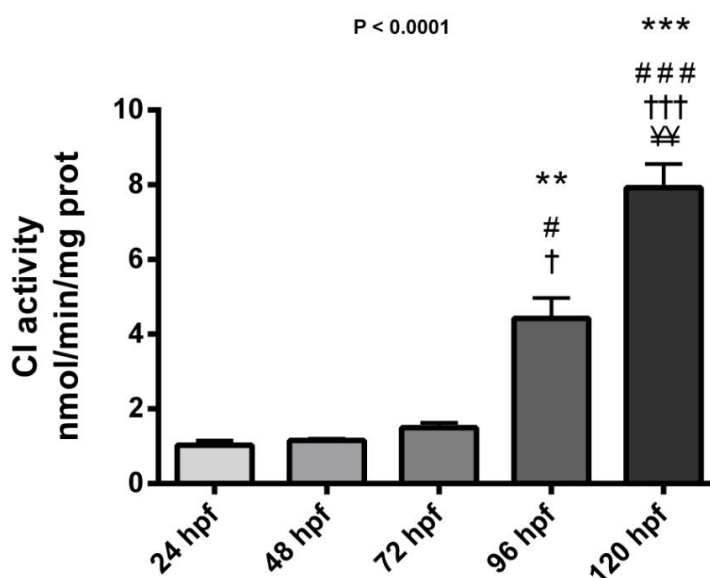


Figura 1. Actividad del complejo I mitocondrial en embriones de pez cebra durante las primeras 120 horas tras la fecundación. Los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 5 - 8$ homogenados de 70 embriones). ** $P < 0.01$ vs. 24 hpf, *** $P < 0.001$ vs. 24 hpf; # $P < 0.05$ vs. 48 hpf, ### $P < 0.001$ vs. 48 hpf; † $P < 0.05$ vs. 72 hpf, ††† $P < 0.001$ vs. 72 hpf; ¥ $P < 0.01$ vs. 96 hpf. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey.

Conocidos los valores basales de actividad del CI, el siguiente paso fue incubar los embriones de pez cebra, a partir de las 24 hpf, con diferentes dosis de MPTP, dosis que van desde 300 μM hasta 800 μM , y analizar la actividad del CI para determinar la dosis de MPTP necesaria para inhibir dicho complejo un 40-50% en los embriones, inhibición que caracteriza al estado parkinsoniano. Transcurridas 24 horas de tratamiento, cuando los embriones tienen 48 hpf, sólo el grupo tratado con 800 μM de MPTP sufre una reducción significativa en de la actividad del CI con respecto al control ($P < 0.01$, Figura 2B). Sin embargo, 24 horas más de tratamiento, es decir, a las 72 hpf, la dosis de 600 μM induce una inhibición del 56% en la actividad del CI comparado con el grupo control ($P < 0.001$, Figura 2B). Con el mismo tiempo de tratamiento, la dosis de 300 μM tuvo un efecto mucho menor sobre la actividad del CI, ocasionando un 35% de inhibición en la actividad de dicho complejo ($P < 0.01$). Por su parte, la dosis de 800 μM ocasionó la muerte al 100% de los embriones a las 72 hpf (figura 3A).

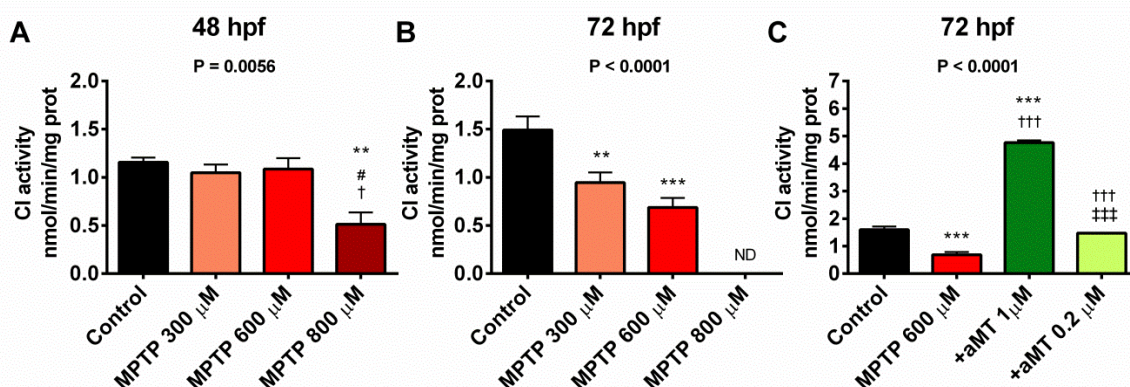


Figura 2. Actividad del complejo I mitocondrial en embriones de pez cebra tratados con diferentes dosis de MPTP y de aMT, y analizados a las 48 y 72 hpf. (A) Actividad del complejo I mitocondrial en embriones de 48 hpf tratados con diferentes dosis de MPTP. La actividad del complejo I mitocondrial sólo se ve disminuida en el grupo tratado con 800 μM MPTP. (B) Actividad del complejo I mitocondrial en embriones de 72 hpf tratados con diferentes dosis de MPTP. Las dosis de 300 μM y 600 μM producen una reducción significativa de la actividad del complejo I. (C) Actividad del complejo I mitocondrial en embriones a las 72 hpf con 600 μM de MPTP y diferentes dosis de aMT. La reducción en la actividad del complejo I mitocondrial producida por el MPTP fue absolutamente prevenida por la melatonina a una dosis de 0.2 μM , y con la dosis de 1 μM fue incluso mejorada con respecto a la actividad del grupo control. Los datos son expresados como la media \pm SEM ($n = 5 - 8$ homegenados de 70 embriones). ** $P < 0.01$ vs. control, *** $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. MPTP 300 μM , † $P < 0.05$ vs. MPTP 600 μM , ††† $P < 0.001$ vs. MPTP 600 μM ; †††† $P < 0.001$ vs. aMT 1 μM . Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey.

Las dosis de 300 μM y 600 μM produjeron un leve aumento de la mortalidad con respecto al grupo control ($P < 0.05$, Figura 3A).

Por tanto, la dosis/tiempo de MPTP que provoca una inhibición de la actividad del complejo I semejante a la registrada en pacientes de PD (Schapira2008), es la de 600 μM mantenido durante 48 horas. Una vez establecida la dosis/tiempo efectiva de MPTP, evaluamos el efecto de diferentes dosis de melatonina sobre la actividad del complejo I. A una dosis de 0.2 μM , la melatonina contrarrestó totalmente el efecto del MPTP sobre la actividad del complejo I ($P < 0.001$), y a una dosis de 1 μM la melatonina aumentó significativamente la actividad del complejo I, un aumento de más de tres veces sobre su valor basal ($P < 0.001$, Figura 2C), alcanzando una actividad similar a la medida en embriones con 5dpf (Figura 1)

El efecto de la melatonina se hizo extensivo a la tasa de mortalidad, con ambas dosis de melatonina los embriones presentaron tasas de mortalidad semejantes a las del grupo control (Figura 3A). La validación del modelo experimental se completó con un análisis fenotípico de las malformaciones más recurrentes. Se cuantificaron malformaciones en la cola, malformaciones en el vitelo y la aparición de oedemas (edemas en la zona pericárdica) (Figura 3C). Los tres tipos de malformaciones aparecieron con más frecuencia en los embriones tratados con MPTP 600 μM que en los controles. El tratamiento con melatonina redujo el porcentaje de aparición de los tres tipos de malformaciones con respecto al grupo tratado con MPTP, mientras que la melatonina por sí sola no produjo ningún tipo de cambio en los aspectos morfológicos (Figura 3B).

En base a estos resultados, establecimos el modelo parkinsoniano tratando a los embriones de pez cebra desde las 24 hpf hasta las 72 hpf con 600 μM de MPTP, en presencia o ausencia de 0.2 μM ó 1 μM de melatonina.

Bajo estas condiciones, la significativa reducción registrada en la actividad del complejo I causada por el tratamiento con MPTP ($P < 0.001$, Figura 2B, C), podría reflejarse en un importante déficit de la bioenergética mitocondrial. Para abordar esta cuestión, medimos *in vivo* el consumo de O_2 en embriones de 72 hpf tratados con MPTP en presencia y ausencia de melatonina. Registramos una profunda caída en la

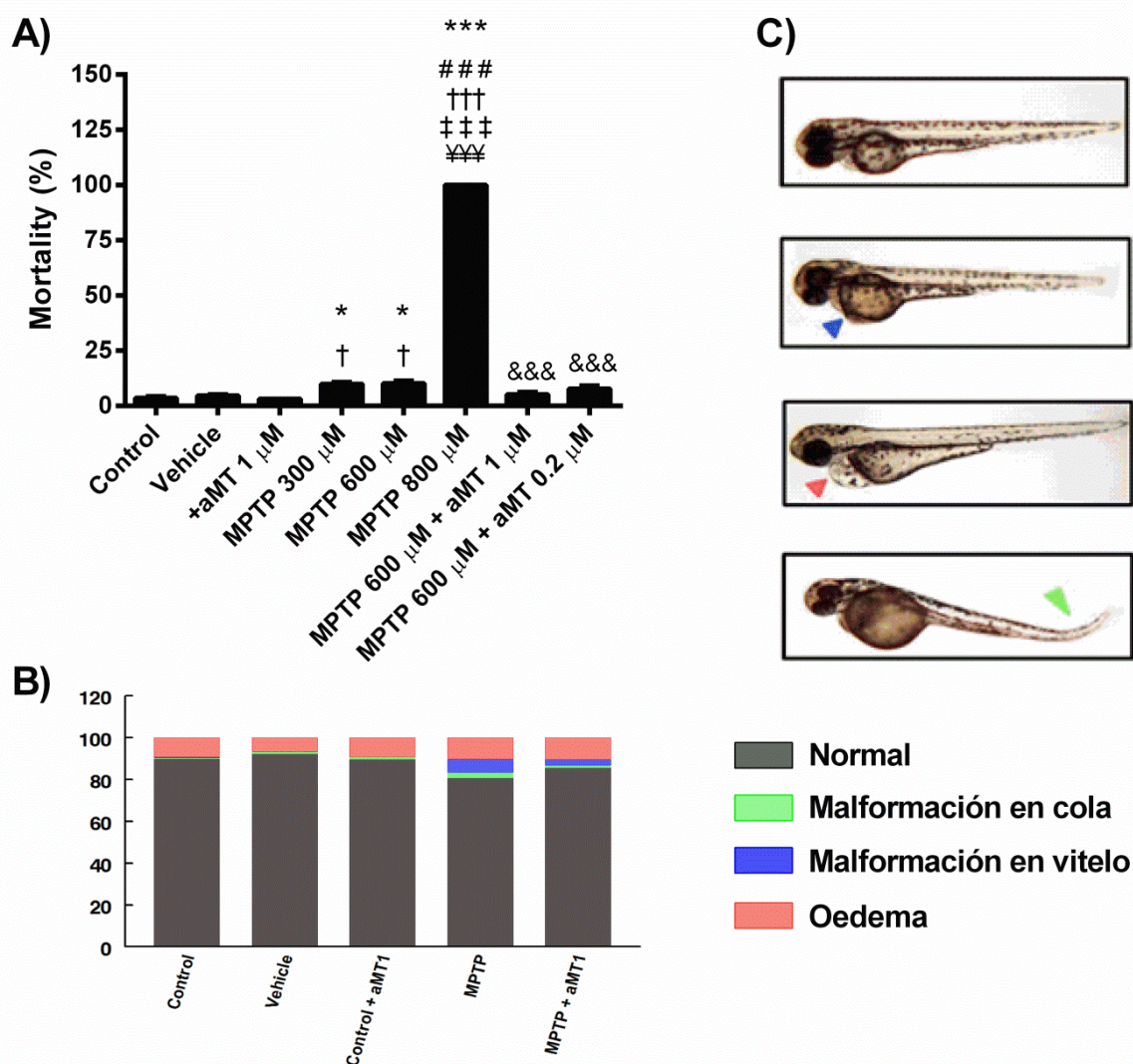


Figura 3. Porcentaje de mortalidad y malformaciones macroscópicas observadas en embriones de pez cebra sometidos a diferentes tratamientos. (A) Porcentaje de mortalidad en embriones de 72 hpf. Los embriones tratados con 300 μ M y 600 μ M de MPTP sufrieron un aumento de la mortalidad del 10%, mientras que el tratamiento con 800 μ M indujo el 100% de la mortalidad. La melatonina previno la mortalidad causada por 600 μ M de MPTP. (B) Porcentaje de malformaciones. El tratamiento con 600 μ M de MPTP indujo la aparición de curvatura en la cola, oedema y alteraciones en el vitelo, estas malformaciones fueron reducidas por la administración de melatonina. (C) Imagen de embriones de 72 hpf mostrando cada una de las malformaciones analizadas. Datos son expresados como la media \pm SEM (n = 500 embriones) * P < 0.05 vs. control, *** P < 0.001 vs. control; ### P < 0.001 vs. vehículo; † P < 0.05 vs. +aMT 1 μ M, ††† P < 0.001 vs. +aMT 1 μ M; ††† P < 0.001 vs. MPTP 300 μ M; †††† P < 0.001 vs. MPTP 600 μ M; ††††† P < 0.001 vs. MPTP 800 μ M. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey.

función respiratoria de los embriones tratados con MPTP, representada por una disminución significativa de la respiración basal y de la capacidad ETS (medida tras la adición de FCCP) en comparación con los embriones controles ($P < 0.001$, Figura 4A, B, F). El MPTP también aumentó de forma significativa el proton leak (medido tras la adición de oligomicina) y por lo tanto, el cociente de acoplamiento L/E (leak/capacidad ETS) ($P < 0.001$, Figura 4C, E). Los valores del cociente L/E están comprendidos entre 0.0 y 1.0, donde 0.0 significa que el transporte de electrones a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial está totalmente acoplado a la fosforilación oxidativa, y 1.0 marca unas mitocondrias totalmente desacopladas. Nuestros resultados mostraron que las mitocondrias en presencia de MPTP están significativamente más desacopladas que las del grupo control ($P < 0.001$, Figura 4D). En conjunto, estos resultados reflejan un significativo daño en la membrana mitocondrial interna, y como cabe esperar, estos cambios conducen a una reducción significativa en la producción de ATP ($P < 0.001$, Figura 4F).

La adición de melatonina al medio en el que se encuentran los embriones, protegió a la mitocondria, de forma dosis dependiente, del fracaso bioenergético inducido por el MPTP. El daño producido por el MPTP sobre la respiración basal, fue parcialmente y de forma significativa recuperado por la administración de aMT a ambas dosis ($P < 0.001$ para la dosis de aMT 1 μM ; $P < 0.01$ para la dosis de aMT 0.02 μM). El mismo efecto tuvo esta indolamina sobre la capacidad ETS, recuperando de forma significativa el efecto deletéreo del MPTP ($P < 0.01$ para la dosis de aMT 1 μM ; $P < 0.05$ para la dosis de 0.2 μM). Además la melatonina también restauró el proton leak y el cociente L/E ($P < 0.001$, Figura 4C y D), como consecuencia se recuperó de forma significativa la producción de ATP ($P < 0.001$, Figura 4E) y, por lo tanto, la integridad de la membrana mitocondrial interna.

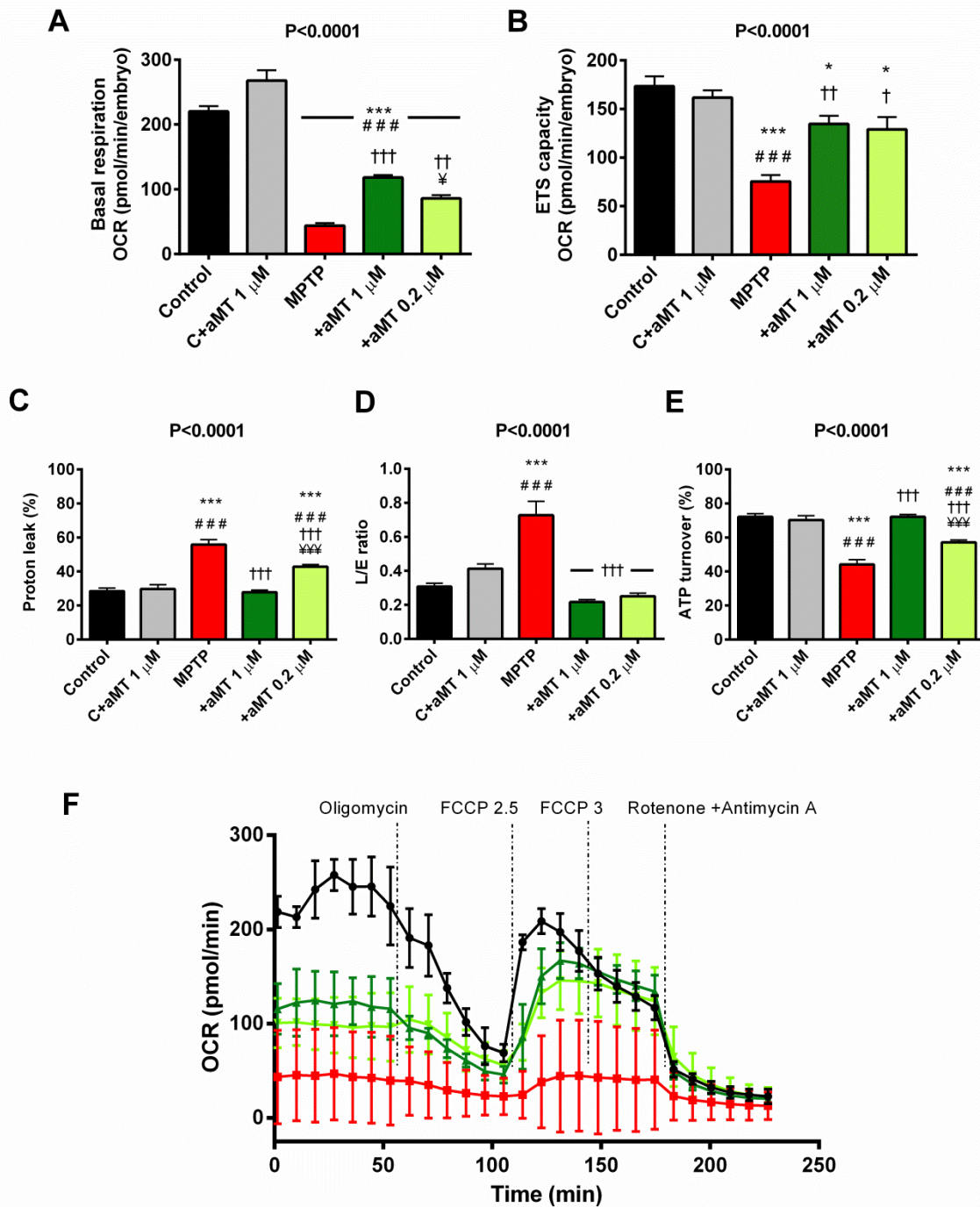


Figura 4. La melatonina previene el fallo bioenergético ocasionado por el MPTP. (A) Respiración basal. (B) Capacidad máxima (Electron transfer system capacity, ETS). (C) Porcentaje de proton leak. (D) Ratio L/E (leak/ETS). (E) Estimación de la producción de ATP. La melatonina recupera la bioenergética mitocondrial y en ninguno de los casos tiene efecto cuando es añadida a los embriones de pez cebra en ausencia de MPTP. (F) Representación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) obtenida del análisis de respiración en embriones de pez cebra *in vivo*. Los datos son expresados como la media \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control; *** $P < 0.001$ vs. control; #### $P < 0.001$ vs. C + aMT; † $P < 0.05$ vs. MPTP; †† $P < 0.01$ vs. MPTP; ††† $P < 0.001$ vs. MPTP; † $P < 0.05$ vs. +aMT 1 μ M; †††† $P < 0.001$ vs. MPTP. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey ($n = 10-15$ embryos).

En conjunto, todos estos resultados demuestran que la melatonina tiene un papel protector frente a la disfunción mitocondrial inducida por la inhibición del complejo I en presencia de MPTP, pero teniendo en cuenta que la melatonina se añadió al medio E3 en el que se encontraban los embriones, quedaba por saber qué cantidad de la melatonina administrada al medio penetraba en los embriones y por tanto era la responsable del potente efecto protector observado. Para ello, analizamos el contenido de melatonina y de sus principales metabolitos, AMFK y AMK, tanto en los embriones de pez cebra, como en el medio E3 en el que se encontraban dichos embriones.

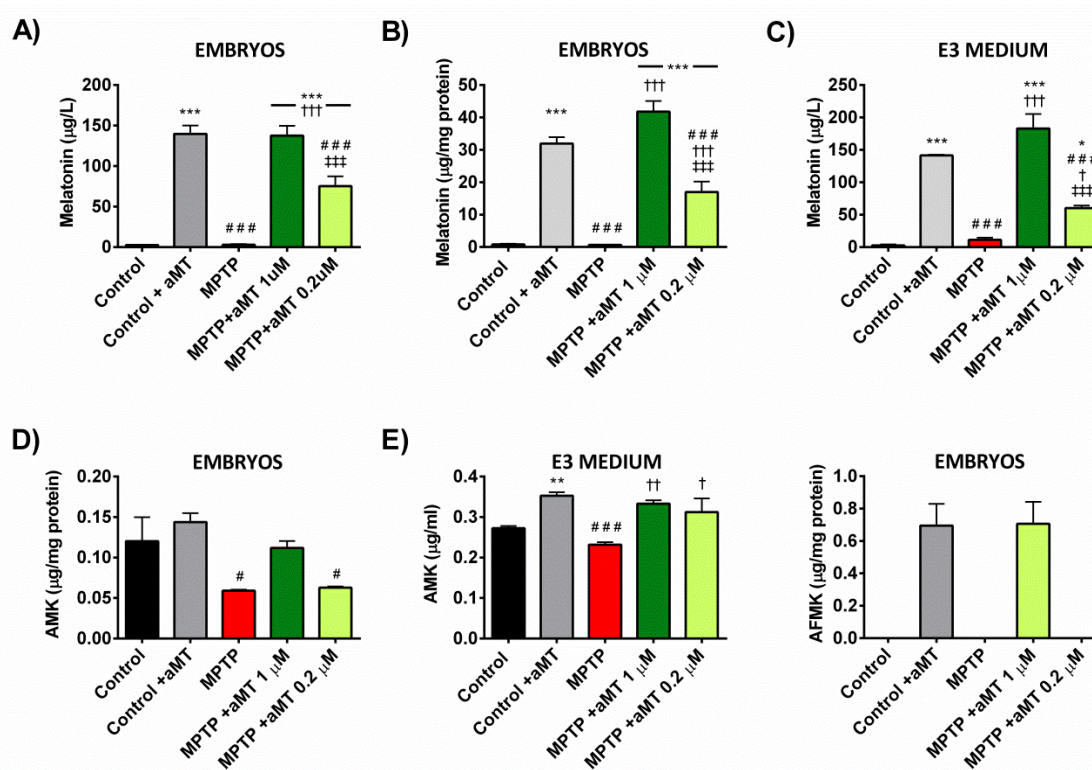


Figura 5. Concentraciones de melatonina, AMK y AFMK en embriones de pez cebra y en el medio que los contiene. (A) Concentración de melatonina en embriones de 72 hpf. (B) Concentración de melatonina en embriones de 72 hpf normalizada por proteína. (C) Concentración de melatonina en el medio E3 que contiene a los embriones. (D) Concentración de AMK en embriones de 72 hpf. (E) Concentración de AMK en el medio E3. (F) Concentración de AFMK en embriones de 72 hpf. Los datos son expresados como la media \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control; ** $P < 0.01$ vs. Control; *** $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. C + aMT; ### $P < 0.001$ vs. C + aMT; † $P < 0.05$ vs. MPTP; †† $P < 0.01$ vs. MPTP; ††† $P < 0.001$ vs. MPTP; ††† $P < 0.001$ vs. +aMT 1 μ M. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey ($n = 5$).

La concentración de melatonina en el grupo control fue de 40 veces menor que en el grupo control con melatonina ($P < 0.0001$, Figura 5A y B). En los embriones tratados con MPTP, la concentración de melatonina no se diferenció significativamente de la encontrada en el grupo control, pero fue 60 veces menor que la concentración en el grupo tratado con $1 \mu\text{M}$ de aMT ($P < 0.0001$, Figura 5B) y 25 veces menor que en el grupo tratado con $0.2 \mu\text{M}$ de aMT ($P < 0.001$, Figura 5B). Los análisis en el medio E3 donde se administró la melatonina, mostraron aproximadamente un 40% de la melatonina administrada entró en los embriones (Figura 5C). En cuanto a los metabolitos de la melatonina, AMK se detectó a concentraciones muy bajas, tanto en los embriones como en el medio E3, mostrando una disminución significativa en el grupo tratado con MPTP ($P < 0.05$ para AMK en los embriones, $P < 0.0001$ para AMK en el medio E3, Figura 5D y E), mientras que AFMK sólo se detectó en embriones tratados con $1 \mu\text{M}$ de aMT (Figura 5F).

2. LA MELATONINA PROTEGE A LOS EMBRIONES DEL DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR EL MPTP.

Típicamente, la inhibición de la actividad del complejo I conduce, como hemos mostrado previamente, a un aumento de la fuga de electrones y por tanto un aumento de la formación de ROS, lo cual daña a la mitocondria y reduce su capacidad para producir ATP (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Balaban *et al.*, 2005; Spillantini *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 2014). Por este motivo analizamos el estado oxidativo y la respuesta antioxidante en los embriones de pez cebra en estas condiciones. Observamos que el cociente GSSG/GSH, comúnmente utilizado como indicativo del estado redox intracelular (Martin *et al.*, 2000a; Spillantini *et al.*, 1997), aumentó significativamente en embriones incubados con MPTP ($P < 0.001$, Figura 6C). Este resultado apoya un cambio hacia un estado hiperoxidativo en el embrión, caracterizado por un aumento significativo en los niveles de GSSG con respecto al grupo control ($P < 0.001$, Figura 6B), que no fueron adecuadamente convertidos en GSH, el cual disminuye de forma significativa con respecto al grupo control ($P < 0.001$, Figura 6A).

El ciclo redox del GSH depende de la actividad de dos enzimas, la GPx y la GRd, las cuales actúan en tándem. La actividad peroxidasa de la GPx implica la oxidación de

dos moléculas de GSH en una molécula de GSSG, la cual debería ser reducida por la GRd en una reacción dependiente de NADPH. Los embriones tratados con MPTP experimentaron una disminución significativa de la actividad de la GPx en relación al grupo control ($P < 0.0001$, Figura 6D) y una bajada más brusca en la actividad de la GRd con respecto al grupo control ($P < 0.001$, Figura 6E). Estos cambios en las actividades de estas dos enzimas, son los responsables de la acumulación de GSSG durante el tratamiento con MPTP (Figura 6B).

La causa primaria en la disrupción del ciclo del glutation causado por el MPTP, probablemente derive del fallo en la primera línea de defensa antioxidante, la cual depende de la SOD. Por este motivo analizamos la actividad de la SOD y observamos una reducción significativa en la actividad de esta enzima en embriones incubados con MPTP en comparación con el grupo control ($P < 0.001$, Figura 6F), lo que condiciona un estado oxidativo capaz de dañar las enzimas de las siguiente línea de defensa, GPx y, más importante, GRd (Martin *et al.*, 2000a; Spillantini *et al.*, 1997).

Los niveles ARN mensajero, tanto de *sod* como de la *gpx* también disminuyeron de forma significativa en relación al grupo control ($P < 0.001$, $P < 0.01$ respectivamente, Figura 6G e I), reforzando la explicación de la reducida capacidad del embrión para hacer frente a la formación de ROS inducida por el MPTP. Sin embargo, los niveles de ARN mensajero de *grd* aumentaron de forma significativa en estas condiciones comparado con el grupo control ($P < 0.001$, Figura 6H), sugiriendo un mecanismo de regulación diferente, compatible con un mecanismo compensatorio al brusco descenso de la actividad de la enzima, muy sensible al daño por ROS (Martin *et al.*, 2000a; Spillantini *et al.*, 1997).

La presencia de melatonina en el medio de incubación de los embriones, contrarresta, el estado pro-oxidativo causado por el MPTP, normalizando el ratio GSSG/GSH, a ambas dosis de aMT ($P < 0.001$, Figura 6C), recuperando así el equilibrio redox intracelular. Esto es debido a que la melatonina, de forma dosis dependiente, disminuye los niveles de GSSG con respecto al grupo tratado con MPTP ($P < 0.001$, Figura 6B) y aumenta los niveles de GSH de forma significativa con la dosis de $1 \mu\text{M}$ comparado con el grupo MPTP ($P < 0.01$, Figura 6A). Estos efectos de la melatonina

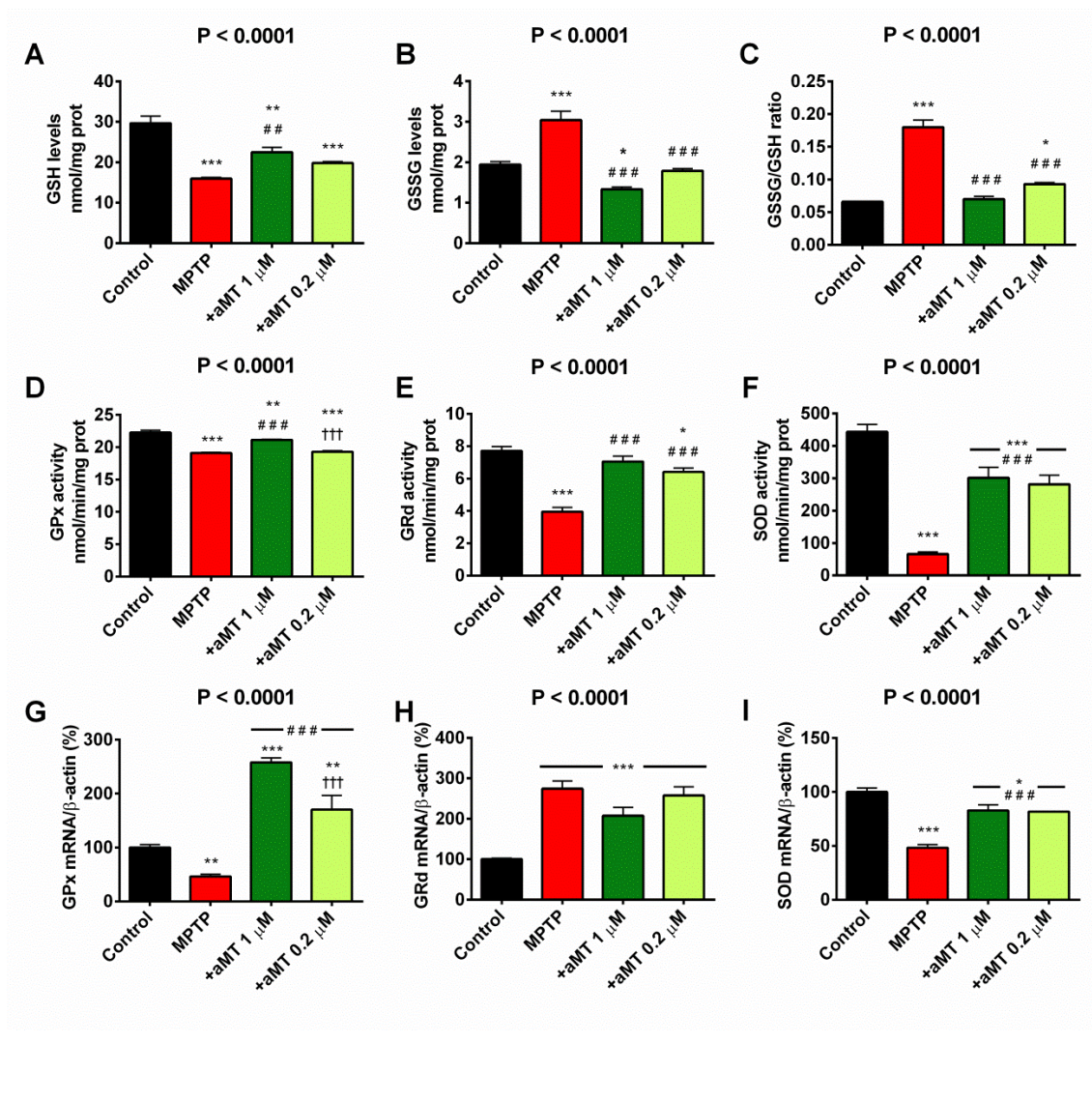


Figura 6. La melatonina previene el estado hiperoxidativo que sigue al daño mitocondrial inducido por el tratamiento con MPTP. Los embriones fueron tratados con MPTP y aMT y analizados a las 72 hpf. (A) Niveles de GSH mostrando una disminución de los niveles con el MPTP y una recuperación con el tratamiento de melatonina. (B) Niveles de GSSG aumentados por el tratamiento con MPTP y recuperados con la adición de aMT. (C) Cambios en el ciclo del glutatión con los tratamientos, mostrando que el MPTP aumenta significativamente el ratio GSSG/GSH. (D) Actividad de la glutatión peroxidasa. (E) Actividad de la glutatión reductasa. El MPTP reduce la actividad de GPx y GRd requeridas para mantener el ciclo del glutatión. (F) Actividad de la superóxido dismutasa, la cual es dramáticamente reducida por el MPTP. (G) Niveles de ARNm de la enzima GPx. (H) Niveles de ARNm de la enzima GRd. (I) Niveles de ARNm de la enzima SOD. El MPTP reduce los niveles de ARNm de GPx y SOD, mientras que provoca un aumento del ARNm de la GRd. En todos los casos la melatonina administrada recupera los valores normales. Los datos son expresados como la media \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control; ** $P < 0.01$ vs. Control; *** $P < 0.001$ vs. control; ### $P < 0.01$ vs. MPTP; #### $P < 0.001$ vs. MPTP; ††† $P < 0.001$ vs. +aMT 1 μ M. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey ($n = 5$).

pueden explicarse por su capacidad para modificar la expresión y actividad del sistema antioxidante. El tratamiento con melatonina a ambas dosis, mejoró de forma significativa la actividad de las enzimas GRd y SOD con respecto al grupo MPTP ($P < 0.001$, Figura 6D – F), y sólo el tratamiento aMT 1 μM tuvo un efecto significativamente positivo sobre la actividad de la GPx en comparación con el grupo de MPTP ($P < 0.001$).

Estos efectos derivan de los cambios que produce esta indolamina en los niveles de ARN mensajero de los genes que codifican para estas tres enzimas antioxidante (Figura 6G – I). Observamos un aumento significativo de los niveles de ARN mensajero para la GPx y SOD con respecto al grupo tratado con MPTP ($P < 0.001$, Figura 6G e I), y un aumento significativo de la expresión del gen para la GRd con respecto al grupo control ($P < 0.001$, Figura 6 H). Todos estos cambios producidos por la melatonina, se traducen en la normalización del ciclo del glutation, requerido para mantener el estado redox bajo control (Figura 6C).

3. LA MELATONINA PROTEGE A LOS EMBRIONES DE LA INFLAMACIÓN Y DE LA NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA INDUCIDA POR EL MPTP.

Una de las principales consecuencias del daño mitocondrial y del consecuente daño oxidativo en la enfermedad de Parkinson, es la reacción inflamatoria de la respuesta de la inmunidad innata que participa en la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Barcia *et al.*, 2003; Blesa *et al.*, 2015; Perry2012). Por esta razón, analizamos los niveles de ARN mensajero y contenido proteico de la iNOS, enzima proinflamatoria que prácticamente no se expresa de forma constitutiva, pero que sin embargo es fuertemente inducida durante la respuesta inflamatoria, reflejando así el grado de activación de la inmunidad innata (Forstermann *et al.*, 1998). Los niveles de ARN mensajero de la *inos* y el contenido de proteína se elevaron de forma significativa en los embriones incubados con 600 μM de MPTP con respecto al grupo control ($P < 0.001$, Figura 7A y B), apoyando la teoría de que esta neurotoxina induce una respuesta neuroinflamatoria. Mediante inmunohistoquímica mostramos que el mayor

incremento de iNOS se produjo en las áreas del bulbo olfatorio y del diencefalo de los embriones tratados con MPTP (Figura 7C, a-f).

En línea con los experimentos previos, la administración de melatonina contrarrestó el efecto del MPTP y produjo una disminución significativa de los niveles de RNA mensajero de *inos* y del contenido de esta enzima, tanto en los embriones incubados con 1 μ M de melatonina como en los incubados con 0.2 μ M de melatonina comparados con el grupo tratado con MPTP ($P < 0.001$, Figura 7A y B).

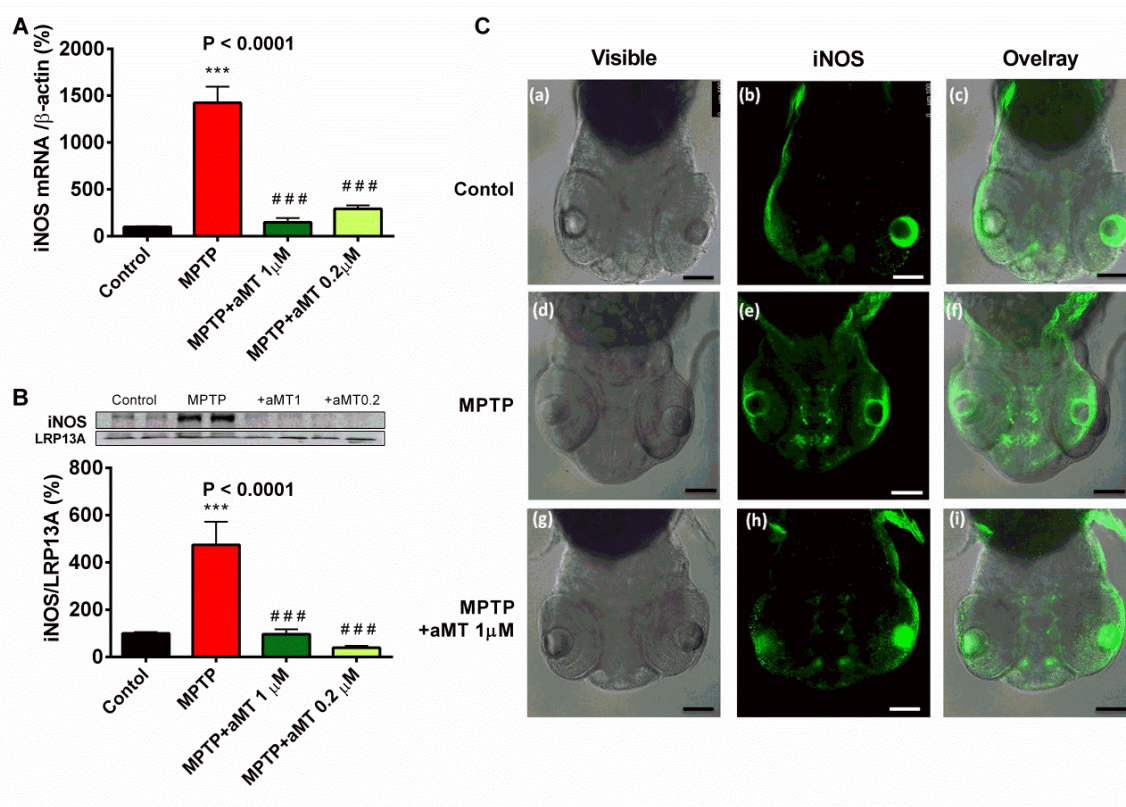


Figura 7. La melatonina previene la neuroinflamación inducida por el tratamiento con MPTP. Los embriones fueron tratados con MPTP y aMT y analizados a las 72 hpf. (A) El MPTP incrementa significativamente los niveles de ARNm de *iNOS*. La administración de aMT de forma significativa y dosis dependiente recupera la expresión de *iNOS*. (B) El MPTP provocó un aumento significativo en el contenido proteico de *iNOS* y la melatonina restableció los niveles proteicos de *iNOS* a valores que no difieren significativamente de los controles. (C) Inmunohistoquímica en embriones de 72 hpf usando anticuerpo anti-*iNOS*. Comparado con el control (a-b), el MPTP incrementó *iNOS* en las áreas del bulbo olfatorio y del diencefalo de los embriones (d-e), lo cual fue prevenido por el tratamiento con melatonina (g-h). Los datos son expresados como la media \pm SEM. *** $P < 0.001$ vs. control; ### $P < 0.001$ vs. MPTP. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey ($n = 5-7$ homogenate). Barras de escala: 100 μ m ($n = 3$ animales/grupo para análisis inmunohistoquímico).

El MPTP provoca la muerte de neuronas dopaminérgicas principalmente a través de dos mecanismos, el estrés oxidativo causado por la disfunción mitocondrial y la autoxidación de la dopamina, y la subsecuente inflamación. Para evaluar esta alteración, determinamos la expresión y el contenido de la enzima tiroxina hidroxilasa (TH) como marcador de neuronas dopaminérgicas. En nuestro modelo observamos que, en los embriones de pez cebra el MPTP causó una profunda disminución en los niveles de ARN mensajero de *TH* comparado con el grupo control ($P < 0.001$, Figura 8A). Esta disminución en la expresión se vio reflejada en una disminución significativa en el contenido proteico de TH en relación al grupo control ($P < 0.001$, Figura 8B), con la consecuente pérdida de neuronas dopaminérgicas y de sus axones. Estos datos reflejan el daño del sistema dopaminérgico en los embriones de 72 hpf en presencia de MPTP.

Los efectos de la melatonina para regular la inmunidad innata y mejorar la producción de dopamina están bien documentados en la bibliografía (Crespo *et al.*, 1999; Escames *et al.*, 2006a; Khaldy *et al.*, 2003; Tapias *et al.*, 2009). Aquí nosotros mostramos que la incubación de los embriones con melatonina los hizo más resistentes a los efectos deletéreos del MPTP, previniendo la neuroinflamación y también la neurodegeneración, normalizando la expresión de *TH* con la dosis 0.2 μM de melatonina e incluso induciendo la expresión de *TH* significativamente por encima del valor del grupo control con la dosis de 1 μM de melatonina ($P < 0.001$, Figura 8A). Este efecto de la melatonina sobre la expresión de *TH*, se reflejó en el contenido de THasa. Observamos que el grupo tratado con 1 μM de melatonina, aumentó significativamente el contenido en TH con respecto al grupo tratado con MPTP ($P < 0.001$), alcanzando niveles que no difieren significativamente del grupo control (Figura 8B).

Mediante inmunofluorescencia, estudiamos los efectos de melatonina sobre los diferentes grupos de neuronas dopaminérgicas en el embrión de 72 hpf. Esto fue posible, puesto que todos los grupos de neuronas dopaminérgicas presentes en el pez adulto pueden ser ya detectadas en los embriones con 72 hpf (Holzschuh *et al.*, 2001; Sallinen *et al.*, 2009). El MPTP ejerció un efecto deletéreo sobre todos los grupos de neuronas TH positivas, de forma que los embriones mostraron una importante

reducción en la cantidad de neuronas TH positivas en comparación con el grupo control. Las poblaciones de neuronas dopaminérgicas más afectadas por el MPTP fueron las poblaciones localizadas en el bulbo olfatorio, pretecal y diencéfalo, de forma que la representación del sistema dopaminérgico quedó reducida a un pequeño grupo de neuronas localizadas en el locus coeruleus (Figura 8C, a - f). La administración de melatonina a 1 μ M en embriones tratados con MPTP, provocó un claro aumento en la densidad de las poblaciones de neuronas dopaminérgicas, principalmente las localizadas en el diencéfalo y en el bulbo olfatorio (Figura 8, g - i), previniendo por tanto el efecto deletéreo de esta neurotoxina sobre el sistema dopaminérgico de los embriones de pez cebra.

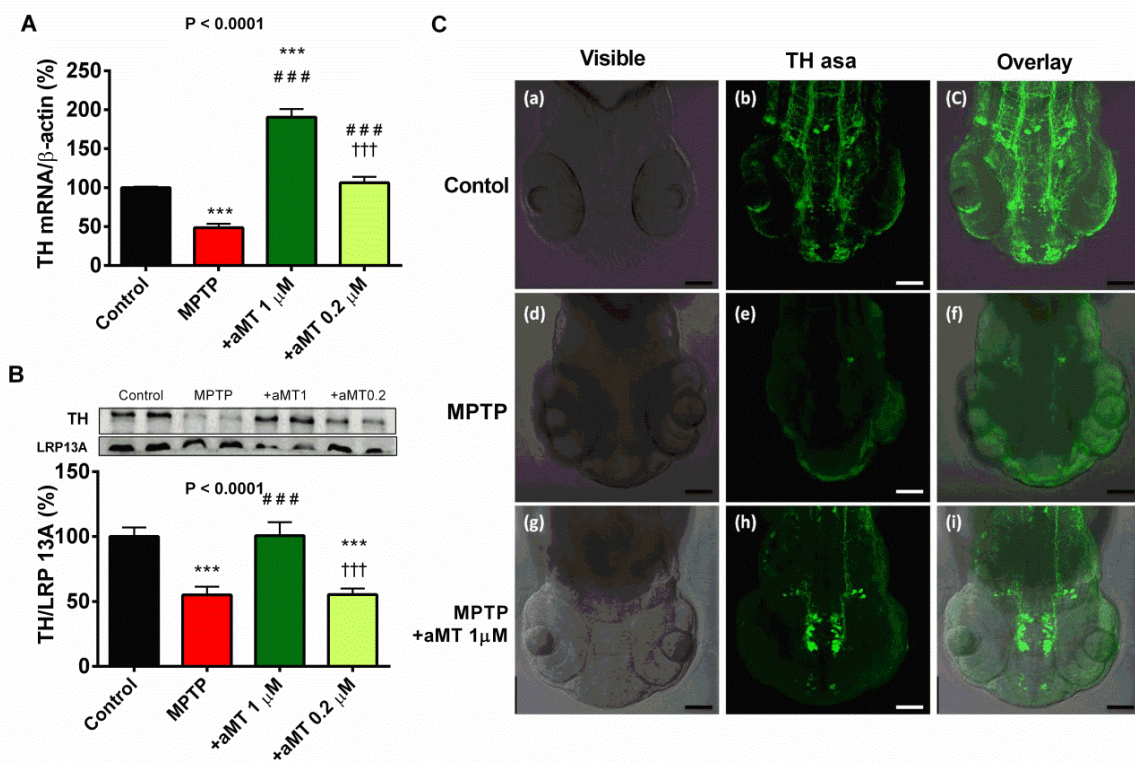


Figura 8. La melatonina previene la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por el tratamiento con MPTP. Los embriones fueron tratados con MPTP y aMT y analizados a las 72 hpf. (A) El MPTP disminuyó significativamente los niveles de ARNm de *TH*. La administración de aMT, de forma significativa y dosis dependiente, recuperó la expresión de *TH* incluso a niveles superiores del grupo control. (B) El MPTP provocó un descenso significativo en el contenido proteico de TH. La melatonina 1 μ M restableció los niveles proteicos de TH a valores que no difieren significativamente de los controles. (C) Inmunohistoquímica en embriones de 72 hpf usando anticuerpo anti-iNOS. Comparado con el control (a-b), MPTP incrementó el contenido de iNOS en las áreas del bulbo olfatorio y del diencéfalo de los embriones (d-e), lo cual fue prevenido por el tratamiento con melatonina (g-h). Los datos son expresados como la media \pm SEM. *** $P < 0.001$ vs. control; ### $P < 0.001$ vs. MPTP. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey ($n = 5-7$ homogenate). Barras de escala: 100 μ m ($n = 3$ animales/grupo para análisis inmunohistoquímico).

Existe una clara coincidencia entre las áreas del cerebro donde se produce una fuerte inducción de la iNOS como consecuencia del tratamiento con MPTP, áreas que corresponden al diencéfalo y el bulbo olfatorio, y las áreas donde se produce la mayor muerte neuronal dopaminérgica. Es en éstas áreas donde la melatonina ejerce un fuerte efecto neuroprotector, que en parte podría ser debido a su capacidad para inhibir la expresión de iNOS previniendo el proceso inflamatorio.

4. LA MELATONINA PREVIENE LOS EFECTOS DEL MPTP SOBRE LA EXPRESIÓN DE γ -SINUCLÉINA Y SOBRE LOS GENES RELACIONADOS CON LA HOMEOSTASIS MITOCONDRIAL.

La enfermedad de Parkinson se caracteriza, además de por la muerte de neuronas dopaminérgicas, por la acumulación y agregación de α -sinucleína, que es el principal componente de los cuerpos de Lewy. Los peces zebra no contienen α -sinucleína, en su lugar presentan las isoformas β -, γ 1- y γ 2-sinucleína, codificadas por los genes *sncb*, *sncg1* y *sncg2*, respectivamente, muy conservadas filogenéticamente con respecto a sus parálogos humanos (Milanese *et al.*, 2012). Desde los primeros estadios del desarrollo embrionario se detectan niveles de ARN mensajero de *sncg1* en el cerebro de los peces cebra (Chen *et al.*, 2009), y alteraciones en la expresión de este gen, y por tanto en el contenido en γ 1-sinucleína, están relacionadas con anomalías fenotípicas. Por este motivo, evaluamos el contenido en γ 1-sinucleína en nuestro modelo experimental, mostrando que hay una expresión basal del gen *sncg1* en el grupo control, que sin embargo no se ve reflejada en niveles detectables de proteína (Figura 9A y B).

La incubación con MPTP causó un aumento significativo en los niveles de ARN mensajero de *sncg1* en relación al grupo control ($P < 0.001$, Figura 9A), que se corresponde con unos elevados niveles de γ 1-sinucleína en este grupo experimental en relación al resto de los grupos experimentales donde esta proteína no fue detectada (Figura 9B). La administración de melatonina causó una reducción dosis dependiente en los niveles de expresión del ARN mensajero de *sncg1*, que fue significativa con respecto al grupo tratado con MPTP ($P < 0.001$, Figura 9A). Estos cambios en la expresión, condujeron a unos niveles indetectables de γ 1-sinucleína en los grupos

tratados con melatonina, alcanzando valores semejantes a lo registrado en el grupo control (Figura 9B). Por lo que la melatonina se comporta como un protector celular evitando la sobreexpresión de la γ 1-sinucleína en el cerebro de los peces.

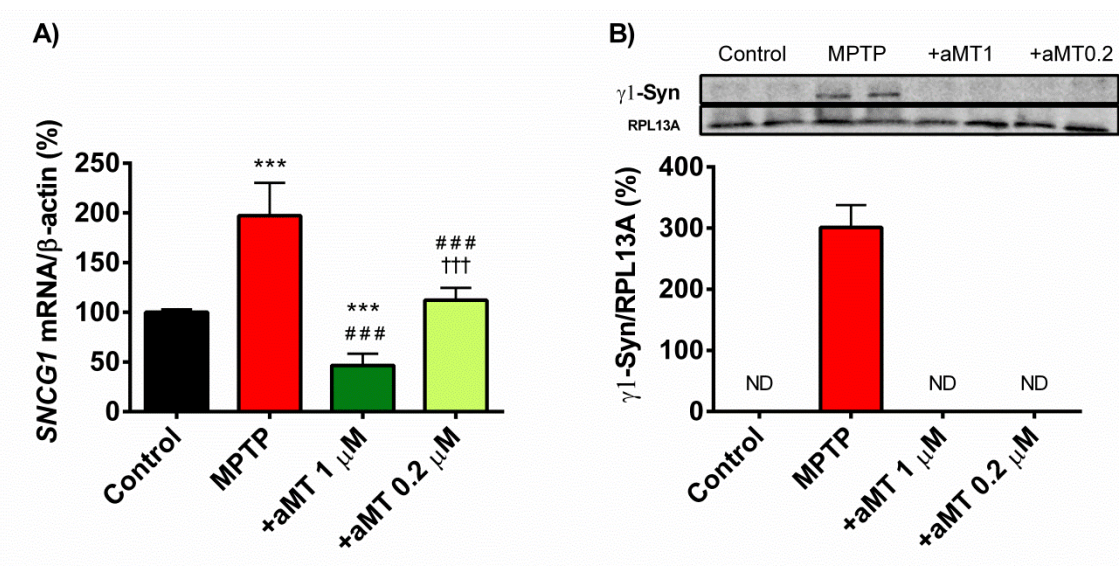


Figura 9. La melatonina previene la sobreexpresión de γ 1-sinucleína inducida por el tratamiento con MPTP. Los embriones fueron tratados con MPTP y aMT y analizados a las 72 hpf. (A) El MPTP aumentó significativamente los niveles de ARNm de γ 1-sinucleína. La administración de aMT, de forma significativa y dosis dependiente, recuperó la expresión de γ 1-sinucleína incluso a niveles inferiores del grupo control. (B) El MPTP provocó un aumento significativo en el contenido proteico de γ 1-sinucleína. La melatonina restableció los niveles proteicos de γ 1-sinucleína a valores indetectables igual que los controles. Los datos son expresados como la media \pm SEM. *** $P < 0.001$ vs. control; ### $P < 0.001$ vs. MPTP; ††† $P < 0.001$ vs. +aMT 1 μ M. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey ($n = 5-7$ homogenados).

Debido a que, muchos de los genes implicados en la enfermedad de Parkinson hereditaria tienen funciones específicas sobre la actividad mitocondrial, y debido a que, como hemos demostrado, el tratamiento con MPTP afecta directamente a esta organela ocasionando un fallo mitocondrial acusado en los embriones de pez cebra, hemos analizado el estado de estos genes relacionados con la homeostasis mitocondrial en nuestro modelo experimental a las 72 hpf.

Primero analizamos la conexión PINK1/parkina, y nuestros resultados muestran que tras el tratamiento con MPTP los niveles de parkina fueron indetectables por western blot, mientras que los niveles de PINK1 sufrieron una disminución significativa

en el grupo tratado con MPTP con respecto al grupo control ($P < 0.01$, figura 10A y B). Estos datos se correlacionan con una reducción significativa en los niveles de ARN mensajero de *parkin* ($P < 0.01$, figura 10A). *DJ-1*, otro de los genes implicados en la homeostasis mitocondrial junto con *PINK1/parkina*, también sufrió una reducción significativa en los niveles de ARN mensajero en presencia de MPTP comparado con el grupo control ($P < 0.001$, Figura 10C), lo que condujo a unos niveles indetectables de la proteína DJ-1 por western blot (Figura 10C).

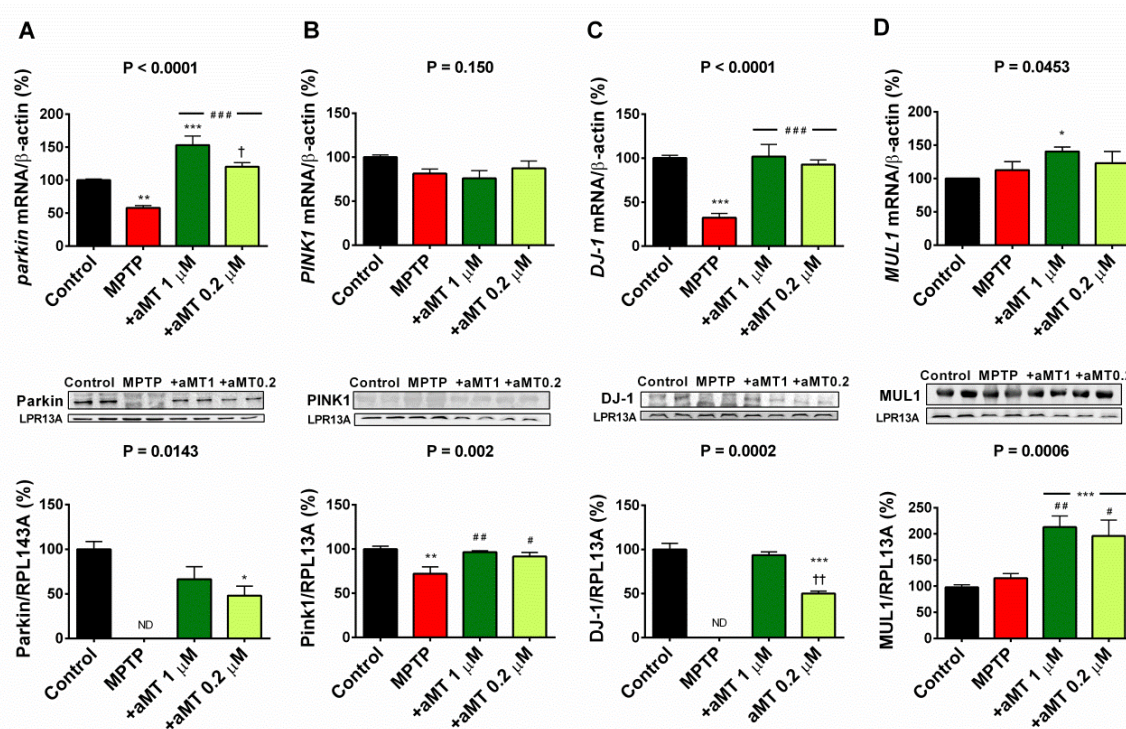


Figura 10. La melatonina previene la alteración producida por el MPTP sobre las proteínas Parkin/PINK1/DJ-1/MUL1. Los embriones fueron tratados con MPTP y aMT y analizados a las 72 hpf. (A) La melatonina previene la inhibición de la expresión del gen de la *parkina* y del contenido proteico de Parkina inducido por el MPTP. (B) La expresión del gen *PINK1* no fue modificada por los tratamientos, sin embargo, el contenido proteico de PINK1 disminuyó por la administración de MPTP y fue mantenido a niveles normales cuando se incubó a los embriones con aMT. (C) El MPTP redujo significativamente la expresión del ARN mensajero de *DJ-1* y el contenido proteico de DJ-1, efecto que fue eliminado con la administración de melatonina. (D) La expresión de ARN mensajero de MUL1 y el contenido en proteína MUL1 no fueron modificados por el MPTP, aunque la melatonina incrementó los dos. Los datos son expresados como la media \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Control; ** $P < 0.01$ vs. Control; *** $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. MPTP; ## $P < 0.01$ vs. MPTP; ### $P < 0.001$ vs. MPTP; † $P < 0.05$ vs. +aMT 1 μ M; †† $P < 0.01$ vs. +aMT 1 μ M. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey ($n = 5-7$ homogenate).

Un cuarto participante en la vía de PINK1/parkina/DJ-1 es la proteína MUL1 (Li *et al.*, 2008). Un aumento compensador de los niveles de MUL1 contrarresta el efecto deletéreo de muchos de los fenotipos mutantes para *PINK1/parkina*, de forma que la ausencia de MUL1 empeora los eventos fisiopatológicos en animales mutantes en *PINK1/parkina* (Yun *et al.*, 2014). Puesto que en nuestros embriones tratados con MPTP registramos una ausencia de parkina y una disminución en el contenido de PINK1, realizamos un análisis de la expresión y contenido proteico de MUL1. Observamos que, los niveles de ARN mensajero para *MUL1* y el contenido en proteína MUL1, no se modificaron en el grupo tratado con MPTP con respecto al grupo control, por lo que es imposible contrarrestar las alteraciones producidas en PINK1/Parkina/DJ-1 (Figura 10D). Como consecuencia de todas estas alteraciones producidas por el tratamiento con MPTP, los embriones parkinsonianos son incapaces de eliminar las mitocondrias alteradas lo cual permite que sigan formándose más ROS, aumentando el estado oxidativo y el fallo bioenergético.

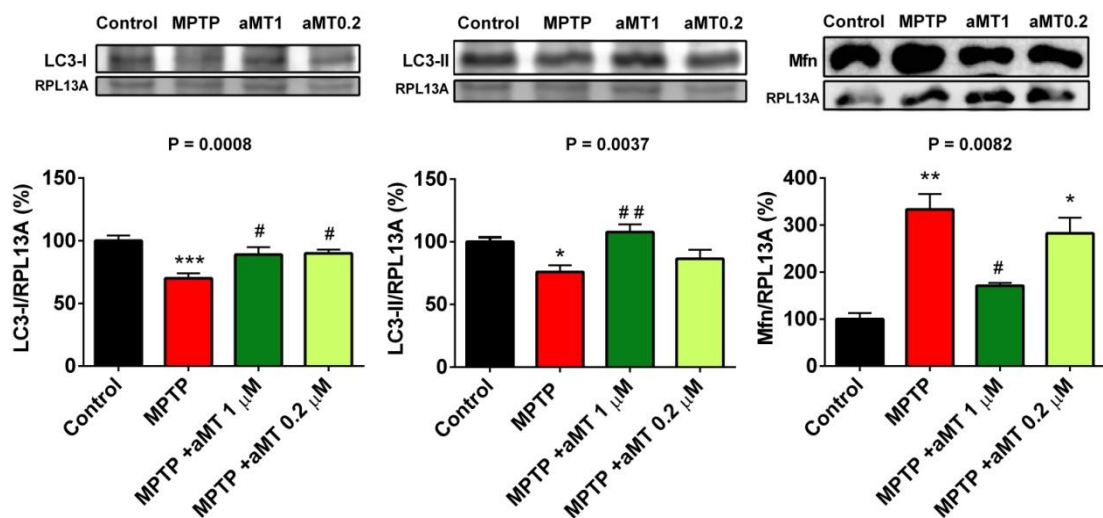


Figura 11. La melatonina previene la alteración producida por el MPTP sobre la autofagia y la ubiquitinización de Mfn. Los embriones fueron tratados con MPTP y aMT y analizados a las 72 hpf. (A) La melatonina previene la disminución en LC3I inducida por el MPTP. (B) El contenido en LC3II fue disminuido por el tratamiento con MPTP y contrarrestado por la incubación de los embriones con melatonina 1 μ M. (C) El MPTP incrementó significativamente el contenido en Mfn, efecto que fue eliminado con la administración de melatonina. Los datos son expresados como la media \pm SEM. * P < 0.05 vs. Control; ** P < 0.01 vs. Control; *** P < 0.001 vs. control; # P < 0.05 vs. MPTP; ## P < 0.01 vs. MPTP. Prueba

Debido al poder protector que ha mostrado tener la melatonina frente al efecto deletéreo del MPTP en experimentos previamente mostrados, nos planteamos a continuación si la melatonina tiene algún efecto protector sobre las alteraciones producidas por el MPTP en los genes relacionados con la homeostasis mitocondrial aquí analizados. Observamos que, aunque en algunos casos la melatonina tuvo un efecto dosis dependiente, parece claro que incluso con la dosis más baja, 200 nM, esta indolamina fue capaz de contrarrestar las alteraciones producidas por el MPTP en la expresión de los genes *parkina* y *DJ-1*, lo que se tradujo en la normalización de los niveles de las proteínas parkina/DJ-1/PINK1 (Figura 10A – C). El tratamiento con melatonina 1 μ M también produjo un incremento significativo de los niveles de ARN mensajero de MUL1 ($P < 0.05$, Figura 10D). Este efecto sobre la expresión, se tradujo en un aumento dosis dependiente del contenido en proteína MUL1 ($P < 0.01$ para el tratamiento 1 μ M de aMT; $P < 0.05$ para el tratamiento 0.2 μ M de aMT, Figura 10D). Estos resultados sugieren que la melatonina tiene un importante papel neuroprotector, evitando el efecto deletéreo del MPTP sobre las proteínas PINK1/Parkina/DJ-1/MUL1 todas ellas requeridas para mantener la función correcta función mitocondrial, y por lo tanto, reducir el estrés oxidativo y mantener la función bioenergética de la mitocondria.

En esta situación, con toda la vía PINK1/Parkina/DJ-1/MUL1 comprometida, las funciones de estas proteínas sobre la mitocondria pueden encontrarse igualmente comprometidas. Aunque por los resultados mostrados previamente observamos que existe PINK1 para detectar el daño mitocondrial y fosforilar a parkina, la ausencia de parkina impediría la activación de la mitofagia mediada por ella, así como la ubiquitinización de Mfn, actividad que comparte con MUL1. Por ello analizamos el contenido en LC3I, LC3II y Mfn. Observamos que el tratamiento con MPTP produce una disminución significativa en el contenido de LC3-I y LC3-II ($P < 0.001$, $P < 0.05$ respectivamente, Figura 11A y B), así como un aumento significativo del contenido de Mfn ($P < 0.01$, Figura 11C). El tratamiento con melatonina contrarresta el efecto causado por el MPTP, restableciendo de forma significativa los niveles de LC3-I con ambas dosis ($P < 0.05$) y LC3-II con la dosis de 1 μ M de melatonina ($P < 0.01$, Figura 11 A y B). Por último, esta indolamina también produjo, con ambas dosis, una reducción

significativa de los niveles de Mfn con respecto al grupo tratado con MPTP ($P < 0.05$, Figura 11C).

5. LA MELATONINA RECUPERA EL DAÑO PRODUCIDO POR EL MPTP EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA DE 5 DPF.

Una vez demostrado que la melatonina, gracias a sus propiedades neuroprotectoras aquí analizadas, puede prevenir los efectos deletéreos del MPTP en los embriones de pez cebra, el siguiente paso fue analizar si esta indolamina era capaz de recuperar a los embriones de pez cebra una vez que había sido establecido el fenotipo parkinsoniano. Para abordar este objetivo usamos un diseño experimental adicional. En este caso, el tratamiento con MPTP se realizó desde las 24 hpf hasta las 72 hpf, a partir de este momento y hasta las 120 hpf los embriones se mantuvieron sin MPTP. Esta discontinuidad en el tratamiento con MPTP se debe a que a las 72 hpf el estado parkinsoniano está ya establecido como ha quedado demostrado por los experimentos anteriores. Un segundo grupo de embriones fue incubado tras el tratamiento con MPTP con 1 μM de melatonina desde las 72 hpf hasta las 120 hpf, es decir, la melatonina se administró durante dos días una vez establecido el estado parkinsoniano, este tratamiento fue llamado “tratamiento curativo”. Un tercer grupo de embriones fueron incubados con melatonina 1 μM desde las 24 hpf hasta las 120 hpf, en este caso la melatonina fue mantenida durante 5 días, 3 de ellos coincidiendo con el tratamiento de MPTP. A éste último tratamiento se le llamó “tratamiento preventivo”. En la figura 12 se muestran los datos obtenidos en estos experimentos.

La actividad del complejo I mitocondrial sufre una disminución significativa en el grupo de embriones tratado con MPTP en relación con el grupo control ($P < 0.001$, figura 12A). Esta disminución, a las 120 hpf, es de un 83.17% con respecto al control, siendo una disminución mucho mayor que la que experimentan los embriones tratados con MPTP a las 72 hpf (56.61%) (Figura 2B y C), lo que sugiere que el daño producido por el MPTP en la mitocondria continua después de suprimir el tratamiento con MPTP ($P < 0.001$, figura 12A). La incubación de los embriones con melatonina, previene parcialmente y de forma dosis dependiente la disminución de la actividad del complejo I mitocondrial ($P < 0.01$ grupo tratado con aMT 1 μM , Figura 12A).

El tratamiento con MPTP provoca un aumento de los niveles de ARN mensajero de *iNOS* y $\gamma 1$ -*sinucleína* ($P < 0.001$, $P < 0.05$ respectivamente, Figura 12B y D), y una disminución de los niveles del ARN mensajero de *TH* con respecto al grupo control ($P < 0.001$, Figura 12C) en los embriones de 5 dpf, de forma semejante a como ocurre en los embriones de 3 dpf. La incubación de los embriones con melatonina, tanto en tratamiento preventivo (aMT 5 días) como en tratamiento curativo (aMT 2 días), recupera las alteraciones producidas por el MPTP en la expresión de estos genes. El tratamiento curativo, es capaz de disminuir los valores de ARN mensajero de *iNOS* a valores que no difieren significativamente del grupo control (Figura 12B) y los niveles de ARN mensajero de $\gamma 1$ -*sinucleína* a niveles incluso por debajo del grupo control ($P < 0.01$, Figura 12C). En cuanto a los niveles de ARN mensajero de *TH*, la melatonina los aumenta de forma significativa con respecto al grupo tratado con MPTP ($P < 0.001$, Figura 12C).

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre los genes implicados en la vía *PINK1/parkina/DJ-1/MUL1* relacionada con el mantenimiento de la función mitocondrial, observamos que el tratamiento con MPTP causó una disminución significativa en los niveles de expresión del ARN mensajero de *parkina* y *DJ-1* con respecto al grupo control ($P < 0.001$, Figura 12E y G) similar a lo observado en los embriones de 3dpf. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en los embriones de 3 dpf, el MPTP tuvo un efecto más severo sobre *PINK1* y *MUL1* en los embriones de 5dpf, produciendo una disminución significativa de los niveles de ARN mensajero en ambos genes con respecto al grupo control ($P < 0.001$, Figura 12F y H).

El tratamiento preventivo (aMT 5 días) tuvo un efecto significativamente protector sobre todos los genes de la vía *PINK1/parkina/DJ-1/MUL1*, aumentando los niveles de ARN mensajero en todos los casos de forma significativa con respecto al grupo tratado con MPTP ($P < 0.05$ para *parkina* y *PINK1*, $P < 0.001$ para *DJ-1* y *MUL1*, Figura 12E- H). El tratamiento curativo (aMT 2 días) incrementó de forma significativa los niveles de ARN mensajero de *DJ-1* y *MUL1* con respecto al grupo tratado con MPTP ($P < 0.05$ y $P < 0.001$ respectivamente, Figura 12G y H).

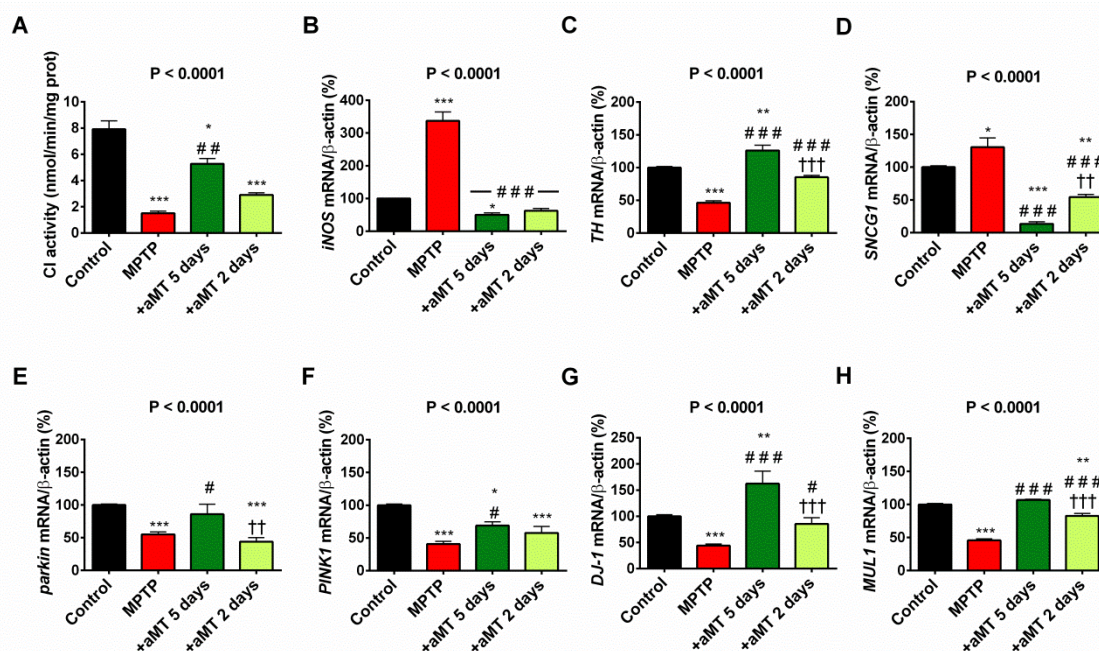


Figura 12. La melatonina previene y recupera la alteración producida por el MPTP sobre la vía *PINK1/parkina/DJ-1/MUL1* en embriones de 5dpf. (A) La actividad del complejo I mitocondrial fue reducida por el MPTP. Este efecto fue prevenido y parcialmente recuperado por la melatonina. (B) Niveles de ARN mensajero de γ 1-sincucleína. (C) Neuroinflamación, medida como los niveles de ARN mensajero de iNOS, los cuales fueron incrementados con MPTP y recuperados a niveles basales por la melatonina. (D) Niveles de ARN mensajero de TH, fueron reducidos por el MPTP y recuperados de nuevo por la melatonina. (E-H) Expresión genética de parkina, PINK1, DJ-1 y MUL1, los cuales fueron disminuidos por el tratamiento con MPTP y totalmente prevenidos y parcialmente recuperados por la melatonina. Los datos son expresados como la media \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Control; ** $P < 0.01$ vs. Control; *** $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. MPTP; ### $P < 0.001$ vs. MPTP; †† $P < 0.01$ vs. +aMT 1 μ M; ††† $P < 0.001$ vs. +aMT 1 μ M. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey ($n = 5-7$ homogenados).

La significativa reducción registrada en la actividad del complejo I causada por el tratamiento con MPTP así como la alteración en la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la función mitocondrial, podría reflejarse en un importante déficit de la bioenergética mitocondrial. Para abordar esta cuestión, medimos *in vivo* el consumo de O₂ en embriones de 120 hpf tratados con MPTP en presencia y ausencia de melatonina. Registramos un descenso significativo en la función respiratoria de los embriones tratados con MPTP, representada por una disminución significativa de la

respiración basal y de la capacidad ETS en comparación con los embriones controles ($P < 0.001$ para la respiración basal, $P < 0.01$ para la capacidad ETS, Figura 13A y B). El MPTP también aumentó de forma significativa el proton leak con respecto al grupo control ($P < 0.05$, Figura 13C) y por lo tanto, el cociente de acoplamiento L/E ($P < 0.001$, Figura 13E), poniendo de manifiesto, al igual que en los embriones de 3 dpf, un mayor desacoplamiento mitocondrial en el grupo tratado con MPTP que en el grupo control. Estos resultados reflejan una importante alteración de la función respiratoria, que conduce a una reducción significativa en la producción de ATP en los embriones tratados con MPTP en relación al grupo control ($P < 0.05$, Figura 13D).

La adición de melatonina al medio en el que se encuentran los embriones, ya sea mediante el tratamiento curativo o mediante el tratamiento preventivo, protegió a la mitocondria del fracaso bioenergético inducido por el MPTP. El daño producido por el MPTP sobre la respiración basal, fue significativamente recuperado por ambos tratamientos con melatonina ($P < 0.001$, Figura 13A). El mismo efecto tuvo esta indolamina sobre la capacidad ETS, recuperando de forma significativa el efecto deletéreo del MPTP ($P < 0.05$, Figura 13B). Además la melatonina también redujo de forma significativa el proton leak con respecto al grupo tratado con MPTP ($P < 0.001$, Figura 13C), disminuyendo los valores de proton leak significativamente por debajo de los grupos controles ($P < 0.001$, Figura 13C). Como consecuencia, ambos tratamientos con melatonina disminuyeron de forma significativa el cociente L/E con respecto a grupo tratado con MPTP ($P < 0.001$, Figura 13E) y recuperaron forma significativa la producción de ATP con respecto al grupo control ($P < 0.001$, Figura 13D).

En conjunto, todos estos resultados demuestran que ambos tratamientos con melatonina, tratamiento curativo y tratamiento preventivo, tienen un papel protector frente al fracaso bioenergético inducido por el tratamiento con MPTP, manteniendo mitocondrias acopladas y con una respiración más eficaz como muestran unos menores valores de proton leak, lo que conduce a una mayor producción de ATP, incluso por encima del grupo control ($P < 0.001$, Figura 13D).

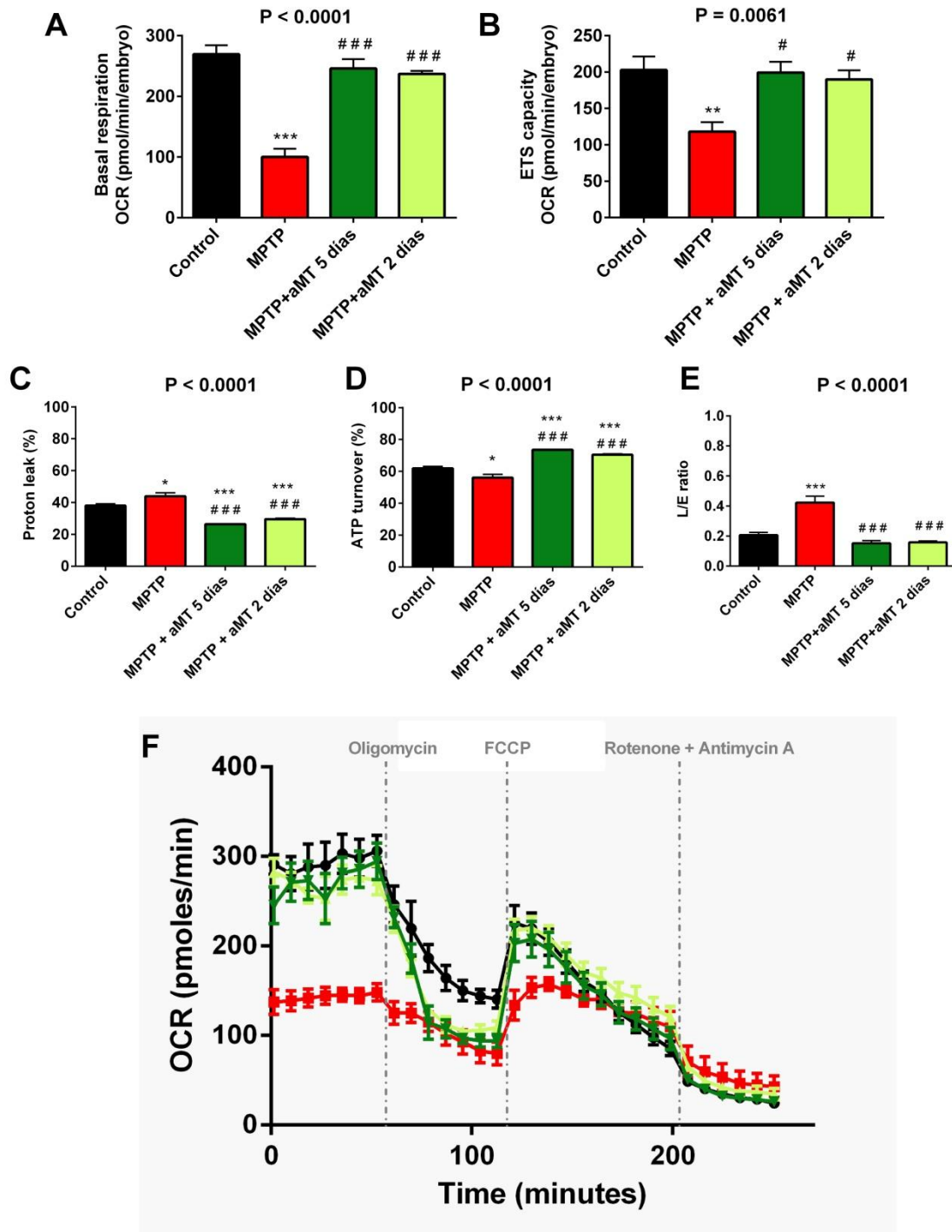


Figura 13. La melatonina previene el fallo bioenergético ocasionado por el MPTP en embriones a las 120 hpf. (A) Respiración basal. (B) Capacidad máxima (Electron transfer system capacity, ETS). (C) Porcentaje de proton leak. (D) Estimación de la producción de ATP. (E) Ratio L/E (leak/ETS). La melatonina recupera la bioenergética mitocondrial. (F) Representación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) obtenida del análisis de respiración en embriones de pez cebra *in vivo*. Los datos son expresados como la media \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control; ** $P < 0.01$ vs. Control; *** $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. MPTP; ### $P < 0.001$ vs. MPTP. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey ($n = 5$ embryos).

6. EL DAÑO PRODUCIDO POR EL MPTP SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA EN LOS EMBRIONES DE PEZ CEBRA ES PREVENIDO Y RECUPERADO POR LA MELATONINA.

Otro síntoma típico asociado a la enfermedad de Parkinson es la disfunción motora, que se debe a la degeneración dopaminérgica que acontece en el transcurso de esta enfermedad. Por este motivo nuestra siguiente pregunta fue si la pérdida de neuronas TH reactivas inducida por el tratamiento con MPTP afecta al comportamiento locomotor en embriones de pez cebra. Para abordar esta cuestión se analizaron la distancia recorrida y la velocidad máxima de natación durante un periodo de 5 minutos en embriones de pez cebra a las 120 hpf.

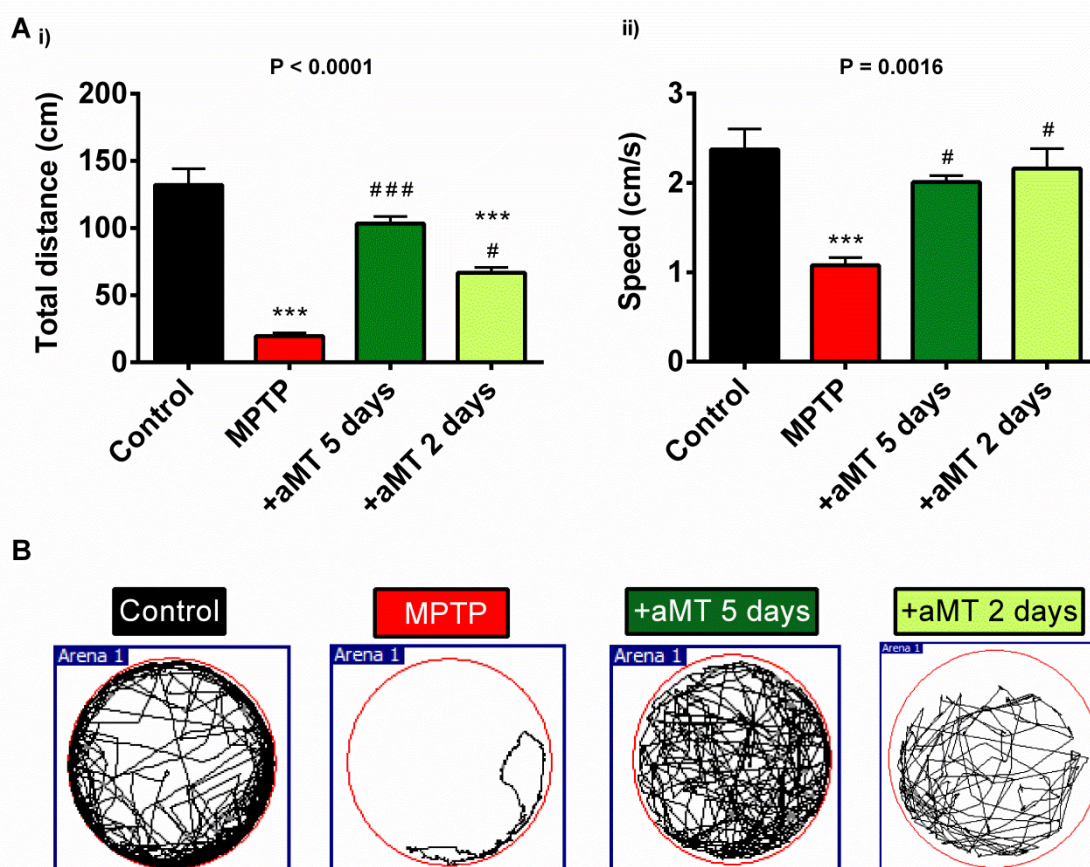


Figura 13. La melatonina recupera la actividad motora dañada por el tratamiento con MPTP en embriones de 120 hpf. (A) La distancia recorrida y la velocidad de natación fueron significativamente disminuidas por el tratamiento con MPTP. La melatonina parcialmente previene y recupera la distancia total recorrida por los embriones, y recupera y previene totalmente la velocidad de natación. (B) Registro del patrón de natación de los embriones con los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos. Los datos son expresados como la media \pm SEM. *** $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. MPTP; ### $P < 0.001$ vs. MPTP. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey ($n = 6-10$ individuos por grupo).

Observamos que en los embriones tratados con MPTP se redujo significativamente tanto el total de la distancia recorrida como la velocidad máxima ($P < 0.001$, Figura 13A y B).

De nuevo la administración de melatonina, ya sea mediante un tratamiento curativo (aMT 2 días) como mediante un tratamiento preventivo (aMT 5 días), tiene la capacidad de prevenir y recuperar de forma significativa tanto el total de distancia recorrida como la velocidad máxima alcanzada, con una capacidad de prevención de aproximadamente el 80% del efecto del MPTP sobre la distancia total y velocidad de natación, y una capacidad de recuperación superior al 50% del efecto causado por el MPTP en la distancia total y casi del 100% en la velocidad de natación. El registro del patrón de natación recogido en estos experimentos es mostrado en la figura 10B. Este efecto preventivo y recuperador que ejerce la melatonina sobre la actividad motora en los embriones, se debe a la capacidad de esta indolamina de proteger y recuperar la muerte de neuronas dopaminérgicas que provoca el tratamiento con MPTP, como hemos analizado en experimentos previos.

V. DISCUSIÓN

La disfunción mitocondrial está íntimamente relacionada con la patogénesis de la enfermedad de Parkinson, tanto si el origen de la enfermedad es familiar como si es idiopático (Schapira2008). Por este motivo, esa organela debería ser considerada como la principal diana farmacológica en esta enfermedad neurodegenerativa.

En el presente estudio, haciendo uso del pez cebra como modelo de la enfermedad de Parkinson, tal y como se ha descrito previamente, aclaramos las principales cuestiones relacionadas con la mitocondria en lo que a la enfermedad de Parkinson se refiere. En primer lugar hemos podido analizar la respiración mitocondrial en embriones parkinsonianos de pez cebra a las 72 y 120 hpf *in vivo*, lo que nos ha permitido obtener información de los cambios bioenergéticos que acontecen en la mitocondria de una forma dinámica. En segundo lugar, el estrés oxidativo inducido por el MPTP en embriones de pez cebra no es la única causa del fallo mitocondrial, como hemos comprobado, el tratamiento con MPTP causa una profunda alteración en la expresión de genes relacionados con el control de la eficiencia mitocondrial y de la mitofagia. Esta alteración impediría la eliminación de mitocondrias dañadas que seguirían presentes en la célula manteniendo una producción deficitaria de ATP y unos niveles elevados de estrés oxidativo. Como resultado, cuando se retira el MPTP del medio que contiene a los embriones de pez cebra, el proceso neurodegenerativo continua ocasionando una importante pérdida en la actividad locomotora de estos animales. Este resultado es absolutamente diferente de lo que ocurre con mamíferos pequeños, los cuales generalmente se recuperan de su condición parkinsoniana una vez que el tratamiento con MPTP es eliminado. En tercer lugar, hemos descrito una nueva diana molecular de la melatonina, que explicaría sus propiedades neuroprotectoras, y no sólo hemos demostrado que la melatonina previene la degeneración parkinsoniana inducida por el MPTP en embriones de pez cebra a todos los niveles analizados, sino que además y por primera vez, hemos demostrados que la melatonina recupera el fenotipo normal en embriones de pez cebra una vez que el estado parkinsoniano se ha desarrollado.

La relación entre disfunción mitocondrial y la enfermedad de Parkinson idiopática fue hecha, por primera vez, tras el descubrimiento de que los pacientes con enfermedad de Parkinson sufrían una deficiencia de la actividad del complejo I

mitocondrial en la sustancia negra, concretamente en la *pars compacta* (Schapira *et al.*, 1989). Tras estudios preliminares dosis y tiempo dependientes, hemos establecido un modelo de síndrome parkinsoniano en embriones de pez cebra, incubándolos con una dosis de 600 μM de MPTP, los cuales muestran una reducción del 55% en la actividad del complejo I mitocondrial dos días después de iniciar el tratamiento con esta neurotoxina. Esta reducción en la actividad del complejo I mitocondrial es semejante a la encontrada en pacientes que sufren la enfermedad de Parkinson (Schapira 2008). El daño en la actividad del complejo I mitocondrial condujo a un fallo bioenergético significativo, evaluado mediante la respiración mitocondrial *in vivo* y caracterizado por un declive en el consumo de oxígeno y en la producción de ATP. Como consecuencia, el tratamiento con MPTP provocó un aumento del escape de protones, causando desacoplamiento mitocondrial, y conduciendo a una fosforilación oxidativa insuficiente y por lo tanto a la formación de ROS (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007; Balaban *et al.*, 2005), que se reflejó por un importante aumento en el cociente GSSG/GSH, sugiriendo un estado de estrés oxidativo intracelular (Kemp *et al.*, 2008). La disminución en las actividades de las enzimas SOD y GRd, explican la acumulación de ROS y la incapacidad para recuperar el pool de GSH.

Esta situación de estrés oxidativo y daño mitocondrial se acompañó por un aumento en la expresión de iNOS en los embriones incubados con MPTP. El análisis por inmunofluorescencia confirmó la presencia de una mayor concentración de iNOS en las áreas cerebrales del diencefalo y del bulbo olfatorio, donde se localizan las neuronas dopaminérgicas en estos animales (Holzschuh *et al.*, 2001; Rink and Wullimann 2001), confirmando la presencia de un proceso neuroinflamatorio en el cerebro de los embriones de pez cebra, al igual que se ha observado en modelos murinos de Parkinson con MPTP. Esos hechos apoyan que la administración de MPTP es responsable del aumento de la expresión de la isoforma inducible de la NOS, y que el NO producido por las células gliales participa en los procesos que llevan a la degeneración neuronal en los embriones de pez cebra al igual que ocurre en ratones tratados con MPTP (Liberatore *et al.*, 1999; Tapias *et al.*, 2009). El aumento de iNOS condujo a un aumento de los niveles NO^{\cdot} , que puede reaccionar con $\text{O}_2^{\cdot-}$ formando peroxinitritos (ONOO^-), los cuales inhiben de forma irreversible a los complejos

respiratorios, convirtiéndose en otra fuente de estrés oxidativo (Ortiz *et al.*, 2014). En estas condiciones, la mitocondria entra en un estado oxidativo que conduce a la apertura del poro de transición mitocondrial, liberando ROS, citocromo c y ADN mitocondrial al citosol, señales que activan la apoptosis conduciendo a la muerte neuronal (Blesa *et al.*, 2015; Exner *et al.*, 2012; Hwang2013; Kroemer *et al.*, 2007; Van Laar and Berman 2013).

A las 72 hpf, y como consecuencia de todo este cuadro fisiopatológico, se detectó una disminución en la expresión de TH, que por inmunofluorescencia confirmó una pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en las áreas cerebrales del diencéfalo y del bulbo olfatorio de los embriones de pez cebra incubados con MPTP (Naskar *et al.*, 2015; Sallinen *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2008), áreas que coinciden con las áreas cerebrales donde observábamos el fuerte incremento de iNOS. Estos análisis moleculares y morfológicos apoyan que la neuroinflamación, seguida al estrés oxidativo, está implicada en la pérdida de neuronas TH positivas en el cerebro del pez cebra.

La conexión entre disfunción mitocondrial y enfermedad de Parkinson ha sido reforzada por el hallazgo de genes que codifican proteínas mitocondriales o proteínas relacionadas con la función mitocondrial y cuyas mutaciones están asociados con la enfermedad de Parkinson hereditaria (Cardoso 2011; Sai *et al.*, 2012). Algunos de estos genes, como γ 1-sinucleína, parálogo de la α -sinucleína y con funciones similares (Toni and Cioni2015), *parkina*, *PINK1* y *DJ-1*, están directamente implicados en una vía común relacionada con el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial, y sus mutaciones son las responsables de la mayoría de casos de enfermedad de Parkinson autosómica de aparición temprana (van der Merwe *et al.*, 2015). Estos genes han sido analizados en modelos animales knockout y/o modelos knockdown (Anichtchik *et al.*, 2008; Flinn *et al.*, 2009; Kitada *et al.*, 2009; Sallinen *et al.*, 2010). En nuestro modelo experimental, el tratamiento con MPTP alteró la expresión de estos genes, causando un 20% de disminución en el contenido de PINK1 y niveles indetectables de parkina y DJ-1 en los embriones de pez cebra. Por lo que, incluso la pequeña disminución en el contenido de PINK1, el cual *in vitro* es protector frente al MPTP (Haque *et al.*, 2008; Petit *et al.*, 2005), no pudo ser compensada por parkina o DJ-1, a pesar de que se ha

demostrado que ambas pueden compensar incluso de la ausencia total de PINK1 (Haque *et al.*, 2012), y en conjunto, la reducción de estas tres proteínas se acompañó de la disminución de la expresión de TH y neurodegeneración dopaminérgica (Anichtchik *et al.*, 2008).

PINK1 actúa como sensor para detectar el daño mitocondrial, reclutando y fosforilando a la parkina citosólica, lo que conlleva a la activación de parkina y por tanto de su actividad E3 ligasa (Clark *et al.*, 2006; Kane *et al.*, 2014). Una vez activada, la parkina es reclutada por la mitocondria, donde activa procesos de autofagia que culminan con la eliminación de la mitocondria dañada (Pickrell and Youle 2015). La total ausencia de parkina en embriones de pez cebra incubados con MPTP, impide, a pesar de la presencia de PINK1, que esta proteína sea activada e inicie el proceso de mitofagia protector para la célula, por lo que las mitocondrias dañadas siguen manteniéndose en la célula y sigue manteniéndose, como consecuencia, el estado hiperoxidativo (Rub *et al.*, 2015)(Figura 14).

Esta condición podría ser en parte contrarrestada por la proteína DJ-1, debido a que esta proteína que es expresada en neuronas dopaminérgicas del pez cebra (Bai *et al.*, 2006), se activa por oxidación entrando en el núcleo y activando la expresión de genes antioxidantes (Ariga *et al.*, 2013; Taira *et al.*, 2004). Bajo una situación de estrés oxidativo, DJ-1 también puede localizarse en la membrana mitocondrial externa favoreciendo un entorno mitocondrial normal. Y aunque DJ-1 puede recatar el fenotipo de PINK1, pero no el de parkina en ratones (van der Merwe *et al.*, 2015), la pérdida absoluta de la proteína DJ-1 en nuestro modelo experimental, hace imposible que esta proteína lleve a cabo estos efectos beneficiosos tanto en el citosol como sobre la fisiología mitocondrial y contrarreste la ausencia de parkina, colaborando, en consecuencia, con el proceso neurodegenerativo en el sistema dopaminérgico de los embriones de pez cebra tratados con MPTP. Pero además, DJ-1 ha sido relacionado con la regulación de la expresión del gen *TH* (Ishikawa *et al.*, 2010), lo cual explicaría, al menos en parte, la disminución que se produjo en la expresión del gen *TH* en los embriones incubados con MPTP (Figura 14).

En estas condiciones, es decir, baja expresión de PINK1 y ausencia de parkina y DJ-1, la sobreexpresión del gen MUL1, que codifica la proteína MUL1 involucrada en la regulación de mitofusina (Li *et al.*, 2008), podría contrarrestar la ausencia de las proteínas PINK1 y parkina, restaurando el fenotipo normal (Yun *et al.*, 2014). En nuestro modelo experimental, sin embargo, este mecanismo compensatorio está ausente, dado el aumento de mitofusina que se produce tras el tratamiento con MPTP. Por lo tanto, después de la exposición al MPTP, la ausencia de parkina y DJ-1 impiden la puesta en marcha de mecanismos de reparación y/o eliminación de mitocondrias alteradas, permitiendo el mantenimiento de un pool de mitocondrias dañadas y un ambiente oxidante que empeora la situación, en un ciclo vicioso que no puede ser compensado por PINK1 y/o por la sobreexpresión de MUL1, reforzando aún más el proceso neurodegenerativo.

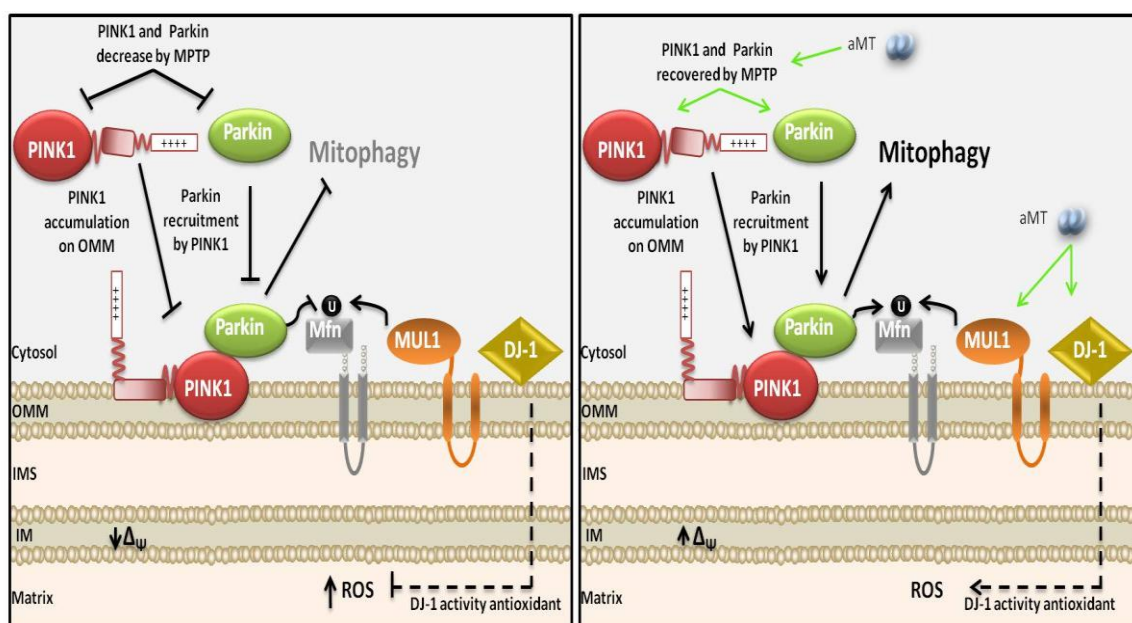


Figura 14. Diagrama representativo de las relaciones entre las vías moleculares analizadas en el estudio. El tratamiento con MPTP induce disfunción mitocondrial caracterizada por una disminución en el contenido de PINK1 y parkina, evitando el reclutamiento de PINK1 en la OMM, la activación de parkina y por tanto el proceso de mitofagia, acumulándose las mitocondrias dañadas en la célula. La falta de parkina activa también produce una disminución en la ubiquitinización de Mfn, llevándose a cabo ahora este proceso sólo por MUL1. La administración de MPTP también disminuye el contenido de DJ-1 que conduce a un incremento de ROS. La adicción de melatonina induce la expresión de *PINK1* y *parkin*, desbloqueando el proceso de mitofagia. También, esta indolamina incrementa la expresión de MUL1, que ahora junto con parkina ubiquitinizan a Mfn. Finalmente la melatonina normaliza la expresión de DJ-1 disminuyendo los niveles de ROS (ver discusión para más detalles).

Si esta hipótesis es cierta, y basándonos en los resultados de este estudio, una vez el MPTP hace su efecto, deberíamos ver una progresión o al menos el mantenimiento del estado parkinsoniano en los embriones de pez cebra. Para comprobar esta hipótesis, analizamos la expresión genética, la función mitocondrial y la actividad locomotora en embriones de 120 hpf, es decir, 48 horas después de haber eliminado el tratamiento con MPTP. La ausencia de MPTP no evita la evolución de las alteraciones moleculares, sino que se ve reducida todavía más la actividad del complejo I mitocondrial y los niveles de ARN mensajero de los genes PINK1 y MUL1. Todo esto va acompañado de fracaso bioenergético, caracterizado por mitocondrias desacopladas y disminución en la producción de ATP. Estos cambios son paralelos a la reducción en la actividad locomotora de los embriones de pez cebra a las 120 hpf, lo que sugiere que el modelo de enfermedad de Parkinson utilizando embriones de pez cebra aquí mostrado parece llegar a ser crónico.

En nuestro estudio mostramos que el MPTP recapitula todas las características clínicas de la enfermedad de Parkinson porque también incrementó la expresión de γ 1-sinucleína, proteína paróloga de la α -sinucleína humana asociada con la patogénesis de la enfermedad de Parkinson hereditario e idiopático (Braak *et al.*, 2003; Chartier-Harlin *et al.*, 2004). Al igual que ocurre en humanos con la α -sinucleína, la acumulación de γ 1-sinucleína en el embrión de pez cebra está relacionado con la disfunción mitocondrial, contribuyendo por lo tanto a las alteraciones dopaminérgicas y motoras mostradas en este estudio.

Debido a que actualmente no existe una terapia farmacológica que retrase o frene el proceso neurodegenerativo durante el avance de la enfermedad de Parkinson, el desarrollo de una terapia neuroprotectora que modifique el curso de la enfermedad es una necesidad clínica no satisfecha. En el presente trabajo, se investigaron los efectos de la melatonina en esta enfermedad neurodegenerativa, debido a la vinculación entre la disfunción mitocondrial y la enfermedad de Parkinson y el hecho de que la mitocondria es una de las dianas celulares de la melatonina. Estudios previos han analizado los efectos neuroprotectores de la melatonina en diferentes modelos animales de parkinsonismo causados por MPTP y MPP+ (Khaldy *et al.*, 2003; Tapias *et al.*, 2009; Thomas and Mohanakumar 2004), sin embargo su mecanismo de acción

permanece desconocido. Basándonos en sus propiedades neuroprotectoras, incubamos con melatonina a los embriones tratados con MPTP para elucidar las dianas moleculares de esta indolamina. La melatonina mostró un efecto significativamente positivo sobre la bioenergética mitocondrial tanto a 72 hpf como a 120 hpf. En primer lugar, encontramos un efecto dosis-dependiente típico de la melatonina sobre la actividad del complejo I mitocondrial, debido a la capacidad tanto de la melatonina como de sus metabolitos para eliminar ROS a los que el complejo I es especialmente sensible y a la acción potenciadora que esta indolamina tiene sobre la actividad del complejo I (Martin *et al.*, 2000a; Martin *et al.*, 2000b). En segundo lugar, mediante estudios de respiración mitocondrial *in vivo*, relacionamos esta mejora de la actividad del complejo I mitocondrial con una mejora de todos los parámetros bioenergéticos, como una reducción del consumo basal de O₂, efecto que podría proteger a la mitocondria de un excesivo daño oxidativo (Galano *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2009), seguido de un aumento en la producción de ATP y una disminución del escape de protones, haciendo en conjunto más eficiente la fosforilación oxidativa y restableciendo totalmente la capacidad bioenergética mitocondrial.

Aunque todavía no está claro si el daño oxidativo es la causa o la consecuencia de la disfunción mitocondrial en la patofisiología de la enfermedad de Parkinson, si hay claras evidencias que implican tanto a ROS como RNS en el daño y muerte neuronal (Andersen 2004). La melatonina tiene excelentes actividades antioxidantes y antiinflamatorias, eliminando radicales libres, induciendo la expresión y actividad de enzimas antioxidantes, y reduciendo la inmunidad innata dependiente de NF-kB (Crespo *et al.*, 1999; Escames *et al.*, 2003; Galano *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2015; Ozturk *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2015). Estos efectos de la melatonina permiten a los embriones de pez cebra incubados con MPTP recuperar un balance redox normal, incluyendo el cociente GSSG/GSH, e inhibir la expresión de iNOS, apoyando un efecto genómico de esta indolamina (Leon *et al.*, 2006). Consecuentemente, los embriones de pez cebra incubados con melatonina estuvieron absolutamente protegidos por esta indolamina de los efectos pro-oxidantes y proinflamatorios causados por el MPTP, bloqueando la apoptosis mediada por radicales libres (Galano *et al.*, 2011; Zhang and Zhang 2014).

Además de sus efectos directos sobre la mitocondria, en este estudio demostramos que la melatonina restablece la expresión alterada por el MPTP de los genes γ -sinucleína, *Parkin*, *PINK1* y *DJ-1*, abriendo una nueva vía por la cual esta indolamina es capaz de actuar sobre la mitocondria para mantener un funcionamiento normal de esta organela.

La acumulación intracelular de sinucleína puede interactuar con la mitocondria causando disfunción en esta organela por despolarización de la membrana mitocondrial, pérdida de la capacidad de OXPHOS, y apertura del poro de transición mitocondrial (Bir *et al.*, 2014). La melatonina reduce la expresión y contenido de α -sinucleína en modelos experimentales de Parkinson con ratones (Su *et al.*, 2015), pero no existen datos sobre si esta indolamina tiene algún efecto sobre la expresión y contenido en γ 1-sinucleína. En nuestro estudio, la administración de melatonina previno la inducción en la expresión de γ 1-sinucleína en los embriones tratados con MPTP, contribuyendo así al mantenimiento de la integridad mitocondrial. Parte de este efecto de la melatonina puede involucrar a PGC-1 α , debido a que PGC-1 α , que participa en la detoxificación de ROS y en la regulación de la biogénesis mitocondrial, puede anular la toxicidad de la sinucleína en neuronas sensoriales periféricas de pez cebra, y la melatonina es capaz de promover la vía Sirt1/PGC-1 α , mejorando por tanto la función mitocondrial (Garcia *et al.*, 2015; Guo 2012; O'Donnell *et al.*, 2014; Volt *et al.*, 2016). Estos efectos en conjunto reflejan la alta eficacia de la melatonina para mantener la homeostasis mitocondrial (Acuña-Castroviejo D. *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2000a).

Además, la melatonina bloquea el efecto que el MPTP tiene sobre parkina, PINK1 y DJ-1, y aumenta la expresión de *MUL1*, reforzando su papel en el control de la homeostasis mitocondrial (Figura 14). Esto incluye, la eliminación de mitocondrias dañadas mediante la activación de la mitofagia vía PINK1/parkina, el aumento de la degradación dependiente de ubiquitinización de Mfn tanto por la vía PINK1/parkina como por la vía MUL1, y la prevención de la agregación de proteínas y la toxicidad de la sinucleína a través de la actividad de DJ-1, como una chaperona reguladora de estrés oxidativo (Bueler2009). Nuestros resultados abren una nueva vía por la cual la melatonina actúa sobre la mitocondria, permitiendo el funcionamiento adecuado de

mecanismos involucrados en la eliminación del daño mitocondrial tales como autofagia/mitofagia/degradación proteica.

En conjunto, todas las acciones de la melatonina resultan en un importante efecto neuroprotector frente a la muerte de neuronas dopaminérgicas en embriones parkinsonianos de pez cebra. En este estudio describimos por primera vez la capacidad de la melatonina para prevenir la muerte de las neuronas dopaminérgicas del diencéfalo ventral y del bulbo olfatorio en embriones parkinsonianos de pez cebra, de forma semejante a lo registrado anteriormente en neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central de ratones (Patki and Lau2011). Además, la melatonina también recupera la expresión de DJ-1, el cual tiene un efecto positivo sobre la expresión de TH (Ishikawa *et al.*, 2010), reforzando así el efecto neuroprotector de la indolamina sobre el sistema dopaminérgico de los peces.

La capacidad de la melatonina, a través de todos los efectos demostrados en el presente trabajo, para frenar la muerte de las neuronas dopaminérgicas en los embriones parkinsonianos, finalmente resulta en una prevención del fenotipo motor derivado de la pérdida de estas neuronas dopaminérgicas (Sallinen *et al.*, 2009; Sallinen *et al.*, 2010). Como resultado de todos los efectos de esta indolamina, incluso las malformaciones inducidas por el MPTP en los embriones de pez cebra fueron corregidas por la administración de melatonina.

La última consideración, pero una de las más interesantes, es que mostramos por primera vez que la melatonina no sólo previene los efectos deletéreos del MPTP cuando se administra al mismo tiempo que la neurotoxina, como demostramos en los embriones de 3 dpf, sino que una vez que el MPTP ha inducido las alteraciones moleculares y fenotípicas típicas de un estado parkinsoniano, la melatonina administrada mediante un tratamiento curativo o preventivo recupera a los embriones de pez cebra de estas alteraciones. Esta reversión se consiguió mediante la prevención y recuperación de la actividad del complejo I mitocondrial, que se vio reflejado en la recuperación de la bioenergética mitocondrial, con mitocondrias mejor acopladas y mayor producción de ATP, por tanto una respiración mitocondrial más eficaz con menor producción de ROS.

Los tratamientos con melatonina también recuperaron la expresión de los genes *sncga*, *iNOS* y *TH* en embriones de 120 hpf. Asimismo, dichos tratamientos condujeron a la prevención y recuperación de la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial analizados, *parkina/PINK1/DJ-1/MUL1* a las 120 hpf. Estos efectos de la melatonina son seguidos por cambios a nivel fenotípico. Analizando la motilidad de los embriones a las 120 hpf, momento en el cual ya existe una actividad locomotora controlada en los embriones de pez cebra (Brustein *et al.*, 2003b), pusimos de manifiesto que el déficit motor causado por el tratamiento con el MPTP es totalmente recuperado tanto con la terapia preventiva como con la terapia curativa con melatonina, restableciendo el fenotipo normal en los embriones parkinsonianos tratados con la indolamina.

En resumen, la relación entre mitocondria y la etiología/patogénesis de la enfermedad de Parkinson está totalmente aceptada actualmente (Schapira2008). Cuando la enfermedad de Parkinson tiene un origen genético, el desencadenante de la enfermedad es la mutación genética, mutación que afecta fundamentalmente a los genes *PARK1/4*, *PARK2*, *PARK6* y *PARK7*, todos ellos genes relacionados con el correcto funcionamiento mitocondrial, lo cual conduce a una disfunción mitocondrial y daño oxidativo (Abeliovich and Flint2006; Lucking *et al.*, 2000; Valente *et al.*, 2004a). Cuando la enfermedad de Parkinson es idiopática, el daño mitocondrial es el evento primario en la enfermedad, lo cual conduce a un fallo bioenergético mitocondrial y a una situación de estrés oxidativo, induciendo un estado neuroinflamatorio, con la consecuente muerte de neuronas dopaminérgicas y alteraciones en la expresión genética de genes relacionados con la homeostasis mitocondrial (Keeney *et al.*, 2006; Liberatore *et al.*, 1999; Sian *et al.*, 1994; Valente *et al.*, 2004b). Esta última vertiente, es totalmente apoyada por los datos que hemos obtenido en el modelo parkinsoniano de pez cebra tratado con MPTP, donde hemos descrito la secuencia de eventos dirigidos por el fallo mitocondrial dependiente de MPTP, como el primer evento patofisiológico en el desarrollo del estado parkinsoniano. Esta alteración mitocondrial conlleva a un estado neuroinflamatorio, a la pérdida de neuronas dopaminérgicas y a la inhibición de la expresión de genes relacionados con la homeostasis mitocondrial. Otro resultado a destacar de este estudio es el hallazgo de que la melatonina puede

ser muy útil en la terapia frente a la enfermedad de Parkinson debido a que es capaz de recuperar, no sólo de prevenir, el daño causado sobre el sistema dopaminérgico que acontece durante esta enfermedad. Finalmente, nuestros resultados apoyan que la mitocondria es una diana terapéutica clave para la neuroprotección en varias enfermedades neurodegenerativas entre las que se incluye la enfermedad de Parkinson (Milane *et al.*, 2015).

VI. CONCLUSIONES

1. Describimos un modelo de parkinsonismo en embriones de pez cebra de 72 y 120 hpf que manifiesta todos los eventos fisiopatológicos de la enfermedad, que va desde el fracaso bioenergético a la neuroinflamación y déficit de TH, culminando en la muerte neuronal dopaminérgica y subsecuente bradiquinesia.
2. Demostramos que el MPTP no sólo induce la típica inhibición del complejo I mitocondrial parkinsoniana, sino que colabora en el fracaso bioenergético al aumentar la expresión de γ 1-sinucleína y reducir la expresión de Parkina/PINK1/DJ-1. De esta forma, no sólo disminuye la defensa antioxidante mitocondrial, si no que, además, la ausencia de parkina anula los mecanismos de mitofagia necesarios para eliminar las mitocondrias dañadas, acumulándolas y agravando el estado oxidativo.
3. Observamos que, una vez retirado a las 72 hpf el MPTP del medio de incubación, el proceso fisiopatológico parkinsoniano continúa empeorando, alcanzando a las 120 hpf un peor estado bioenergético y alteración de los genes de regulación mitocondrial. Esta situación explica la muerte dopaminérgica a lo largo del tiempo en el Parkinson, ya que el mantenimiento del estado hiperoxidativo de origen mitocondrial por ausencia de mitofagia favorece el proceso neurodegenerativo.
4. Identificamos nuevas dianas terapéuticas de la melatonina que explican sus propiedades neuroprotectoras. La importante capacidad de la melatonina para estimular la función mitocondrial no sólo se debe a sus propiedades antioxidantes, si no que es capaz de revertir la inhibición de Parkina/PINK1/DJ-1 inducida por el MPTP, restableciendo los mecanismos de mitofagia que permiten recuperar las mitocondrias sanas y eliminar las defectuosas. En consecuencia, se restablece el estado bioenergético que frena la muerte dopaminérgica y evita la disfunción motora.

5. Por primera vez demostramos que el efecto neuroprotector de la melatonina frente al parkinsonismo no sólo depende de la prevención del proceso neurodegenerativo inducido por el MPTP, si no que la melatonina también recupera al pez cebra una vez dicho proceso está establecido. Estas propiedades, preventivas y curativas de la melatonina la hacen altamente eficaz frente a la degeneración parkinsoniana.

VII CONCLUSIONS

1. We report here a PD model in 72 hpf and 120 hpf zebrafish embryos, which show all pathophysiological events of the disease, from the bioenergetic failure to neuroinflammation and TH deficit, finishing in dopaminergic neuronal death and subsequent bradikinesia.
2. We show here that MPTP does not only induce a typical mitochondrial complex I inhibition, but it collaborates in the bioenergetic impairment increasing γ 1-synuclein expression and reducing the Parkina/PINK1/DJ-1 network. Therefore, does not only decrease the mitochondrial antioxidative defense in the presence of MPTP but the absence of parkin blunts the mitophagy mechanisms required to remove damaged mitochondria, leading to their accumulation and further exacerbating the oxidative status.
3. We observed that, once removed MPTP from the incubation medium in the 72 hpf embryos, the pathophysiological parkinsonian process continues to get worse, reaching a worse bioenergetic status at 120 hpf, continuing with reduced mitochondrial regulatory gene expression. This condition explains the dopaminergic cell death over time in PD, because the maintenance of the hyperoxidative status of mitochondrial origin due to the absence of mitophagy, favors the neurodegenerative process.
4. We identify new therapeutic targets for melatonin that explain its neuroprotective properties. The great ability of melatonin to boost the mitochondrial function is a consequence of its antioxidative properties and its capacity to revert the MPTP-dependent inhibition of the Parkina/PINK1/DJ-1 network. So, melatonin recovers the mitophagy events allowing to remove damaged mitochondria and retrieve healthy ones. The bioenergetic status is thus restored by melatonin, hampering the dopaminergic cell death and motor dysfunction.

5. For the first time we demonstrate that the neuroprotective effect of melatonin against MPTP-induced PD is not only a preventive one; also, melatonin is also able to recover zebrafish from the parkinsonian neurodegenerative process once it was established. These properties, preventive and curative ones, make melatonin a highly effective pharmacological tool against parkinsonian degeneration.

VIII BIBLIOGRAFÍA

Abeliovich A and Flint BM. Parkinsonism genes: culprits and clues. *J Neurochem* 2006; 99: 1062-1072.

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.

Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia MM, Ortiz GG, Reiter RJ. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci* 1997; 60: L23-L29.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Leon J, Carazo A, Khaldy H. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 549-557.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Rodriguez MI, Lopez LC. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci* 2007; 12: 947-963.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Lopez LC *et al.* Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71: 2997-3025.

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.

Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 82: 253-256.

Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res* 1994; 16: 100-112.

Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res* 1994; 16: 100-112.

Amsterdam A and Becker TS. Transgenes as screening tools to probe and manipulate the zebrafish genome. *Dev Dyn* 2005; 234: 255-268.

Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 2004; 10 Suppl: S18-S25.

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.

Andrews ZB, Diano S, Horvath TL. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 829-840.

Anichtchik O, Diekmann H, Fleming A, Roach A, Goldsmith P, Rubinsztein DC. Loss of PINK1 function affects development and results in neurodegeneration in zebrafish. *J Neurosci* 13-8-2008; 28: 8199-8207.

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* 12-7-2002; 943: 163-173.

Ariano MA, Stromski CJ, Smyk-Randall EM, Sibley DR. D2 dopamine receptor localization on striatonigral neurons. *Neurosci Lett* 14-9-1992; 144: 215-220.

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.

Bahadori R, Rinner O, Schonthaler HB, Biehlmaier O, Makhankov YV, Rao P *et al.* The Zebrafish fade out mutant: a novel genetic model for Hermansky-Pudlak syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 4523-4531.

Bai Q, Mullett SJ, Garver JA, Hinkle DA, Burton EA. Zebrafish DJ-1 is evolutionarily conserved and expressed in dopaminergic neurons. *Brain Res* 3-10-2006; 1113: 33-44.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 25-2-2005; 120: 483-495.

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* 16-4-2010; 584: 1571-1576.

Barcia C, Fernandez BA, Poza M, Herrero MT. Parkinson's disease and inflammatory changes. *Neurotox Res* 2003; 5: 411-418.

Barcia GC and Herrero Ezquerro MT. [Inflammation and Parkinson's disease]. *Rev Neurol* 16-3-2004; 38: 545-553.

Barrett R, Chappell C, Quick M, Fleming A. A rapid, high content, in vivo model of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biotechnol J* 2006; 1: 651-655.

Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 325-334.

Beal MF. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 120-131.

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* 18-11-1994; 269: 28531-28534.

Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 2006; 40: 1-9.

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

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* 4-6-1996; 1290: 191-196.

Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001; 39: 381-391.

Benveniste EN, Nguyen VT, Wesemann DR. Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia. *Brain Behav Immun* 2004; 18: 7-12.

Berghmans S, Hunt J, Roach A, Goldsmith P. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res* 2007; 75: 18-28.

Bertorello A and Aperia A. Inhibition of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase activity requires simultaneous activation of DA1 and DA2 receptors. *Am J Physiol* 1990; 259: F924-F928.

Bilotta J, Barnett JA, Hancock L, Saszik S. Ethanol exposure alters zebrafish development: a novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol Teratol* 2004; 26: 737-743.

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.

Birch-Machin MA, Briggs HL, Saborido AA, Bindoff LA, Turnbull DM. An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 1994; 51: 35-42.

Blesa J and Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat* 2014; 8: 155.

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

Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 57-69.

Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R *et al.* Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 135-172.

Boassa D, Berlanga ML, Yang MA, Terada M, Hu J, Bushong EA *et al.* Mapping the subcellular distribution of alpha-synuclein in neurons using genetically encoded probes

for correlated light and electron microscopy: implications for Parkinson's disease pathogenesis. *J Neurosci* 6-2-2013; 33: 2605-2615.

Borla MA, Palecek B, Budick S, O'malley DM. Prey capture by larval zebrafish: evidence for fine axial motor control. *Brain Behav Evol* 2002; 60: 207-229.

Boyadjiev SA, Fromme JC, Ben J, Chong SS, Nauta C, Hur DJ *et al.* Cranio-lenticulo-sutural dysplasia is caused by a SEC23A mutation leading to abnormal endoplasmic-reticulum-to-Golgi trafficking. *Nat Genet* 2006; 38: 1192-1197.

Braak H, Del TK, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 197-211.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7-5-1976; 72: 248-254.

Brandt U. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 69-92.

Bretau S, Lee S, Guo S. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicol Teratol* 2004; 26: 857-864.

Brooks WJ, Jarvis MF, Wagner GC. Astrocytes as a primary locus for the conversion MPTP into MPP+. *J Neural Transm* 1989; 76: 1-12.

Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? *Environ Health Perspect* 2006; 114: 156-164.

Brustein E, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Drapeau P. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J Physiol Paris* 2003a; 97: 77-86.

Brustein E, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Drapeau P. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J Physiol Paris* 2003b; 97: 77-86.

Budick SA and O'malley DM. Locomotor repertoire of the larval zebrafish: swimming, turning and prey capture. *J Exp Biol* 2000; 203: 2565-2579.

Bueler H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2009; 218: 235-246.

Burgess HA and Granato M. Sensorimotor gating in larval zebrafish. *J Neurosci* 2-5-2007; 27: 4984-4994.

Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* 1995; 18: 222-226.

Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S *et al.* The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15-6-2004; 101: 9103-9108.

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.

Cardoso SM. The mitochondrial cascade hypothesis for Parkinson's disease. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 3390-3397.

Carlberg C and Wiesenberg I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res* 1995; 18: 171-178.

CARLSON AJ. Science versus life. *J Am Med Assoc* 16-4-1955; 157: 1437-1441.

Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S *et al.* Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 25-9-2004; 364: 1167-1169.

Chen YC, Cheng CH, Chen GD, Hung CC, Yang CH, Hwang SP *et al.* Recapitulation of zebrafish *sncga* expression pattern and labeling the habenular complex in transgenic zebrafish using green fluorescent protein reporter gene. *Dev Dyn* 2009; 238: 746-754.

Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH *et al.* *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 29-6-2006; 441: 1162-1166.

Cohen G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 1984; 5: 77-82.

Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE, Mann D. Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A* 25-2-2000; 59: 229-234.

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* 15-4-2009; 169: 919-926.

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.

Crofts AR. The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol* 2004; 66: 689-733.

de Lau LM and Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5: 525-535.

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* 4-4-2008; 283: 9089-9100.

Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2013; 3: 461-491.

Doerrier C, Garcia JA, Volt H, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Ortiz F *et al.* Identification of mitochondrial deficits and melatonin targets in liver of septic mice by high-resolution respirometry. *Life Sci* 15-1-2015; 121: 158-165.

Erpapazoglou Z and Corti O. The endoplasmic reticulum/mitochondria interface: a subcellular platform for the orchestration of the functions of the PINK1-Parkin pathway? *Biochem Soc Trans* 2015; 43: 297-301.

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.

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* 25-7-1997; 230: 147-150.

Escames G, Leon J, Macias M, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 2003; 17: 932-934.

Escames G, Lopez LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB *et al.* Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 2006b; 40: 71-78.

Escobar A. Fisiopatología y neuropatología de la enfermedad de parkinson. *Rev Mex Neuroci* 2003; 4: 295-303.

Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J* 18-7-2012; 31: 3038-3062.

Fasano M, Bergamasco B, Lopiano L. Is neuromelanin changed in Parkinson's disease? Investigations by magnetic spectroscopies. *J Neural Transm (Vienna)* 2006; 113: 769-774.

Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem* 2003; 86: 1142-1148.

Finocchiaro LM and Glikin GC. Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. *J Pineal Res* 1998; 24: 22-34.

Flinn L, Mortiboys H, Volkmann K, Koster RW, Ingham PW, Bandmann O. Complex I deficiency and dopaminergic neuronal cell loss in parkin-deficient zebrafish (*Danio rerio*). *Brain* 2009; 132: 1613-1623.

Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; 12: 773-790.

Fujiwara M, Shibata M, Watanabe Y, Nukiwa T, Hirata F, Mizuno N *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase. Formation of L-kynurenine from L-tryptophan in cultured rabbit pineal gland. *J Biol Chem* 10-9-1978; 253: 6081-6085.

Gahtan E, Tanger P, Baier H. Visual prey capture in larval zebrafish is controlled by identified reticulospinal neurons downstream of the tectum. *J Neurosci* 5-10-2005; 25: 9294-9303.

Gainetdinov RR, Fumagalli F, Jones SR, Caron MG. Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J Neurochem* 1997; 69: 1322-1325.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011; 51: 1-16.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* 2013; 54: 245-257.

Garcia JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, Lopez LC *et al.* Disruption of the NF-kappaB/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice. *FASEB J* 2015; 29: 3863-3875.

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.

Gerfen CR, Keefe KA, Gauda EB. D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci* 1995; 15: 8167-8176.

Giroto S, Sturlese M, Bellanda M, Tessari I, Cappellini R, Bisaglia M *et al.* Dopamine-derived quinones affect the structure of the redox sensor DJ-1 through modifications at Cys-106 and Cys-53. *J Biol Chem* 25-5-2012; 287: 18738-18749.

Graybiel AM. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 1990; 13: 244-254.

Guo M. *Drosophila* as a model to study mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2.

Guyon JR, Mosley AN, Zhou Y, O'Brien KF, Sheng X, Chiang K *et al.* The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum Mol Genet* 15-3-2003; 12: 601-615.

Hamza TH, Zabetian CP, Tenesa A, Laederach A, Montimurro J, Yearout D *et al.* Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat Genet* 2010; 42: 781-785.

Haque ME, Mount MP, Safarpour F, Abdel-Messih E, Callaghan S, Mazerolle C *et al.* Inactivation of Pink1 gene in vivo sensitizes dopamine-producing neurons to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and can be rescued by autosomal recessive Parkinson disease genes, Parkin or DJ-1. *J Biol Chem* 29-6-2012; 287: 23162-23170.

Haque ME, Thomas KJ, D'Souza C, Callaghan S, Kitada T, Slack RS *et al.* Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 5-2-2008; 105: 1716-1721.

Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27: 119-130.

Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 2001-2018.

Hardeland R and Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond)* 10-9-2005; 2: 22.

Hardeland R and Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 2003; 34: 233-241.

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.

Hayashi T, Ishimori C, Takahashi-Niki K, Taira T, Kim YC, Maita H *et al.* DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity. *Biochem Biophys Res Commun* 18-12-2009; 390: 667-672.

Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* 4-10-1984; 311: 467-469.

Hentschel DM, Park KM, Cilenti L, Zervos AS, Drummond I, Bonventre JV. Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F923-F929.

Hernandez-Romero MC, Delgado-Cortes MJ, Sarmiento M, de Pablos RM, Espinosa-Oliva AM, Arguelles S *et al.* Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. *Neurotoxicology* 2012; 33: 347-360.

Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nurnberg G *et al.* Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 2006; 38: 1397-1405.

Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem* 25-2-1974; 249: 1311-1313.

Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 28-7-1988; 334: 345-348.

Hirsch EC, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 214-228.

Hissin PJ and Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74: 214-226.

Holzschuh J, Ryu S, Aberger F, Driever W. Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mech Dev* 2001; 101: 237-243.

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* 3-5-1963; 75: 309-312.

Hunot S and Hirsch EC. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53 Suppl 3: S49-S58.

Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol* 2013; 22: 11-17.

Iacovitti L, Stull ND, Johnston K. Melatonin rescues dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. *Brain Res* 12-9-1997; 768: 317-326.

Inazu M, Takeda H, Matsumiya T. Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. *J Neurochem* 2003; 84: 43-52.

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* 17-12-2010; 285: 39718-39731.

Isken A, Golczak M, Oberhauser V, Hunzelmann S, Driever W, Imanishi Y *et al.* RBP4 disrupts vitamin A uptake homeostasis in a STRA6-deficient animal model for Matthew-Wood syndrome. *Cell Metab* 2008; 7: 258-268.

Jagadeeswaran P, Paris R, Rao P. Laser-induced thrombosis in zebrafish larvae: a novel genetic screening method for thrombosis. *Methods Mol Med* 2006; 129: 187-195.

Jana S, Sinha M, Chanda D, Roy T, Banerjee K, Munshi S *et al.* Mitochondrial dysfunction mediated by quinone oxidation products of dopamine: Implications in dopamine cytotoxicity and pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 663-673.

Javitch JA and Snyder SH. Uptake of MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur J Pharmacol* 13-11-1984; 106: 455-456.

Javoy F, Sotelo C, Herbet A, Agid Y. Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 6-2-1976; 102: 201-215.

Jin BK, Shin DY, Jeong MY, Gwag MR, Baik HW, Yoon KS *et al.* Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) neurotoxicity in rats. *Neurosci Lett* 3-4-1998; 245: 61-64.

Johnson BN, Charan RA, LaVoie MJ. Recognizing the cooperative and independent mitochondrial functions of Parkin and PINK1. *Cell Cycle* 1-8-2012; 11: 2775-2776.

Josefa León, Germaine Escames, María I. Rodríguez, Luis C. López, Victor Tapias, Antonio Entrena *et al.* Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. 2006.

Josefa León, Manuel Macías, Germaine Escames, Encarna Camacho, Huda Khaldy, Miguel Martín *et al.* Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. 2000.

Kahle PJ, Waak J, Gasser T. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radic Biol Med* 15-11-2009; 47: 1354-1361.

Kalaria RN and Harik SI. Blood-brain barrier monoamine oxidase: enzyme characterization in cerebral microvessels and other tissues from six mammalian species, including human. *J Neurochem* 1987a; 49: 856-864.

Kalaria RN and Harik SI. Blood-brain barrier monoamine oxidase: enzyme characterization in cerebral microvessels and other tissues from six mammalian species, including human. *J Neurochem* 1987b; 49: 856-864.

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* 20-10-2010; 29: 3571-3589.

Kane LA, Lazarou M, Fogel AI, Li Y, Yamano K, Sarraf SA *et al.* PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J Cell Biol* 28-4-2014; 205: 143-153.

Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP, Jr. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci* 10-5-2006; 26: 5256-5264.

Kemp M, Go YM, Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* 15-3-2008; 44: 921-937.

Khaldy H, Escames G, Leon J, Bikjdaouene L, Acuna-Castroviejo D. Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 491-500.

Khaldy H, Escames G, Leon J, Vives F, Luna JD, Acuna-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: 100-107.

Khuchua Z, Yue Z, Batts L, Strauss AW. A zebrafish model of human Barth syndrome reveals the essential role of tafazzin in cardiac development and function. *Circ Res* 21-7-2006; 99: 201-208.

Kim C, Ho DH, Suk JE, You S, Michael S, Kang J *et al.* Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun* 2013; 4: 1562.

Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol* 2015; 24: 325-340.

Kitada T, Tong Y, Gautier CA, Shen J. Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *J Neurochem* 2009; 111: 696-702.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87: 99-163.

Kuhn DM, Arthur RE, Jr., Thomas DM, Elferink LA. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 1999; 73: 1309-1317.

Kumar MJ and Andersen JK. Perspectives on MAO-B in aging and neurological disease: where do we go from here? *Mol Neurobiol* 2004; 30: 77-89.

Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, Matsumoto T. Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 29-9-2006a; 348: 787-793.

Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, Shono M, Akaike M, Azuma H *et al.* Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol Genet* 15-3-2006b; 15: 883-895.

Kvetnoy IM, Ingel IE, Kvetnaia TV, Malinovskaya NK, Rapoport SI, Raikhlin NT *et al.* Gastrointestinal melatonin: cellular identification and biological role. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23: 121-132.

Lam CS, Korzh V, Strahle U. Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 1758-1762.

Lam SH and Gong Z. Modeling liver cancer using zebrafish: a comparative oncogenomics approach. *Cell Cycle* 2006; 5: 573-577.

Langenau DM, Feng H, Berghmans S, Kanki JP, Kutok JL, Look AT. Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 26-4-2005; 102: 6068-6073.

Langenbacher AD, Dong Y, Shu X, Choi J, Nicoll DA, Goldhaber JL *et al.* Mutation in sodium-calcium exchanger 1 (NCX1) causes cardiac fibrillation in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 6-12-2005; 102: 17699-17704.

Langston JW and Ballard PA, Jr. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med* 4-8-1983; 309: 310.

Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38: 1-9.

Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2-7-2004; 75: 765-790.

Leon J, Escames G, Rodriguez MI, Lopez LC, Tapias V, Entrena A *et al.* Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem* 2006; 98: 2023-2033.

Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. Structure of melatonin. *J A Chem Soc* 1959; 81: 6084-6085.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J A Chem Soc* 1958; 80: 2587-2592.

Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav* 30-1-2007; 90: 54-58.

Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A *et al.* Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 2008; 3: e1487.

Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG *et al.* Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 1999; 5: 1403-1409.

Lieschke GJ and Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 353-367.

Liu T and Borjigin J. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res* 2005; 39: 91-96.

Lopez A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lopez LC *et al.* Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 2009; 46: 188-198.

Lopez LC, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D. Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* 2006a; 27: 623-630.

Lopez LC, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D. Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* 2006b; 27: 623-630.

Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De MG, Gasser T *et al.* Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 25-5-2000; 342: 1560-1567.

Lumsden AL, Henshall TL, Dayan S, Lardelli MT, Richards RI. Huntingtin-deficient zebrafish exhibit defects in iron utilization and development. *Hum Mol Genet* 15-8-2007; 16: 1905-1920.

Macdonald R. Zebrafish immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 1999; 127: 77-88.

Macias 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.

Macias M, Rodriguez-Cabezas MN, Reiter RJ, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* 1999; 27: 86-94.

Manso MJ, Becerra M, Molist P, Rodriguez-Moldes I, Anadon R. Distribution and development of catecholaminergic neurons in the brain of the brown trout. A tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J Hirnforsch* 1993; 34: 239-260.

Martin 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.

Martin M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG *et al.* Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res* 2000b; 28: 242-248.

Martin 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.

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.

Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Antolin I, Rodriguez C, Reiter RJ. Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine* 2005; 27: 169-178.

McCord C.P. and Allen F.B. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 1917; 13: 207.

McKinley ET, Baranowski TC, Blavo DO, Cato C, Doan TN, Rubinstein AL. Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 30-11-2005; 141: 128-137.

Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 1993; 53: 373-382.

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

Milane L, Trivedi M, Singh A, Talekar M, Amiji M. Mitochondrial biology, targets, and drug delivery. *J Control Release* 10-6-2015; 207: 40-58.

Milanese C, Sager JJ, Bai Q, Farrell TC, Cannon JR, Greenamyre JT *et al.* Hypokinesia and reduced dopamine levels in zebrafish lacking beta- and gamma1-synucleins. *J Biol Chem* 27-1-2012; 287: 2971-2983.

Moore RY. The innervation of the mammalian pineal gland. *Prog Reprod Biol* 2016; 4: 1-29.

Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK *et al.* CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods* 2015; 12: 982-988.

Munoz P, Huenchuguala S, Paris I, Segura-Aguilar J. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons Dis* 2012; 2012: 920953.

Nasevicius A and Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 2000; 26: 216-220.

Naskar A, Prabhakar V, Singh R, Dutta D, Mohanakumar KP. Melatonin enhances L-DOPA therapeutic effects, helps to reduce its dose, and protects dopaminergic neurons in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *J Pineal Res* 2015; 58: 262-274.

Nathan AT and Singer M. The oxygen trail: tissue oxygenation. *Br Med Bull* 1999; 55: 96-108.

Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE. MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci* 23-2-1987; 40: 721-729.

Ninkovic J, Folchert A, Makhankov YV, Neuhauss SC, Sillaber I, Straehle U *et al.* Genetic identification of AChE as a positive modulator of addiction to the psychostimulant D-amphetamine in zebrafish. *J Neurobiol* 2006; 66: 463-475.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F *et al.* Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 6-10-2000; 275: 31311-31317.

Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 1-6-2001; 61: 1369-1379.

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 alpha-synuclein toxicity. *Dis Model Mech* 2014; 7: 571-582.

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N *et al.* Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2000; 23: S8-19.

Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev* 2007; 39: 443-455.

Ortiz F, Garcia JA, Acuna-Castroviejo D, Doerrier C, Lopez A, Venegas C *et al.* The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS. *J Pineal Res* 2014; 56: 71-81.

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* 1-6-2013; 22: 2152-2168.

Ozturk G, Akbulut KG, Guney S, Acuna-Castroviejo D. Age-related changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: modulation by melatonin. *Exp Gerontol* 2012; 47: 706-711.

Panula P, Sallinen V, Sundvik M, Kolehmainen J, Torkko V, Tiittula A *et al.* Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish* 2006; 3: 235-247.

Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Protective role of melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Arch Toxicol* 2015; 89: 923-939.

Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Reiter RJ. Phytomelatonin: a review. *J Exp Bot* 2009; 60: 57-69.

Parent A, Parent M, Charara A. Glutamatergic inputs to midbrain dopaminergic neurons in primates. *Parkinsonism Relat Disord* 1999; 5: 193-201.

Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P. Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 1272-1284.

Patki G and Lau YS. Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 99: 704-711.

Perry VH. Innate inflammation in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a009373.

Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M *et al.* Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem* 7-10-2005; 280: 34025-34032.

Petrovitch H, Ross GW, Abbott RD, Sanderson WT, Sharp DS, Tanner CM *et al.* Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. *Arch Neurol* 2002; 59: 1787-1792.

Pickrell AM and Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* 21-1-2015; 85: 257-273.

Pierrefiche G and Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol* 1995; 30: 213-227.

Pilsl A and Winklhofer KF. Parkin, PINK1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2012; 123: 173-188.

Pintor J, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A. Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT3 receptor. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 831-836.

Pisanu A, Lecca D, Mulas G, Wardas J, Simbula G, Spiga S *et al.* Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR-gamma agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2014; 71: 280-291.

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* 17-11-1994; 738: 419-420.

Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A *et al.* Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet* 1998; 18: 345-349.

Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L. PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol* 2007; 5: e172.

Prober DA, Rihel J, Onah AA, Sung RJ, Schier AF. Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish. *J Neurosci* 20-12-2006; 26: 13400-13410.

Qian L, Flood PM, Hong JS. Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J Neural Transm (Vienna)* 2010; 117: 971-979.

Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12: 151-180.

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* 2003a; 527: 539-548.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar TM, Flores LJ, Koppisepi S. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv Med Sci* 2007; 52: 11-28.

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* 2003b; 50: 1129-1146.

Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Saarela S. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 31-5-1994; 719: 1-12.

Ren Y and Feng J. Rotenone selectively kills serotonergic neurons through a microtubule-dependent mechanism. *J Neurochem* 2007; 103: 303-311.

Reyes-Toso CF, Ricci CR, de Mignone IR, Reyes P, Linares LM, Albornoz LE *et al.* In vitro effect of melatonin on oxygen consumption in liver mitochondria of rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24: 341-344.

Riachi NJ and Harik SI. Strain differences in systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice correlate best with monoamine oxidase activity at the blood-brain barrier. *Life Sci* 1988; 42: 2359-2363.

Richardson JR, Caudle WM, Guillot TS, Watson JL, Nakamaru-Ogiso E, Seo BB *et al.* Obligatory role for complex I inhibition in the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol Sci* 2007; 95: 196-204.

Rink E and Wullimann MF. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 19-1-2001; 889: 316-330.

Rodriguez LA, Algarabel S, Escudero J. Exploring recollection and familiarity impairments in Parkinson's disease. *J Clin Exp Neuropsychol* 2014; 36: 494-506.

Roper JA, Kang N, Ben J, Cauraugh JH, Okun MS, Hass CJ. Deep brain stimulation improves gait velocity in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol* 28-4-2016.

Rub C, Schroder N, Voos W. Biochemical properties of the kinase PINK1 as sensor protein for mitochondrial damage signalling. *Biochem Soc Trans* 2015; 43: 287-291.

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: 200-210.

Sai Y, Zou Z, Peng K, Dong Z. The Parkinson's disease-related genes act in mitochondrial homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* 2012; 36: 2034-2043.

Sallinen V, Kolehmainen J, Priyadarshini M, Toleikyte G, Chen YC, Panula P. Dopaminergic cell damage and vulnerability to MPTP in Pink1 knockdown zebrafish. *Neurobiol Dis* 2010; 40: 93-101.

Sallinen V, Torkko V, Sundvik M, Reenila I, Khrustalyov D, Kaslin J *et al.* MPTP and MPP+ target specific aminergic cell populations in larval zebrafish. *J Neurochem* 2009; 108: 719-731.

Saravanan KS, Sindhu KM, Mohanakumar KP. Melatonin protects against rotenone-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. *J Pineal Res* 2007; 42: 247-253.

Sauer H and Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 1994; 59: 401-415.

Sayer JA, Otto EA, O'Toole JF, Nurnberg G, Kennedy MA, Becker C *et al.* The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet* 2006; 38: 674-681.

Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008; 7: 97-109.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 3-6-1989; 1: 1269.

Schapira AH and Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011; 26: 1049-1055.

Schapira AH, Olanow CW, Greenamyre JT, Bezdard E. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet* 9-8-2014; 384: 545-555.

Schonberger J, Wang L, Shin JT, Kim SD, Depreux FF, Zhu H *et al.* Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 2005; 37: 418-422.

Shafizadeh E, Huang H, Lin S. Transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein. *Methods Mol Biol* 2002a; 183: 225-233.

Shafizadeh E, Paw BH, Foott H, Liao EC, Barut BA, Cope JJ *et al.* Characterization of zebrafish merlot/chablis as non-mammalian vertebrate models for severe congenital anemia due to protein 4.1 deficiency. *Development* 2002b; 129: 4359-4370.

Sharma R, McMillan CR, Tenn CC, Niles LP. Physiological neuroprotection by melatonin in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Res* 12-1-2006; 1068: 230-236.

Shults CW. Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 7-2-2006; 103: 1661-1668.

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F *et al.* Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 1994; 36: 348-355.

Skulachev VP. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med* 1999; 20: 139-184.

Smeyne RJ and Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 24-3-2005; 134: 57-66.

Song Y and Cone RD. Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J* 2007; 21: 2042-2049.

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.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 28-8-1997; 388: 839-840.

Srinivasan V, Cardinali DP, Srinivasan US, Kaur C, Brown GM, Spence DW *et al.* Therapeutic potential of melatonin and its analogs in Parkinson's disease: focus on sleep and neuroprotection. *Ther Adv Neurol Disord* 2011a; 4: 297-317.

Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Brown GM, Cardinali DP. Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Int J Alzheimers Dis* 2011b; 2011: 326320.

Stackley KD, Beeson CC, Rahn JJ, Chan SS. Bioenergetic profiling of zebrafish embryonic development. *PLoS One* 2011; 6: e25652.

Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A *et al.* Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; 30: 243-247.

Stott SR and Barker RA. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2014; 39: 1042-1056.

Su LY, Li H, Lv L, Feng YM, Li GD, Luo R *et al.* Melatonin attenuates MPTP-induced neurotoxicity via preventing CDK5-mediated autophagy and SNCA/alpha-synuclein aggregation. *Autophagy* 3-10-2015; 11: 1745-1759.

Sun Z and Gitler AD. Discovery and characterization of three novel synuclein genes in zebrafish. *Dev Dyn* 2008; 237: 2490-2495.

Szmuskowicz AW and Heinzelman RV. Synthesis of N-acetilmethoxytryptamine. *J Org Chem* 1960; 25: 287.

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

Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R *et al.* N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 2001; 15: 2294-2296.

Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules* 2015; 20: 18886-18906.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF. Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging. *Biol Signals Recept* 1999; 8: 70-74.

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.

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* 27-12-2010; 191: 1367-1380.

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.

Taylor KS, Cook JA, Counsell CE. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 905-906.

Thomas B and Mohanakumar KP. Melatonin protects against oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse nigrostriatum. *J Pineal Res* 2004; 36: 25-32.

Tobin JL, Di FM, Eichers E, May-Simera H, Garcia M, Yan J *et al.* Inhibition of neural crest migration underlies craniofacial dysmorphology and Hirschsprung's disease in Bardet-Biedl syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 6-5-2008; 105: 6714-6719.

Tomasiewicz HG, Flaherty DB, Soria JP, Wood JG. Transgenic zebrafish model of neurodegeneration. *J Neurosci Res* 15-12-2002; 70: 734-745.

Toni M and Cioni C. Fish Synucleins: An Update. *Mar Drugs* 2015; 13: 6665-6686.

Tucker B, Richards RI, Lardelli M. Contribution of mGluR and Fmr1 functional pathways to neurite morphogenesis, craniofacial development and fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1-12-2006; 15: 3446-3458.

Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 1968; 5: 107-110.

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.

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* 21-5-2004a; 304: 1158-1160.

Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V *et al.* PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004b; 56: 336-341.

van der Merwe C, Jalali Sefid DZ, Christoffels A, Loos B, Bardien S. Evidence for a common biological pathway linking three Parkinson's disease-causing genes: parkin, PINK1 and DJ-1. *Eur J Neurosci* 2015; 41: 1113-1125.

Van Laar VS and Berman SB. The interplay of neuronal mitochondrial dynamics and bioenergetics: implications for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2013; 51: 43-55.

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.

Venegas C, Garcia JA, Escames G, Ortiz F, Lopez A, Doerrier C *et al.* Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res* 2012; 52: 217-227.

Volt H, Garcia JA, Doerrier C, Diaz-Casado ME, Guerra-Librero A, Lopez LC *et al.* Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res* 2016; 60: 193-205.

Von GC, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 2002; 309: 151-162.

Wang H, Walaszczyk EJ, Li K, Chung-Davidson YW, Li W. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection and ultra-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of indoleamine neurotransmitters and their metabolites in sea lamprey plasma. *Anal Chim Acta* 6-4-2012; 721: 147-153.

Watson MB, Richter F, Lee SK, Gabby L, Wu J, Masliah E *et al.* Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp Neurol* 2012; 237: 318-334.

Welten MC, de Haan SB, van den Boogert N, Noordermeer JN, Lamers GE, Spaink HP *et al.* ZebraFISH: fluorescent in situ hybridization protocol and three-dimensional imaging of gene expression patterns. *Zebrafish* 2006; 3: 465-476.

Wen L, Wei W, Gu W, Huang P, Ren X, Zhang Z *et al.* Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Dev Biol* 1-2-2008; 314: 84-92.

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

Westlund KN, Denney RM, Kochersperger LM, Rose RM, Abell CW. Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science* 11-10-1985; 230: 181-183.

Whitehead RE, Ferrer JV, Javitch JA, Justice JB. Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. *J Neurochem* 2001; 76: 1242-1251.

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: 500-502.

Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D *et al.* Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev* 1-10-2005; 19: 2320-2330.

Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 2011; 26 Suppl 1: S1-58.

Withyachumnarnkul B, Limpanawattanukul M, Trakulrunsi W. Retention of radioactive substances in the hypothalamus, anterior pituitary, and reproductive organs of male rats after 3H-melatonin administration. *Life Sci* 12-5-1986; 38: 1757-1765.

Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z, Abramov AY, Miljan EA, Keen G *et al.* PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One* 2008; 3: e2455.

Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 637-639.

Xie CL, Shao B, Chen J, Zhou Y, Lin SY, Wang WW. Effects of neurostimulation for advanced Parkinson's disease patients on motor symptoms: A multiple-treatments meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep* 2016; 6: 25285.

Yang HW, Kutok JL, Lee NH, Piao HY, Fletcher CD, Kanki JP *et al.* Targeted expression of human MYCN selectively causes pancreatic neuroendocrine tumors in transgenic zebrafish. *Cancer Res* 15-10-2004; 64: 7256-7262.

Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2-4-1996; 93: 2696-2701.

Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 3-6-2011; 286: 19630-19640.

Yun J, Puri R, Yang H, Lizzio MA, Wu C, Sheng ZH *et al.* MUL1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway in regulating mitofusin and compensates for loss of PINK1/parkin. *Elife* 2014; 3: e01958.

Zecca L, Wilms H, Geick S, Claasen JH, Brandenburg LO, Holzknrecht C *et al.* Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2008; 116: 47-55.

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

Zhang HM and Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res* 2014; 57: 131-146.

Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML *et al.* Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 2005; 19: 533-542.

Zuo L and Motherwell MS. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene* 10-12-2013; 532: 18-23.

ANEXO

Melatonin rescues zebrafish embryos from the parkinsonian phenotype restoring the parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network

Abstract: Multiple studies reporting mitochondrial impairment in Parkinson's disease (PD) involve knockout or knockdown models to inhibit the expression of mitochondrial-related genes, including *parkin*, *PINK1*, and *DJ-1* ones. Melatonin has significant neuroprotective properties, which have been related to its ability to boost mitochondrial bioenergetics. The meaning and molecular targets of melatonin in PD are yet unclear. Zebrafish are an outstanding model of PD because they are vertebrates, their dopaminergic system is comparable to the nigrostriatal system of humans, and their brains express the same genes as mammals. The exposure of 24 hpf zebrafish embryos to MPTP leads to a significant inhibition of the mitochondrial complex I and the induction of *snca* gene, responsible for enhancing γ -synuclein accumulation, which is related to mitochondrial dysfunction. Moreover, MPTP inhibited the *parkin/PINK1/DJ-1* expression, impeding the normal function of the parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network to remove the damaged mitochondria. This situation remains over time, and removing MPTP from the treatment did not stop the neurodegenerative process. On the contrary, mitochondria become worse during the next 2 days without MPTP, and the embryos developed a severe motor impairment that cannot be rescued because the mitochondrial-related gene expression remained inhibited. Melatonin, added together with MPTP or added once MPTP was removed, prevented and recovered, respectively, the parkinsonian phenotype once it was established, restoring gene expression and normal function of the parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 loop and also the normal motor activity of the embryos. The results show, for the first time, that melatonin restores brain function in zebrafish suffering with Parkinson-like disease.

María E. Díaz-Casado^{1,2}, Elena Lima¹, José A García^{1,2}, Carolina Doerrier^{1,2}, Paula Aranda^{1,2}, Ramy KA Sayed^{1,3}, Ana Guerra-Librero^{1,2}, Germaine Escames G^{1,2}, Luis C López^{1,2} and Darío Acuña-Castroviejo^{1,2,4}

¹Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, Granada, Spain; ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, Granada, Spain; ³Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Sohag University, Sohag, Egypt; ⁴Unidad de Gestión Clínica de Laboratorios Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

Key words: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, mitochondrial complex I, mitochondrial-related genes, parkinson's disease, zebrafish

Address reprint requests to Darío Acuña-Castroviejo, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, Avda. del Conocimiento s/n, 18016 Granada, Spain.
E-mail: dacuna@ugr.es

Received March 3, 2016;
Accepted April 8, 2016.

Introduction

Zebrafish (*Danio rerio*) rise as an outstanding model of Parkinson's disease because it is a vertebrate and their dopaminergic system is well characterized and comparable to the nigrostriatal system in humans [1, 2]. Among others, *alpha-synuclein*, *parkin*, *PINK1*, and *DJ-1* genes, whose mutations differently affect mitochondrial homeostasis, have been identified by genetic analyses in patients with familial Parkinson's disease, and they are also present in zebrafish brain [3, 4]. Parkinson's disease courses with the appearance of Lewy bodies [5, 6], which are intracellular protein aggregates mainly composed of α -synuclein [7]. Zebrafish lacks α -syn gene, but contains three genes, *snca*, *snca*, and *snca*, expressing β - and two γ -synuclein isoforms, respectively [8, 9]. γ -syn1 and β -syn are required for spontaneous movements and dopaminergic functions, with roles similar to those in humans [10]. Parkin, a ubiquitin E3 ligase [11] also present in the zebrafish [3], is phosphorylated by PINK1, an ubiquitin kinase that detects and binds to damaged mitochondrial [12]. Once activated

parkin E3 ligase activity by PINK1 [13, 14], the former is recruited by the mitochondria, starting the autophagic destruction of damaged mitochondria [15, 16]. Another mitochondrial protein, DJ-1, is also expressed in zebrafish DA neurons [17]. DJ-1 is regulated by oxidative modification and translocated to the nucleus where it regulates antioxidant [18, 19] and *tyrosine hydroxylase* genes expression [20]. The three genes *parkin*, *PINK1*, and *DJ-1* participate in a common biological pathway related to mitochondrial homeostasis, and they are responsible for the majority of the cases of autosomal, recessive, early-onset Parkinson's disease [3, 21, 22]. Recently identified, *MUL1* encodes MUL1, a mitochondrial E3 protein ligase that may counteract the *PINK1/parkin*-mutant phenotypes [23].

Clinical and experimental data support a specific defect of mitochondrial CI in the substantia nigra in Parkinson's disease [24, 25]. Because 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a neurotoxin, induces many key features of Parkinson's disease [26] and primarily affects the mitochondria, it could be proposed that sporadic

Parkinson's disease may start with mitochondrial impairment that surpasses the capacity of the above-described mitochondrial-related genes to recover a healthy mitochondrial status.

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine, aMT) is a highly conserved indoleamine also present in zebrafish [27] and located in all cellular compartments including brain mitochondria [28, 29]. Due to its antioxidant and anti-inflammatory activities, melatonin maintains mitochondrial homeostasis under different experimental conditions [28, 30–34], including different models of parkinsonism [35–38]. These data account for a preventive role of melatonin against Parkinson's disease development, but no information exists regarding the capacity of melatonin to recover from an established Parkinson's disease condition. Moreover, there are no studies that identifying whether these protective effects of melatonin on mitochondria in Parkinson's disease are related to the regulation of the expression of the mitochondrial-related genes above comment.

In this study, we used MPTP to produce mitochondrial damage in 72–120 hpf zebrafish embryos to assess whether primary mitochondrial dysfunction induced by MPTP may secondarily affect the expression of *parkin*, *PINK1*, *DJ-1*, and *MUL1*, leading to the inability of the parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network to maintain the mitochondrial function. This model allows us to examine parkinsonian signs secondary to mitochondrial impairment, such as the loss of motility.

Materials and methods

Fish maintenance

Adult zebrafish (*Danio rerio*) of the AB line were provided by ZFBiolabs S.L (Madrid, Spain) and used as breeding stocks. The fish line was maintained in the University of Granada's facility at a water temperature of $28.5 \pm 1^\circ\text{C}$ and under a photoperiod of 14:10 hr (lights on at 08:00 hr) in a recirculation aquaculture system (Aquaoneering Incorporated, Barcelona, Spain). Embryos were obtained from mating pairs of adult zebrafish and were cultured in E3 medium. Fish feeding, breeding, and maintenance were performed according to the published protocols [39]. Tricaine was used to anesthetize animals when necessary. All experiments were performed according to a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Granada (procedures CEEA 2009-254 and 2010-275) and were in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS #123) and the Spanish law (R.D. 53/2013).

MPTP and melatonin treatment

Embryos at 24 hpf (hours postfertilization) were used for the treatments with a time course over a period of 2 days or 4 days (Fig. 1). At 24 hpf, the embryos were dechorionated manually and were randomly distributed in 24-well plate (six embryos per well) containing E3 medium with or without the drugs in a total volume of 1 mL. Stock

solution of MPTP (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was freshly prepared in E3 medium at a concentration of 50 mM and at a final concentration of $600 \mu\text{M}$ in the zebrafish E3 medium. Melatonin (Fagrón Ibérica, Barcelona, Spain) was dissolved in 1% dimethylsulfoxide (DMSO) and used at a final concentration of 0.2 and $1 \mu\text{M}$ in the E3 medium. The embryos were exposed to MPTP from 24 hpf to 72 hpf. For neuroprotective experiments, melatonin was added to the wells containing zebrafish embryos together with MPTP on 24–72 hpf. Another two groups of zebrafish embryos were followed up to 120 hpf. Both groups were incubated with MPTP from 24 hpf to 72 hpf, and melatonin was added in one group from 24 hpf to 120 hpf with MPTP (preventive treatment), and in the other group, melatonin was added from 72 hpf to 120 hpf (recovery treatment). Control groups received DMSO. Half of the solution of each group was replaced daily with a fresh prewarmed solution. After completing the experimental protocols, that is, 72 hpf and 120 hpf, the embryos were anesthetized with tricaine and sacrificed. Phenylthiourea (PTU, Sigma-Aldrich) was added at a final concentration of 0.003% to prevent the pigmentation of embryos. Previous studies have shown that PTU does not affect the expression of the *tyrosine hydroxylase* (*TH*) gene in the developing brain [1].

Gene expression analyses

Total cellular RNA from the frozen tissue of embryos was extracted and electrophoresed in 1.5% agarose to check RNA integrity. RNA was extracted with RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Hilden, GER, Europe). Total RNA was quantified by optical density at 260/280 nm, and it was used to generate cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, United States). Amplification was performed with quantitative real-time PCR, by the standard curve method, with specific Taqman probes (Applied Biosystems) for the targeted gene zebrafish *park-2* (Dr03135273_m1); *park7* (Dr03083195_m1); *PINK1* (Dr03423116_m1); *th* (Dr03437804_m1); *nos2a* (Dr03124752_m1); *sncga* (Dr03181390_s1); *MUL1a* (Dr03135397_g1); *sad2* (Dr03100019_m1); *gpx1a* (Dr03071768_m1); *gsw* (Dr03109438_m1); and the zebrafish *actb1* (Dr03432610_m1) probe as a standard loading control.

Sample preparation and Western blot analysis in embryos

Western blot analyses were performed in 50-pooled 72 hpf zebrafish embryos. Samples were homogenized in buffer A (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, pH 7.6) with a protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific, Madrid, Spain). Homogenates were sonicated and centrifuged at 1000 g for 5 min at 4°C , and the resultant supernatant was used for Western blot analysis. Proteins were quantified by Bradford assay, and $40 \mu\text{g}$ of protein was mixed with sample buffer. After denaturation at 99°C for 5 min, the samples were loaded in 12% SDS-PAGE gel. The extracts were electrophoresed using the mini-PROTEAN Tetra Cell

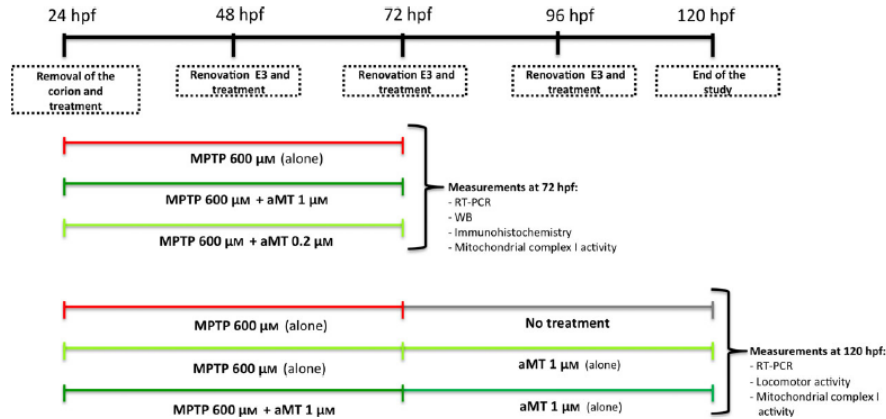


Fig. 1. Experimental model diagram. Detailed schedule of the experimental paradigm, including treatment's timing and doses with MPTP and/or melatonin (aMT), and measurements conducted at each embryo's age.

electrophoresis system (Bio-Rad, Madrid, Spain). The proteins were transferred onto PVDF membranes using a mini Trans-blot Cell (Bio-Rad) and probed with target antibodies. Protein-antibody interactions were detected with peroxidase-conjugated horse anti-mouse or anti-rabbit IgG (immunoglobulin G) antibodies using Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Sciences, Barcelona, Spain). Bands were quantified with the Kodak Image Station 2000R (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) and a Kodak 1D 3.6 software. Protein band intensity was normalized to RPL13A, and the data were expressed in terms of percent to control embryos. The following primary antibodies were used: anti-PINK1 (10006283, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, United States), anti-PARK7/DJ1 (ab11251, Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-parkin (ab15954, Abcam), anti-E3 ubiquitin-protein ligase MUL1 (ab99096, Abcam), anti-tyrosine hydroxylase (MAB318, Millipore, Madrid, Spain), anti- γ -synuclein (ab55424, Abcam), anti-mouse iNOS (610432, BD Biosciences Pharmingen) and anti-RPL13A (ab96074, Abcam) antibody as a standard loading control.

Assessment of the locomotor activity

Locomotor activity was tested in 120 hpf zebrafish embryos. Fish were raised in 24-well plate containing 1 mL of E3 medium with or without treatment as stated. Larval behavior was analyzed using a digital video tracking system consisting of a CCD camera connected to a computer, and the acquired images were processed using SMART 3.0 (Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Spain). Distance travelled (cm) and velocity (cm/s) of each fish were quantified. Only fish exhibiting normal phenotype were used for the analysis. The larval swimming patterns were recorded for 5 min with 6–13 replicates per group.

Immunohistochemistry

Embryos were treated with 0.003% PTU for removing pigmentation. All incubation steps were carried out on a shaker. The embryos were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 3 hr at room temperature and then washed in phosphate-buffered saline containing 0.3% Triton X-100 (PBS-T) for 3×15 min at room temperature (RT). Then, the embryos were treated with 10 mM sodium citrate buffer for the antigen retrieval. Incubation with anti-tyrosine hydroxylase antibody (MAB318, 1:1000) and mouse anti-mouse iNOS (610432, Becton Dickinson, 1:2000) was performed in Dako REAL Antibody Diluent (S2022, Dako, Barcelona, Spain) overnight at 4°C. The next day, the embryos were washed in PBS-T 3×15 min at RT. For detection, the embryos were incubated with goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (A11029, Life technology, Carlsbad, California, United States) in PBS-T plus 1% goat serum for 2 hr at RT and then washed in PBS-T 3×15 min at RT. The embryos were mounted on microscope cover slips with agarose [40, 41].

Determination of mitochondrial complex I activity

Embryos harvested at 72 and 120 hpf (70 embryos per sample) were homogenized in 200 μL buffer (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M KCl, pH 7.5) and then stored at -80°C until their use. The activity of mitochondrial CI (NADH CoQ oxidoreductase, expressed as nmol oxidized NADH/min/mg prot) was spectrophotometrically measured in 500 μL final volume following the oxidation rate of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at 340 nm in an UV-1700 spectrophotometer (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany). The assay buffer contained 50 mM KH_2PO_4 , 20 mM KCN, 25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 0.2 mg/mL antimycin A, 5 mM

decylubiquinone, 50 mM MgCl₂, and the zebrafish homogenate (35 μL), the reaction was started with 1.3 mM NADH and inhibited with 100 μg/mL of rotenone [42, 43].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6 scientific software (GraphPad, Software, Inc. La Jolla, CA, USA). Data are expressed as the mean ± S.E.M of five experiments per group. One-way ANOVA with a Tukey post hoc test was used to compare the differences between the experimental groups. A *P*-value of 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

As we expected, *iNOS* expression and content increased significantly in zebrafish embryos incubated with 600 μM MPTP (*P* < 0.001, Fig. 2A,B), supporting the notion that neuroinflammatory response is driven by the neurotoxin. By immunohistochemistry, we showed that this increase in *iNOS* was greater in the diencephalon and olfactory

bulb in MPTP group (Fig. 2a–f), coinciding with the area where it is produced the highest mortality of dopaminergic neurons. Melatonin administration counteracted MPTP effect and produced a significant decrease in the *iNOS* mRNA and protein contents in both aMT 1 and aMT 0.2 groups compared with MPTP group (*P* < 0.001, Fig. 2A,B).

MPTP causes dopaminergic neuron death by two main mechanisms, which resemble those occurring in human Parkinson’s disease, that is, the oxidative stress caused by mitochondrial impairment and dopamine autoxidation, and the subsequent inflammation. So, we can observe also in zebrafish embryos that MPTP caused a profound reduction in the mRNA expression and protein content of TH, with the consequent loss of dopaminergic neurons and their axons (*P* < 0.001, Fig. 3A,B). These data reflect the impairment of dopamine synthesis by the embryos in the presence of MPTP.

The effects of melatonin to regulate the innate immunity and to enhance the production of dopamine are well supported by the literature. Here, we show that incubation of the embryos with melatonin was almost insensitive to the deleterious effects of MPTP, preventing

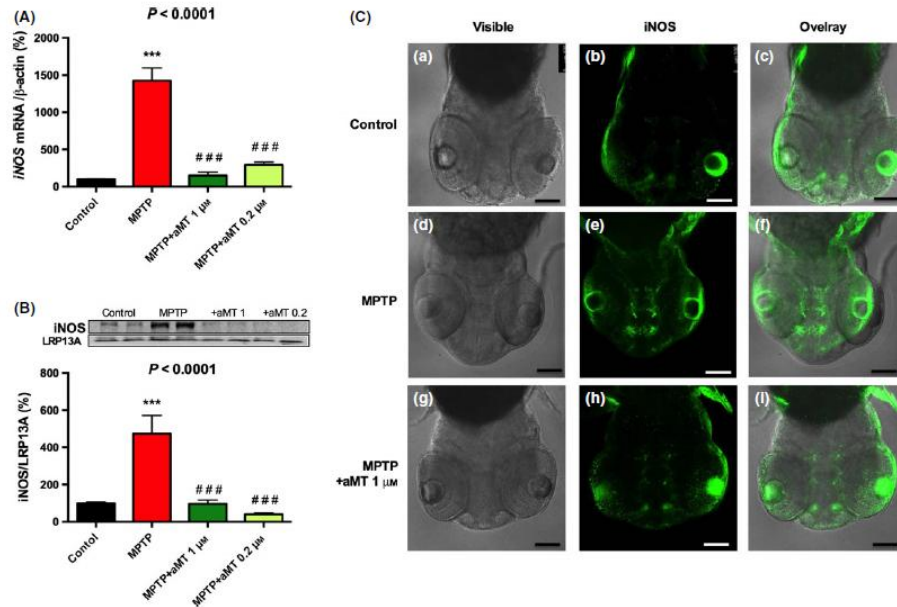


Fig. 2. Melatonin prevented neuroinflammation induced by MPTP. Embryos were treated with MPTP and melatonin (aMT) at 24 hpf and analyzed 48 hr later, that is, at 72 hpf. (A) MPTP increased significantly the *iNOS* mRNA expression and the *iNOS* protein content, analyzed by qRT-PCR and Western blot, respectively. Melatonin recovered the expression and protein content of *iNOS*. (B) *iNOS* protein content was found to be increased by the MPTP. The treatment with 1 μM melatonin maintained the normal levels of *iNOS* protein (C) Immunohistochemical labeling using anti-*iNOS* antibody. Compared with the control (a,b), MPTP increased *iNOS* in olfactory bulb and diencephalic areas of the embryos (d,e), which was prevented by 1 μM melatonin treatment (g,h). Data are presented as mean ± S.E.M. (n = 5–7). ****P* < 0.001 versus control; ###*P* < 0.001 versus MPTP. One-way ANOVA with a Tukey’s post hoc test. Scale bars: 100 μm. n = 3 animals/group for immunohistochemical analysis.

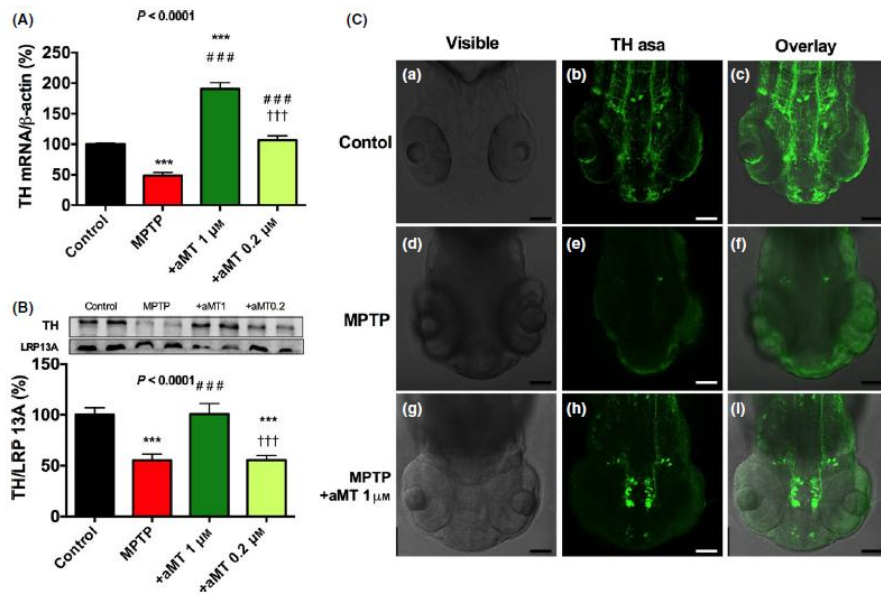


Fig. 3. Melatonin prevented the dopaminergic neuron loss from the deleterious effect of MPTP. Embryos were treated with MPTP and melatonin (aMT) at 24 hpf and the *TH* mRNA expression and TH protein content were analyzed by qRT-PCR and Western blot, respectively, 48 hr later, that is, at 72 hpf. (A) Both the *TH* mRNA expression and TH protein content decreased by MPTP treatment, an effect absolutely prevented by melatonin. (B) TH protein content reduced by the neurotoxin. Melatonin 1 μM maintained the normal levels of TH protein. (C) Immunohistochemical labeling using anti-tyrosine hydroxylase antibody. Neurons positive for TH, localized in olfactory bulb and diencephalic area of zebrafish embryo (a,b), were found to be reduced in embryos treated with MPTP (d,f), but preserved in the presence of 1 μM melatonin (g-i). Data are presented as mean ± S.E.M (n = 5–7). ****P* < 0.001 versus control; ###*P* < 0.001 versus MPTP; †††*P* < 0.001 versus +aMT 1 μM. One-way ANOVA with a Tukey's post hoc test. Scale bars: 100 μm. n = 3 animals of each group for immunohistochemical analysis.

neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration and recovering the expression of *TH* even upon control values [Figs 2(A) and 3(A)].

Using immunofluorescence with an antibody for TH, we investigated the effects of melatonin on the different dopaminergic neural cluster. MPTP exerted the effects on several TH-ir neuron groups, so that MPTP embryos showed an important reduction in the amount of TH-ir neurons related to control group. The neuron populations most severely affected by MPTP were the olfactory bulb, pretectal, and diencephalic populations. The dopaminergic neurons were found to be reduced to small groups of neurons in the locus coeruleus (Fig. 3a–f). Melatonin administration at 1 μM in MPTP-treated embryos caused a remarkable increase in TH immunoreactivity mainly in the diencephalic and olfactory bulb neuron populations (Fig. 3g–i), thus preventing the deleterious effects of the neurotoxin on the embryo's dopaminergic system.

Besides DA loss, Parkinson's disease also courses with the accumulation of α-synuclein, but zebrafish lacks α-syn gene, and then here, we assessed the γ1-syn turnover in zebrafish embryos, showing that there is a basal *sncg1* mRNA expression that is not reflected in detectable levels

of protein. MPTP, however, caused a profound increase in the *sncg1* mRNA expression and γ1-syn protein content at 72 hpf (Fig. 4A). Melatonin caused a dose-dependent reduction in the *sncg1* expression, leading to undetectable protein levels of γ1-syn. So, melatonin behaves as a protector of the cell physiology, preventing the aggregation of γ1-syn in zebrafish brain.

Because the first target of MPTP is the mitochondria, the mitochondrial failure following MPTP treatment may be related to the alteration in the expression of the genes related to mitochondrial homeostasis. Firstly, the PINK1/parkin connection was analyzed, and our results show that parkin levels were undetectable by Western blot after MPTP treatment, whereas PINK1 levels were found to be significantly reduced by MPTP (*P* < 0.01, Fig. 4B,C). These data correlate with a reduction in the mRNA expression of *parkin* (*P* < 0.01, Fig. 4B) and, in a lesser extent, of *PINK1*. In these conditions, although there is enough PINK1 to detect mitochondrial damage and phosphorylate parkin, the absence of the latter prevents the activation of its E3 ligase activity. Another player in the PINK1/parkin connection is DJ-1. *DJ-1* mRNA expression decreased significantly (*P* < 0.001, Fig. 4D) in the

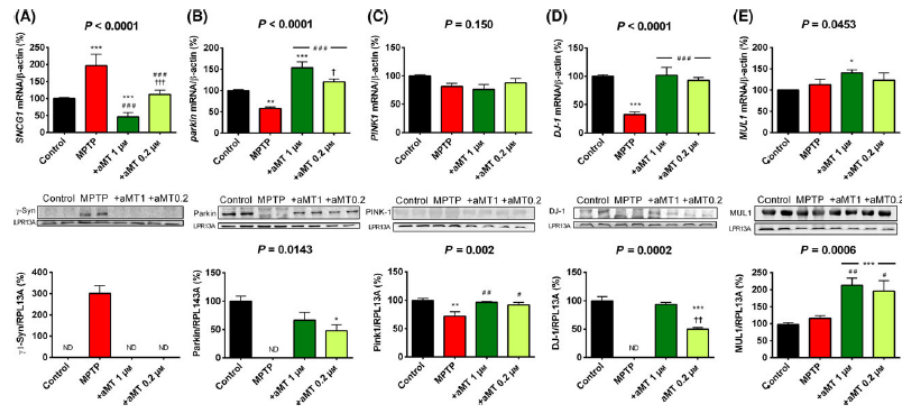


Fig. 4. Melatonin prevented γ -syn1 accumulation and restored parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network disrupted by MPTP. Embryos were treated with MPTP and melatonin (aMT) at 24 hpf and analyzed 48 hr later, that is, at 72 hpf by qRT-PCR and Western blot. (A) Enhanced expression of *snca* mRNA and of γ -syn1 protein content induced by MPTP, an effect antagonized by melatonin (aMT). (B) Melatonin prevented the inhibition of *parkin* gene expression and parkin protein induced by MPTP. (C) *PINK1* gene expression was unmodified by MPTP, although PINK1 protein content was found to be reduced by the neurotoxin. Melatonin maintained normal levels of PINK1 protein. (D) MPTP reduced significantly *DJ-1* mRNA expression and DJ1 protein content, which were antagonized in the presence of melatonin. (E) *MUL1a* mRNA expression and MUL1 protein content were unmodified by MPTP, although melatonin increased both of them. Data are presented as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ versus Control, ** $P < 0.01$ versus Control, *** $P < 0.001$ versus control; # $P < 0.05$ versus MPTP, ## $P < 0.01$ versus MPTP, ### $P < 0.001$ versus MPTP; $^{\dagger}P < 0.05$ versus +aMT 1 μ M, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ versus +aMT 1 μ M, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$ versus +aMT 1 μ M. One-way ANOVA with a Tukey's post hoc test ($n = 5-9$).

presence of MPTP, leading to undetectable levels of DJ-1 protein content by Western blot (Fig. 4D). MUL1 is involved in the regulation of the PINK1/parkin/DJ-1 pathway. In our hands, *MUL1* mRNA expression and MUL1 protein content did not change in MPTP-treated embryos, making it unable to counteract the PINK1/parkin/DJ-1 pathway alteration (Fig. 4E). Consequently, the embryos from the parkinsonian phenotype are unable to remove dysfunctional mitochondria; thus, they can form more ROS, enhancing the oxidative status and the bioenergetic failure.

With the protective effects of melatonin against MPTP reported above, we wonder whether melatonin may protect the mitochondria by preventing the deleterious effects of MPTP on the mitochondrial-related genes here analyzed. Although in some cases melatonin had a concentration-dependent effect, it seems clear that at the lower dose used, 200 nM, the indoleamine was able to counteract the alteration in the gene expression of *Parkin*, *PINK1*, and *DJ-1*, normalizing the protein expression of their coded proteins (Fig. 4B–D). Melatonin also enhanced the mRNA expression of *MUL1* and of its coded protein MUL1 ($P < 0.01$, Fig. 4E), which suggests that melatonin has a broad neuroprotective role, upregulation of the proteins required for a full mitochondrial work.

To analyze whether the neuroprotective properties of melatonin here reported do not only prevent the effects of MPTP on zebrafish embryos but also can rescue these embryos once the parkinsonian phenotype is yet established, we used an additional experimental paradigm. Here, zebrafish embryos were incubated with MPTP from

24 hpf to 72 hpf and, then, they were maintained in the absence of MPTP up to 120 hpf. The discontinuation of MPTP was required because the mortality of embryos in the presence of MPTP beyond 72 hpf was almost 100%. Another group of embryos was incubated with 1 μ M melatonin from 24 hpf to 120 hpf, that is, 5 days of treatment (preventive treatment), and a third group of embryos was treated with 1 μ M melatonin from 72 hpf to 120 hpf, that is, 2 days of treatment (recovery treatment) (Fig. 5). The activity of the mitochondrial complex I in the MPTP group decreased compared with the control group, which was much higher at 120 hpf (83.17% decrease) than at 72 hpf (56.61% decrease), suggesting that the mitochondrial deterioration continues after MPTP discontinuation ($P < 0.001$, Fig. 5A,B). In embryos at 72 hpf, 0.2 μ M melatonin totally blunted the effect of MPTP on CI activity and 1 μ M melatonin significantly increased CI activity more than three times its basal value. In embryos at 120 hpf, melatonin treatment partially prevented the reduction in complex I activity ($P < 0.01$, Fig. 5A,B). Melatonin also prevented and recovered normal *snca1*, *iNOS*, and *TH* gene expression ($P < 0.001$, Fig. 5C–E). Moreover, melatonin prevented and recovered the mitochondrial-related genes expression of *parkin*, *PINK1*, *DJ-1*, and *MUL1* ($P < 0.001$, Fig. 5F–I).

Motor dysfunction is typically related to dopaminergic degeneration in Parkinson's disease, and thus, we next asked whether the loss of TH-ir cells induced by MPTP affected locomotor behavior in 120 hpf zebrafish embryos. The total distance travelled and the maximal swimming speed were found to be significantly reduced by MPTP

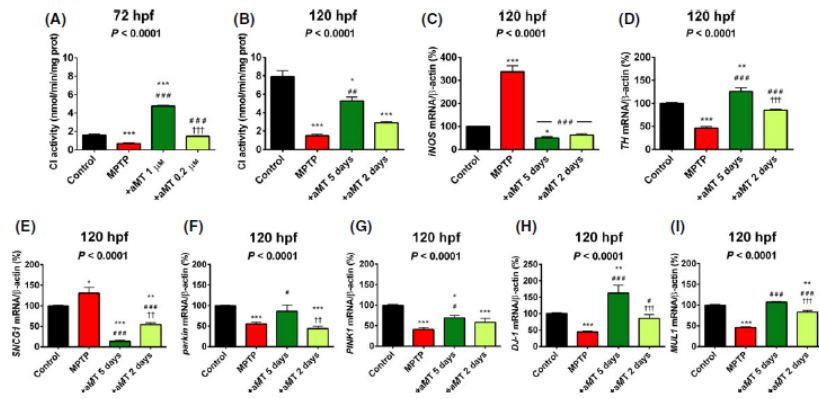


Fig. 5. Melatonin recovered parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network and mitochondrial function disrupted by MPTP in embryos 120 hpf. Embryos were treated with MPTP and/or melatonin (aMT) from 24 hpf to 72 hpf; then, MPTP was removed and the embryos continued with melatonin alone until 120 hpf (+aMT 5-day group). Another group of embryos was treated with MPTP alone from 24 hpf to 72 hpf; then, MPTP was removed and the embryos were exposed only to melatonin (+aMT 2-day group) from 72 hpf to 120 hpf. For comparison, mitochondrial complex I activity at 72 hpf is enclosed. (A) Mitochondrial complex I activity measured fivefold in the homogenates of embryos 72 hpf. The reduction in complex I activity by MPTP was absolutely prevented by 0.2 μ M melatonin, whereas 1 μ M melatonin enhanced the activity of complex I above control. (B) Complex I activity, measured fivefold in the homogenates of embryos at 120 hpf, was found to be further reduced even in the absence of MPTP, and melatonin treatment prevented and partially recovered its activity. (C) Neuroinflammation, measured as the mRNA expression of *iNOS* in embryos 120 hpf, increased with MPTP, whereas melatonin recovered its basal expression. (D) Tyrosine hydroxylase-positive neurons, assessed by *TH* gene expression, were found to be reduced by MPTP, an effect prevented and also recovered by melatonin in embryos 120 hpf. (E) *snca2* mRNA expression induced by MPTP in embryos 120 hpf, was counteracted by melatonin. (F–I) Gene expression of *parkin*, *PINK1*, *DJ-1*, and even *MUL1* was blunted by MPTP treatment and fully prevented and recovered by melatonin in 120 hpf embryos. Data are presented as mean \pm S.E.M. * P < 0.05 versus Control, ** P < 0.01 versus Control, *** P < 0.001 versus control; # P < 0.05 versus MPTP, ## P < 0.01 versus MPTP, ### P < 0.001 versus MPTP; † P < 0.01 versus +aMT 5 days, †† P < 0.001 versus +aMT 5 days. One-way ANOVA with a Tukey's post hoc test (n = 5–9).

compared with controls (P < 0.001, Fig. 6A,B). Melatonin administration prevented and recovered the motor deficits induced by MPTP; it prevented already 80% of the MPTP effects on total distance and swimming speed and recovered up to 50% of the MPTP effect on total distance and almost 100% of the swimming speed. A typical swimming pattern recorded from one experiment is shown (Fig. 6C). Additionally, the motor behavior of zebrafish embryos in these experimental conditions can be seen in the movie.

Discussion

Mitochondria dysfunction is closely related to the pathogenesis of both sporadic and familial Parkinson's disease [44]; this means that these organelles should be considered a main pharmacological target in this neurodegenerative process. With the zebrafish model of Parkinson's disease here described, we clarified the main issues related to the mitochondria–Parkinson's disease relationship. Firstly, the MPTP treatment caused a profound alteration in the expression of genes related to the control of mitochondrial efficiency and mitophagy. Thus, damaged mitochondria are not removed and they maintain a condition linked to mitochondrial failure. The result is that, once MPTP was removed from the embryo water, the neurodegenerative process continues, leading to a loss of motor activity. This

is absolutely different that happens with small mammals, which normally recovers their parkinsonian condition once MPTP was removed from the treatment. Thirdly, we described here new molecular targets that explain the neuroprotective properties of melatonin. Of note, melatonin not only prevented the parkinsonian degeneration induced by MPTP in zebrafish embryos, but for the first time we showed that melatonin recovered normal embryo's phenotype once parkinsonism was developed.

The link between mitochondria dysfunction and idiopathic Parkinson's disease was first supported by the discovery of mitochondria complex I deficiency in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease [45]. We found that at 24 hpf embryos incubated with 600 μ M MPTP show a 55% reduction in the mitochondrial complex I activity 2 days later, that is, at 72 hpf. This reduction is close to that found in patients suffering from Parkinson's disease [44]. Complex I damage drives a significant bioenergetic failure and a subsequent ROS formation [44]. Mitochondrial impairment and oxidative stress are followed by the rise in the *iNOS* mRNA expression and protein content in 72 hpf embryos after MPTP incubation. These results, with the immunofluorescence analysis of *iNOS*, confirm the presence of a neuroinflammatory process in zebrafish brain, which may explain the cell death [46–48]. At 72 hpf, it was detected selective loss of

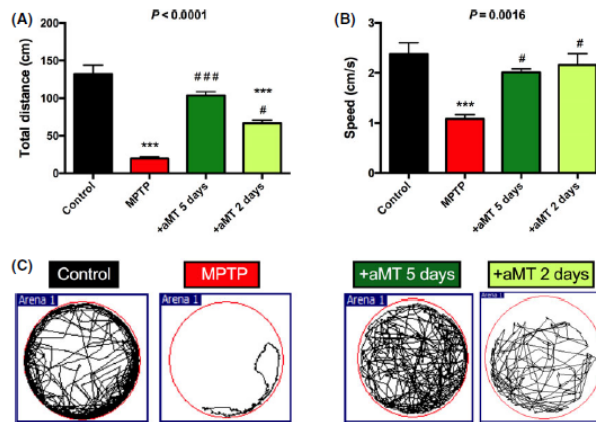


Fig. 6. Melatonin recovered motor activity impaired by MPTP. Embryos were treated with MPTP and/or melatonin (aMT) from 24 hpf to 72 hpf; then, MPTP was removed and embryos continued with melatonin alone (+aMT 5 days group). Another group of embryos was treated with MPTP alone from 24 hpf to 72 hpf; then, MPTP was removed and embryos were exposed only to melatonin (+aMT 2 days group) from 72 hpf to 120 hpf. (A) Distance travelled and (B) velocity of swimming were significantly depressed by MPTP treatment. Melatonin partially prevented and recovered the total distance travelled by embryos, and fully prevented and recovered the swimming speed. (C) Typical swimming activity recorded from an individual zebrafish embryo in each group. Data are presented as mean \pm S.E.M. *** $P < 0.001$ versus control; # $P < 0.05$ versus MPTP, ### $P < 0.001$ versus MPTP. One-way ANOVA with a Tukey's post hoc test ($n = 6-10$).

dopaminergic neurons in the diencephalon and olfactory bulb areas of zebrafish embryos incubated with MPTP [41,49,50], the areas in which we observed *iNOS* expression and reduction in *TH* expression. These data support that the neuroinflammation following the oxidative stress causes the loss of TH-positive neurons of the brain zebrafish [51].

The connection between mitochondrial dysfunction and Parkinson's disease has been reinforced by the finding that several of the genes associated with hereditary Parkinson's disease encode either mitochondrial proteins or proteins associated with mitochondria [52, 53]. Among them, the roles of γ -syn1, paralogue of human α -syn and with similar roles [10], and *parkin*, *PINK1*, and *DJ-1*, directly linked in a common biological pathway and responsible for the majority of the cases of autosomal, recessive, early-onset Parkinson's disease [22], have been analyzed in knockout or knockdown models [3, 4, 15, 54]. Here, we showed that MPTP recapitulates the clinical feature of Parkinson's disease, increasing the expression of γ -syn1, associated with the pathogenesis of sporadic and familial Parkinson's disease [6, 55]. As in humans, the accumulation of γ -syn1 in zebrafish is related to mitochondrial dysfunction, contributing to above-mentioned dopaminergic and motor alterations, and abundant *sneg1* mRNA expression is detected in the zebrafish brain from the early development [56]. MPTP caused a 20% drop in the content of PINK1 in wild-type zebrafish embryos, with no detectable levels of parkin and DJ-1. Thus, even the small drop in PINK1, which in vitro is protective against MPTP [57, 58], cannot be compensated by parkin/DJ-1 expression, and the reduction in the three proteins was accompanied by a loss of *TH* expression and dopaminergic

neurodegeneration. PINK1 serves like a sensor to detect the damaged mitochondria [59], recruiting and phosphorylating cytosolic parkin and activating parkin E3 ligase activity [13, 14]. Once activated, parkin is then recruited by the mitochondria (Fig. 7), triggering the autophagy events that culminate in with mitochondrial destruction [16]. The total absence of parkin in zebrafish embryos treated with MPTP impedes launching this protective process, blocking the autophagy removal of damaged mitochondria and maintaining the pool of dysfunctional mitochondria and, thus, the hyperoxidative status in parkinsonian embryos. This condition could be counterbalanced by DJ-1, because this protein, expressed in zebrafish dopaminergic neurons [17] and oxidatively activated, enters to the nucleus activating antioxidant gene expression [18, 19]. Under oxidative stress, DJ-1 also locates to the outer mitochondrial membrane favoring normal mitochondria environment (Fig. 7). But the absolute lack of DJ-1 in our experimental model prevents also from its beneficial effects on both cytosol and mitochondrial physiology, collaborating with the neurodegenerative process and also the increased oxidative stress present in zebrafish embryos treated with MPTP [16]. Even more, DJ-1 has been related to the regulation of *TH* gene expression [20], which also explains, at least in part, the reduction in *TH* expression here reported. Although it was reported that DJ-1 can rescue the phenotype of *PINK1*, but not of *parkin* to mice [22], the total absence of both parkin and DJ-1 makes it impossible this compensatory mechanism in our experimental model.

In these conditions, that is, low expression of *PINK1* and the absence of *parkin/DJ-1* expression, overexpression of *MUL1*, which codes MUL1, involved in the regulation

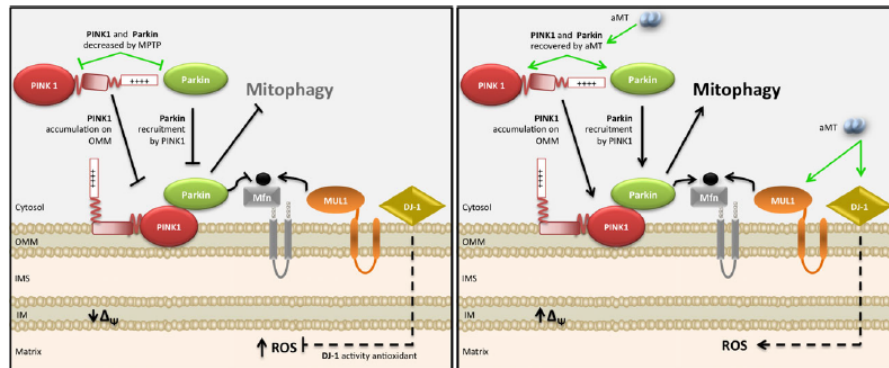


Fig. 7. Representative drawing of the relationships between the molecular pathways analyzed in the study. Treatment with MPTP induced mitochondrial dysfunction characterized by a decrease in the content of PINK1 and parkin, preventing the recruitment of PINK1 in OMM, the activation of parkin, and therefore the process of mitophagy. Decreasing parkin also causes a reduction in Mfn ubiquitination, which can only be carried out by MUL1. MPTP also reduces DJ-1, leading to increased ROS. Together, these changes led to the accumulation of damaged mitochondria. Melatonin induces the expression of *PINK1* and *parkin*, unlocking the process of mitophagy. Also, melatonin increases *MUL1* expression, which along with parkin ubiquitinates to Mfn. Finally, melatonin normalizes the expression of *DJ-1* decreasing ROS (see discussion for details).

of mitofusin [60], can counteract the lack of PINK1/parkin, restoring normal phenotype [23] (Fig. 7). In our experimental model, this compensatory mechanism, however, is absent. Thus, after MPTP exposure, the lack of parkin/DJ-1 maintains a pool of impaired mitochondria and an oxidative environment that worsens this situation, in a vicious cycle that could not be broken by PINK1 and/or MUL1, reinforcing the neurodegenerative process over time. If this hypothesis is true, once MPTP made its effect, we must see a progression or at least maintenance of the parkinsonian disorder in zebrafish embryos. To check this assumption, we analyze gene expression, mitochondrial function, and locomotor activity in zebrafish embryos at 120 hpf, that is, 48 hr after MPTP was removed from the treatment. The absence of MPTP did not prevent the evolution of the molecular alterations, but reduced the complex I activity and *PINK1* mRNA expression. These changes paralleled the reduction in motor activity of the zebrafish embryos at 120 hpf and suggest that the zebrafish model of Parkinson's disease here reported seems to become chronic.

Previous reports have analyzed the neuroprotective effects of melatonin in mouse models of Parkinson's disease [37, 38]; its mechanisms of action, however, remain elusive. So, we added melatonin to zebrafish embryos treated with MPTP to decipher the molecular targets of the indoleamine. We found a typical dose-dependent effect of melatonin on complex I activity. The accumulation of γ -syn1 interacts with mitochondria causing mitochondrial membrane depolarization, the loss of OXPHOS, and opening mitochondrial membrane permeability [61]. It was reported that melatonin reduced the expression and protein content of α -syn in the experimental models of Parkinson's disease in mice [62]; there were no data showing that the indoleamine also inhibits the expression and content of

γ 1-syn. Here, melatonin prevented the γ -syn1 induction in MPTP-treated zebrafish, contributing to maintain the mitochondrial integrity. Part of these findings may involve pgc-1 α regulation, which inhibits γ -syn1 toxicity in zebrafish peripheral sensory neurons, because melatonin promotes Sirt1/pgc-1 α signaling, improving mitochondrial function [63–66]. These effects reflect the high efficacy of melatonin to maintain the mitochondrial homeostasis elsewhere reported [30, 33, 67]. Melatonin also has outstanding antioxidative and anti-inflammatory activities, inducing the expression and the activity of antioxidant enzymes and reducing the NF- κ B-dependent innate immunity [63, 68–72]. These effects of melatonin allowed zebrafish embryos incubated with MPTP recovering the normal *iNOS* expression. Consequently, zebrafish were absolutely protected by melatonin against proinflammatory effects of MPTP. Melatonin, which recovered the *DJ-1* expression [20], also keeps safe the dopaminergic system, recovering the *TH* expression.

In addition, melatonin blunted the effect of MPTP on *parkin* and *PINK1* and enhanced the expression of *MUL1*, reinforcing its role in the full homeostatic control of mitochondria (Fig. 7). These included removing damaged mitochondria by PINK1/parkin and preventing protein aggregation and synuclein toxicity through the activity of DJ-1 as an oxidative stress-regulated chaperone [73]. Our results open a new approach via by which melatonin targets mitochondria, allowing the proper function of the autophagy/mitophagy mechanisms involved in the elimination of damaged mitochondria. From these neuroprotective effects, melatonin avoids the neuronal death in the ventral diencephalon and olfactory bulb of parkinsonian zebrafish, resulting in a prevention of the motor phenotype deficit derived from dopaminergic neuronal loss [4, 41].

At last consideration, but one of the most interesting, is that we showed for the first time that melatonin did not only prevent the deleterious effects of MPTP when giving both drugs at the same time but given once MPTP induced the molecular and phenotypic parkinsonian events, melatonin recovered the embryos from these changes. Thus, we analyzed the swimming ability of the embryos at 120 hpf, when the locomotor network of zebrafish reaches a mature beat [74]. The motor deficit caused by MPTP was fully avoided with the preventive therapy, but also melatonin recovered the phenotype during the recovery treatment. These effects of melatonin on motor performance followed the prevention and recovery, respectively, of the mitochondrial complex I activity and of the normal expression of the *snca*, *iNOS*, and *TH* genes. Moreover, melatonin also prevented and recovered the *parkin/PINK1/DJ-1/MUL1* gene expression at 120 hpf.

In summary, our results obtained with the MPTP model of zebrafish parkinsonism describe the sequence of events triggered by MPTP-dependent mitochondrial impairment, which in turn leads to neuroinflammation, the loss of dopaminergic neurons, and deficiency of mitochondrial-related gene expression. These data support the mitochondrial impairment as the primary pathophysiological event in the development of PD. The other important result of the study is the finding that melatonin may be a useful drug in the therapy for Parkinson's disease because it is not only able to prevent the damage induced by MPTP, but also able to recover it. Finally, our results point that targeting mitochondria is the main choice of the therapeutic strategy for neuroprotection in multiple diseases including Parkinson's disease [75].

Acknowledgements

This study was partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad and Fondos Feder, Spain n° RD12/0043/0005, PI08-1664; PI13-00981) and from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P07-CTS-03135, and P10-CTS-5784), Spain. The authors thank Iryna Rusanova for her technical support. MED-C is a PhD student supported by the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía, Spain; JAG was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Spain; CD current address: postdoctoral fellow at the Department of Visceral, Transplant and Thoracic Surgery, Medical University of Innsbruck, Austria; AG-L is a PhD student supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain; and LCL is supported by the 'Ramón y Cajal' National Program (Ministerio de Economía y Competitividad, Spain).

References

- HOLZSCHUH J, RYU S, ABERGER F et al. Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mech Dev* 2001; **101**:237–243.
- RINK E, WULLMANN MF. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum)

is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 2001; **889**:316–330.

- FLINN L, MORTBOYS H, VOLKMAN K et al. Complex I deficiency and dopaminergic neuronal cell loss in parkin-deficient zebrafish (*Danio rerio*). *Brain* 2009; **132**:1613–1623.
- SALLINEN V, KOLEHMAINEN J, PRIVADARSHINI M et al. Dopaminergic cell damage and vulnerability to MPTP in Pink1 knockdown zebrafish. *Neurobiol Dis* 2010; **40**:93–101.
- BRAAK H, SANDMANN-KEIL D, GAI W et al. Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry. *Neurosci Lett* 1999; **265**:67–69.
- BRAAK H, TK DEL, RUB U et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; **24**:197–211.
- SPILLANTINI MG, SCHMIDT ML, LEE VM et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; **388**:839–840.
- MILANESE C, SAGER JJ, BAI Q et al. Hypokinesia and reduced dopamine levels in zebrafish lacking beta- and gamma1-synucleins. *J Biol Chem* 2012; **287**:2971–2983.
- SUN Z, GITLER AD. Discovery and characterization of three novel synuclein genes in zebrafish. *Dev Dyn* 2008; **237**:2490–2495.
- TONI M, CIONI C. Fish synucleins: an update. *Mar Drugs* 2015; **13**:6665–6686.
- SHIMURA H, HATTORI N, KUBO S et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; **25**:302–305.
- VALENTE EM, ABOU-SLEIMAN PM, CAPUTO V et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; **304**:1158–1160.
- CLARK IE, DODSON MW, JIANG C et al. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006; **441**:1162–1166.
- KANE LA, LAZAROU M, FOGEL AI et al. PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J Cell Biol* 2014; **205**:143–153.
- KITADA T, TONG Y, GAUTIER CA et al. Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *J Neurochem* 2009; **111**:696–702.
- PICKRELL AM, YOULE RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* 2015; **85**:257–273.
- BAI Q, MULLETT SJ, GARVER JA et al. Zebrafish DJ-1 is evolutionarily conserved and expressed in dopaminergic neurons. *Brain Res* 2006; **1113**:33–44.
- ARIGA H, TAKAHASHI-NIKI K, KATO I et al. Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013; **2013**:683920.
- TAIRA T, SAITO Y, NIKI T et al. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 2004; **5**:213–218.
- ISHIKAWA S, TAIRA T, TAKAHASHI-NIKI K et al. Human DJ-1-specific transcriptional activation of tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem* 2010; **285**:39718–39731.
- ABELIOVICH A, FLINT BM. Parkinsonism genes: culprits and clues. *J Neurochem* 2006; **99**:1062–1072.
- VAN DER MERWE C, JALALI SEFID DZ, CHRISTOFFELS A et al. Evidence for a common biological pathway linking three Parkinson's disease-causing genes: parkin, PINK1 and DJ-1. *Eur J Neurosci* 2015; **41**:1113–1125.
- YUN J, PURI R, YANG H et al. MUL1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway in regulating mitofusin and compensates for loss of PINK1/parkin. *Elife* 2014; **3**:e01958.

24. ABOU-SLEIMAN PM, MUQIT MM, WOOD NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2006; **7**:207–219.
25. SCHAPIRA AH, COOPER JM, DEXTER D et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990; **54**:823–827.
26. PRZEDBORSKI S, JACKSON-LEWIS V, YOKOYAMA R et al. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**:4565–4571.
27. LIMA-CABELLO E, DIAZ-CASADO ME, GUERRERO JA et al. A review of the melatonin functions in zebrafish physiology. *J Pineal Res* 2014; **57**:1–9.
28. ACUÑA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, VENEGAS C et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 2014; **71**:2997–3025.
29. VENEGAS C, GARCIA JA, ESCAMES G et al. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res* 2012; **52**:217–227.
30. ACUÑA-CASTROVIEJO D, LOPEZ LC, ESCAMES G et al. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 2011; **11**:221–240.
31. ACUÑA-CASTROVIEJO D, MARTIN M, MACIAS M et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; **30**:65–74.
32. ACUÑA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, RODRIGUEZ MI et al. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci* 2007; **12**:947–963.
33. MARTIN M, MACIAS M, ESCAMES G et al. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000; **14**:1677–1679.
34. REITER RJ, TAN DX, PAPPOLLA MA. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementias. *Ann N Y Acad Sci* 2004; **1035**:179–196.
35. ACUÑA-CASTROVIEJO D, COTO-MONTES A, GAIA MM et al. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci* 1997; **60**:L23–L29.
36. ANTOLIN I, MAYO JC, SAINZ RM et al. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2002; **943**:163–173.
37. KHALDY H, ESCAMES G, LEON J et al. Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiol Aging* 2003; **24**:491–500.
38. TAPIAS V, ESCAMES G, LOPEZ LC 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.
39. WESTERFIELD M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* 5th edn, University of Oregon Press, Eugene, 2007.
40. MACDONALD R. Zebrafish immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 1999; **127**:77–88.
41. SALLINEN V, TORKKO V, SUNDEVIK M et al. MPTP and MPP+ target specific aminergic cell populations in larval zebrafish. *J Neurochem* 2009; **108**:719–731.
42. BARRIENTOS A. In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 2002; **26**:307–316.
43. BIRCH-MACHIN MA, BRIGGS HL, SABORIDO AA et al. An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 1994; **51**:35–42.
44. SCHAPIRA AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008; **7**:97–109.
45. SCHAPIRA AH, COOPER JM, DEXTER D et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; **1**:1269.
46. BLESJA J, TRIGO-DAMAS I, QUIROGA-VARELA A et al. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat* 2015; **9**:91.
47. FORSTERMANN U, BOISSEL JP, KLEINERT H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; **12**:773–790.
48. HWANG O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol* 2013; **22**:11–17.
49. NASKAR A, PRABHAKAR V, SINGH R et al. Melatonin enhances L-DOPA therapeutic effects, helps to reduce its dose, and protects dopaminergic neurons in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *J Pineal Res* 2015; **58**:262–274.
50. WEN L, WEI W, GU W et al. Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Dev Biol* 2008; **314**:84–92.
51. PERRY VH. Innate inflammation in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; **2**:a009373.
52. CARDOSO SM. The mitochondrial cascade hypothesis for Parkinson's disease. *Curr Pharm Des* 2011; **17**:3390–3397.
53. SAI Y, ZOU Z, PENG K et al. The Parkinson's disease-related genes act in mitochondrial homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* 2012; **36**:2034–2043.
54. ANICHTCHIK O, DIEKMANN H, FLEMING A et al. Loss of PINK1 function affects development and results in neurodegeneration in zebrafish. *J Neurosci* 2008; **28**:8199–8207.
55. CHARTIER-HARLIN MC, KACHERGUS J, ROUMIER C et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; **364**:1167–1169.
56. CHEN YC, CHENG CH, CHEN GD et al. Recapitulation of zebrafish snca expression pattern and labeling the habenular complex in transgenic zebrafish using green fluorescent protein reporter gene. *Dev Dyn* 2009; **238**:746–754.
57. HAQUE ME, THOMAS KJ, D'SOUZA C et al. Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:1716–1721.
58. PETIT A, KAWARAI T, PATTEL E et al. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem* 2005; **280**:34025–34032.
59. RUB C, SCHRODER N, VOOS W. Biochemical properties of the kinase PINK1 as sensor protein for mitochondrial damage signalling. *Biochem Soc Trans* 2015; **43**:287–291.
60. LI W, BENGTON MH, ULBRICH A et al. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS ONE* 2008; **3**:e1487.
61. BIR A, SEN O, ANAND S 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.
62. SU LY, LI H, LV L et al. Melatonin attenuates MPTP-induced neurotoxicity via preventing CDK5-mediated autophagy and SNCA/alpha-synuclein aggregation. *Autophagy* 2015; **11**:1745–1759.
63. GARCIA JA, VOLT H, VENEGAS C et al. Disruption of the NF-kappaB/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice. *FASEB J* 2015; **29**:3863–3875.

64. GUO P, PI H, XU S et al. Melatonin Improves mitochondrial function by promoting MT1/SIRT1/PGC-1 alpha-dependent mitochondrial biogenesis in cadmium-induced hepatotoxicity in vitro. *Toxicol Sci* 2014; **142**:182–195.
65. O'DONNELL KC, LULLA A, STAHL MC et al. Axon degeneration and PGC-1alpha-mediated protection in a zebrafish model of alpha-synuclein toxicity. *Dis Model Mech* 2014; **7**:571–582.
66. VOLT H, GARCIA JA, DOERRIER C et al. Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res* 2016; **60**:193–205.
67. LOPEZ A, GARCIA JA, ESCAMES G et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 2009; **46**:188–198.
68. CRESPO E, MACIAS M, POZO D 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.
69. ESCAMES G, LEON J, MACIAS M et al. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 2003; **17**:932–934.
70. ZHANG HM, ZHANG Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional prooxidant actions. *J Pineal Res* 2014; **57**:131–146.
71. OZTURK G, AKBULUT KG, GUNAY S et al. Age-related changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: modulation by melatonin. *Exp Gerontol* 2012; **47**:706–711.
72. MANCHESTER LC, COTO-MONTES A, BOGA JA et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res* 2015; **59**:403–419.
73. BUELER H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2009; **218**:235–246.
74. BRUSTEIN E, SAINT-AMANT L, BUSS RR et al. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J Physiol Paris* 2003; **97**:77–86.
75. MILANE L, TRIVEDI M, SINGH A et al. Mitochondrial biology, targets, and drug delivery. *J Control Release* 2015; **207**:40–58.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Movie S1. Recording of the motor activity of zebrafish embryos in the presence of MPTP and/or melatonin, showing the effect of melatonin to prevent the development of the parkinsonian phenotype and to recover from this phenotype once it was established.

